



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Naujų zondų sintezė ir jų pritaikymas
merkptoaminorūgštims atpažinti**

Baigiamasis magistro projektas

Šarūnė Daškevičiūtė

Projekto autorė

Prof. dr. Vytautas Getautis

Vadovas

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Naujų zondų sintezė ir jų pritaikymas merkaptoaminorūgštims atpažinti

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Šarūnė Daškevičiūtė

Projekto autorė

Prof. dr. Vytautas Getautis

Vadovas

Doc. Ilona Jonuškienė

Recenzentė

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Šarūnė Daškevičiūtė

Naujų zondų sintezė ir jų pritaikymas merkptoaminorūgštims atpažinti

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Šarūnės Daškevičiūtės, baigiamasis projektas tema „Naujų zondų sintezė ir jų pritaikymas merkptoaminorūgštims atpažinti“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

Šarūnė Daškevičiūtė

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Daškevičiūtė, Šarūnė. Naujų zondų sintezė ir jų pritaikymas merkaptaminorūgštims atpažinti. Magistro baigiamasis projektas / vadovas prof. dr. Vytautas Getautis; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): Biotechnologijos, Technologijos mokslai.

Reikšminiai žodžiai: merkaptaminorūgštys, biotioliai, cisteinas, homocisteinas, glutationas, zondai, fluorescenciniai zondai, fluorescencija.

Kaunas, 2020. 52 p.

Santrauka

Gamtoje randama apie tris šimtus skirtingų aminorūgščių ir jų darinių. Įvairaus sudėtingumo biologiniuose objektuose ir jų sistemose yra labai svarbios merkaptaminorūgštys, kurios susijusios su reikšmingomis fiziologinėmis veiklomis žmogaus organizme. Esminius vaidmenis čia atlieka trys panašios struktūros biotioliai – cisteinas, homocisteinas ir glutationas. Nustatyta, kad jų koncentracijų pakitimai ląstelėse yra susiję su daugeliu sunkių ligų, todėl labai svarbu selektyviai identifikuoti merkaptobiotiolius ir jų koncentracijas organizme. Tam tikslui plačiai taikomas Michaelio fluorescencinis metodas, kai maleimido fragmentas naudojamas kaip biotolių receptorių. Šio projekto tikslas susintetinti maleimido fragmentą turinčius dažiklius (zondus), kurie reaguodami su merkaptaminorūgštimis selektyviai jas identifikuotų.

Projekte susintetinti cianininiai dažikliai (zondai) su skirtingu dvigubųjų jungčių skaičiumi konjuguotoje grandinėje, jungiančioje elektron donorinę ir elektron akceptorinę dažiklio dalis. Iš jų buvo sukurti visų trijų biotolių – cisteino, homocisteino ir glutationo – fluorescuojantys zondai. Atlikus fluorescencijos tyrimus iš emisijos maksimumo poslinkių buvo nustatyta, kad dvi dvigubąsias jungtis chromofore turintis zondas **Z2** merkaptaminorūgštis selektyviai identifikuoja 1,4-dioksane ir tetrahidrofurane. Iš žymeklio susidaręs cisteino fluorescuojantis zondas **Z2-Cys** dimetilsulfoksido parodė didžiausią fluorescencijos intensyvumą, kuris lyginant su pradiniu cianininiu dažikliu išaugo net 9 kartus, o kvantinė išeiga siekė 7,5 %. Buvo nustatyta, kad konjuguotos dvigubosios grandinės ilginimas zondų emisijos maksimumus paslenka batochromiškai. Tris dvigubąsias jungtis chromofore turintis zondas **Z3** fluorescencijos maksimumą paslinko į 815 nm elektromagnetinės spinduliuotės sritį, kuri yra ypač patraukli merkaptaminorūgštims identifikuoti. Tai puikus rezultatas siekiant identifikuoti tiolius, nes dabartinėje mokslinėje literatūroje nėra pateikta duomenų apie zondus, kurių emisijos maksimumai būtų toliau nei 800 nm elektromagnetinės spinduliuotės srityje. Zondas **Z3** merkaptobiotiolius selektyviai identifikuoja dimetilsulfoksido. Iš šio žymeklio susidaręs cisteino fluorescuojantis zondas **Z3-Cys** parodė dar geresnius fluorescencijos intensyvumo rezultatus – ji išaugo net 12 kartų, o kvantinė išeiga siekė 9,7 %.

Akivaizdu, jog susintetinti zondai **Z2** ir **Z3** sėkmingai gali būti naudojami merkaptaminorūgštims identifikuoti biologiniuose mėginiuose.

Daškevičiūtė, Šarūnė. Synthesis of New Probes and Their Application for Detection of Mercapto Amino Acids. Master's Final Degree Project / supervisor prof. dr. Vytautas Getautis; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): Biotechnology, Technological Sciences.

Keywords: mercapto amino acids, biothiols, cysteine, homocysteine, glutathione, probes, fluorescence probes, fluorescence.

Kaunas, 2020. 52 pages.

Summary

About three hundred different amino acids and their derivatives are found in nature. Mercapto amino acids, which are related to significant physiological activities in the human organism, are very important in biological objects and their systems of various complexity. There are three mercapto biomolecules of the similar structure – cysteine, homocysteine and glutathione – that play crucial roles. It has been established that their alternations in concentration levels in cells have been linked to a number of diseases. Therefore, detection of these mercapto biomolecules in biological samples is of crucial importance. For that purpose, a fluorescent Michael addition method employing a fragment of the maleimide as biothiols receptor is widely used. The main goal of this project was to synthesize dyes (probes) with a maleimide fragment, which could react selectively with mercapto amino acids and identify them.

Cyanine dyes (probes) with different number of double bonds in the conjugated chain connecting the electron donor and electron acceptor parts of dyes have been synthesized in this project. They were used as precursors in the synthesis of fluorescent probes for detection of all three biothiols – cysteine, homocysteine and glutathione.

In the fluorescence spectra of the novel probes, the shifts in emission maximum have revealed that the probe with two double bonds in chromophore **Z2** identifies selectively mercapto amino acids in 1,4-dioxane and tetrahydrofuran. Fluorescent cysteine probe **Z2-Cys** prepared from this marker showed the highest fluorescence intensity, which was 9 times higher than that of the initial cyanine dye and quantum yield was 7.5 % in dimethyl sulfoxide. It has been established that the extension of the conjugated chain of double bonds shifts the emission maximum bathochromically. The fluorescence maximum for the probe with three double bonds in chromophore **Z3** was shifted to a region of electromagnetic radiation 815 nm, which is a particularly attractive for identification of mercapto amino acids. This is an excellent result for the identification of thiols, since no data is provided for probes, which emission maximum would be further than 800 nm in the region of electromagnetic radiation, in the scientific literature. The probe **Z3** identifies selectively mercapto amino acids in dimethyl sulfoxide. Fluorescent cysteine probe **Z3-Cys** prepared from this marker showed even better fluorescence intensity results, which were even 12 times higher than that of the initial cyanine dye and quantum yield was 9.7 %.

As a conclusion, the synthesized probes **Z2** and **Z3** can be used successfully for the identification of mercapto amino acids in biological samples.

Turinys

Santrumpų ir terminų sąrašas	6
Įvadas.....	7
1. Literatūros apžvalga	8
1.1. Aminorūgščių svarba žmogaus organizmui	8
1.2. Aminorūgščių klasifikacija žmogaus fiziologiniu požiūriu	9
1.3. Merkoptoaminorūgštys	9
1.3.1. Homocisteinas	10
1.3.1.1. Homocisteino apykaitos procesai žmogaus organizme	10
1.3.1.2. Hiperhomocisteinemija ir jos pasekmės	10
1.3.2. Cisteinas	11
1.3.2.1. Cisteino svarba ir apykaitos procesai žmogaus organizme	11
1.3.2.2. Cisteino deficito žmogaus organizme pasekmės	11
1.3.3. Glutationas.....	11
1.3.3.1. Glutationo svarba ir apykaitos procesai žmogaus organizme	11
1.3.3.2. Glutationo deficito žmogaus organizme pasekmės	12
1.4. Biotolių identifikavimo metodai	13
1.4.1. Michaelio fluorescencinis metodas	13
1.4.2. Biotolių identifikavimo tio-Michaelio reakcijomis istorija.....	14
1.5. Literatūros apžvalgos apibendrinimas	18
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	19
2.1. Aparatūra	19
2.2. Medžiagos.....	20
2.3. Eksperimentų aprašymas	20
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	29
3.1. Cianininio dažiklio sintezė	29
3.2. Cianininių dažiklių sąveika su merkoptoaminorūgštimis.....	32
3.3. Optinių savybių tyrimai	35
3.3.1. Cianininių dažiklių ir fluorescuojančių zondu sugerties tyrimai.....	36
3.3.2. Cianininių dažiklių ir fluorescuojančių zondu fluorescencijos tyrimai.....	38
4. Rekomendacijų dalis	44
Išvados	47
Literatūros sąrašas	48
Padėka	52

Santrumpų ir terminų sąrašas

^{13}C BMR – anglies ^{13}C izotopo branduolių magnetinis rezonansas;

^1H BMR – vandenilio ^1H branduolių magnetinis rezonansas;

Ar – argonas;

Cys – cisteinas;

d – dubletas;

DCM – dichlormetanas;

DMSO – dimetilsulfoksidas;

FL – fluorescencija;

GSH – glutationas;

Hcy – homocisteinas;

HCl – druskos rūgštis;

HEPES – 4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etansulfonrūgštis;

m – multipletas;

m.d. – milijoninės dalys;

NaH – natrio hidridas;

s – singletas;

t – tripletas;

TEA – trietilaminas;

THF – tetrahidrofuranas;

$T_{\text{kamb.}}$ – kambario temperatūra;

$T_{\text{vir.}}$ – virimo temperatūra;

UV – ultravioletinis.

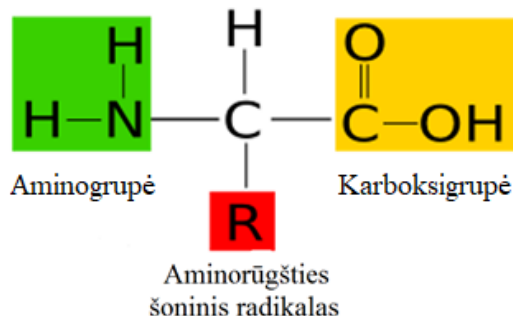
1. Literatūros apžvalga

Skyriuje apžvelgiama informacija:

- aminorūgščių svarba žmogaus organizmui;
- aminorūgščių klasifikacija žmogaus fiziologiniu požiūriu – pakeičiamosios ir nepakeičiamosios aminorūgštys;
- svarbiausios merkaptaminorūgštys;
- homocisteino apykaitos procesai žmogaus organizme ir ligos, išsivystančios dėl jo koncentracijos padidėjimo;
- cisteino apykaitos procesai žmogaus organizme ir ligos, išsivystančios dėl jo deficito;
- glutationo apykaitos procesai žmogaus organizme ir ligos, išsivystančios dėl jo deficito;
- dažniausiai naudojami metodai biotioliams identifikuoti;
- fluorescenciniai identifikavimo metodai ir jų privalumai;
- Michaelio fluorescencinio metodo reakcijos kinetika ir biotolių identifikavimo galimybės naudojant tio-Michaelio prijungimo reakciją;
- biotolių identifikavimo tio-Michaelio reakcijomis istorija – iki šių dienų naudoti zondai tioliams atpažinti ir jų pritaikymo galimybės.

1.1. Aminorūgščių svarba žmogaus organizmui

Aminorūgštims chemijoje vadinamos organinės karboksirūgštys, kurios turi nors vieną aminogrupę (-NH₂) ir karboksigrupę (-COOH). Pagal šių grupių tarpusavio padėtį struktūroje jos skirstomos į α , β ir γ rūgštis. Biocheminiu požiūriu svarbiausios yra α -aminorūgštys (žr. 1.1 pav.). Visos jos, išskyrus gliciną, turi du enantiomerus – *L*-aminorūgštį ir *D*-aminorūgštį [1].



1.1 pav. Bendra α -aminorūgšties struktūra

Gamtoje randama apie tris šimtus skirtingų aminorūgščių ir jų darinių. Žmogaus organizme yra apie šešiasdešimt. Dvidešimt jų yra svarbiausios – tai mūsų organizmo statybinė medžiaga, sudaranti baltymus ir peptidus. Iš baltymų sudaryti visi fermentai, dauguma hormonų, didžioji dalis žmogaus imuninės sistemos, raumenys bei kiti kūno audiniai, todėl akivaizdu, jog jie priklauso svarbiausioms cheminėms struktūroms žemėje [2].

Baltymo molekulėje aminorūgštys jungiasi kovalentiniu ryšiu, kuris vadinamas peptidiniu. Jis susidaro tarp vienos aminorūgšties karboksigrupės ir kitos rūgšties aminogrupės, atskylant vandens molekulei. Aminorūgštims susijungus į grandinę, ši susisuka įvairiausiomis spiralėmis. Baltymų biologiniam aktyvumui labai svarbi dideliu cheminiu reaktyvumu pasižyminti cisteino merkaptogrupė. Pastaroji labai lengvai oksiduoja ir gali sudaryti disulfidinius tiltelius tarp atskirų polipeptidinių grandinių ar vienos grandinės viduje [3].

Kai kurios aminorūgštys neįeina į baltymų sudėtį. Laisvos jos randamos ląstelėse arba kitų nebaltyminių medžiagų sudėtyje.

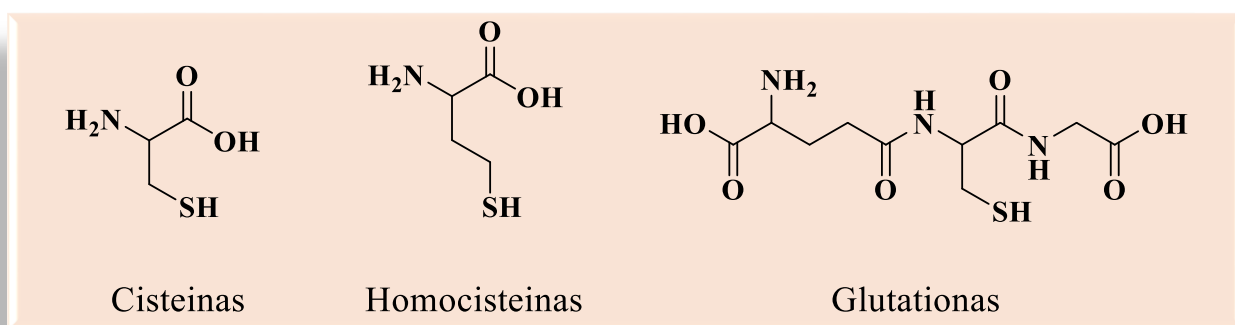
1.2. Aminorūgščių klasifikacija žmogaus fiziologiniu požiūriu

Normaliam mūsų organizmo funkcionavimui yra būtinos dvidešimt aminorūgščių. Dvylika jų žmogaus organizmas gali pasigaminti pats, o kitas aštuonias turi gauti su maistu. Jei nors vienos iš dvidešimties trūksta, sutrinka medžiagų apykaita, organizmas nustoja augti bei vyksta patologiniai procesai. Pagal biologinę klasifikaciją jos skirstomos į dvi grupes.

1. Nepakeičiamosios aminorūgštys. Šios rūgštys turi būti gaunamos su maistu, nes organizme jos nesintetinos arba sintetinos nepakankami jų kiekiai. Visiškai nepakeičiamos aminorūgštys – valinas, leucinas, izoleucinas, treoninas, lizinas, triptofanas, fenilalaninas ir metioninas. Pastarasis reikalingas pakeičiamos aminorūgšties cisteino sintezei, o taip pat ir homocisteino gamybai, kuris prisideda prie širdies ir kraujagyslių sistemos funkcijų palaikymo. Argininas ir histidinas yra nepakeičiamos aminorūgštys tik intensyvios baltymų biosintezės laikotarpiu, organizmui augant ar sveikstant po ligų.
2. Pakeičiamosios aminorūgštys. Žmogaus organizmas negaudamas pastarųjų su maistu kurį laiką sugeba jų susintetinti iš nepakeičiamų aminorūgščių arba kitų medžiagų. Tai alaninas, asparaginas, asparto rūgštis, glicinas, glutaminas, glutamo rūgštis, prolinas, serinas, tirozinas ir cisteinas [4]. Šis toliau reikalingas natūralaus antioksidanto glutathiono gamybai, kuris padeda pašalinti toksinus.

1.3. Merkoptoaminorūgštys

Įvairaus sudėtingumo biologiniuose objektuose ir jų sistemose yra labai svarbūs biotioliai, kurie susiję su reikšmingomis fiziologinėmis veiklomis žmogaus organizme. Esminius vaidmenis čia atlieka trys panašios struktūros merkaptobiomolekulės (žr. 1.2 pav.).



1.2 pav. Merkoptoaminorūgščių struktūrinės formulės

Nustatyta, kad biotolių kiekio disbalansas ląstelėje yra susijęs su daugeliu sunkių ligų. Buvo iširta, jog padidėjusi merkaptobiomolekulių koncentracija gali sąlygoti širdies, kraujagyslių bei Alzheimerio ligas. Tuo tarpu jų trūkumas inicijuoja odos bei plaukų pažeidimus ir silpnumą, virškinimo sistemos apsaugos sutrikimą, plaučių ir virusines ligas [5, 6].

1.3.1. Homocisteinas

1.3.1.1. Homocisteino apykaitos procesai žmogaus organizme

Homocisteinas – sieros turinti aminorūgštis. Tai tarpinis aminorūgščių metionino ir cisteino apykaitos produktas. Šis biotolis per metabolinius procesus susidaro iš metionino, kuris yra vienintelis jo šaltinis organizme. Hcy susidaro vykstant metionino demetilinimui. Dalyvaujant adenziltransferazei ir adenzino trifosfatui metioninas yra paverčiamas į S-adenozilmetioniną. Toliau vykstančios metilinimo reakcijos produktas yra S-adenozilhomocisteinas, kuris hidrolizuojamas į homocisteiną (grįžtama reakcija).

Mokslinėje literatūroje [7] teigiama, kad homocisteino metabolizmas vyksta dviem būdais ir jam reikalingi B grupės vitaminai B₁₂, B₆ bei folio rūgštis. Jei yra jų trūkumas, biotolis lieka nepakitęs ir kaupiasi organizme.

1. Remetilinimo būdas – pernešus metilo grupę gali vėl susidaryti metioninas. Remetilinimo reakciją katalizuoja metioninsintazė, o metilo grupės donoras yra 5-metiltetrahidrofolatas. Pastarasis yra metabolinis folio rūgšties produktas. Esant šio vitamino stygiui, trūksta metilo grupių metioninui susidaryti ir tai sąlygoja ūminį homocisteino koncentracijos padidėjimą.
2. Pernešus sieros atomą per metabolinius procesus iš jo susidaro cisteinas. Šią reakciją katalizuoja cistationino β-sintazė, priklausoma nuo kofaktoriaus vitamino B₆ [8].

1.3.1.2. Hiperhomocisteinemija ir jos pasekmės

Nors homocisteinas yra svarbus organizmo metaboliniuose procesuose, jo perteklius, sutrikus reguliavimo mechanizmams, gali sukelti įvairias patologines būsenas. Nustatyta, kad normali šio biotolio koncentracija žmogaus kraujo serume yra 5–10 μmol/l [9]. Tačiau žmonėms, turintiems autosominį recesyvinį sutrikimą, kuriam būdingas Hcy koncentracijos kraujo serume padidėjimas, gali išsivystyti hiperhomocisteinemija. Ji pasireiškia, kai fermentai, dalyvaujantys homocisteino metabolizme, pasižymi genetiniais defektais arba yra didelis jų trūkumas [10]. Šio merkaptobiotolio kiekio padidėjimas nuo 15 iki 30 μmol/l yra vidutinis, 30–100 μmol/l – tarpinis ir daugiau kaip 100 μmol/l labai rizikingas [11]. Hiperhomocisteinemija – tai rizikos faktorius, rodantis, jog gali išsivystyti daugelis sunkių ligų ir sutrikimų.

1. Širdies ir kraujagyslių ligos [12]. Padidinta Hcy koncentracija kraujo serume turi neigiamą poveikį kraujagyslių endoteliui ir kraujo krešėjimo sistemai. Tai sąlygoja aterosklerotinius pakitimus kraujagyslėse ir trombų formavimąsi. Esant endotelio morfologiniam pažeidimui, homocisteinas aktyvina trombocitų adheziją ir agregaciją [13], todėl greitėja tromboniniai procesai smegenų ir periferinėse arterijose. Nustatyta, kad pacientams, kuriems homocisteino kiekis kraujo plazmoje padidėjęs, yra apie tris kartus didesnė tikimybė susirgti miokardo infarktu ar insultu palyginti su tais, kurių Hcy koncentracija yra normali [11].
2. Alzheimerio liga. Didelė homocisteino koncentracija gali sukelti nervinių ląstelių žūtį smegenų žievėje. Pripažinta, kad žmonėms, turintiems širdies ir kraujagyslių problemų, yra didesnė rizika susirgti Alzheimeriu [14].
3. Nepalanki nėštumo baigtis. Spontaniškas ankstyvus ir savaiminis abortas, traukulių priepoliai, vaisiaus defektai – visa tai pasireiškia dėl padidintos homocisteino koncentracijos nėštumo metu.

1.3.2. Cisteinas

1.3.2.1. Cisteino svarba ir apykaitos procesai žmogaus organizme

Cisteinas – viena iš dvidešimties pagrindinių sieros turinti aminorūgštis. Be esminio vaidmens baltymų sintezėje šis merkaptobiotolis vaidina gyvybiškai svarbų vaidmenį atliekant redokso homeostazę, nes būtent jis yra pagrindinio antioksidanto glutationo pagrindas. Taip pat jis sunaudojamas ir kitais metabolizmo būdais – sieros turinčių aminorūgščių taurino bei lantionino ir kofermento A gamybai, o taip pat ir vandenilio sulfido generavimui.

Organizme cisteinas susidaro iš metionino per tarpinį produktą homocisteiną. Pastarąjį sujungus su serinu, dalyvaujant fermentui cistationino β -sintazei ir vitaminui B₆, susidaro tarpinis produktas cistationinas. Galutiniame metabolizmo etape fermentas cistationino γ -liazė ir vitaminas B₆ paverčia cistationiną į cisteiną ir α -ketobutiratą. Labai svarbu tai, kad cistationino γ -liazė yra vienintelis žmogaus organizme esantis cisteino biosintezės fermentas, todėl jo trūkumas nulemia biotolio deficitą. Cys susidaro iš serino angliavandenilinio skeleto, o sieros atomas yra kilęs iš metionino [15].

1.3.2.2. Cisteino deficito žmogaus organizme pasekmės

Normali merkaptaminorūgšties cisteino koncentracija žmogaus kraujo serume yra 30–200 $\mu\text{mol/l}$ [15]. Mokslinėse literatūrose nurodoma, kad esant šio biotolio trūkumui organizme, gali pasireikšti daugybė sutrikimų.

1. Odos pažeidimai ir silpnumas. Odos viršutiniame sluoksnyje epidermyje yra netirpus fibrilinis baltymas keratinas. Būtent jis ir suteikia odai tvirtumą. Nemažą keratino sudėties dalį (10–14 %) sudaro cisteinas. Šis keratino baltymo komponentas leidžia formuoti disulfidinius ryšius, nuo kurių priklauso keratino vientisumas ir tvirtumas. Susiformavusi struktūra yra spiralės formos ir labai stabili, nes sieros atomai yra arti vienas kito. Taigi, pasireiškiant Cys tiolio trūkumui, fibrilinio baltymo struktūra pradeda irti ir gali pasireikšti įvairūs odos pažeidimai [16].
2. Plaukų depigmentacijos ir jų slinkimas. Natūralios mūsų plauko struktūros didžioji dalis taip pat yra keratinas. Jo trūkumas pastebimai keičia plaukų gyvybines funkcijas – prarandamas elastingumas, žvilgesys, atsiranda išsausėjimas. Jei cisteino deficitas nepašalinamas naudojant farmacinius papildus, dėl keratino trūkumo pasireiškia dar didesni sveikatos sutrikimai – prasideda plaukų slinkimo etapas, kuris vadinamas difuzine alopecija [17].
3. Virškinimo sistemos apsaugos susilpnėjimas. Didelis alkoholio vartojimas yra rizikos faktorius, kuris gali lemti vėžio išsivystimą virškinimo trakte. Etanolis (alkoholis) organizme yra paverčiamas į kancerogeninę cheminę medžiagą – acetaldehidą. Cisteinas mažina šio junginio koncentraciją seilėse, todėl sumažėja acetaldehido poveikis virškinimo traktui ir atitinkamai vėžio rizikai. Tačiau, pasireiškiant šio biotolio trūkumui organizme, išlieka didelis sunkios ligos rizikos faktorius [18].

1.3.3. Glutationas

1.3.3.1. Glutationo svarba ir apykaitos procesai žmogaus organizme

Glutationas – sieros turinti aminorūgštis. Jis žmogaus organizme atlieka daugybę svarbių funkcijų. Pirmiausia, tai vienas svarbiausių ląstelėse sintetinamų ir jas nuo pažeidimų bei laisvųjų radikalų poveikio saugantis antioksidantas. Taip pat jis pasižymi unikalia savybe – gali maksimaliai padidinti ir kitų antioksidantų efektyvumą, pvz., vitaminų C, E, lipinės rūgšties ir kt. Kita svarbi funkcija –

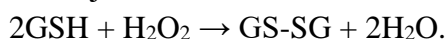
ksenobiotikų detoksikavimas. Tai farmakologiškai arba toksikologiškai aktyvios medžiagos, kurios paprastai nėra gaminamos ar randamos žmogaus organizme, pvz., narkotikai. Be visa ko, GSH taip pat vaidina gyvybiškai svarbų vaidmenį redokso ciklo pusiausvyros palaikyme tarp laisvų biotiolio formų ir disulfidų.

Organizme glutationas sintetinamas iš pagrindinių aminorūgščių *L*-cisteino, *L*-glutamo rūgšties ir glicino. Šio tripeptido sintezė vyksta dviem etapais. Pirmajame sintezės etape *L*-glutamo rūgštis ir cisteinas, dalyvaujant fermentui γ -glutamilcisteino sintetazei, yra paverčiami į tarpinį produktą γ -glutamilcisteiną. Vėlesniame etape fermentu glutationo sintetaze prie jo yra prijungiamas glicinas ir gaunamas glutationas. Būtent cisteino merkaptogrupė yra atsakinga už GSH biologinį aktyvumą [19].

Šis tripeptidas organizme gali būti nustatomas tiek redukuota (GSH), tiek oksiduota (GS-GS) formomis. Įprasta, kad žmonių audiniuose daugiau nei 90 % glutationo turi būti redukuotos formos, o tik likusi procentinė dalis gali būti oksiduota forma. Redukcinės savybės priklauso nuo -SH grupės, kuri yra redukuotų ekvivalentų (H^+) donoras.

1.3.3.2. Glutaciono deficito žmogaus organizme pasekmės

Normali merkaptoaminorūgšties GSH koncentracija žmogaus kraujo serume yra 1–10 mmol/l [20]. Glutacionas yra priskiriamas antioksidantams. Tai – junginių grupė, atiduodanti elektronus ir taip neutralizuojanti laisvuosius radikalus. Pastarieji gali būti endogeniniai – natūraliai susidarantys mūsų organizme dėl ląstelių metabolizmo, streso ar pervargimo, arba egzogeniniai – susidarantys dėl odą veikiančių išorinių veiksnių, tokių kaip UV, rūkymo, teršalų. Laisvieji radikalai neturi elektrono todėl stengiasi jį paveržti iš artimiausios molekulės. Jei jie elektronus prisijungia iš svarbių mūsų organizmo komponentų, pvz., DNR, baltymų ar riebalų, jie pažeidžia jų ląsteles ir sukelia sveikatos problemų. Dalyvaujant fermentui glutaciono peroksidazei yra neutralizuojami visi organizme esantys laisvieji radikalai ir biotiolis iš redukuotos formos pereina į oksiduotą:



Sugaudyti laisvieji radikalai tampa tirpūs ir iš žmogaus organizmo gali pasišalinti su šlapimu. Kitame etape fermentas glutaciono reduktazė grąžina GSH į savo pradinę redukuotą formą:



Taigi, glutacionas pasižymi labai stipriomis antioksidacinėmis savybėmis, todėl palaikyti normalią jo koncentraciją žmogaus organizme yra labai svarbu. Esant biotiolio deficitui, gali įvykti oksidacinis stresas – ryškus biocheminės pusiausvyros sutrikimas, sukeliantis sunkias ligas [21].

1. Plaučių ligos. Rūkymas ir ore esančių teršalų įkvėpimas yra pagrindinis faktorius, lemiantis plaučių pažeidimus, kurie susiję su lėtinės obstrukcinės plaučių ligos patogenezė. Cigarečių dūmai susideda iš didelės koncentracijos laisvųjų radikalų – superoksido anijonų ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ir azoto monoksido (NO). Pastarieji greitai reaguoja tarpusavyje, sudarydami labai reaktyvią ir toksišką peroksinitrito (ONOO) molekulę, kuri turi būti neutralizuojama antioksidantų. Mokslinėje literatūroje [22] teigiama, kad cigarečių dūmai negrįžtamai keičia glutaciono koncentracijos lygį plaučių gleivinės skysčiuose. Taigi, sumažėjęs antioksidanto kiekis gali būti labai rizikingas susirgti sunkiomis plaučių ligomis.
2. Virusinės ligos. Mokslinėje literatūroje [23] nurodoma, kad glutaciono koncentracijos sumažėjimas yra susijęs su įvairiais žmogaus imunodeficito viruso (ŽIV) infekcijos aspektais bei kitomis virusinėmis ligomis. Į žmogaus organizmą patekę azoto ir deguonies laisvieji radikalai

nėra neutralizuojami, todėl pasireiškia įvairios infekcijos. Taip pat teigiama, kad merkaptoaminorūgštis GSH gali būti naudojama kaip terapinis agentas gydant šiuos sutrikimus. Buvo atlikti moksliniai tyrimai, kurių rezultatai parodė, kad glutationas slopina gripo viruso replikaciją. Atsižvelgiant į tai, yra labai svarbu, kad biotolio koncentracija žmogaus organizme būtų optimali.

1.4. Biotolių identifikavimo metodai

Apžvelgus biologinėse sistemose esančių tiolių koncentracijų pokyčių ryšį su daugybe pavojingų žmogaus sveikatai ligų, svarbu, kad homocisteino, cisteino ir glutationo koncentracijos būtų optimalios. Greitas ir selektyvus šių merkaptoaminorūgščių deficito ar jų koncentracijos padidėjimo fiziologinėse terpėse identifikavimas leistų užkirsti kelią ankstyvų komplikacijų atsiradimui. Todėl labai svarbu sukurti veiksmingus metodus, leidžiančius lengvai ir jautriai nustatyti šiuos mažus tiolius biologiniuose mėginiuose.

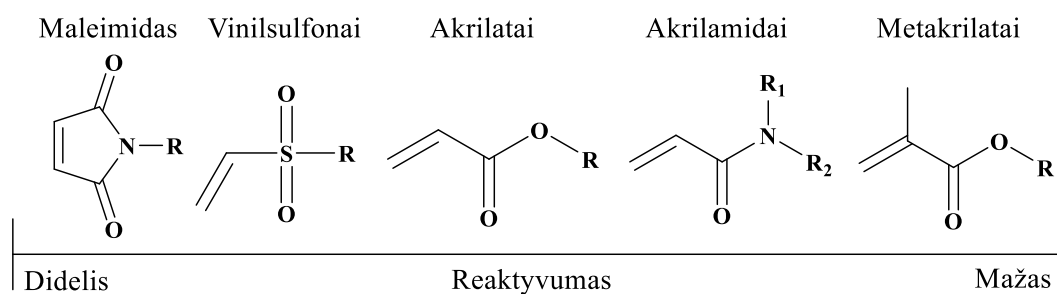
Per pastaruosius metus plačiai naudojami įvairūs analizės metodai – didelio efektyvumo skysčių chromatografija, masių spektrometrija, kapiliarinė elektroforezė ir kiti [24, 25, 26]. Tačiau daugeliui šių metodų reikalinga brangi įranga, o prieš analizės atlikimą ir sudėtingos manipuliacijos. Todėl rasti ir kiekybiškai iširti tiolius biologiniuose mėginiuose gali būti taikomi paprastesni ir mažiau sąnaudų reikalaujantys fluorescenciniai metodai. Jie pasižymi specifiniu selektyvumu ir jautrumu merkaptobiomolekulėms bei didele skiriamąja geba [27].

Pirmieji moksliniai pranešimai apie mažų molekulių fluorescenciją (FL) pasirodė dar XIX a., o per pastaruosius kelis dešimtmečius pastebimai išaugo įvairių fluorescencinių zondų naudojimas biologinių mėginių stebėsenai. Pastarųjų susidarymas yra pagrįstas dviem pagrindiniais reakcijų mechanizmais – nukleofilinės [28] arba skilimo [29], kurios toliau skirstomos į ciklizaciją su aldehidu, reakcijomis su metalų kompleksais ar nanomedžiagomis, sulfonamidų ir sulfanatų esterių skilimu, disulfidų mainais, 2,4-dinitrobenzensulfonilo grupės suskaidymu ir kt. Nors fluorescencinių zondų sintezės mechanizmų yra daug, tačiau labiausiai išpopuliarėjęs būdas – Michaelio prijungimo reakcija (angl. *Michael addition*).

1.4.1. Michaelio fluorescencinis metodas

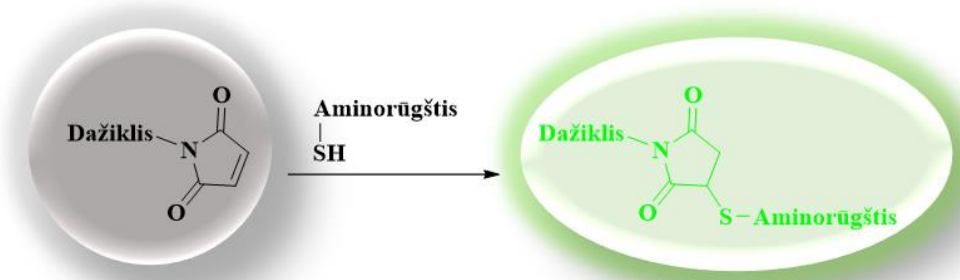
Šį fluorescencinį metodą atrado amerikiečių chemikas A. Michaelis 1880-ųjų metų pabaigoje. Selektyvus tiolio ir akceptorius reagavimas vandeningoje aplinkoje, greita reakcijos kinetika ir stabilus produktas – visa tai rodo, kad metodas gali būti plačiai taikomas merkaptoaminorūgščių nustatymui biologinėse sistemose.

Michaelio fluorescencinis metodas pagrįstas nukleofiliniu reakcijos mechanizmu. Dažniausiai naudojami akceptoriai yra maleimidas, vinilsulfonai, akrilatai, akrilamidai ir metakrilatai. Įrodyta, jog reaktyviausias iš jų yra maleimidas dėl C=C jungties kampo iškraipymo ir žiedinio įtempio bei karbonilo grupės (žr. 1.3 pav.) [30].



1.3 pav. Michaelio reakcijų akceptorių reaktyvumo eilė

Šis metodas apima anglies, okso-, azo- ir tio-Michaelio reakcijas. Dėl silpnos vandenilio ir sieros ryšio sąveikos, gali būti inicijuojama tio-Michaelio reakcija, kuri yra labai selektyvi ir paprasta tioliams – vyksta esant lengvoms reakcijos sąlygoms, dalyvaujant silpnais katalizatoriais. Akceptorius maleimido dviguboji jungtis selektyviai reaguoja ir prisijungia aminorūgšties merkaptogrūpę (žr. 1.1 schema). Susidaro fluorescuojantis zondas, kurio švytėjimo ryškumas priklauso nuo tiolių koncentracijos [31]. Labai svarbu tai, kad pradinis junginys, turintis akceptorių, prieš reaguojant su biotoliu beveik nepasižymi fluorescencija.



1.1 schema. Tio-Michaelio prijungimo reakcija

Mokslinėje literatūroje [30] nustatyta, kad tio-Michaelio prijungimo reakcijos kinetika ir išeiga priklauso nuo tiolio koncentracijos ir sterinio prieinamumo, elektronus traukiančios grupės pobūdžio bei tirpiklio poliškumo. Ypač poliškuose tirpikliuose, tokiuose kaip dimetilsulfoksidas ar dimetilformamidas, reakcijai vykti nereikalingi net silpni katalizatoriai. Šio metodo didelis pranašumas – nesusidaro šalutinių produktų, kaip, pvz., radikaliniai junginiai.

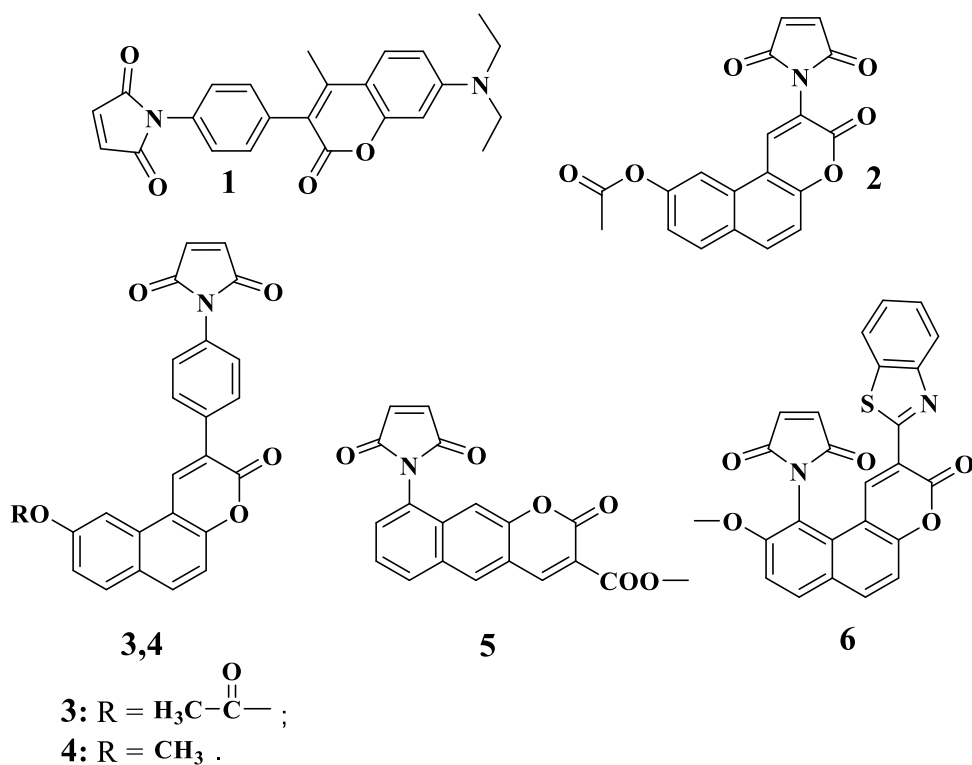
1.4.2. Biotolių identifikavimo tio-Michaelio reakcijomis istorija

Norint sukurti zondus, kurie selektyviai atskirtų cisteiną, homocisteiną ir glutationą biologiniuose mėginiuose, reikia, kad pastarieji tenkintų tris pagrindines sąlygas.

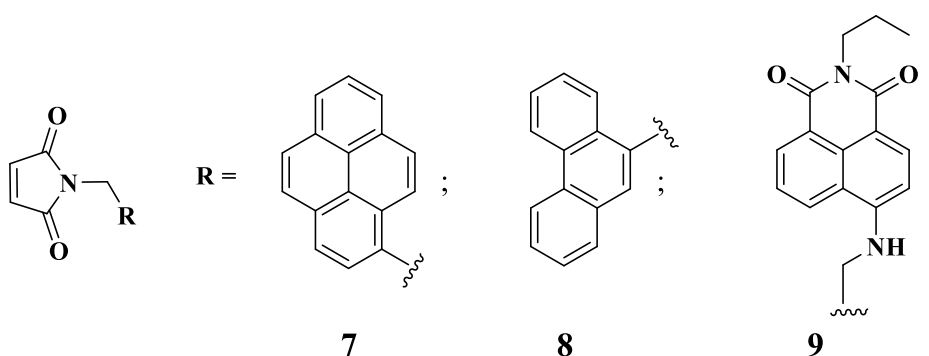
1. Didelė skiriamoji geba. Svarbu, kad susidarančių biotolių fluorescuojančių zondų FL spektro emisijos maksimumai būtų hipsochromiškai arba bathochromiškai pasislinkę tiek vienas kito, tiek pradinio žymeklio atžvilgiu.
2. Žymus fluorescencijos intensyvumo padidėjimas, prisijungus tiolius.
3. Zondų emisijos maksimumai turi būti 650–900 nm elektromagnetinės spinduliuotės srityje [32], nes biologiniuose mėginiuose 250–600 nm vyksta vietinių biomolekulių autofluorescencija, kuri gali apriboti fluorescuojančių zondų FL nustatymo tikslumą [33].

Toliau pateikiama mokslinėje literatūroje rasta informacija apie tio-Michaelio reakcijoms sintetintus zondus ir jų pritaikomumo galimybes.

Zondų kūrimo ištakos siekia 1981 m., kuomet T. O. Sippelis paskelbė apie pirmuosius maleimido junginius – kumarino darinius, kurie buvo naudojami kaip žymekliai merkaptaminorūgštims identifikuoti. Prisijungus biotilius buvo galima stebėti šviesiai mėlyną fluorescenciją [34]. Po kelių metų M. E. Langmuir kartu su kolegomis juos patobulino ir zondai **2** ir **3** jau galėjo nežymiai išskirti glutationą iš kitų biotilių [35].

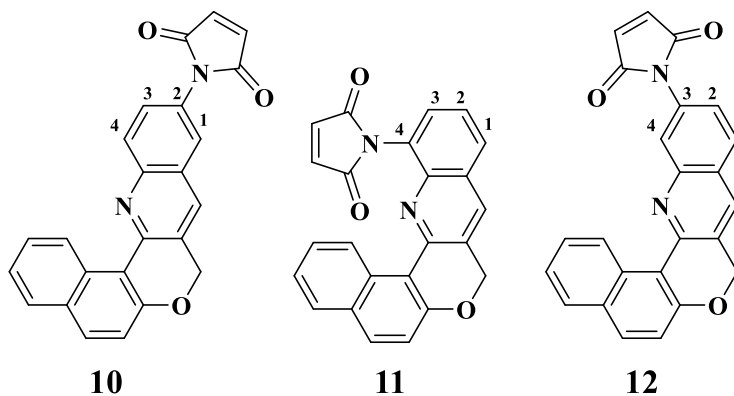


1998 m. A. P. de Silva sukurti žymekliai kondensuotų aromatinių junginių pagrindu **7**, **8** ir imidas **9** sukėlė tikrą sensaciją nustatant cisteiną vandeniniame metanolio tirpale [36]. Tačiau bandymai su homocisteinu ir glutationu atlikti nebuvo.



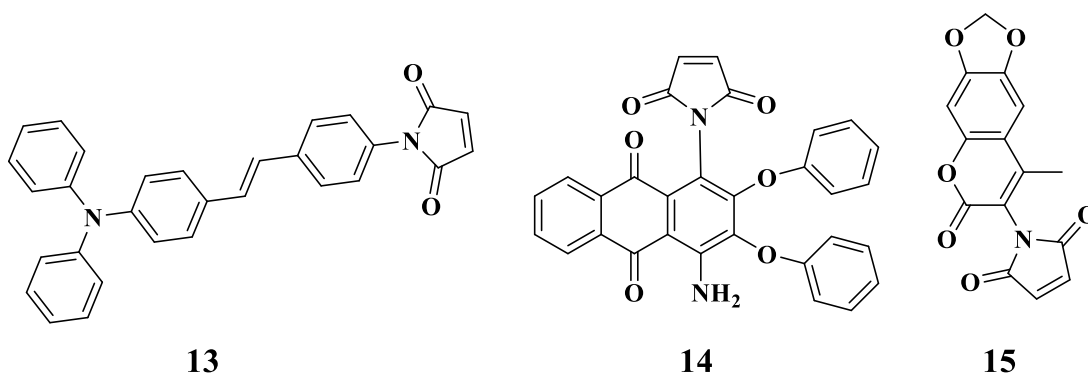
2012 m. K. Dnyaneshwaras pranešė apie maleimido zondą **10** su chinolino dariniu. Šį junginį ištirpinus DMSO su HEPES buferiu (pH = 7,4) ir pridėjus biotilių buvo stebimas žymus fluorescencijos padidėjimas. Iš visų trijų tiolių cisteino fluorescencija buvo intensyviausia, tačiau visų merkaptaminorūgščių FL spektro emisijos maksimumas buvo bendras ties 455 nm [37]. Siekiant selektyvumo vėlesniais metais žymeklis buvo modifikuojamas, keičiant maleimido fragmento

pozicijas – C-2, C-3 ir C-4. Zondas **11** parodė gerokai didesnę fluorescenciją su glutationu, o **12** gerų rezultatų nepateikė nė vieno tiolio atžvilgiu [38]. Deja, visi trys žymekliai negali būti naudojami selektyviai atskirti biotiolius tarpusavyje.



2016 m. T. Liu su bendraautoriais mokslinėje literatūroje [39] paskelbė apie maleimido zondą **13** su trifenilamino fragmentu. Šis žymeklis pats nefluorescuoja, tačiau prisijungus homocisteiną ir glutationą, pasireiškė intensyvus FL padidėjimas. Tuo tarpu cisteinas beveik nekėlė jokių pokyčių. Hcy ir GSH fluorescencinių zondų emisijos maksimumai atitinkamai buvo ties 480 ir 485 nm. Kad imituotų fiziologinį pH tyrimai atlikti vandeninio HEPES buferio ir DMSO mišinyje. Kaip patys autoriai teigia, šio zondo trūkumas – sužadavimo ir spinduliavimo bangų ilgis yra artimojoje regimojoje srityje.

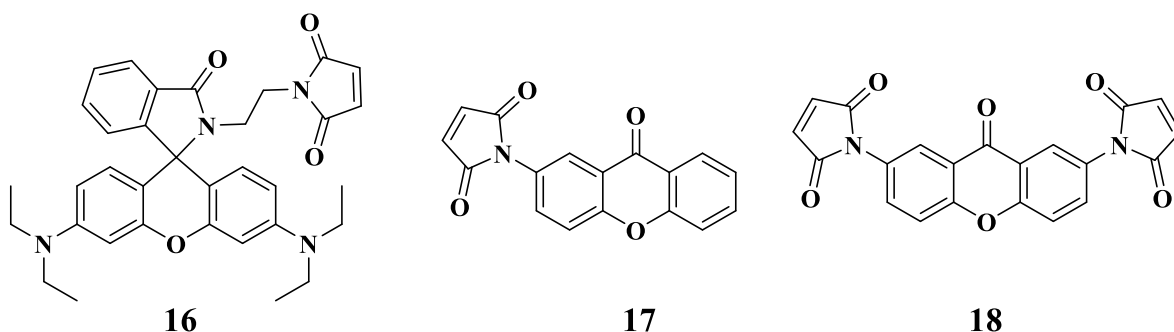
Tais pačiais metais J. Li su komanda pranešė apie maleimido zondą **14** su antraceno fragmentu. Fluorescencijos intensyvumas žymiai padidėjo pridėjus biotolių. Taip pat įvyko batochrominis poslinkis pradinio zondo atžvilgiu, tačiau visų trijų tiolių emisijos maksimumas buvo vienodas 573 nm. Nustatyta, kad minimali cisteino, homocisteino ir glutationo aptikimo riba yra 0,015 μM. Šio zondo selektyvumas pasiektas tik kitų aminorūgščių atžvilgiu, bet ne kiekvieno biotolio atskirai [40].



2017 m. mokslinėje literatūroje [41] buvo publikuotas kumarino pagrindu sukurtas žymeklis **15**. Tačiau jis, kaip ir prieš tai aptartas zondas **14**, selektyviai išskiria merkaptoaminorūgštis iš kitų, bet ne cisteiną, homocisteiną ir glutationą tarpusavyje. Buvo atlikti tyrimai su biologiniais mėginiais ir rezultatai parodė, kad junginys **15** gali būti naudojamas tiolių nustatymui žmogaus organizme.

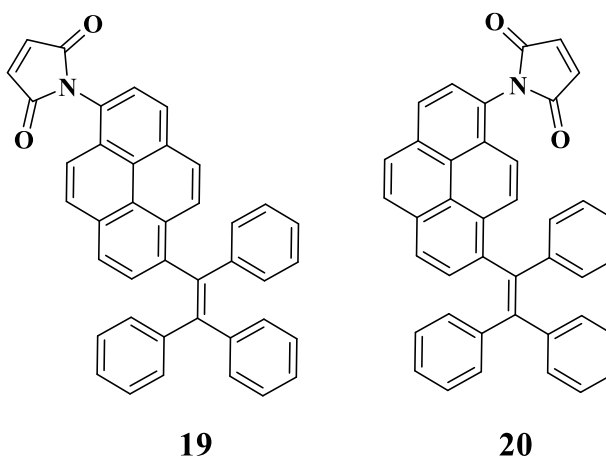
Po metų Kinijos mokslininkų komanda pristatė naują biotolių nustatymui skirtą zondą **16**, kurio struktūra pagrįsta rodaminu B ir 2,5-pirolidindiono fragmentais. Pridėjus skirtingų aminorūgščių ir biotolių ryškiu FL intensyvumo padidėjimu pasižymėjo tik glutationo fluorescencinis zondas, kurio emisijos maksimumas buvo ties 580 nm. Eksperimentams buvo naudota metanolio ir vandens mišinys

su buferiu (pH = 7,4). Siekiant išsiaiškinti, ar nėra ryškaus poveikio GSH nustatymo kokybei, tolimesniuose tyrimuose į tirpalą buvo pridėta įvairių jonų (Cr^{3+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Na^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Cl^- , I^- , NO_3^- ir kiti). Rezultatai buvo neigiami, todėl autoriai teigia, kad zondas **16** gali būti naudojamas biologiniuose mėginiuose kaip labai selektyvus glutationo jutiklis [42].



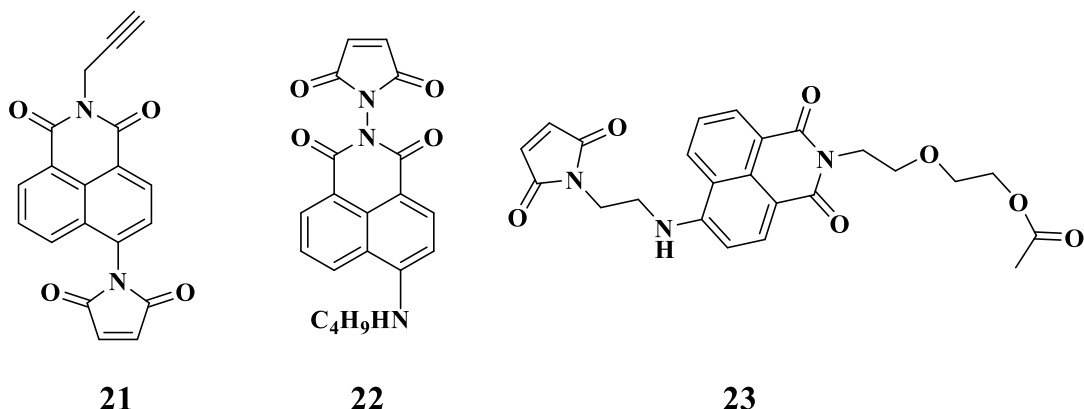
2020 m. A. Grzelakowska su bendraautoriais mokslinėje literatūroje [43] publikavo ksantono pagrindu susintetintus maleimido zondus **17** ir **18**. Pastarųjų sąveikos buvo tirtos su visais trimis biotioliais, tačiau fluorescencijos intensyvumo atsakas pasireiškė tik su cisteinu. Susidarius Cys fluorescuojančiam zondui FL padidėjo 25 kartus lyginant pradinio žymeklio **17** atžvilgiu, o **18** – net 60 kartų. Taip pat ištirta, kad kitų aminorūgščių pridėjimas neturi įtakos fluorescencijos atsakui – zondai selektyviai atpažįsta tik cisteiną. Vėlesniuose tyrimuose buvo eksperimentuojama nustatinėjant biotolio koncentracijos aptikimo ribas. Emisijos maksimumams esant ties 469 nm (**17**) ir 474 nm (**18**) fluorescencijos intensyvumas pamažu didėja, kol cisteino koncentracija pasiekia 20 μM , o žemiausios biotolio aptikimo ribos atitinkamai yra 0,117 ir 0,121 μM .

Tais pačiais metais Kinijos mokslininkai paskelbė apie tetrafeniletileno fragmentus turinčius izomerinius maleimido zondus **19** ir **20**.



Inkubuojant žymeklius su glutationu fluorescencija nepasireiškė, tačiau ji žymiai padidėjo su cisteinu ir homocisteinu. Problema, jog abiejų biotolių fluorescuojančių zondų emisijos maksimumai buvo vienodi – 495 nm. Tyrimai atlikti tetrahidrofurano ir vandens mišinyje. Nors izomeriniai zondai **19** ir **20** nepasižymėjo aukštu selektyvumu, autoriai teigia, kad jie gali būti naudojami viduląsteliniais biotoliams vizualizuoti [44].

Kiti Kinijos mokslininkai pranešė apie tris naujus naftalimido pagrindu sukurtus maleimido zondus **21**, **22** ir **23**. Kaip teigiama mokslinėje literatūroje [45], dėl gero fotofizikinio stabilumo ir nejautrumo pH kitimui naftalimidas yra dažnai naudojamas fluoroforas įvairių analičių zondų kūrimui.



Visi žymekliai į biotiolius reagavo skirtingai. Zondas **21** buvo labai selektyvus cisteinui. Tik jam prisijungus padidėjo fluorescencijos intensyvumas, kai tuo tarpu kiti biotioliai nesukėlė reikšmingos FL. Emisijos maksimumas buvo ties 465 nm, o homocisteino ir glutationo per kelias dešimtis pasislinkę trumpųjų bangų link. Biotioliams prisijungus prie zondo **22** buvo stebima didžiausia fluorescencija su cisteinu, o homocisteino ir glutationo FL buvo vienodos. Tačiau šis zondas nepateikė gero selektyvumo, nes neįvyko hipsochrominiai ar batochrominiai poslinkiai nė vieno tiolio atžvilgiu. Zondas **23** nepateikė gerų rezultatų – tiek fluorescencijos intensyvumas, tiek emisijos maksimumai visų merkaptaminorūgščių išsidėstė vienodai ties 538 nm. Kad imituotų fiziologinį pH visi tyrimai buvo atlikti dimetilsulfoksido tirpiklyje, naudojant fosfato buferį. Autoriai teigia, kad žymeklis **21** gali būti pritaikytas cisteinui identifikuoti gyvose ląstelėse.

1.5. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Trys merkaptobiomolekulės su panašiomis struktūromis – cisteinas, homocisteinas ir glutationas – yra labai svarbios normaliam žmogaus organizmo funkcionavimui ir atlieka esminius vaidmenis palaikant biologines sistemas. Nustatyta, kad nukrypus nuo optimalios tiolių koncentracijos organizme, gali išsivystyti daugelis pavojingų ir sunkių žmogaus sveikatai ligų.

Merkaptaminorūgštims identifikuoti ir jų koncentracijoms organizme nustatyti plačiai naudojami įvairūs metodai – didelio efektyvumo skysčių chromatografija, masių spektrometrija, kapiliarinė elektroforezė ir kiti. Tačiau patys paprasčiausi ir mažiausiai sąnaudų reikalaujantys yra fluorescenciniai metodai. Pastarieji pasižymi specifiniu selektyvumu ir jautrumu merkaptobiomolekulėms. Plačiai naudojamas yra Michaelio fluorescencinis metodas. Šiandieniniame pasaulyje jis vis tobulinamas ir kuriami nauji maleimido zondai, galintys selektyviai identifikuoti biotiolius. Pastaraisiais metais buvo pranešta apie perspektyvius rezultatus, susijusius su tiolių aptikimu biologinėse sistemose. Tačiau šis metodas vis dar nėra galutinai ištirtas ir nėra sukurtų visiškai selektyvių zondų, identifikuojančių visus tris tiolius – cisteiną, homocisteiną ir glutationą – atskirai. Taip pat susidarančių fluorescuojančių zondų emisijos maksimumai nepatenka į ypač patrauklią merkaptaminorūgštims identifikuoti 650–900 nm elektromagnetinės spinduliuotės sritį, kurioje FL intensyvumo neslopina biologinėse sistemose esančių vietinių biomolekulių autofluorescencija. Todėl susidomėjimo naujais zondais tendencija išlieka ir jų kūrimas yra aktualus.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

Skyriuje apžvelgiama informacija:

- moksliniams eksperimentams naudota aparatūra;
- naujų junginių (žymeklių ir fluorescuojančių zondų) sintezei naudotos medžiagos;
- išsamūs naujų junginių (žymeklių ir fluorescuojančių zondų) sintezės etapų aprašymai.

2.1. Aparatūra

Branduolių magnetinis rezonansas (BMR)

Branduolių magnetinio rezonanso (^1H , ^{13}C BMR) spektrai užrašyti „Bruker Avance III“ (400 MHz) spektrometru. Spektro skalė sugraduota milijoninėmis dalimis (m.d.). Vidiniu standartu panaudotas tetrametilsilanas (TMS, 0 m.d.). Gautų junginių spektrinė analizė atlikta naudojant deuteriuotą tirpiklį – dimetilsulfoksidą (DMSO- d_6).

Lydimosi temperatūra

Junginio lydimosi temperatūra nustatyta naudojant elektroterminį „Mel-Temp/DigiMelt MPA 161“ aparatą. Tiriamą medžiagą patalpinama į mikrokapiliarą, kurio vidinis diametras yra 1 mm, o ilgis 75 mm. Temperatūros kėlimo greitis – 1 °C/min.

Elementinė analizė

Junginių elementinė analizė atlikta „Exeter Analytical CE-440“ aparatu. Nustatyta anglies, vandenilio ir azoto procentinės dalys junginiuose.

Ultravioletinės spinduliuotės ir regimosios šviesos spektroskopija (UV/RŠ)

Bandinių tirpalų šviesos sugerties spektrai regimosios ir ultravioletinės spinduliuotės dalyse užrašyti „Perkin Elmer Lambda 35 UV/VIS“ spektrofotometru. Naudoti tirpikliai – THF, 1,4-dioksanas, metanolis ir DMSO. Tirpalo koncentracija 10^{-4} mol/l. Spektro registracijos greitis 2 nm/s. Kiuvetės storis $d = 1$ mm. Difrakcinės gardelės plyšio plotis 2 nm. Bangos ilgis λ pateiktas nm.

Fluorescencinė spektroskopija

Bandinių tirpalų fluorescencijos spektrai užrašyti „Edinburgh Instruments FLS920“ fluorescencijos spektrofotometru. Naudoti tirpikliai – THF, 1,4-dioksanas, metanolis ir DMSO. Tirpalo koncentracija 10^{-5} mol/l. Kiuvetės storis $d = 1$ cm. Difrakcinės gardelės plyšio plotis 2,5 nm. Bangos ilgis λ pateiktas nm.

Skirtinguose tirpikliuose tirtos medžiagos buvo paveiktos atitinkama spinduliuote:

1. THF – junginys **Z2** – 680 nm, **Z2-Cys** – 668 nm, **Z2-Hcy** – 675 nm, **Z2-GSH** – 670 nm;
2. 1,4-dioksanas – junginys **Z2** – 680 nm, **Z2-Cys** – 645 nm, **Z2-Hcy** – 685 nm, **Z2-GSH** – 685 nm;
3. Metanolis – junginys **Z2** – 650 nm, **Z2-Cys** – 647 nm, **Z2-Hcy** – 650 nm, **Z2-GSH** – 655 nm, **Z3** – 750 nm, **Z3-Cys** – 750 nm, **Z3-Hcy** – 750 nm, **Z3-GSH** – 750 nm;
4. DMSO – junginys **Z2-Hcy** – 660 nm, **Z2-GSH** – 660 nm, **Z3** – 680 nm, **Z3-Cys** – 760 nm, **Z3-Hcy** – 682 nm, **Z3-GSH** – 760 nm.

2.2. Medžiagos

Visi komerciniai reagentai buvo pirkti iš kompanijų „Sigma – Aldrich“ ir „TCI Europe“ (žr. 2.1 lentelė). Kai kurių gautų junginių chromatografiniam grynimui buvo naudojamas silikagelis Merck Grade 9385 (dalelių dydis 230–400, porų dydis 60Å) įsigytas iš įmonės „Sigma – Aldrich“.

2.1 lentelė. Komerciniai reagentai ir jų charakteristika

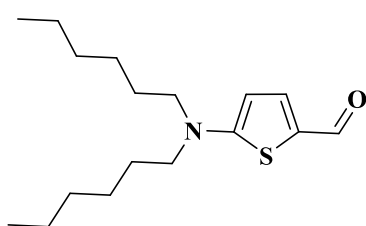
Nr.	Reagento pavadinimas	CAS numeris	Reagento grynumas	Tiekėjas
1.	5-bromo-2-tiofenokarboksialdehidas	4701-17-1	>95 %	„Sigma – Aldrich“
2.	Diheksilaminas	143-16-8	>97 %	„Sigma – Aldrich“
3.	Tributil(1,3-dioksolan-2-ilmetil)fosforo bromidas	115754-62-6	>97 %	„Sigma – Aldrich“
4.	Natrio hidridas (60 % disperguotas mineralinėje alyvoje)	7646-69-7	Sausas >90 %	„Sigma – Aldrich“
5.	2-amino-1,1,3-triciano-1-propenas	868-54-2	>98 %	„TCI Europe“
6.	Maleino anhidridas	108-31-6	>99 %	„Sigma – Aldrich“
7.	Trietilaminas (TEA)	121-44-8	≥99 %	„Sigma – Aldrich“
8.	HEPES buferis	7365-45-9	≥99,5 %	„Sigma – Aldrich“
9.	L-Cisteinas	52-90-4	≥97 %	„Sigma – Aldrich“
10.	L-Homocisteinas	6027-13-0	≥98 %	„Sigma – Aldrich“
11.	Glutacionas	70-18-8	≥98 %	„Sigma – Aldrich“

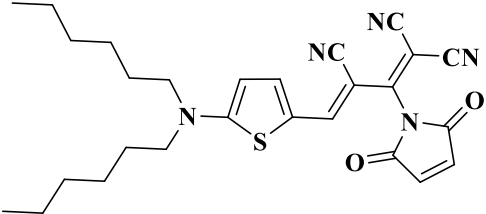
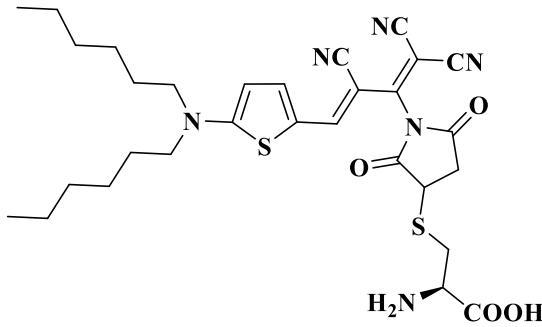
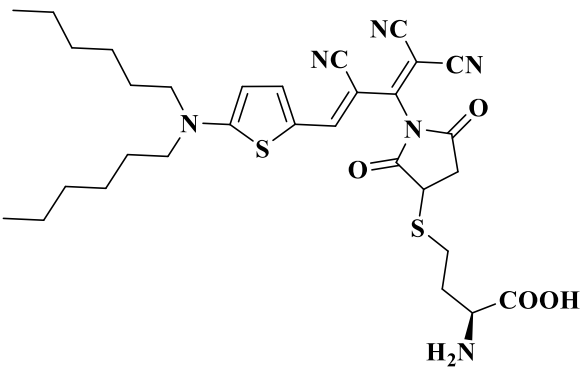
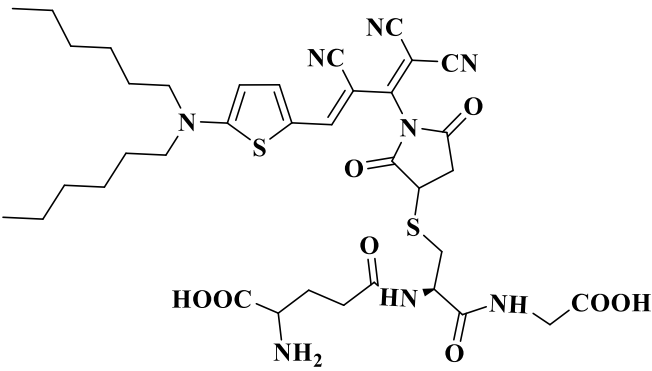
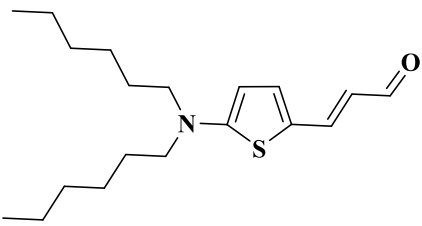
2.3. Eksperimentų aprašymas

Reakcijų eiga ir junginių grynumas buvo sekami plonasluoksnės chromatografijos metodu ant ALUGRAM SIL G/UV254 plokšelių, kurios stebimos 254 ir 366 nm UV spinduliuotės poveikyje.

Šis magistro baigiamasis projektas yra bakalauro darbo „Naujų zondų sintezė ir panaudojimas merkaptaminorūgščių identifikavimui“ [47], kuris buvo apgintas prieš du metus, tęsinys. Norint nuosekliai išdėstyti naujų biotolių receptorių ir fluorescuojančių zondų sintezės kelią bei atlikti kokybišką visų junginių tyrimų palyginamąją analizę, 2.2 lentelėje pateikiama keletas toliau naudotų tarpinių ir galutinių junginių iš bakalauro projekto.

2.2 lentelė. Tarpiniai ir galutiniai bakalauro projekto metu susintetinti junginiai

Junginio pavadinimas	Junginio formulė
Junginiai su viena dvigubąja -CH=CH- jungtimi konjuguotoje grandinėje	
[5-(diheksilamino)tiofen-2-il]metanalis (1)*	

Junginio pavadinimas	Junginio formulė
4-[5-(diheksilamino)tiofen-2-il]-2-(2,5-diokso-2,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirol-1-il)buta-1,3-dien-1,1,3-trikarbonitrilas (Z1)	
2,5-diokso-1-{1,1,3-triciano-4-[5-(diheksilamino)tiofen-2-il]buta-1,3-dien-2-il}pirolidin-3-il- <i>L</i> -cisteinas (Z1-Cys)	
2,5-diokso-1-{1,1,3-triciano-4-[5-(diheksilamino)tiofen-2-il]buta-1,3-dien-2-il}pirolidin-3-il- <i>L</i> -homocisteinas (Z1-Hcy)	
N ⁵ -{1-[(karboksimetil)amino]-3-[(2,5-diokso-1-(1,1,3-triciano-4-(5-(diheksilamino)tiofen-2-il)buta-1,3-dien-2-il)pirolidin-3-il)tio]-1-oksopropan-2-il} glutaminas (Z1-GSH)	
Junginiai su dviem dvigubosiomis -CH=CH- jungtimis konjuguotoje grandinėje	
3-[5-(diheksilamino)tiofen-2-il]propenalis (2)*	

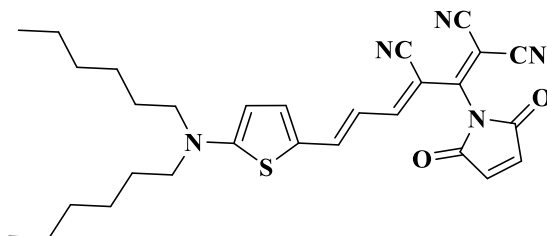
Junginio pavadinimas	Junginio formulė
2-amino-6-[5-(diheksilamino)tiofen-2-il]heksa-1,3,5-trien-1,1,3-trikarbonitrilas (3)	
6-[5-(diheksilamino)tiofen-2-il]-2-(2,5-diokso-2,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirol-1-il)heksa-1,3,5-trien-1,1,3-trikarbonitrilas (Z2)*	
2,5-diokso-1-{1,1,3-triciano-6-[5-(diheksilamino)tiofen-2-il]heksa-1,3,5-trien-2-il}pirolidin-3-il- <i>L</i> -cisteinas (Z2-Cys)	

* Junginiai, kurie buvo pakartotinai susintetinti magistrantūros studijose.

Visi 2.2 lentelėje pateikti junginiai buvo gauti pagal [46, 47] mokslinėje literatūroje aprašytus eksperimentus, o jų elementinės ir spektrinės analizės rezultatai atitinka minėtoje literatūroje nurodytus duomenis.

Darbo pradžioje buvo atlikta zondo **Z2** pakartotinė gausinimo sintezė.

6-[5-(diheksilamino)tiofen-2-il]-2-(2,5-diokso-2,5-dihidro-1*H*-pirol-1-il)heksa-1,3,5-trien-1,1,3-trikarbonitrilas (**Z2**)

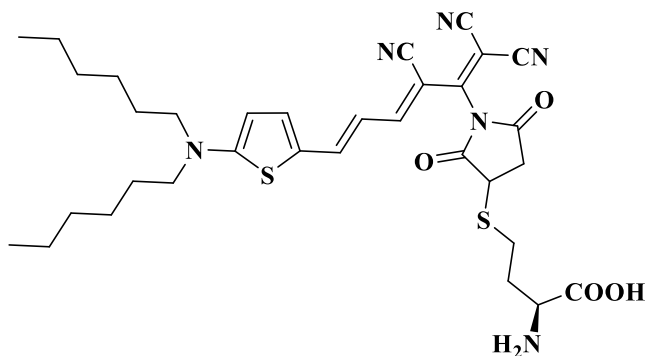


Inertinėje argono atmosferoje 40 ml sauso dichlormetano ištirpinama 0,7 g (1,7 mmol) junginio **3** ir 0,49 g (5,1 mmol) maleino anhidrido. Į gautą mišinį lėtai sulašinama 0,5 g (5,1 mmol) katalizatoriaus TEA. Reakcija vykdoma kambario temperatūroje 5 val., o jai pasibaigus (plonasluoksnė chromatografija, THF:*n*-heksanas, 1:1,5) mišinys ekstrahuojamas etilacetatu. Organinis sluoksnis džiovinamas bevandeniu Na₂SO₄, nufiltruojamas, organiniai tirpikliai nudistiliuojami rotaciniu garintuvu. Gautas junginys gryninamas kolonėlinės chromatografijos būdu (THF:*n*-heksanas, 8:17).

Gauta 0,52 g (61 %) žalvarinės spalvos kristalų. Išskirto produkto lydymosi temperatūra ir BMR spektrai atitinka mokslinėje literatūroje [47] aprašytus duomenis.

Kaip matome iš 2.2. lentelėje pateiktų duomenų, bakalauro projekte, naudojant biotilių receptorių **Z2**, buvo gautas tik vienas fluorescuojantis zondas **Z2-Cys**, todėl magistro projekte pabaigiama sintezė su minėtu biotilių receptoriu **Z2** – gaunami nauji fluorescuojantys zondai su homocisteinu **Z2-Hcy** ir glutationu **Z2-GSH**.

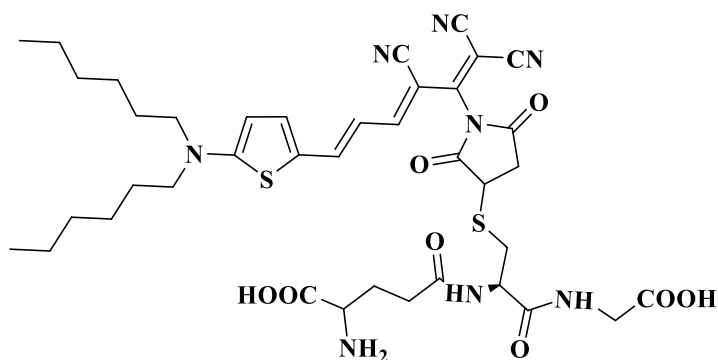
2,5-diokso-1-{1,1,3-triciano-6-[5-(diheksilamino)tiofen-2-il]heksa-1,3,5-trien-2-il}pirolidin-3-il-L-homocisteinas (Z2-Hcy)



0,3 g (0,6 mmol) pradinio zondo **Z2** ištirpinama 15 ml THF, o 0,09 g (0,7 mmol) *L*-homocisteino merkaptaminorūgštis – 7,5 ml dejonizuoto vandens. Analogiškame dejonizuoto vandens kiekyje yra ištirpinama 0,08 g (0,3 mmol) HEPES buferio (pH = 7,4), į kurį vienu metu supilami zondo ir biotilio tirpalai. Reakcija vykdoma kambario temperatūroje 15 min., o jai pasibaigus (plonasluoksnė chromatografija, THF:*n*-heksanas, 1:1,5), mišinys išekstrahuojamas etilacetatu. Organinis sluoksnis džiovinamas bevandeniu Na₂SO₄, nufiltruojamas, organiniai tirpikliai nudistiliuojami rotaciniu garintuvu. Gauta derva sukristalinama eteriu ir du kartus juo praplaunama. Gauta 0,25 g (66 %) tamsiai vyšninių metalinių kristalų.

Elementinė analizė (%) medžiagai C₃₃H₄₂N₆O₄S₂ (650,86 g/mol): apskaičiuota C 60,90; H 6,50; N 12,91; rasta C 60,62; H 6,43; N 12,76.

N⁵-{-1-[(karboksimetil)amino]-3-[(2,5-diokso-1-(1,1,3-triciano-6-(5-(diheksilamino)tiofen-2-il)heksa-1,3,5-trien-2-il)pirolidin-3-il)tio]-1-oksopropan-2-il}glutaminas (Z2-GSH)



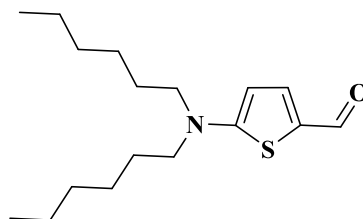
0,3 g (0,6 mmol) pradinio zondo **Z2** ištirpinama 15 ml THF, o 0,22 g (0,7 mmol) glutationo merkaptaminorūgštis – 7,5 ml dejonizuoto vandens. Analogiškame dejonizuoto vandens kiekyje yra ištirpinama 0,08 g (0,3 mmol) HEPES buferio (pH = 7,4), į kurį vienu metu supilami zondo ir

biotiolio tirpalai. Reakcija vykdoma kambario temperatūroje 20 min., o jai pasibaigus (plonasluoksnė chromatografija, THF:*n*-heksanas, 1:1,5), mišinys išekstrahuojamas etilacetatu. Organinis sluoksnis džiovinamas bevandeniu Na₂SO₄, nufiltruojamas, organiniai tirpikliai nudistilijuojami rotaciniu garintuvu. Gauta derva sukristalinama eteriu ir du kartus juo praplaunama. Gauta 0,28 g (59 %) tamsiai vyšninių (beveik juodų) metalinių kristalų.

Elementinė analizė (%) medžiagai C₃₉H₅₀N₈O₈S₂ (823,00 g/mol): apskaičiuota C 56,92; H 6,12; N 13,62; rasta C 56,69; H 6,39; N 13,75.

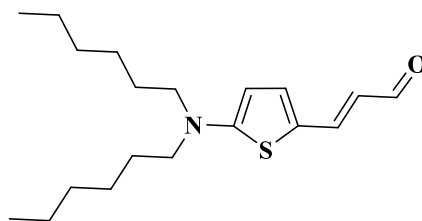
Naujo zondo **Z3** su trimis dvigubosiomis -CH=CH- jungtimis konjuguotoje grandinėje sintezei reikalingų **1** ir **2** tarpinių junginių gausinimas.

[5-(diheksilamino)tiofen-2-il]metanalis (1)



Inertinėje argono atmosferoje 75 ml ksileno ištirpinama 5,0 g (26,2 mmol) 5-bromo-2-tiofenokarboksialdehido, supilama 4,9 g (26,2 mmol) diheksilamino ir sulašinama 2,7 g (26,2 mmol) sauso TEA. Mišinys maišomas kambario temperatūroje 15 min. Tuomet temperatūra lėtai keliami iki virimo. Reakcija vyksta 40 val., o jai pasibaigus (plonasluoksnė chromatografija, THF:*n*-heksanas, 1:4) mišinys ekstrahuojamas etilacetatu. Organinis sluoksnis džiovinamas bevandeniu Na₂SO₄, nufiltruojamas, organiniai tirpikliai nudistilijuojami rotaciniu garintuvu. Gauta derva gryninama kolonėlinės chromatografijos būdu (acetonas:*n*-heksanas, 0,5:24,5). Gauta 5,9 g (76 %) geltonai rudos spalvos dervos. Išskirto produkto BMR spektrų duomenys atitinka mokslinėje literatūroje [46] aprašytus spektrus.

3-[5-(diheksilamino)tiofen-2-il]propenalis (2)

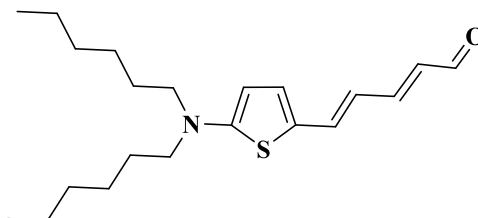


Inertinėje argono atmosferoje 30 ml sauso THF ištirpinama 3,0 g (10,2 mmol) junginio **1** ir 4,1 g (11,2 mmol) tributil(1,3-dioksolan-2-ilmetil)fosforo bromido. Į gautą tirpalą suberiama 0,7 g (30,5 mmol) mineralinėje alyvoje disperguoto 60 % natrio hidrido. Reakcija vykdoma kambario temperatūroje 13 val., o jai pasibaigus (plonasluoksnė chromatografija, acetonas:*n*-heksanas, 1:4) natrio hidrido perteklius pašalinamas lašinant 10 % druskos rūgšties tirpalą, kol mišinio terpė pasidaro rūgštinė. Po hidrolizės gautas mišinys maišomas dar 1 val. kambario temperatūroje. Reakcijai pasibaigus, (plonasluoksnė chromatografija, acetonas:*n*-heksanas, 1:4) mišinys ekstrahuojamas etilacetatu. Organinis sluoksnis džiovinamas bevandeniu Na₂SO₄, nufiltruojamas, organiniai tirpikliai nudistilijuojami rotaciniu garintuvu. Gauta derva gryninama kolonėlinės chromatografijos būdu

(acetonas:*n*-heksanas, 1:24). Gauta 2,8 g (78 %) rudos spalvos dervos. Išskirto produkto BMR spektrų duomenys atitinka mokslinėje literatūroje [46] aprašytus spektrus.

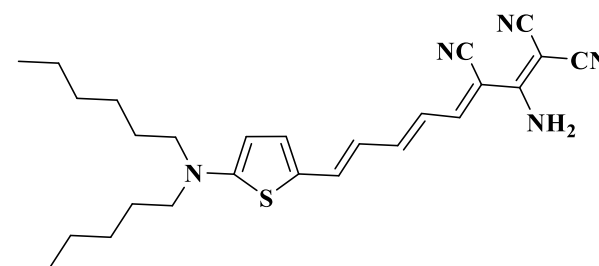
Toliau vykdoma naujo zondo **Z3** su trimis dvigubosiomis -CH=CH- jungtimis konjuguotoje grandinėje ir jo pagrindu susidarančių cisteino **Z3-Cys**, homocisteino **Z3-Hcy** ir glutationo **Z3-GSH** fluorescuojančių zondų sintezė.

5-[5-(diheksilamino)tiofen-2-il]penta-2,4-dienalis (4)



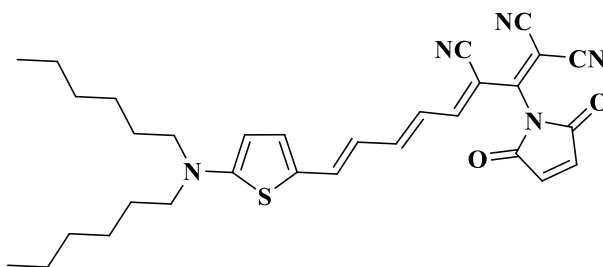
Inertinėje argono atmosferoje 20 ml sauso THF ištirpinama 2,0 g (5,7 mmol) junginio **2** ir 2,3 g (6,3 mmol) tributil(1,3-dioksolan-2-ilmetil)fosforo bromido. Į gautą tirpalą suberiama 0,4 g (17,2 mmol) mineralinėje alyvoje disperguoto 60 % natrio hidrido. Reakcija vykdoma kambario temperatūroje 23 val., o jai pasibaigus (plonasluoksnė chromatografija, acetonas:*n*-heksanas, 1:4) natrio hidrido perteklius pašalinamas lašinant 10 % druskos rūgšties tirpalą, kol mišinio terpė pasidaro rūgštinė. Po hidrolizės gautas mišinys maišomas dar 1 val. kambario temperatūroje. Reakcijai pasibaigus, (plonasluoksnė chromatografija, acetonas:*n*-heksanas, 1:4) mišinys ekstrahuojamas etilacetatu. Organinis sluoksnis džiovinamas bevandeniu Na₂SO₄, nufiltruojamas, organiniai tirpikliai nudistiliuojami rotaciniu garintuvu. Gauta derva gryninama kolonėlinės chromatografijos būdu (acetonas:*n*-heksanas, 4:21). Gauta 1,5 g (70 %) rudos spalvos dervos. Išskirto produkto BMR spektrų duomenys atitinka mokslinėje literatūroje [46] aprašytus spektrus.

2-amino-8-[5-(diheksilamino)tiofen-2-il]okta-1,3,5,7-tetraen-1,1,3-trikarbonitrilas (5)



Inertinėje argono atmosferoje 30 ml sauso etanolio ištirpinama 1,5 g (4,0 mmol) junginio **4** ir 0,53 g (4,0 mmol) 2-amino-1,1,3-triciano-1-propeno. Reakcija vykdoma virimo temperatūroje 4 val., o jai pasibaigus (plonasluoksnė chromatografija, acetonas:*n*-heksanas, 1:4) mišinys atvėsintas ir filtruojamas. Produktas gaunamas be pašalinių priemaišų, todėl papildomo gryninimo nereikia. Gauta: 1,3 g (71 %) žalios spalvos metalinių kristalų. Išskirto produkto lydymosi temperatūra ir BMR spektrų duomenys atitinka mokslinėje literatūroje [46] aprašytus duomenis.

8-[5-(diheksilamino)tiofen-2-il]-2-(2,5-diokso-2,5-dihidro-1H-pirol-1-il)okta-1,3,5,7-tetraen-1,1,3-trikarbonitrilas (Z3)



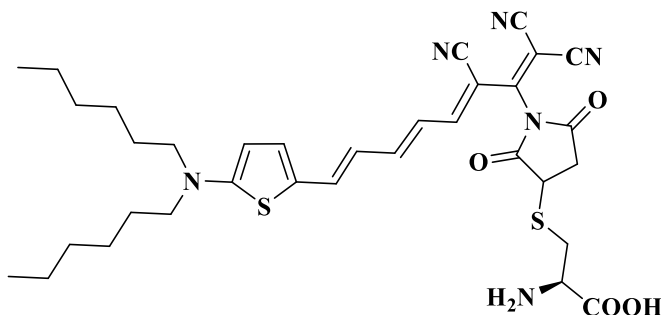
Inertinėje argono atmosferoje 75 ml sauso dichlormetano ištirpinama 1,3 g (2,8 mmol) junginio **5** ir 0,83 g (8,4 mmol) maleino anhidrido. Į gautą mišinį lėtai sulašinama 0,9 g (8,4 mmol) katalizatoriaus TEA. Reakcija vykdoma kambario temperatūroje 5 val., o jai pasibaigus (plonasluoksnė chromatografija, THF:*n*-heksanas, 1:1,5) mišinys ekstrahuojamas etilacetatu. Organinis sluoksnis džiovinamas bevandeniu Na₂SO₄, nufiltruojamas, organiniai tirpikliai nudistilijuojami rotaciniu garintuvu. Gautas junginys gryninamas kolonėlinės chromatografijos būdu (THF:*n*-heksanas, 11:14). Gauta 0,76 g (50 %) bronzinės spalvos kristalų. Lydimosi temperatūra 98–99 °C.

¹H BMR – (400 MHz, DMSO, δ): 7,99 (s, 1H, 3- arba 4-*H* maleino), 7,64 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, -CH=C(CN)-), 7,50–7,03 (m, 5H, 3- arba 4-*H* maleino, 3,4-*H* tiofeno, =CH-CH=CH-CH=C(CN)-, -CH=CH-CH=CH-CH=C(CN)-), 6,88–6,64 (m, 1H, =CH-CH=C(CN)- arba -CH=CH-CH=C(CN)-), 6,56–6,36 (t, 1H, =CH-CH=C(CN)- arba -CH=CH-CH=C(CN)-), 4,02–3,54 (m, 4H, -CH₂-N-), 1,90–1,55 (m, 4H, -CH₂-CH₂-N-), 1,49–1,13 (m, 12H, CH₃-(CH₂)₃-), 0,98–0,71 (m, 6H, -CH₃) m.d.

¹³C BMR – (101 MHz, DMSO, δ): 175,71 (-C-(maleinas)); 168,59 (2,5-*C* maleino); 151,99; 150,64; 144,32; 143,65; 136,09 (3,4-*C* maleino); 133,69; 133,20; 125,22; 122,90; 118,48; 118,43; 116,99; 116,65; 111,93; 88,95 (-CH₂-N-); 60,88 (-CH₂-CH₂-N-); 31,29 (CH₃-(CH₂)₂-(CH₂-)); 26,11 (CH₃-(CH₂)-(CH₂-)); 22,46 (CH₃-(CH₂-)); 14,34 (-CH₃) m.d.

Elementinė analizė (%) medžiagai C₃₁H₃₅N₅O₂S (541,71,00 g/mol): apskaičiuota C 68,73; H 6,51; N 12,93; rasta C 68,82; H 6,39; N 12,82.

2,5-diokso-1-{1,1,3-triciano-8-[5-(diheksilamino)tiofen-2-il]okta-1,3,5,7-tetraen-2-il}pirolidin-3-il-*L*-cisteinas (Z3-Cys)



0,2 g (0,4 mmol) pradinio zondo **Z3** ištirpinama 10 ml THF, o 0,06 g (0,5 mmol) *L*-cisteino merkptoaminorūgštis – 5 ml dejonizuoto vandens. Analogiškame dejonizuoto vandens kiekyje yra ištirpinama 0,05 g (0,2 mmol) HEPES buferio (pH = 7,4), į kurį vienu metu supilami zondo ir biotolio tirpalai. Reakcija vykdoma kambario temperatūroje 10 min., o jai pasibaigus (plonasluoksnė

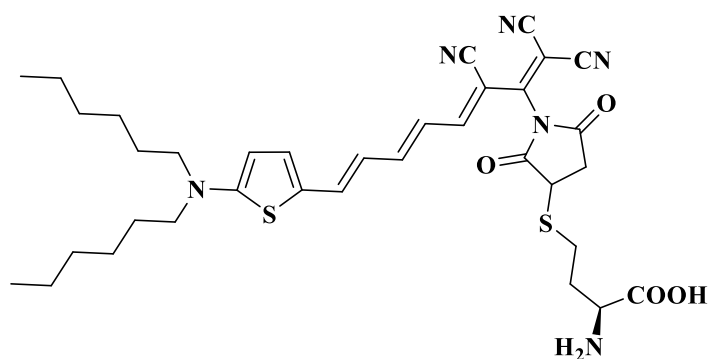
chromatografija, THF:*n*-heksanas, 1:1,5), mišinys išekstrahuojamas etilacetatu. Organinis sluoksnis džiovinamas bevandeniu Na₂SO₄, nufiltruojamas, organiniai tirpikliai nudistilijuojami rotaciniu garintuvu. Gauta derva sukristalinama eteriu ir du kartus juo praplaunama. Gauta 0,19 g (78 %) tamsiai vyšninės spalvos kristalų.

¹H BMR – (400 MHz, DMSO δ): 10,27 (s, 1H, -OH), 8,00–6,74 (m, 7H, -NH₂, -CH=C(CN)-, =CH-CH=CH-CH=C(CN)-, -CH=CH-CH=CH-CH=C(CN)-, 3,4-*H* tiofeno), 6,73–6,59 (m, 1H, =CH-CH=C(CN)- arba -CH=CH-CH=C(CN)-), 6,73–6,59 (m, 1H, =CH-CH=C(CN)- arba -CH=CH-CH=C(CN)-), 4,49–3,94 (m, 2H, 4-*H* pirolo, -CH(NH₂)-COOH), 3,89–3,58 (m, 4H, -CH₂-N-), 3,17–2,65 (m, 3H, -S-CH₂-, 3-*H* pirolo), 1,81–1,55 (m, 4H, -CH₂-CH₂-N-), 1,32–1,17 (m, 12H, CH₃-(CH₂)₃-), 0,87 (t, *J* = 6,2 Hz, 6H, -CH₃) m.d.

¹³C BMR – (101 MHz, DMSO, δ): 172,30 (5-*C* pirolo); 171,89 (-C-(pirolas)); 168,45 (-COOH); 168,39 (2-*C* pirolo); 156,07; 147,66; 145,51; 129,02; 128,98; 126,30; 124,05; 121,89; 120,56; 116,84 (-CN); 116,76; 114,28 (=C(CN)₂); 70,28 (-CH₂-N-); 56,05 (-CH₂-CH₂-N-); 55,06 (-CH(NH₂)); 53,69; 47,51; 37,98; 37,31 (-S-CH₂-); 31,35 (CH₃-(CH₂)₂-(CH₂-)); 26,21 (CH₃-(CH₂)-(CH₂-)); 22,49 (CH₃-(CH₂-)); 14,35 (-CH₃) m.d.

Elementinė analizė (%) medžiagai C₃₄H₄₂N₆O₄S₂ (662,87 g/mol): apskaičiuota C 61,61; H 6,39; N 12,68; rasta C 61,86; H 6,27; N 12,59.

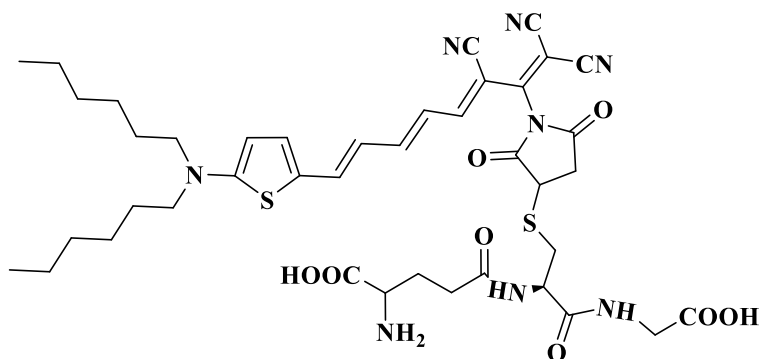
2,5-diokso-1-{1,1,3-triciano-8-[5-(diheksilamino)tiofen-2-il]okta-1,3,5,7-tetraen-2-il}pirolidin-3-il-*L*-homocisteinas (Z3-Hcy)



0,2 g (0,4 mmol) pradinio zondo **Z3** ištirpinama 10 ml THF, o 0,06 g (0,5 mmol) *L*-homocisteino merkptoaminorūgštis – 5 ml dejonizuoto vandens. Analogiškame dejonizuoto vandens kiekyje yra ištirpinama 0,05 g (0,2 mmol) HEPES buferio (pH = 7,4), į kuri vienu metu supilami zondo ir biotiolio tirpalai. Reakcija vykdoma kambario temperatūroje 20 min., o jai pasibaigus (plonasluoksni chromatografija, THF:*n*-heksanas, 1:1,5), mišinys išekstrahuojamas etilacetatu. Organinis sluoksnis džiovinamas bevandeniu Na₂SO₄, nufiltruojamas, organiniai tirpikliai nudistilijuojami rotaciniu garintuvu. Gauta derva sukristalinama eteriu ir du kartus juo praplaunama. Gauta 0,18 g (72 %) metalinio žvilgesio tamsios vyšninės spalvos kristalų.

Elementinė analizė (%) medžiagai C₃₅H₄₄N₆O₄S₂ (676,89 g/mol): apskaičiuota C 62,10; H 6,55; N 12,42; rasta C 61,94; H 6,58; N 12,46.

N⁵-{1-[(karboksimetil)amino]-3-[(2,5-diokso-1-(1,1,3-triciano-8-(5-(diheksilamino)tiofen-2-il)okta-1,3,5,7-tetraen-2-il)pirolidin-3-il)tio]-1-oksopropan-2-il}glutaminas (Z3-GSH)



0,2 g (0,4 mmol) pradinio zondo **Z3** ištirpinama 10 ml THF, o 0,14 g (0,5 mmol) glutationo merkaptaminorūgštis – 5 ml dejonizuoto vandens. Analogiškame dejonizuoto vandens kiekyje yra ištirpinama 0,05 g (0,2 mmol) HEPES buferio (pH = 7,4), į kurį vienu metu supilami zondo ir biotolio tirpalai. Reakcija vykdoma kambario temperatūroje 25 min., o jai pasibaigus (plonasluoksnė chromatografija, THF:*n*-heksanas, 1:1,5), mišinys išekstrahuojamas etilacetatu. Organinis sluoksnis džiovinamas bevandeniu Na₂SO₄, nufiltruojamas, organiniai tirpikliai nudistiliuojami rotaciniu garintuvu. Gauta derva sukristalinama eteriu ir du kartus juo praplaunama. Gauta 0,16 g (52 %) tamsios vyšninės spalvos kristalų.

Elementinė analizė (%) medžiagai C₄₁H₅₂N₈O₈S₂ (849,03 g/mol): apskaičiuota C 58,00; H 6,17; N 13,20; rasta C 58,24; H 6,08; N 13,10.

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Kaip jau buvo minėta, trys merkaptobiomolekulės su panašiomis struktūromis – cisteinas, homocisteinas ir glutationas – yra labai svarbios normaliam žmogaus organizmo funkcionavimui. Jos dalyvauja metaboliniuose procesuose ir atlieka esminius vaidmenis palaikant biosistemas. Moksliniais tyrimais įrodyta, jog jų koncentracijų nukrypimai nuo optimalių ribų gali sukelti patologines būsenas, todėl išsivysto daugelis sunkių ligų. Selektiviai identifikuojant biotilius organizme galima sustabdyti net ankstyvų simptomų atsiradimą. Tam tikslui gali būti naudojami įvairūs metodai, tačiau pats paprasčiausias yra fluorescencinis Michaelio merkaptaminorūgščių nustatymo metodas. Galimi įvairūs receptoriai, selektiviai reaguojantys su tiolių merkaptogrupėmis, tačiau reaktyviausias ir populiariausias yra maleimidais.

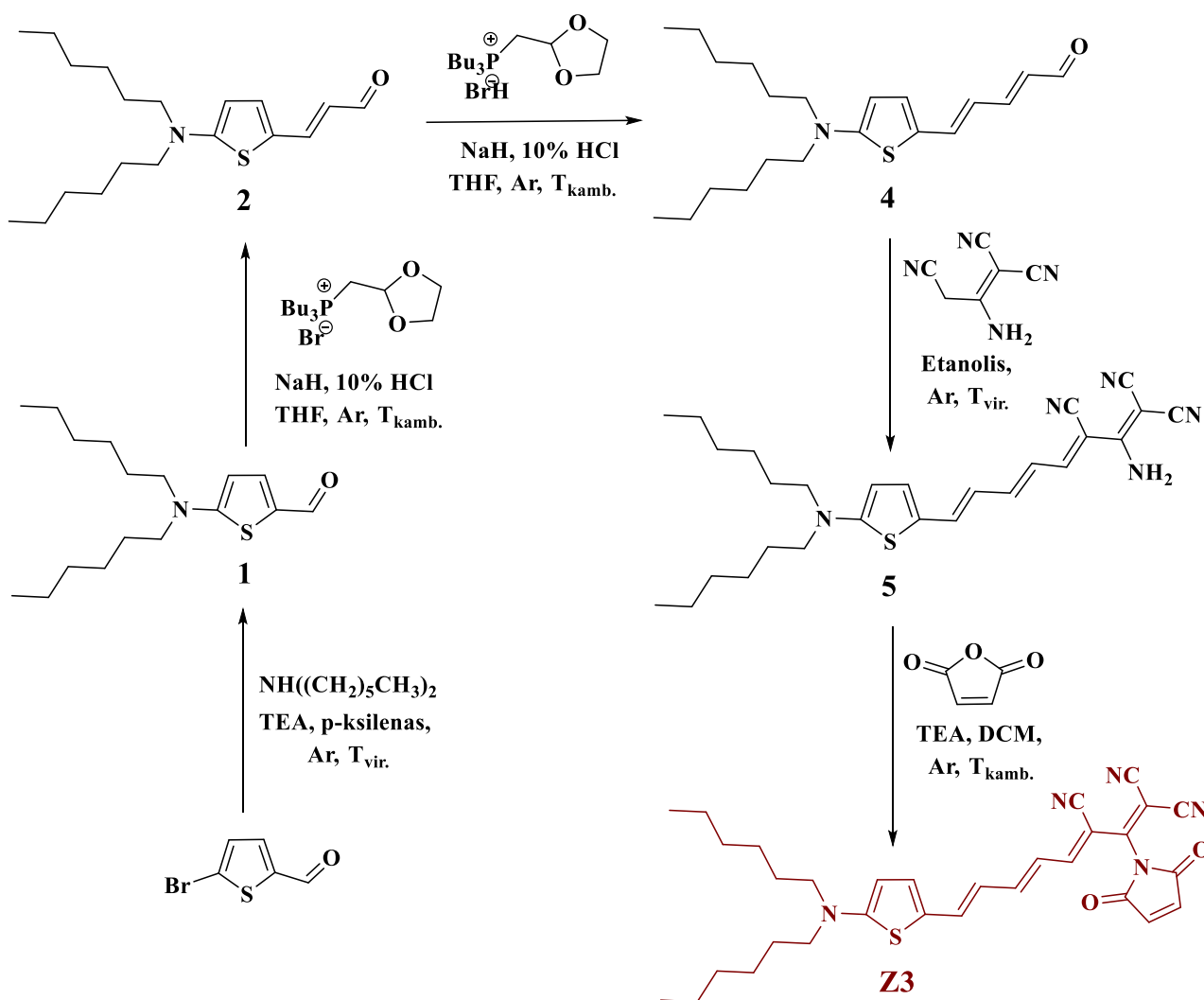
Literatūros apžvalgoje pateikta įvairių zondų su maleimido fragmentu pavyzdžių, skirtų šioms biomolekulėms aptikti. Pastaraisiais metais buvo pranešta apie perspektyvius rezultatus, tačiau nėra sukurtų visiškai selektyvių zondų, identifikuojančių visus tris tiolius – cisteiną, homocisteiną ir glutationą – atskirai. Todėl naujų žymeklių paieška bei kūrimas išlieka aktualūs ir šiai dienai.

Literatūros apžvalgoje taip pat buvo atkreiptas dėmesys į tai, kad norint sukurti zondus, kurie selektiviai atskirtų tiolius biologiniuose mėginiuose, reikia, kad būtų tenkinamos trys pagrindinės sąlygos. Pirmoji ir labai svarbi – zondų emisijos maksimumai turi būti 650–900 nm elektromagnetinės spinduliuotės srityje, nes biologiniuose mėginiuose 250–600 nm vyksta vietinių biomolekulių autofluorescencija, kuri gali apriboti fluorescuojančių zondų FL nustatymo tikslumą. Yra žinoma, kad didinant cianininių dažiklių konjuguotos dvigubųjų jungčių grandinės ilgį, vyksta batochrominis poslinkis ir absorbcijos, o tuo pačiu ir emisijos maksimumus galima ženkliai paslinkti į raudonąją spektro pusę [46]. Būtent dėl šios priežasties prieš du metus KTU Organinės chemijos katedroje buvo susintetinti cianininiai dažikliai (zondai) **Z1** ir **Z2** su skirtingu dvigubųjų jungčių skaičiumi konjuguotoje grandinėje, jungiančioje elektrondonorinę bei elektronakceptorinę dažiklio dalis (žr. 2.2 lentelė). Pastarieji publikuoti bakalauro darbe [47]. Atlikus fluorescencijos tyrimus 1,4-dioksane, metanolyje, tetrahidrofurane ir dimetilsulfoksido rezultatai parodė, kad **Z1** emisijos maksimumai nepriklauso nuo tirpiklio prigimties ir yra ~ 600 nm elektromagnetinės spinduliuotės srityje. Tuo tarpu **Z2** emisijos maksimumas DMSO siekė 657 nm. Įvertinant tai, jog zondai **Z1** ir **Z2** atitinkamai nepatenka arba iš dalies patenka į ypač patrauklią merkaptaminorūgštims identifikuoti elektromagnetinės spinduliuotės sritį, šiame darbe buvo susintetintas naujas cianininis dažiklis su didesniu dvigubųjų jungčių skaičiumi konjuguotoje grandinėje, siekiant dar labiau emisijos maksimumą paslinkti į raudonąją spektro sritį.

3.1. Cianininio dažiklio sintezė

Inertinėje argono atmosferoje ir ksileno virimo temperatūroje reaguojant 5-bromo-2-tiofenokarboksialdehidui ir diheksilaminui, o taip pat reakcijoje dalyvaujant katalizatoriui trietilaminui, buvo išskirtas tarpinis junginys [5-(diheksilamino)tiofen-2-il]metanalis (**1**). Šį veikiant tributil(1,3-dioksolan-2-ilmetil)fosforo bromidu, dalyvaujant natrio hidridui, o vėlesniame hidrolizės etape druskos rūgščiai, buvo gautas 3-[5-(diheksilamino)tiofen-2-il]propenalis (**2**). Pastarasis sintezės etapas identiška kartojamas iš naujo, siekiant gauti tarpinį junginį 5-[5-(diheksilamino)tiofen-2-il]penta-2,4-dienalį (**4**). Šiam reaguojant su 2-amino-1,1,3-triciano-1-propenu, reakciją vykdant argono aplinkoje ir etanolio virimo temperatūroje, susidarė 2-amino-8-[5-(diheksilamino)tiofen-2-il]okta-1,3,5,7-tetraen-1,1,3-trikarbonitrilas (**5**) su trimis dvigubosiomis -CH=CH- jungtimis

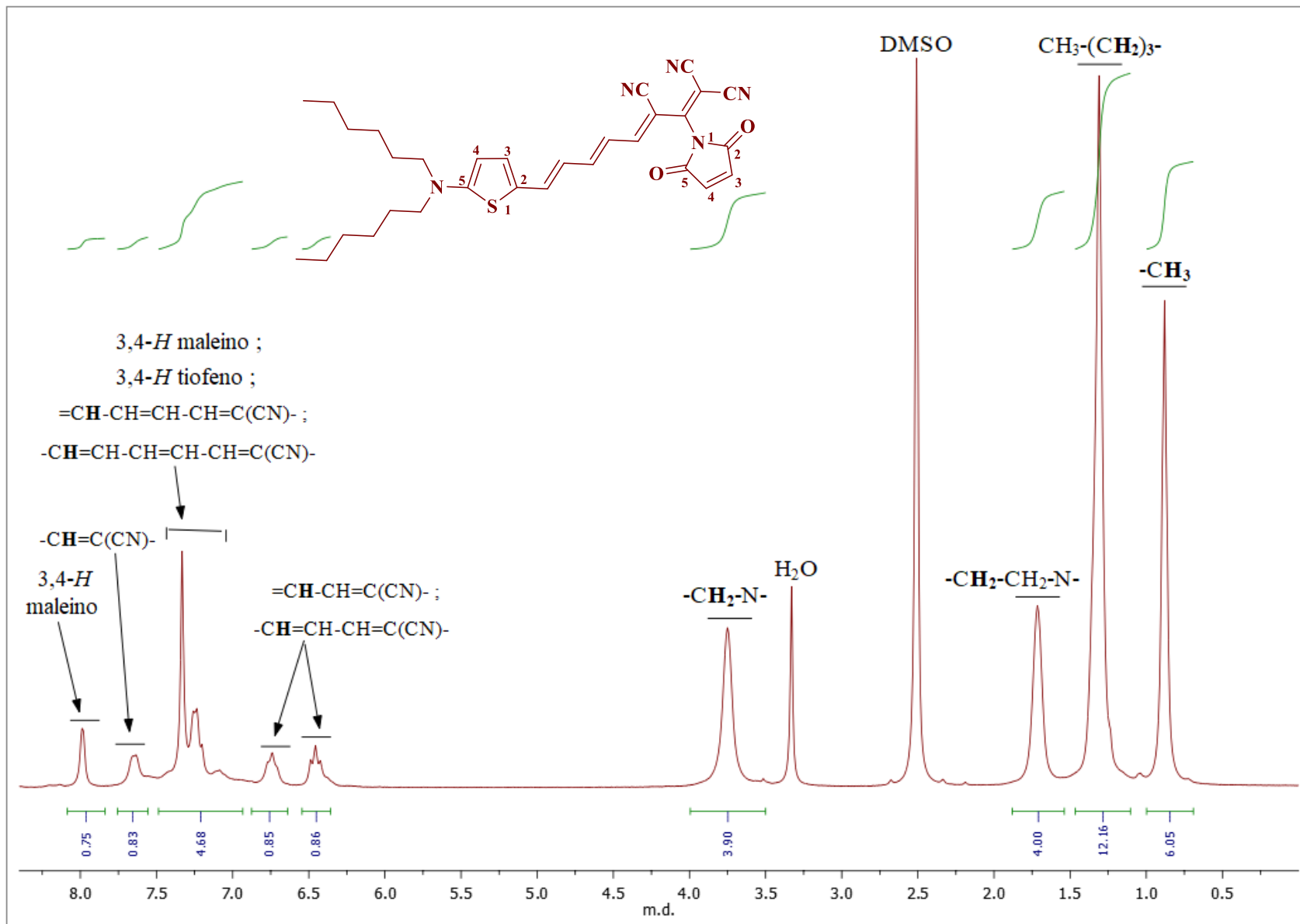
konjuguotoje grandinėje. Paskutinis sintezės etapas vykdytas dichlormetane tarpinį junginį (**5**) kondensuojant su maleino anhidridu, esant katalizatoriui TEA. Išskirtas tikslinis cianininis dažiklis (zondas) 8-[5-(diheksilamino)tiofen-2-il]-2-(2,5-diokso-2,5-dihidro-1*H*-pirol-1-il)okta-1,3,5,7-tetraen-1,1,3 –trikarbonitrilas (**Z3**) (žr. 3.1 schema).



3.1 schema. Cianininio dažiklio (zondo) **Z3** sintezės schema

Susintetinto zondo **Z3** struktūrą patvirtina spektrinės ir elementinės analizės duomenys. ^1H branduolių magnetinio rezonanso spektro (žr. 3.1 pav.) stipresniuose laukuose prie 0,98–0,71 m.d. stebimas metilo grupių multipletas, o intervale ties 1,49–1,13 m.d. $-\text{CH}_2$ grupių dvylikos protonų multipletas. Arčiau azoto $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}-$ ir pat jo $-\text{CH}_2-\text{N}-$ esančių metilinių grupių protonai fiksuojami multiplerais atitinkamai prie 1,90–1,55 ir 4,02–3,54 m.d. $=\text{CH}-\text{CH}=\text{C}(\text{CN})-$ ir $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{C}(\text{CN})-$ multiplėtai matomi prie 6,56–6,36 ir 6,88–6,64 m.d. Prailgintos dvigubųjų jungčių grandinės ($=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{C}(\text{CN})-$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{C}(\text{CN})-$) protonai, esantys 7-oje ir 8-oje konjuguotos grandinės padėtyje, bei 3,4-*H* tiofeno ir vienas maleino protonas spektre stebimi multiplētu ties 7,50–7,03 m.d. $-\text{CH}=\text{C}(\text{CN})-$ grupės protonas išreikštas dubletu prie 7,64 m.d., o tuo tarpu 3- arba 4-*H* maleino protonas fiksuojamas singletu prie 7,99 m.d.

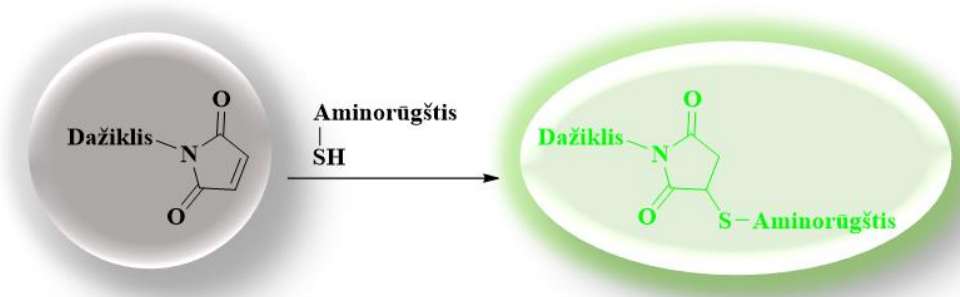
Susintetintas naujas cianininis dažiklis **Z3** buvo panaudotas merkptoaminorūgštims identifikuoti.



3.1 pav. Junginio Z3 ¹H BMR (DMSO, 400 MHz) spektras

3.2. Cianininių dažiklių sąveika su merkaptoaminorūgštimis

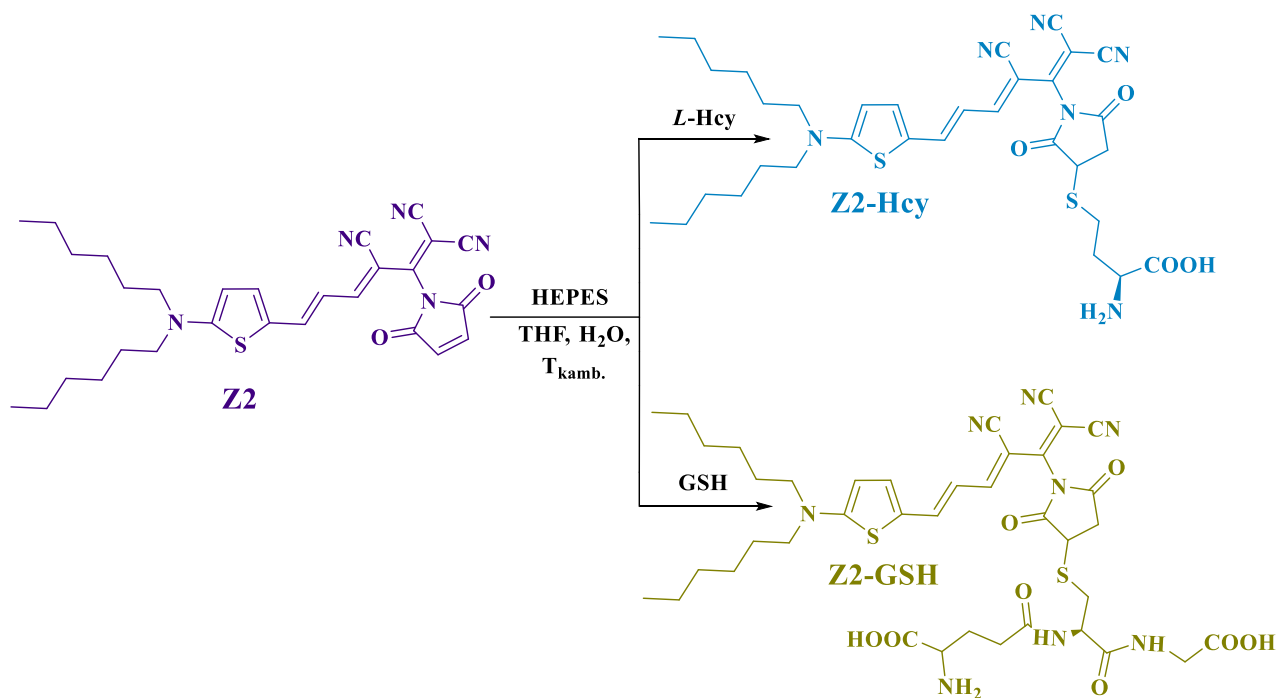
Šios projekto dalies tikslas buvo išskirti junginius – fluorescuojančius zondus. Pastarieji susidaro maleimido fragmentą turinčiam cianininiui dažikliui reaguojant su merkaptoaminorūgštimis. Minėta sąveika remiasi mokslinės literatūros apžvalgoje aprašytu Michaelio fluorescenciniu metodu, kuris naudojamas biotioliams atpažinti. Nukleofilinės reakcijos metu dėl silpnos vandenilio ir sieros ryšio sąveikos inicijuojama tio-Michaelio prijungimo reakcija – reaktyvus akceptorius maleimidas prie savo dvigubosios jungties selektyviai prisijungia tik merkaptoaminorūgštis ir susidaro fluorescuojantis zondas (žr. 3.2 schema).



3.2 schema. Tio-Michaelio prijungimo reakcija

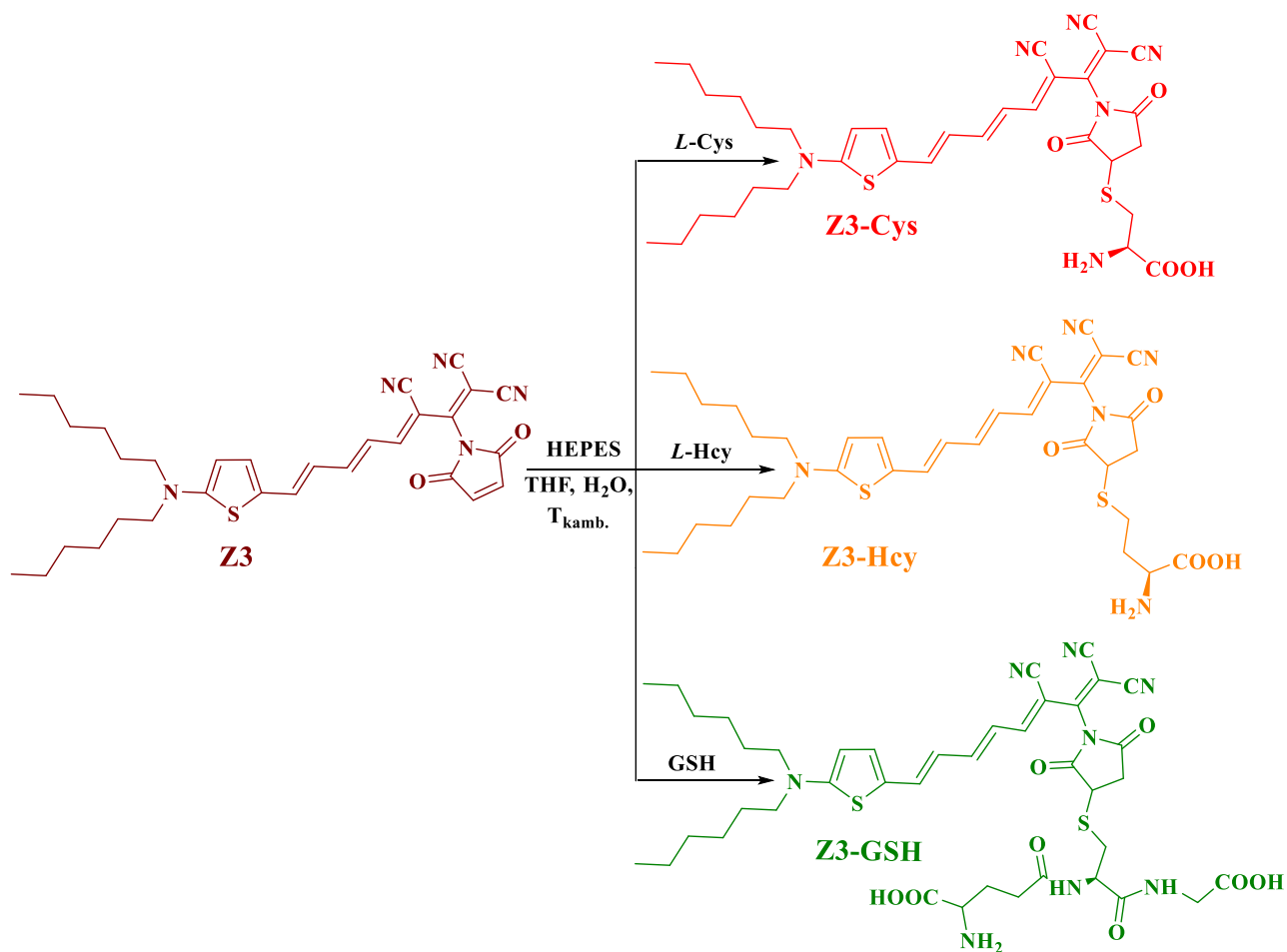
Bakalauro darbe [47] publikuoto cianininio dažiklio **Z1** sąveika buvo tirta su visais trimis biotioliais ir gauti fluorescuojantys zondai **Z1-Cys**, **Z1-Hcy** ir **Z1-GSH**. Dėl lengvesnio fluorescencinio zondo **Z1-Cys** išskyrimo ir didesnių reakcijos išeigų lyginant su analogais **Z1-Hcy** ir **Z1-GSH**, cianininio dažiklio **Z2** su papildoma dvigubąja -CH=CH- jungtimi sąveikai buvo pasirinktas tik biotiolis cisteinas. Todėl toliau tęsiant mokslinius tyrimus, kurie parodo zondo pritaikomumą selektyviam merkaptobiotolių atskyrimui, buvo tirta žymeklio **Z2** sąveika su likusiais dviem tioliais – homocisteinu ir glutationu.

Kambario temperatūroje ekvivalentiniame kiekyje tetrahidrofurano ir dejonizuoto vandens dažiklį **Z2** veikiant *L*-homocisteinu, fiziologinio pH imitavimui reakcijoje dalyvaujant HEPES buferiui, buvo išskirtas merkaptoaminorūgštį prisijungęs tikslinis junginys – fluorescuojantis zondas 2,5-diokso-1-{1,1,3-triciano-6-[5-(diheksilamino)tiofen-2-il]heksa-1,3,5-trien-2-il}pirolidin-3-il-*L*-homocisteinas (**Z2-Hcy**). Analogiškai **Z2** veikiant glutationu susidarė biotolio fragmentą turintis dažiklio **Z2** darinys – fluorescuojantis zondas N⁵-{-1-[(karboksimetil)amino]-3-[(2,5-diokso-1-(1,1,3-triciano-6-(5-(diheksilamino)tiofen-2-il)heksa-1,3,5-trien-2-il)pirolidin-3-il)tio]-1-oksopropan-2-il} glutaminas (**Z2-GSH**) (žr. 3.3 schema).



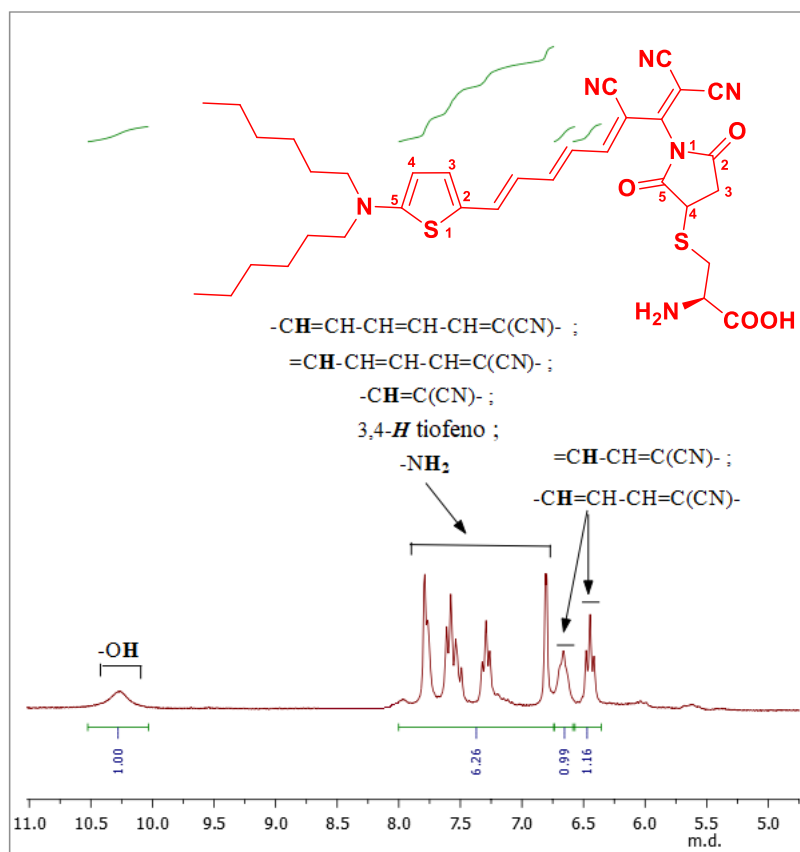
3.3 schema. Cianininio dažiklio (zondo) **Z2** sąveika su merkaptaminorūgštimis

Naujo cianininio dažiklio **Z3** su dviem papildomomis dvigubosiomis $-\text{CH}=\text{CH}-$ jungtimis sąveika buvo tirta su visais trimis biotioliais – cisteinu, homocisteinu ir glutationu. Tikslinių junginių gavimui buvo panaudota anksčiau aprašyta sintezės schema. Zondui **Z3** reaguojant su *L*-cisteinu, *L*-homocisteinu ir glutationu buvo išskirti atitinkami fluorescuojantys zondai 2,5-diokso-1-{1,1,3-triciano-8-[5-(diheksilamino)tiofen-2-il]okta-1,3,5,7-tetraen-2-il}pirolidin-3-il-*L*-cisteinas (**Z3-Cys**), 2,5-diokso-1-{1,1,3-triciano-8-[5-(diheksilamino)tiofen-2-il]okta-1,3,5,7-tetraen-2-il}pirolidin-3-il-*L*-homocisteinas (**Z3-Hcy**) ir N⁵-{1-[(karboksimetil)amino]-3-[(2,5-diokso-1-(1,1,3-triciano-8-(5-(diheksilamino)tiofen-2-il)okta-1,3,5,7-tetraen-2-il)pirolidin-3-il)tio]-1-oksopropan-2-il}glutaminas (**Z3-GSH**) (žr. 3.4 schema).



3.4 schema. Cianininio dažiklio (zondo) **Z3** sąveika su merkaptaminorūgštimis

Gautų fluorescuojančių zondų struktūra patvirtinta elementine analize, o **Z3-Cys** papildomai ir ¹H bei ¹³C BMR spektrinės analizės duomenimis. Šio junginio ¹H branduolių magnetinio rezonanso konjuguotos dalies spektras pateiktas 3.2 pav. Merkaptaminorūgšties cisteino prijungimą liudija iš aromatinės dalies išnykę 3,4-*H* maleino protonų signalai. =CH-CH=C(CN)- ir -CH=CH-CH=C(CN)- multiplėtai matomi prie 6,56–6,36 ir 6,73–6,59 m.d. Atsiradusios aminogrupės, 3,4-*H* tiofeno bei konjuguotos grandinės skirtingoje padėtyje esantys protonai (-CH=C(CN)-, =CH-CH=CH-CH=C(CN), -CH=CH-CH=CH-CH=C(CN)-) stebimi multiplėtu ties 8,00–6,74 m.d. Prie 10,27 m.d. yra fiksuojamas tipinis išplatėjęs karboksigrupės -OH protono singletas.



3.2 pav. Junginio **Z3-Cys** ^1H BMR (DMSO, 400 MHz) aromatinės dalies spektras

Visų aptartų fluorescuojančių zondų susidarymas patvirtino cianininių dažiklių **Z2** ir **Z3** pritaikomumą merkaptaminorūgštims identifikuoti naudojant Michaelio fluorescencinį metodą.

3.3. Optinių savybių tyrimai

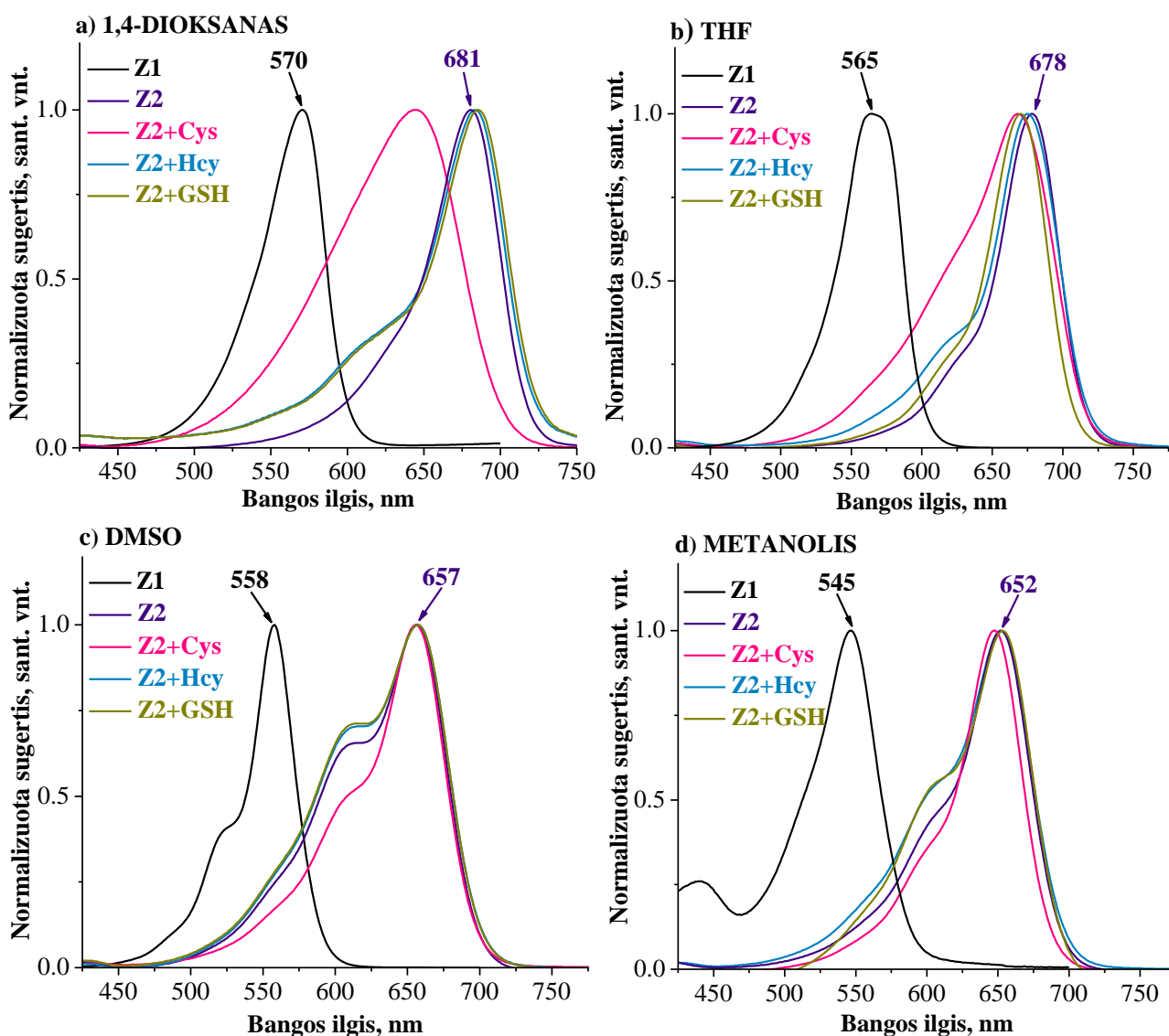
Michaelio prijungimo reakcijos metu susintetinus fluorescuojančius zondus yra svarbu iširti jų optines savybes, kurios parodo, ar žymeklis gali selektyviai atskirti tris biotiolius – Cys, Hcy ir GSH. Literatūros apžvalgoje buvo atkreiptas dėmesys į tris pagrindines sąlygas, kurias turi tenkinti zondai. Pirmoji buvo aptarta ankstesniame skyriuje. Ne mažiau svarbios ir likusios dvi.

1. Didelė skiriamoji geba. Svarbu, kad susidarančių biotolių fluorescuojančių zondų FL spektro emisijos maksimumai būtų hipschromiškai arba batochromiškai pasislinkę tiek vienas kito, tiek pradinio žymeklio atžvilgiu. Pagal šiuos poslinkius galima identifikuoti merkaptaminorūgštis biologiniuose mėginiuose.
2. Prisijungus tiolius stebimas žymus fluorescencijos intensyvumo padidėjimas, kuris priklauso nuo merkaptaminorūgščių koncentracijos žmogaus kraujo serume. Galima sudaryti prototipinius FL spektrus su skirtingomis fluorescuojančio zondo koncentracijomis. Tuomet atlikus tiriamų biologinių mėginių FL spektrų analizę galima sulygtinti gautąjį spektrą su prototipiniu ir sužinoti tikrąją merkaptaminorūgšties koncentraciją žmogaus organizme.

3.3.1. Cianininių dažiklių ir fluorescuojančių zondų sugerties tyrimai

Žinant, kad ypač patrauklūs merkaptoaminorūgštims identifikuoti yra zondai, kurių absorbcijos maksimumas išsidėstęs 650–900 nm elektromagnetinės spinduliuotės srityje, buvo užrašyti žymeklių **Z2** ir **Z3** bei jų pagrindu sukurtų fluorescuojančių zondų UV/RŠ spinduliuotės sugerties spektrai. Norint įvertinti tirpiklio įtaką absorbcijos spektrai buvo užrašyti keturiuose skirtinguose tirpikliuose – THF, 1,4-dioksane, metanolyje ir DMSO. Bangos ilgiai, kai junginių ekstincija pasiekia maksimumą, buvo panaudoti tolimesniuose fluorescencijos tyrimuose – FL sužadinimui.

Mokslinėje literatūroje [47] publikuoto cianininio dažiklio **Z2** ir jo pagrindu sukurto fluorescuojančio zondo **Z2-Cys** optinės savybės buvo tirtos tik DMSO tirpiklyje. Jis buvo pasirinktas, atsižvelgus į analogų – **Z1** ir jo fluorescuojančių zondų **Z1-Cys**, **Z1-Hcy** ir **Z1-GSH** – geresnę tirpumą ir intensyvesnę FL lyginant su kitais trimis tirpikliais. Todėl toliau tęsiant mokslinius tyrimus zondo **Z2** su papildoma dvigubąja -CH=CH- jungtimi konjuguotoje grandinėje ir jo fluorescuojančių zondų **Z2-Cys** (aprašytas mokslinėje literatūroje [47]), **Z2-Hcy** ir **Z2-GSH** (naujai susintetinti) optinės savybės buvo iširtos visuose keturiuose tirpikliuose – THF, 1,4-dioksane, metanolyje ir DMSO (žr. 3.3 pav.).

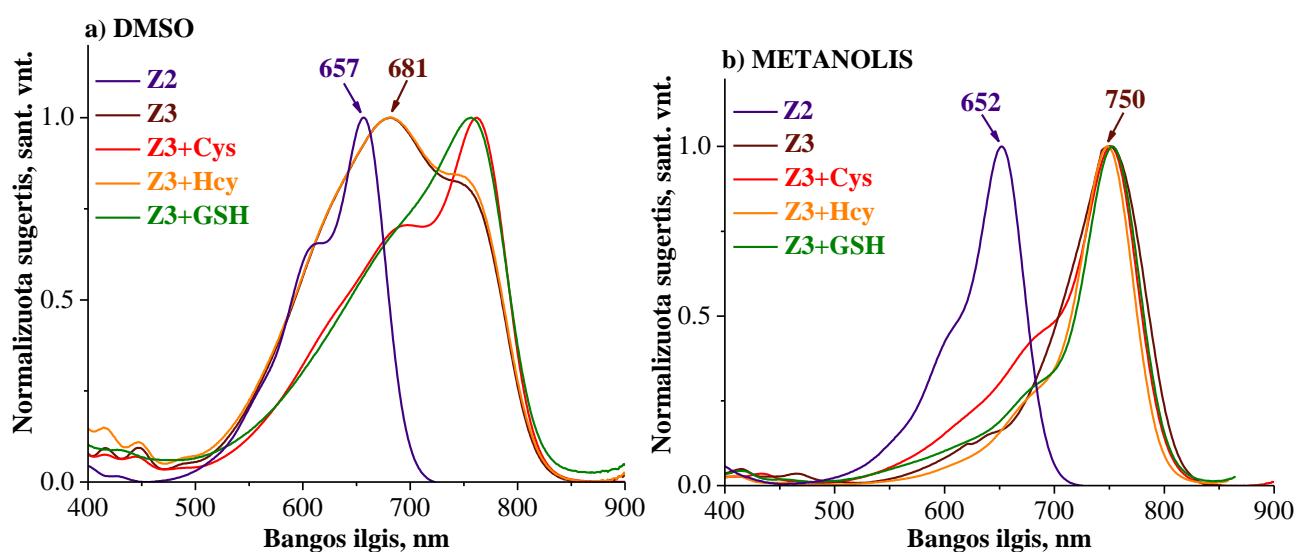


3.3 pav. Junginių tirpalų RŠ spinduliuotės sugerties spektrai ($c = 10^{-4}$ mol/l, $d = 1$ mm)

Dėl aiškesnio poslinkių palyginimo dimetilsulfoksido grafike pateiktos ir **Z2** bei **Z2-Cys** absorbcijos kreivės iš bakalauro darbo [47]. Konjuguotos dvigubųjų jungčių grandinės ilgio įtakos absorbcijos maksimumo poslinkiui į raudonąją spektro pusę įvertinimui grafikuose pateikti ir zondo **Z1** absorbcijos maksimumai iš tos pačios mokslinės literatūros.

Iš 3.3 pav. matyti, kad toliams identifikuoti naudoto zondo **Z2** ir jo darinių absorbcijos juostų maksimumai nedaug priklauso nuo tirpiklio prigimties ir yra išsidėstę 650–680 nm elektromagnetinės spinduliuotės srityje. Taip pat akivaizdu, kad konjuguotos grandinės prailginimas viena papildoma -CH=CH- jungtimi žymeklių ir fluorescuojančių zondų absorbcijos maksimumus visuose tirpikliuose paslino į ilgesnių bangų pusę ~ 110 nm.

Toliau sugerties tyrimai buvo atlikti naujam cianininiui dažikliui **Z3** ir jo fluorescuojantiems zondams **Z3-Cys**, **Z3-Hcy** ir **Z3-GSH** (žr. 3.4 pav.). Šiuo atveju buvo naudoti tik du tirpikliai – DMSO ir metanolis, nes THF ir 1,4-dioksane junginiai neištirpo.



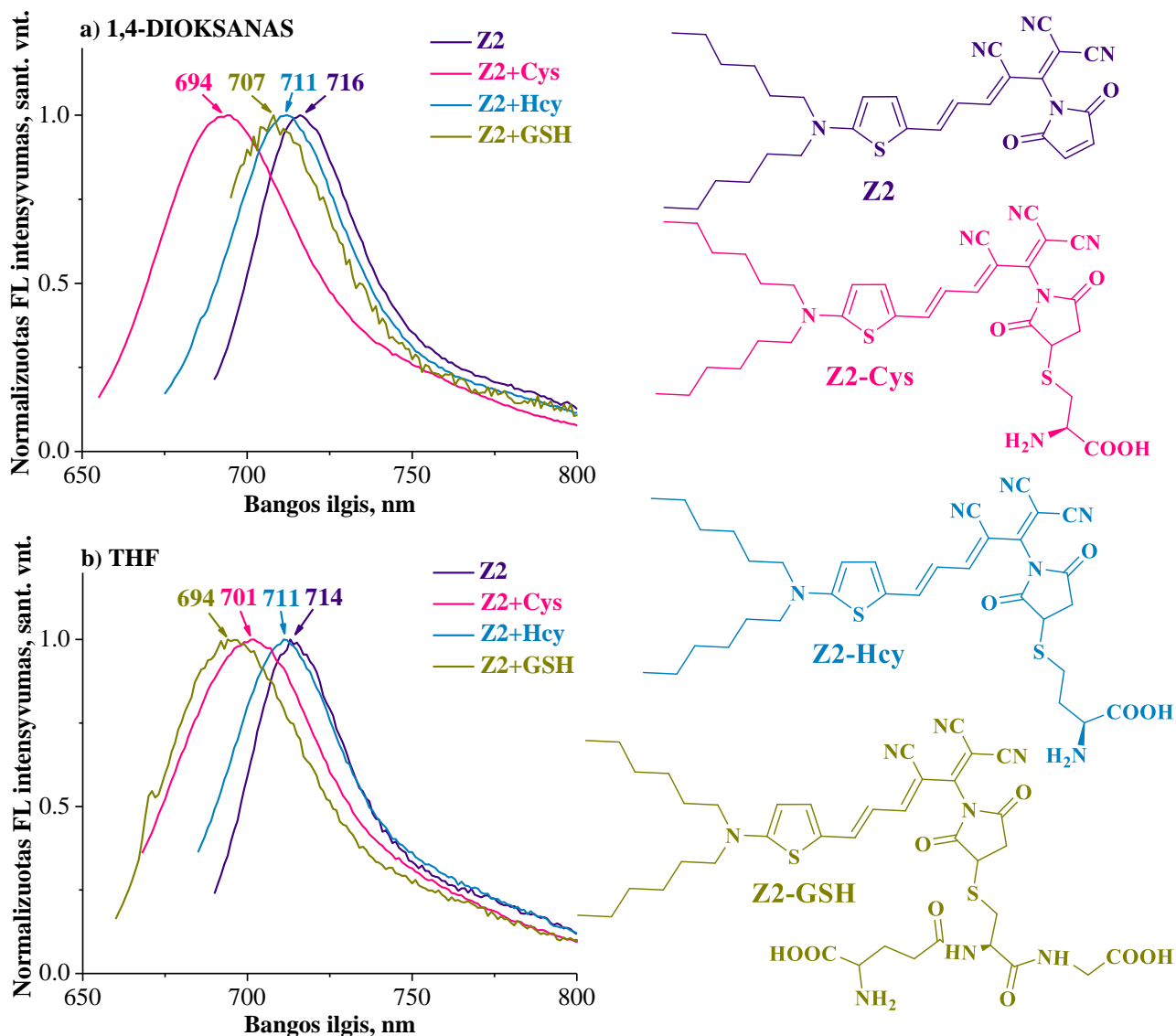
3.4 pav. Junginių tirpalų RŠ spinduliuotės sugerties spektrai ($c = 10^{-4}$ mol/l, $d = 1$ mm)

Pažvelgus į 3.4 pav. matyti, kad žymeklio **Z3** ir jo pagrindu susintetinto fluorescuojančio zondo su homocisteinu **Z3-Hcy** absorbcijos maksimumai DMSO tirpiklyje yra ties 681 nm, o **Z3-Cys** ir **Z3-GSH** pradinio zondo atžvilgiu pasislinkę batochromiškai ~ 80 nm. Tuo tarpu metanolyje visų minėtų junginių absorbcijos yra ties 750 nm. Sugerties spektrai abiejuose tirpikliuose demonstruoja pastarųjų įtaką batochrominiam poslinkiui, kuris priklauso nuo didėjančio dvigubųjų jungčių skaičiaus konjuguotoje grandinėje, jungiančioje elektrondonorinę ir elektronaceptorinę dažiklio dalis. Užrašius sugerties spektrą dimetilsulfoksido tirpiklyje matoma, kad zondo **Z3** su dviem papildomomis -CH=CH- jungtimis absorbcijos maksimumas lyginant su trumpesniu jo analogu **Z2** batochromiškai pasislinko tik 24 nm. Tuo tarpu metanolio tirpiklyje užrašytas UV/RŠ spinduliuotės sugerties spektras pasižymėjo geresniais rezultatais – absorbcijos maksimumas beveik 100 nm pasislinko į raudonąją spektro pusę ir tikrai patenka į reikiamą biotoliams identifikuoti elektromagnetinės spinduliuotės sritį.

Užrašius visų junginių sugerties spektrus ir nustatius žymeklių **Z2** ir **Z3** bei jų darinių su merkaptobiotoliais sužadinimo bangų ilgius, toliau buvo atlikti fluorescencijos matavimai.

3.3.2. Cianininių dažiklių ir fluorescuojančių zondų fluorescencijos tyrimai

Iš pradžių FL tyrimai buvo atliekami žymekliui **Z2** ir jo pagrindu sukurtiems fluorescuojantiems zondams **Z2-Cys**, **Z2-Hcy** ir **Z2-GSH**. Fluorescencijos matavimai 1,4-dioksane ir tetrahidrofurane pateikiami normalizuotais spektrais, nes junginiai juose sunkiai tirpo (žr. 3.5 pav.). Stebima, kaip zondas **Z2** pagal hipsochrominius poslinkius identifikuoja merkaptaminorūgštis.

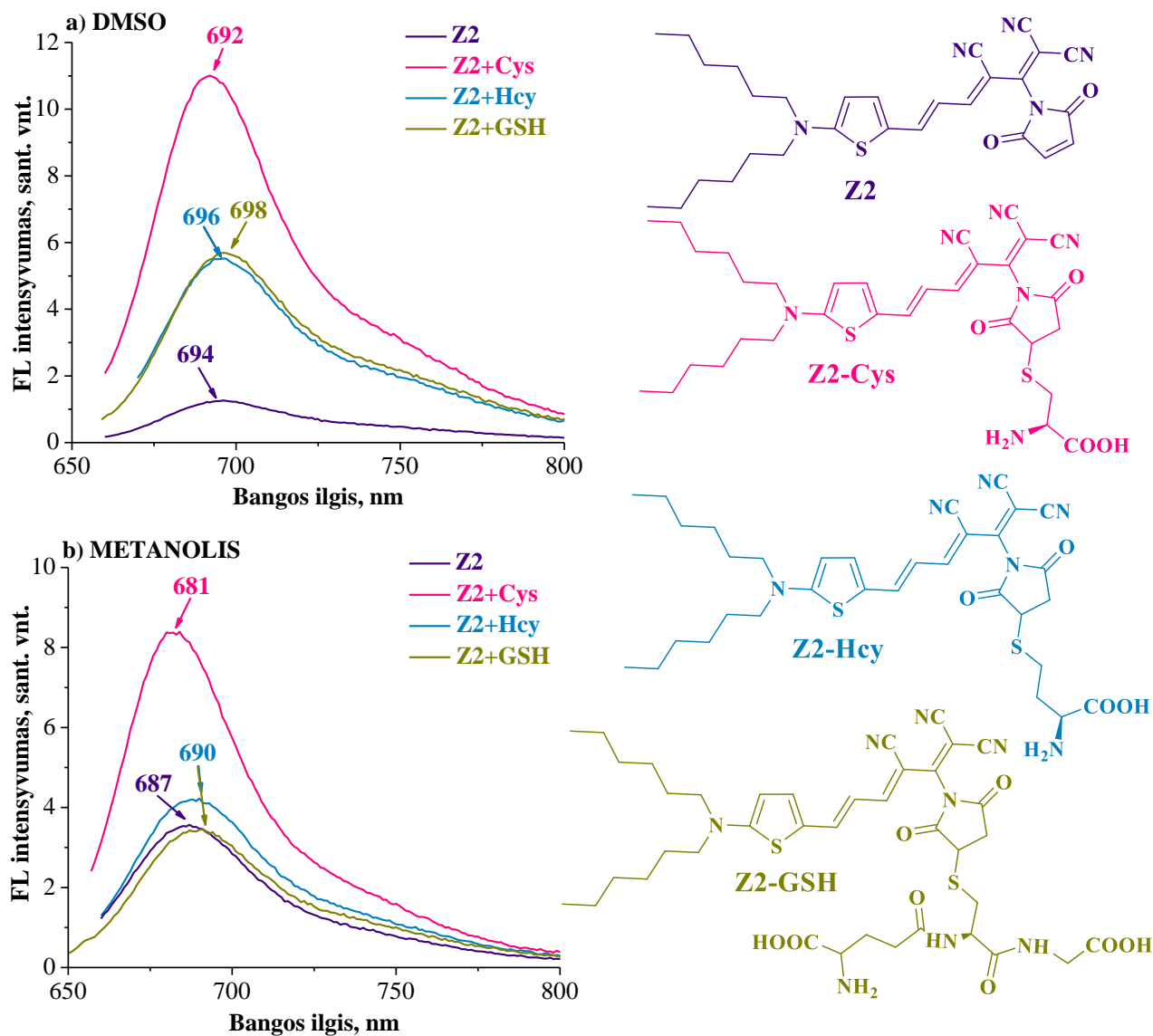


3.5 pav. Junginių tirpalų FL spektrai ($c = 10^{-5}$ mol/l, $d = 1$ cm)

Įvertinus 3.5 pav. pateiktus duomenis akivaizdu, kad zondas **Z2** 1,4-dioksane iš trijų merkaptaminorūgščių selektyviausiai atskiria biotiolį cisteiną, nes stebimas **Z2-Cys** junginio poros dešimčių nm hipsochrominis poslinkis pradinio žymeklio atžvilgiu ($\lambda_{\max} \sim 694$ nm). Homocisteino ir glutationo fluorescuojančių zondų FL maksimumai taip pat hipsochromiškai pasislinkę kas penkis nm vienas kito bei zondo **Z2** atžvilgiu. Atitinkamai jų emisijos maksimumai yra 711 ir 707 nm. Tuo tarpu tetrahidrofurane labiausiai hipsochromiškai pasislinkęs yra **Z2-GSH** ($\lambda_{\max} \sim 694$ nm). Taip pat lengvai identifikuojamas gali būti ir biotiolis cisteinas, nes jo poslinkis pradinio zondo **Z2** atžvilgiu yra 13 nm. Mažiausiai hipsochromiškai pasislinkęs yra **Z2-Hcy**, tačiau jo ir pradinio žymeklio ekstincijos vistiek nepersidengia. Abibendrinant galima sakyti, kad zondas **Z2** tiek 1,4-dioksane, tiek THF gali identifikuoti merkaptobiomolekules. Beto, visų junginių FL emisijos maksimumai šiuose

tirpikliuose patenka į reikalingą merkaptoaminorūgštims identifikuoti 650–900 nm elektromagnetinės spinduliuotės sritį.

Žymeklį **Z2** ir jo pagrindu sukurtus fluorescuojančius zondus pavykus pilnai ištirpinti metanolyje ir DMSO, buvo galima įvertinti ne tik junginių emisijos maksimumų hipsochrominius ar bathochrominius poslinkius, bet ir žymų FL intensyvumo padidėjimą, kai zondas prisijungia biotilius (žr. 3.6 pav.).



3.6 pav. Junginių tirpalų FL spektrai ($c = 10^{-5}$ mol/l, $d = 1$ cm)

Dėl aiškesnio emisijos poslinkių palyginimo dimetilsulfoksido grafike pateiktos ir **Z2** bei **Z2-Cys** absorbcijos kreivės iš bakalauro darbo [47]. Matoma, kad šiame tirpiklyje visi biotiliai yra pasislinkę minimaliais hipsochrominiu ir bathochrominiais poslinkiais pradinio zondo **Z2** su papildoma dvigubą $-\text{CH}=\text{CH}-$ jungtimi konjuguotoje grandinėje atžvilgiu. Tuo tarpu metanolio tirpiklyje gali būti identifikuojama tik merkaptoaminorūgštis cisteinas ($\lambda_{\text{max}} \sim 681$ nm), nes **Z2-Hcy** ir **Z2-GSH** emisijos maksimumai vienodi – ties 690 nm.

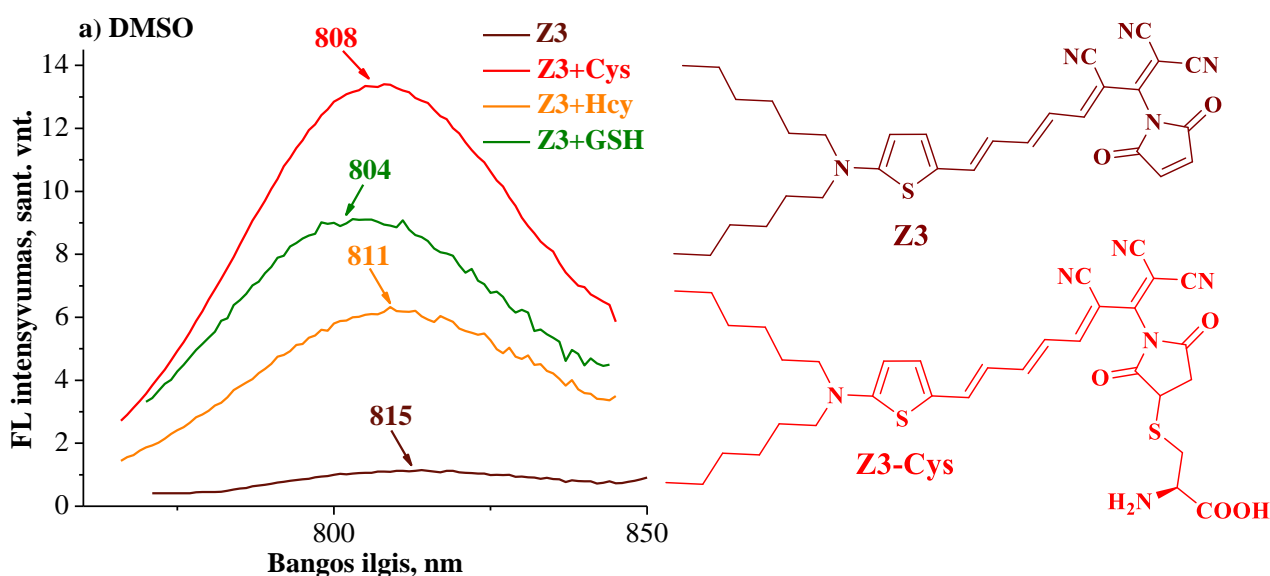
Akivaizdu, jog DMSO yra geriausiai tinkantis tirpiklis vertinti fluorescencijos intensyvumo padidėjimą, kai zondas prisijungia biotilius. Palyginus bakalauro darbe [47] atliktus tyrimus su

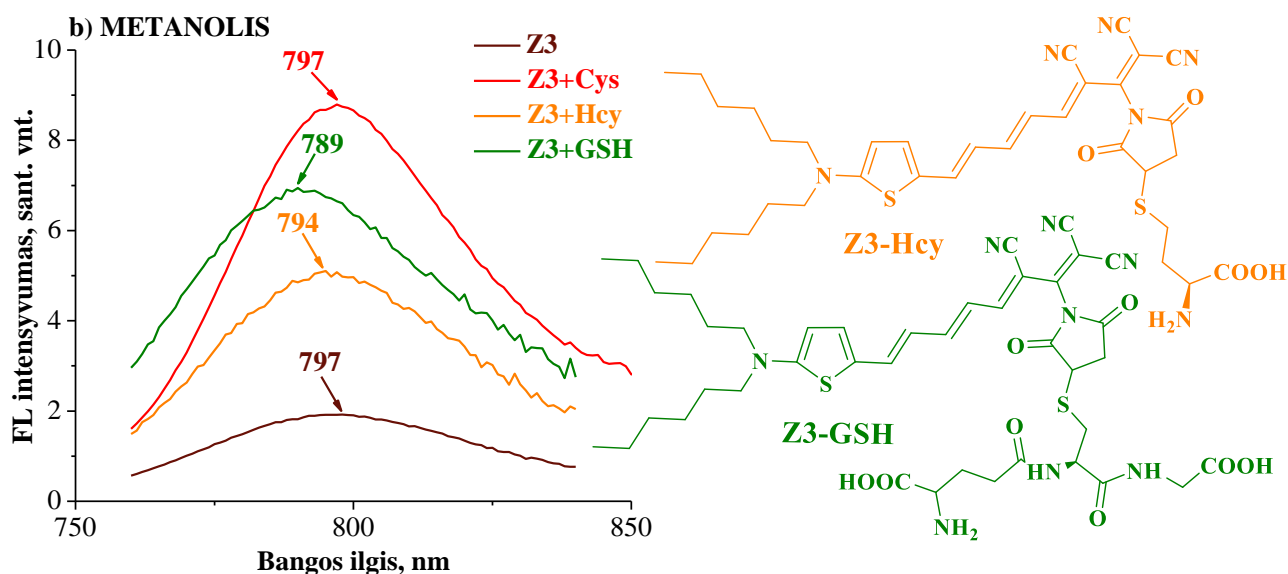
analogu **Z1** matoma ta pati tendencija. **Z1-Cys** fluorescavo geriau už kitus merkaptobiomolekulių darinius **Z1-Hcy** ir **Z1-GSH**, o šis žymus FL intensyvumo šuolis taip pat stebėtas dimetilsulfoksido. Buvo nustatyta, kad **Z1-Cys** FL intensyvumas lyginant su pradiniu junginiu **Z1** padidėjo net 6,5 karto. Cisteino dariniui buvo apskaičiuota ir FL kvantinė išeiga, kuri siekė 0,73 %. Iš 3.6 pav. matyti, kad DMSO **Z2-Cys** vėlgi intensyviau fluorescavo už savo analogus **Z2-Hcy** ir **Z2-GSH**. Stebimas akivaizdus FL padidėjimas, kuris lyginant su pradiniu cianininiu dažikliu **Z2** išaugo net 9 kartus. Cisteino darinio fluorescencijos kvantinė išeiga siekė 7,5 %. Iš tokių rezultatų stebima dar viena tendencija, jog padidinus konjuguotos dvigubųjų jungčių grandinės ilgį ir prijungus merkaptoaminorūgštį stebimas ne tik batochrominis emisijos maksimumo poslinkis, bet ir fluorescavimo intensyvumo bei FL kvantinės išeigos padidėjimai.

Metanolio tirpiklyje taip pat geriausiai fluorescavo **Z2-Cys**, tačiau jo FL intensyvumas lyginant su pradiniu zondų **Z2** padidėjo tik 2,5 karto.

Siekiant įvertinti konjuguotos grandinės tarp donorinės ir akceptorinės dažiklio dalių ilgio įtaką fluorescuojančio zondo FL savybėms toliau buvo atlikti tyrimai su dvi papildomas dvigubąsias jungtis -CH=CH- turinčiu cianininiu dažikliu **Z3** ir jo pagrindu sukurtais fluorescuojančiais zondais (žr. 3.7 pav.). Junginiai 1,4-dioksane ir THF neištirpo, todėl FL tyrimai buvo atlikti tik DMSO ir metanolio tirpikliuose.

Analizuojant 3.7 pav. rezultatus akivaizdu, kad konjuguotos grandinės prailginimas turėjo teigiamų rezultatų emisijos maksimumus ženkliai paslenkant batochromiškai ir šiems patenkant į artimąją IR spinduliuotės sritį. DMSO tirpiklyje žymeklio **Z3** FL maksimumas lyginant su jo analogu **Z2** batochromiškai pasislinko net 121 nm, o metanolyje – 110 nm. Tai puikus rezultatas siekiant identifikuoti tiolius, nes dabartinėje mokslinėje literatūroje nėra pateikta duomenų apie zondus, kurių emisijos maksimumai būtų toliau nei 800 nm elektromagnetinės spinduliuotės srityje. Taip pat galima teigti, jog toliau ilginti zondo konjuguotą grandinę yra netikslinga, nes FL maksimumai gali nepatekti į fluorescencijos aparatų identifikavimo ribas.





3.7 pav. Junginių tirpalų FL spektrai ($c = 10^{-5}$ mol/l, $d = 1$ cm)

Matoma, kad dimetilsulfoksido tirpiklyje visi biotioliai yra pasislinkę skirtingais hipsochrominiais poslinkiais pradinio zondo **Z3** su papildomomis $-\text{CH}=\text{CH}-$ jungtimis konjuguotoje grandinėje atžvilgiu. Labiausiai nutolęs yra glutationo fluorescuojantis zondas **Z3-GSH**, kurio emisijos maksimumas yra ties 804 nm. Cisteino ir homocisteino darinių FL intensyvumai atitinkamai yra 808 ir 811 nm elektromagnetinės spinduliuotės srityje. Tuo tarpu metanolio tirpiklyje **Z3** ir **Z3-Cys** emisijos maksimumai yra vienodi – ties 797 nm. Daugiausiai hipsochromiškai pasislinkęs ir lengviausiai identifikuojamas gali būti glutationas, nes stebimas beveik 10 nm poslinkis pradinio žymeklio atžvilgiu. Homocisteinas, kurio emisijos maksimumas yra ties 794 nm., taip pat gali būti identifikuojamas.

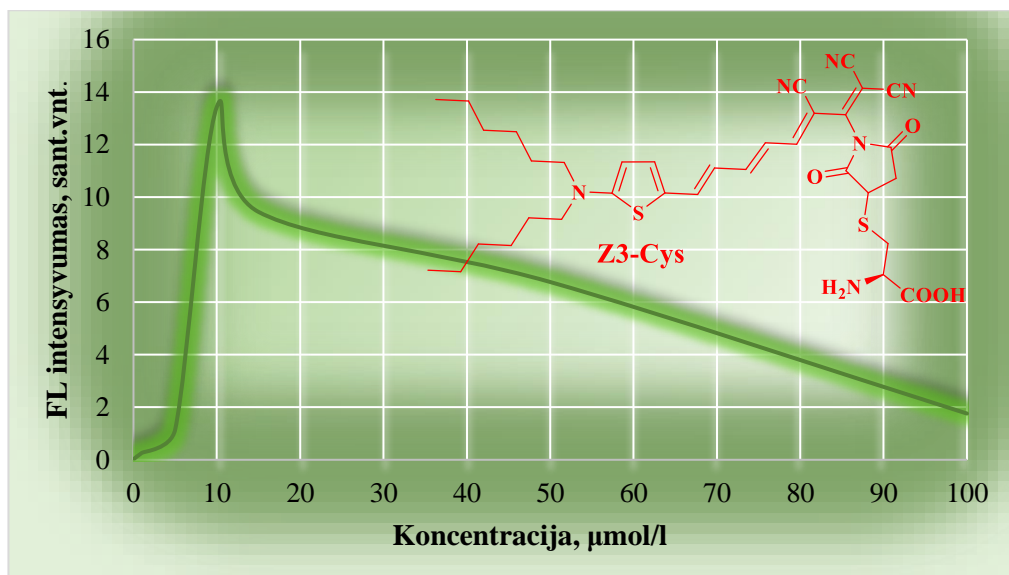
Akivaizdu, jog DMSO gali būti naudojamas ne tik merkaptobiotioliams identifikuoti pagal hipsochrominius poslinkius. Jis ir vėl yra tinkamiausias tirpiklis įvertinti FL intensyvumo padidėjimą susidarius fluorescuojantiems zondams. Lyginant su žymekliais **Z1** ir **Z2** bei jų darinių analogais tendencija išlieka ta pati. **Z3-Cys** vėlgi intensyviau fluorescavo už homocisteino ir glutationo fluorescuojančius zondus. Stebimas akivaizdus FL padidėjimas, kuris lyginant su pradinio žymekliu **Z3** išaugo net 12 kartų. Cisteino darinio fluorescencijos kvantinė išėiga siekė 9,7 %. Pasitvirtina ir hipotezė, kad padidinus konjuguotos dvigubųjų jungčių grandinės ilgį ir prijungus merkaptoaminorūgštį, stebimi fluorescavimo intensyvumo bei kvantinės išėigos padidėjimai.

Metanolyje taip pat geriausiai fluorescavo **Z3-Cys**, tačiau cisteino merkaptoaminorūgštis šiame tirpiklyje žymeklis **Z3** negali selektyviai atskirti, todėl ir FL intensyvumo padidėjimas didelės reikšmės tyrimams neturi.

Atlikus visų žymeklių ir jų pagrindu sukurtų fluorescuojančių zondų FL tyrimus skirtinguose tirpikliuose ir nustčius labiausiai fluorescuojančius biotolių darinius toliau buvo atliekami kiekybinės analizės FL eksperimentai. Mokslinėje literatūroje [31] yra teigiama, kad fluorescencijos intensyvumas priklauso nuo biotolio koncentracijos. Todėl bakalauro darbe [47] buvo atlikti koncentracijos įtakos FL intensyvumui tyrimai su geriausiai DMSO fluorescavusiais cisteino dariniais. Sukurti prototipiniai FL intensyvumo spektrai naudojant skirtingas biotolių koncentracijas (1–100 $\mu\text{mol/l}$). Buvo nustatyta, kad esant junginio **Z1-Cys** koncentracijai iki 10 $\mu\text{mol/l}$ fluorescencijos intensyvumas kyla, o pasiekus šią kritinę ribą pradeda mažėti. Naudojant biotolio

darinį **Z2-Cys** išliko ta pati FL intensyvumo pokyčio tendencija ir jos maksimumas buvo pasiektas kai merkaptoaminorūgšties koncentracija lygi 10 $\mu\text{mol/l}$.

Toliau tęsiant mokslinius tyrimus, prototipinis FL intensyvumo spektras buvo užrašytas dimetilsulfoksido tirpiklyje, naudojant skirtingų koncentracijų geriausiai fluorescavusį žymeklio **Z3** darinį **Z3-Cys** (žr. 3.8 pav.).



3.8 pav. Junginio **Z3-Cys** skirtingų koncentracijų tirpalų FL spektras ($d = 1 \text{ cm}$)

Iš 3.8 pav. matyti fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo skirtingų biotiolio koncentracijų (0,1–100 $\mu\text{mol/l}$). Stebima tokia pati tendencija, kaip ir analogų – žymeklių **Z1** ir **Z2** pagrindu sukurtų cisteino darinių – FL intensyvumas didžiausias, kuomet junginio **Z3-Cys** koncentracija lygi 10 $\mu\text{mol/l}$.

Atlikus abiejų žymeklių **Z2** ir **Z3** bei visų jų pagrindu sukurtų fluorescuojančių zondų optinius tyrimus galima išskirti kelis tinkamiausius būdus merkaptoaminorūgštims identifikuoti. Zondui **Z2** 1,4-dioksanas ir THF yra selektyviausi tirpikliai, nes pagal hipsochrominius poslinkius jo padėties atžvilgiu gali būti identifikuojami visi trys merkaptobiotioliai – Cys, Hcy ir GSH – atskirai. DMSO – pats tinkamiausias stebėti fluorescuojančių zondų FL intensyvumą ir įvertinti kvantines išeigas. Taip pat akivaizdu, jog papildoma dviguboji $-\text{CH}=\text{CH}-$ jungtis konjuguotoje grandinėje absorbcijos maksimumą ženkliai paslenka batochromiškai ir jis patenka į reikalingą merkaptoaminorūgštims identifikuoti 650–900 nm elektromagnetinės spinduliuotės sritį.

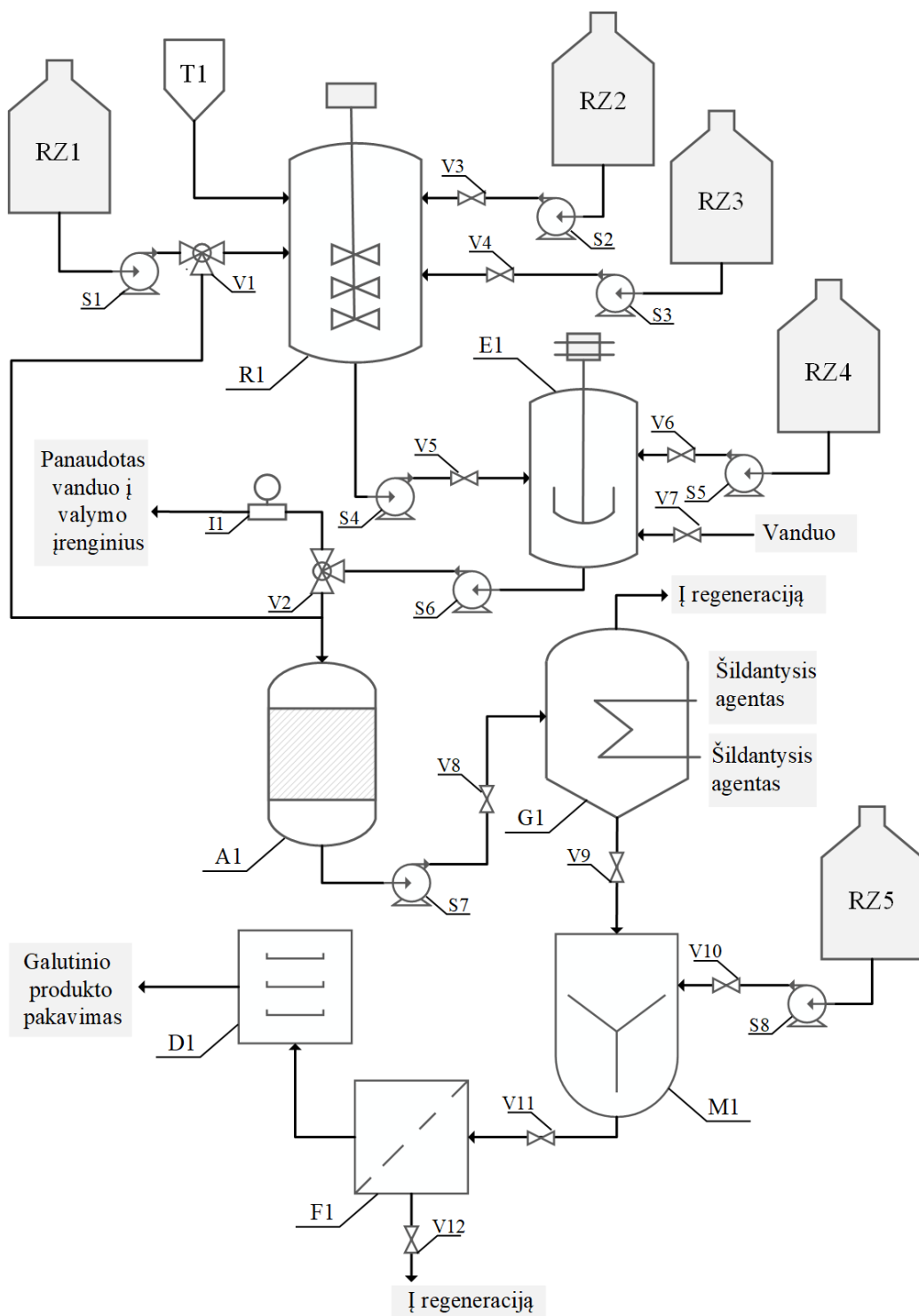
Zondas **Z3** su trim dvigubosiomis $-\text{CH}=\text{CH}-$ jungtimis parodė dar geresnius identifikavimo ir fluorescencijos intensyvumo rezultatus. Nors jo pagrindu sukurti cisteino, homocisteino ir glutatono dariniai neištirpo 1,4-dioksano ir THF tirpikliuose, tačiau jie gali būti identifikuojami DMSO. Būtent jame merkaptobiotolio cisteino fluorescuojantis zondas **Z3-Cys** parodė akivaizdžiai didesnę FL intensyvumą ir žymiai geresnę kvantinę išeigą lyginant su analogais **Z1-Cys** ir **Z2-Cys**. Atsižvelgiant į tokius rezultatus, galima daryti išvadą, jog konjuguotos dvigubosios grandinės ilginimas turi įtakos ne tik absorbcijos maksimumų poslinkiams ilgesnių bangų link, bet ir FL intensyvumui bei kvantinės išeigos didėjimui. Žymeklio **Z3** FL maksimumas lyginant su jo analogu **Z2** batochromiškai pasislinko net 121 nm ir buvo ties 815 nm. Tai puikus rezultatas siekiant identifikuoti tiolius, nes dabartinėje

mokslinėje literatūroje nėra pateikta duomenų apie zondus, kurių emisijos maksimumai būtų toliau nei 800 nm elektromagnetinės spinduliuotės srityje.

Taigi, nauji maleimido fragmentą turintys cianininiai dažikliai sėkmingai gali būti naudojami selektyviai atskirti biotiolius tarpusavyje.

4. Rekomendacijų dalis

Projekte susintetinti skirtingą dvigubųjų jungčių skaičių konjuguotoje grandinėje turintys zondai **Z2** ir **Z3** gali būti sėkmingai naudojami merkapt amino rūgštims identifikuoti biologiniuose mėginiuose. Tris dvigubąsias jungtis chromofore turintis zondas **Z3** fluorescencijos maksimumą paslinko į 815 nm elektromagnetinės spinduliuotės sritį, kuri yra ypač patraukli biotiliams identifikuoti. Iš šio žymeklio susidaręs cisteino fluorescuojantis zondas **Z3-Cys** parodė geriausius fluorescencijos intensyvumo rezultatus, todėl šiam junginiui buvo suprojektuota gamybos aparatūrinė schema (žr. 4.1 schema).



4.1 schema. Fluorescuojančio zondo **Z3** gamybos principinė aparatūrinė schema

4.1 lentelė. Įrangos sąrašas

Sutrumpinimas	Įrangos pavadinimas
R1	Reaktorius
RZ1–RZ5	Tirpiklių rezervuaras
T1	Pradinio junginio talpykla
S1–S8	Siurblys
V1–V2	Trijų kelių vožtuvas
V3–V12	Vožtuvas
E1	Ekstraktorius
I1	pH indikatorius
A1	Adsorberis
G1	Garintuvas
M1	Maišyklė
F1	Filtru
D1	Džiovyklė

Pradinis junginys **Z3** iš talpyklos **T1** dozuojamas į reaktorių **R1**, kur yra ištirpinamas siurbliu **S1** iš rezervuaro **RZ1** tiekiamu THF. Įjungiami reaktoriaus maišyklė. Rezervuaruose **RZ2** ir **RZ3** atitinkamai yra vandenyje ištirpintas biotiolis *L*-cisteinas ir fiziologiniam pH imituoti reikalingas HEPES buferis. Abu tirpalai siurbliais **S2** ir **S3** vienu metu tiekiami į reaktorių **R1**. Mišinys maišomas aplinkos temperatūroje tol, kol iš paimto mėginio užfiksuojama reakcijos pabaiga, ir siurbliu **S4** tiekiamas į ekstraktorių **E1**. Tuo tarpu reaktorius praplaunamas iš rezervuaro **RZ1** paduotu THF, kuris vėliau taip pat patenka į ekstraktorių **E1**. Į pastarąjį yra prileidžiama vandens ir pripilama etilacetato iš rezervuaro **RZ4**. Susidariusi dvifazė sistema išmaišoma. Palaukus, kol vanduo ir organiniai tirpikliai vėl išsiskirstys į atskiras fazes, vanduo išleidžiamas į valymo įrenginius. Vanduo į ekstraktorių pakartotinai leidžiamas ir iš jo išleidžiamas tol, kol pH indikatorius **I1** užfiksuoja neutralią ištekancio vandens pH reikšmę. Tuomet organinis tirpalas siurbliu **S6** yra tiekiamas į adsorberį **A1**, kuriame bevandeniu natrio sulfatu yra sugerama tirpale likusi drėgmė. Praleistas per įkrovą organinis tirpalas toliau tiekiamas į garintuvą **G1**. Siekiant išvengti produkto nuostolių, adsorberyje susidaręs natrio sulfato kristalohidratas pakartotinai yra praplaunamas THF, tiekiamu iš rezervuaro **RZ1**. Garintuve **G1** iš reakcijos mišinio yra atskiriami organiniai tirpikliai, kurie sukondensuojami ir nukreipiami regeneracijai. Likęs produktas su minimaliu kiekiu organinių tirpiklių yra nukreipiamas į maišyklę **M1**. Į pastarąją iš rezervuaro **RZ5** siurbliu **S8** yra tiekiamas eteris. Maišantis organiniam likučiu ir tirpikliui iškrenta švaraus galutinio produkto nuosėdos. Susidarę kristalai nufiltruojami filtru **F1**. Filtratas tiekiamas regeneracijai. Nufiltruotas švarus galutinis produktas yra perkeliamas į džiovyklą **D1**, o išdžiūvęs gali būti pakuojamas ir tiekiamas prekybai.

Atsižvelgus į projekte aptartus rezultatus akivaizdu, jog toliau ilginti zondo konjuguotą grandinę yra netikslinga, nes FL maksimumai gali nebepatekti į fluorescencijos aparatų identifikavimo ribas. Tačiau tolimesniems moksliniams tyrimams galima suformuluoti kitokias gaires.

1. Naujų tirpiklių parinkimas. Išmatuoti žymeklių **Z2** ir **Z3** bei iš jų susidariusių fluorescuojančių zondu **Z2-Cys**, **Z2-Hcy**, **Z2-GSH**, **Z3-Cys**, **Z3-Hcy**, **Z3-GSH** optines savybes kituose organiniuose tirpikliuose pvz. acetone, toluene it kt. Stebėti, ar pagal hipsochrominius ir batochrominius poslinkius gali būti identifikuojami biotioliai.
2. Naujų chromoforų parinkimas. Nauji chromoforai gali praplėsti identifikavimo galimybes. Tačiau jie taip pat turi turėti konjuguotą grandinę, kurios ilgininimas, kaip jau buvo nustatyta, FL emisijos maksimumus batochromiškai paslinktų į 650–900 nm elektromagnetinės spinduliuotės sritį.

Tikimasi, kad šios gairės ateityje praplės biotolių identifikavimo galimybes biologiniuose mėginiuose.

Išvados

1. Naudojant instrumentinės analizės metodus įrodyta, jog buvo susintetinti zondai su skirtingu dvigubųjų jungčių skaičiumi konjuguotoje grandinėje, jungiančioje elektrondonorinę bei elektronakceptorinę dažiklio dalis.
2. Įrodyta, kad sėkmingai susidarė visų trijų merkaptobiotolių – cisteino, homocisteino ir glutationo – fluorescuojantys zondai taikant Michaelio prijungimo maleimido reakcijos metodą.
3. Ištyrus susintetintų žymeklių ir fluorescuojančių zondu optines savybes nustatyti tinkamiausi būdai merkaptoaminorūgštims identifikuoti.
 - 3.1. Dvi dvigubąsias jungtis chromofore turintis zondas **Z2** merkaptoaminorūgštis selektyviai identifikuoja 1,4-dioksane ir tetrahidrofurane.
 - 3.2. Tris dvigubąsias jungtis chromofore turintis zondas **Z3** merkaptoaminorūgštis selektyviai identifikuoja dimetilsulfokside.
 - 3.3. Konjuguotos dvigubosios grandinės ilginimas zondu absorbcijos ir emisijos maksimumus paslenka batochromiškai. Zondas **Z3** su ilgesne dvigubųjų jungčių grandine lyginant su analogu **Z2** fluorescencijos maksimumą paslinko į 815 nm elektromagnetinės spinduliuotės sritį, kuri yra ypač patraukli merkaptoaminorūgštims identifikuoti.
 - 3.4. Sukurtų fluorescuojančių zondu **Z2-Cys**, **Z2-Hcy**, **Z2-GSH**, **Z3-Cys**, **Z3-Hcy**, **Z3-GSH** fluorescencijos intensyvumo ir kvantinės išeigos įvertinimui tinkamiausias tirpiklis yra dimetilsulfoksidas.
 - 3.5. Konjuguotos dvigubosios grandinės ilginimas turi įtakos fluorescavimo intensyvumui ir kvantinės išeigos padidėjimui. Iš žymeklio **Z3** susidaręs cisteino fluorescuojantis zondas **Z3-Cys** pasižymėjo didesniu fluorescencijos intensyvumu (13,4 sant. vnt.) ir geresne kvantine išeiga (9,7 %) lyginant su analogu **Z2-Cys** (11,0 sant. vnt., 7,5 %).
4. Įrodyta, kad susintetinti zondai **Z2** ir **Z3** sėkmingai gali būti naudojami biotoliams identifikuoti.

Literatūros sąrašas

1. SUŽIEDĖLIENĖ, Edita. *Molekulinė biologija*. Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla, 2014. ISBN 978-609-417-096-6.
2. HUGHES, Andrew B. *Amino acids, peptides and proteins in organic chemistry: analysis and function of amino acids and peptides*. Weinheim: Wiley – VCH, 2009. ISBN 978-3-527-32098-1.
3. MILDAŽIENĖ, Vida ir kt. *Struktūrinė biochemija*. Kaunas: VDU leidykla, 1999. ISBN 9986-501-37-7.
4. PRAŠKEVIČIUS, Antanas ir kt. *Biologinių struktūrų chemija: medicinos chemija*. Kaunas: KMU, 2002. ISBN 9955-479-13-2.
5. TOWNSEND, D. M., K. D. TEW, H. TAPIERO. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* [interaktyvus]. 2003, **57**, 145–155 [žiūrėta 2020-02-20]. Prieiga per doi: 10.1016/S0753-3322(03)00043-X.
6. HERZENBERG, L. et al. Glutathione deficiency is associated with impaired survival in HIV disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [interaktyvus]. 1997, **94**, 1967–1972 [žiūrėta 2020-02-25]. Prieiga per doi: 10.1073/pnas.94.5.1967.
7. SABALIAUSKIENĖ, Zita. *Trombocitų agregacijos ir homocisteino koncentracijos kraujyje pokyčių biologinė reikšmė ūmių išeminių galvos smegenų kraujotakos sutrikimų metu: daktaro disertacija*. Kauno medicinos universitetas. Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, 2009.
8. DELOUGHERY, T. D. Hyperhomocysteinemia in ischemic stroke. *Seminars in Cerebrovascular Diseases and Stroke* [interaktyvus]. 2002, **2**(2), 111–119 [žiūrėta 2020-02-25]. Prieiga per doi: 10.1053/scds.2002.32658.
9. UELAND, P. M. et al. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *The American Journal of Clinical Nutrition* [interaktyvus]. 2000, **72**(2), 334–332 [žiūrėta 2020-03-01]. Prieiga per doi: 10.1093/ajcn/72.2.324.
10. AZZABI, S. et al. Late revelation of homocysteinuria: clinical, biological and progressive aspects. *Pathologie Biologie* [interaktyvus]. 2009, **57**(5), 451–455 [žiūrėta 2020-02-27]. Prieiga per doi: 10.1016/j.patbio.2008.09.005.
11. GARALIENĖ, V. The main determinants of endothelial dysfunction. *Medicina* [interaktyvus]. 2006, **42**(5), 362–369 [žiūrėta 2020-02-27]. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16778463>.
12. REFSUM, H. et al. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annual Review of Medicine* [interaktyvus]. 1998, **49**, 31–62 [žiūrėta 2020-03-01]. Prieiga per doi: 10.1146/annurev.med.49.1.31.
13. LENDZ, S. R., J. E. SADLER. Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *The Journal of Clinical Investigation* [interaktyvus]. 1991, **88**, 1906–1914 [žiūrėta 2020-03-10]. Prieiga per doi: 10.1172/JCI115514.
14. BRETELER, M. M. Vascular risk factors for Alzheimer's disease: an epidemiologic perspective. *Neurobiology of Aging* [interaktyvus]. 2000, **21**, 153–160 [žiūrėta 2020-03-10]. Prieiga per doi: 10.1016/S0197-4580(99)00110-4.
15. YUE, Y., F. et al. Dual-site fluorescent probe for visualizing the metabolism of Cys in living cells. *Journal of the American Chemical Society* [interaktyvus]. 2017, **139**, 3181–3185 [žiūrėta 2020-03-06]. Prieiga per doi: 10.1021/jacs.6b12845.

16. BINDU, D. P., J. I. SBODIO, S. H. SNYDER. Cysteine metabolism in neuronal redox homeostasis. *Trends in Pharmacological Sciences* [interaktyvus]. 2018, **39**(5), 515–524 [žiūrėta 2020-03-12]. Prieiga per doi: 10.1016/j.tips.2018.02.007.
17. MINIACI, M. C. et al. Cysteine prevents the reduction in keratin synthesis induced by iron deficiency in human keratinocytes. *Journal of Cellular Biochemistry* [interaktyvus]. 2016, **117**(2), 402–412 [žiūrėta 2020-03-12]. Prieiga per doi: 10.1002/jcb.25286.
18. PLAZA, N. C., M. R. G. GALBIS, R. M. M. ESPINOSA. Effects of the usage of *L*-cysteine (*L*-Cys) on human health. *Molecules* [interaktyvus]. 2018, **23**(3), 575–587 [žiūrėta 2020-03-15]. Prieiga per doi: 10.3390/molecules23030575.
19. Glutatonas, L-glutamil-L-cisteinilglicinas [interaktyvus]. [žiūrėta 2020-03-11]. Prieiga per: <https://www.ligos.lt/terminai/glutatonas-g-l-glutamil-l-cisteinilglicinas/1006/>.
20. LU, S. C. Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* [interaktyvus]. 2013, **1830**(5), 3143–3153 [žiūrėta 2020-03-15]. Prieiga per doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.008.
21. Naujausių gamtos mokslo žinių sklaidos mokytojams tinklas [interaktyvus]. [žiūrėta 2020-03-15]. Prieiga: http://gamta.vdu.lt/mokytojai/kursai/Oksidacinis_stresas_ir_senėjimas.pdf.
22. BISWAS, S. K., I. RAHMAN. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Molecular Aspects of Medicine* [interaktyvus]. 2009, **30**, 60–76 [žiūrėta 2020-03-17]. Prieiga per doi: 10.1016/j.mam.2008.07.001.
23. FRATERNALE, A. et al. GSH and analogs in antiviral therapy. *Molecular Aspects of Medicine* [interaktyvus]. 2009, **30**, 99–110 [žiūrėta 2020-03-17]. Prieiga per doi: 10.1016/j.mam.2008.09.001.
24. XU, K. et al. Study of highly selective and efficient thiol derivatization using selenium reagents by mass spectrometry. *Analytical Chemistry* [interaktyvus]. 2010, **82**, 6926–6932 [žiūrėta 2020-03-17]. Prieiga per doi: 10.1021/ac1011602.
25. CHEN, G., L. ZHANG, J. WANG. Miniaturized capillary electrophoresis system with a carbon nanotube microelectrode for rapid separation and detection of thiols. *Talanta* [interaktyvus]. 2004, **64**, 1018–1023 [žiūrėta 2020-03-17]. Prieiga per doi: 10.1016/j.talanta.2004.04.022.
26. GUO, L. et al. A highly water-soluble, sensitive, coumarin-based fluorescent probe for detecting thiols, and its application in bioimaging. *New Journal of Chemistry* [interaktyvus]. 2017, **41**, 15277–15282 [žiūrėta 2020-03-17]. Prieiga per doi: 10.1039/C7NJ02391J.
27. WANG, K., H. J. PENG, B. H. WANG. Recent advances in thiol and sulfide reactive probes. *Journal of Cellular Biochemistry* [interaktyvus]. 2014, **115**, 1007–1022 [žiūrėta 2020-03-20]. Prieiga per doi: 10.1002/jcb.24762.
28. YIN, C. X. et al. Thiol – addition reactions and their applications in thiol recognition. *Chemical Society Reviews* [interaktyvus]. 2013, **42**, 6032–6059 [žiūrėta 2020-03-20]. Prieiga per doi: 10.1039/c3cs60055f.
29. MAEDA, H. et al. 2,4-Dinitrobenzenesulfonyl fluoresceins as fluorescent alternatives to ellman's reagent in thiol – quantification enzyme assays. *Angewandte Chemie International Edition* [interaktyvus]. 2005, **44**, 2922–2925 [žiūrėta 2020-03-20]. Prieiga per doi: 10.1002/anie.200500114.
30. NAIR, D. P. et al. The thiol-Michael addition click reaction: a powerful and widely used tool in materials chemistry. *Chemistry of Materials* [interaktyvus]. 2014, **26**, 724–744 [žiūrėta 2020-03-20]. Prieiga per doi: 10.1021/cm402180t.
31. NORTHROP, B. H., S. H. FRAYNE, U. CHOUDHARY. Thiol – maleimide „click“ chemistry: evaluating the influence of solvent, initiator, and thiol on the reaction mechanism, kinetics, and

- selectivity. *Polymer Chemistry* [interaktyvus]. 2015, 6, 3415–3430 [žiūrėta 2020-03-23]. Prieiga per doi: 10.1039/C5PY00168D.
32. LIN, X. et al. Cyanine-coumarin composite NIR dye based instantaneous-response probe for biothiols detection and oxidative stress assessment of mitochondria. *Dyes and Pigments* [interaktyvus]. 2020, 174 [žiūrėta 2020-03-24]. Prieiga per doi: 10.1016/j.dyepig.2019.107956.
 33. STRECKYTĖ, Giedrė ir Ričardas ROTOMSKIS. *Fluorescencinė diagnostika biomedicinoje*. Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla, 2007. ISBN 9986199727.
 34. SIPPEL, T. O. Microfluorometric analysis of protein thiol groups with a coumarinylphenylmaleimide. *Histochemistry and Cytochemistry* [interaktyvus]. 1981, 29, 1377–1381 [žiūrėta 2020-03-25]. Prieiga per doi: 10.1177/29.12.7320496.
 35. LANGMUIR, M. E. et al. New naphthopyranone based fluorescent thiol probes. *Tetrahedron Letters* [interaktyvus]. 1995, 36, 3989–3992 [žiūrėta 2020-03-25]. Prieiga per doi: 10.1016/0040-4039(95)00695-9.
 36. DE SILVA, A. P., H. Q. N. GUNARATNE, T. GUNNLAUGSSON. Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) reagents for thiols. *Tetrahedron Letters* [interaktyvus]. 1998, 39, 5077–5080 [žiūrėta 2020-03-25]. Prieiga per doi: 10.1016/S0040-4039(98)00909-5.
 37. KAND, D., A. M. KALLE, S. J. VARMA. A chromenoquinoline – based fluorescent off – on thiol probe for bioimaging. *Chemical Communications* [interaktyvus]. 2012, 48, 2722–2724 [žiūrėta 2020-03-25]. Prieiga per doi: 10.1039/C2CC16593G.
 38. KAND, D., A. M. KALLE, P. TALUGDAR. Chromenoquinoline-based thiol probes: study the quencher position for controlling fluorescent Off–On characteristics. *Organic and Biomolecular Chemistry* [interaktyvus]. 2013, 11, 1691–1701 [žiūrėta 2020-03-27]. Prieiga per doi: 10.1039/c2ob27192c.
 39. LIU, T. et al. A triphenylamine as a fluorophore and maleimide as a bonding group selective turn-on fluorescent imaging probe for thiols. *Dyes and Pigments* [interaktyvus]. 2016, 128, 209–214 [žiūrėta 2020-03-27]. Prieiga per doi: 10.1016/j.dyepig.2015.12.031.
 40. LI, J. et. al. A long wavelength fluorescent probe for biothiols and its application in cell imaging. *Analytical Methods* [interaktyvus]. 2016, 8, 6748–6753 [žiūrėta 2020-03-28]. Prieiga per doi: 10.1039/C6AY02150F.
 41. GUO, L. et. al. A highly water – soluble, sensitive, coumarin – based fluorescent probe for detecting thiols, and its application in bioimaging. *New Journal of Chemistry* [interaktyvus]. 2017, 41, 15277–15282 [žiūrėta 2020-03-28]. Prieiga per doi: 10.1039/C7NJ02391J.
 42. XUE, Z. et al. Synthesis and evaluation of a novel ‘off-on’ chemical sensor based on rhodamine B and the 2,5-pyrrolidinedione moiety for selective discrimination of glutathione and its bioimaging in living cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [interaktyvus]. 2018, 26(8), 1823–1831 [žiūrėta 2020-03-28]. Prieiga per doi: 10.1016/j.bmc.2018.02.030.
 43. GRZELAKOWSKA, A. et al. Novel fluorescent probes for L-cysteine based on the xanthone skeleton. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [interaktyvus]. 2020, 387 [žiūrėta 2020-04-01]. Prieiga per doi: 10.1016/j.jphotochem.2019.112153.
 44. DONG, F. et al. Highly selective isomer fluorescent probes for distinguishing homo-/cysteine from glutathione based on AIE. *Talanta* [interaktyvus]. 2018, 206 [žiūrėta 2020-04-03]. Prieiga per doi: 10.1016/j.talanta.2019.120177.
 45. QIAN, J. et al. Fluorescent detection of biothiols with maleimide-based probes: effect of the spacer on the selectivity. *Sensors and Actuators B: Chemical* [interaktyvus]. 2020, 311 [žiūrėta 2020-04-04]. Prieiga per doi: 10.1016/j.snb.2020.127923.

46. PARTHASARATHY, V. et. al. Combination of cyanine behaviour and giant hyperpolarizability in novel merocyanine dyes: beyond the bond length alternation (BLA) paradigm. *Chemistry a European Journal* [interaktyvus]. 2015, **21**, 14211–14217 [žiūrėta 2020-04-07]. Prieiga per doi: 10.1002/chem.201501800.
47. DAŠKEVIČIŪTĖ, Šarūnė. *Naujų dažiklių sintezė ir panaudojimas merkptoaminorūgščių identifikavimui: bakalauro baigiamasis darbas*. Kauno technologijos universitetas, 2018.

Padėka

Darbo vadovui prof. V. Getaučiui už galimybę dirbti mokslinėje grupėje, suteiktas žinias, naudingus patarimus, rūpestį ir visokeriopą pasitikėjimą.

Vyr. m. d. M. Daškevičienei už įgūdžių ir žinių perdavimą dirbant laboratorijoje.

Doktorantui E. Kasparavičiui už junginių fluorescencijos kvantinių išeigų matavimus.

A. Ilčiukaitei už gerą atmosferą laboratorijoje.

Visiems kitiems grupės nariams už draugystę, pagalbą, nuoširdumą ir smagų laiką praleistą kartu.

Doc. I. Jonuškienei už besąlygišką gerumą ir visokeriopą pagalbą tiek studijų, tiek darbo metu.

Lekt. V. Stankevičienei už lietuvių kalbos konsultacijas.

Dr. K. Kantminienei už anglų kalbos konsultacijas.