

# Mjerenje stvaranja singletnog kisika upotrebom fotodegradacijske metode

---

**Pokrajac, Rafaela**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:486749>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-16**

*Repository / Repozitorij:*

**BIotech**

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Preddiplomski sveučilišni studij  
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Rafaela Pokrajac

**Mjerenje stvaranja singletnog kisika upotrebom fotodegradacijske  
metode**

Završni rad

Rijeka, 2020. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Preddiplomski sveučilišni studij  
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Rafaela Pokrajac

**Mjerenje stvaranja singletnog kisika upotrebom fotodegradacijske  
metode**

Završni rad

Rijeka, 2020. godina

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Nela Malatesti

Završni rad obranjen je dana: \_\_\_\_\_

Pred povjerenstvom:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Rad ima 48 stranica, 42 slike, 7 tablica i 35 literaturnih navoda.

## Skraćenice

PDT – fotodinamička terapija (eng. *photodynamic therapy*)

ROS – reaktivne kisikove vrste (eng. *reactive oxygen species*)

DPBF – 1,3-difenilizobenzofuran

DMA – 9,10-dimetilantracen

ABDA – 9,10-antracendiil-bis(metilen)dimalonska kiselina

DCM – diklormetan

DMF – dimetilformamid

DMSO – dimetilsulfoksid

EtOH – etilni alkohol; etanol

PS – fotosenzibilizator

ISC – međusustavno križanje (eng. *intersystem crossing*)

AUC – površina ispod krivulje (eng. *area under curve*)

## Sažetak

Fotodinamička terapija (PDT) suvremen je pristup liječenju tumora koji se oslanja na interakciju svjetlosti određene valne duljine s molekulom fotosenzibilizatora koja iz svog pobuđenog tripletnog stanja pobuđuje molekularni kisik na više energetske stanje. U tom procesu nastaje visoko reaktivni singletni kisik. Terapijski efekt postiže se lokaliziranim citotoksičnim djelovanjem singletnog kisika na tumorsko tkivo. ROS-ovi poput singletnog kisika razaraju proteine, lipide, nukleinske kiseline i ostale stanične komponente na mjestu djelovanja. Učinkovitost fotodinamičke terapije nastoji se poboljšati modifikacijom svojstava fotosenzibilizatora. Porfirini su zbog svojeg karakterističnog apsorpcijskog i emisijskog spektra posebice zanimljivi kandidati za fotosenzibilizatore. Odabir porfirina koji su potencijalni kandidati za PDT zahtijeva razvitak pouzdanih metoda mjerenja produkcije singletnog kisika.

U ovom je radu provedeno indirektno mjerenje produkcije singletnog kisika dvaju *N*-metiliranih i *N*-oksidiranih porfirina u četiri različita otapala korištenjem fotodegradacijske metode. Fotodegradacijska metoda mjerenja produkcije singletnog kisika oslanja se na mjerenje pada fluorescencije kontrolne boje, u ovom slučaju 1,3-difenilizobenzofurana, u prisutnosti singletnog kisika. Prednost ove metode jest njena praktičnost i komercijalna dostupnost, ali treba imati na umu da rezultat ovisi o uvjetima prilikom mjerenja. Uspoređena je topivost porfirina u otapalima s obzirom na *N*-supstituent, te je promatran utjecaj topivosti i lipofilnosti *N*-supstituiranih porfirina na produkciju singletnog kisika. Utvrđeno je da svi ispitivani porfirini imaju značajan kvantni prinos singletnog kisika barem u nekima od ispitivanih otapala, te da produkcija singletnog kisika uvelike ovisi o topivosti porfirina u određenom otapalu.

Ključne riječi: singletni kisik, *N*-supstituirani porfirini, fotodinamička terapija, fotodegradacijska metoda

## Summary

Photodynamic therapy (PDT) is a contemporary approach to cancer treatment that relies on interaction of light of a specified wavelength with a photosensitizer molecule that has the ability to excite molecular oxygen to a higher energy state. During that process, molecular oxygen receives energy from the photosensitizer in its excited triplet state, thus becoming highly reactive singlet oxygen. The therapeutic effect is achieved by cytotoxic activity of singlet oxygen targeted at tumor tissue. Reactive oxygen species such as singlet oxygen are capable of damaging proteins, lipids, nucleic acids and other cellular components at the site of impact. By modifying the properties of the photosensitizer one can improve the effectiveness of PDT. Due to their characteristic absorption and emission spectra, porphyrins are particularly interesting candidates for usage as photosensitizer molecules. Choosing a porphyrin that is a potential candidate for PDT requires development of reliable methods for measuring singlet oxygen production.

In this work, singlet oxygen production by two *N*-methylated and two *N*-oxidated porphyrins in four solvents was measured indirectly using photodegradation method. The aforementioned method relies on measuring the decrease of fluorescence emission by control dye, in this case DPBF, in the presence of singlet oxygen. The advantage of this method is simple application and commercial availability, although it has to be noted that the result vastly depends on conditions during experiment. Solubility of porphyrins in various solvents was compared in regards to their *N*-substituent as well as the effect of solubility of *N*-substituted porphyrins on singlet oxygen production. It was found that all of the examined porphyrins have significant singlet oxygen production at least in some of the solvents. Also, it was shown that singlet oxygen production depends on solubility of the porphyrin in a given solvent.

Key words: singlet oxygen, *N*-substituted porphyrins, photodynamic therapy, photodegradation method



# Sadržaj

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1.     | Uvod .....  | 1  |
| 1.1.   | Svojstva singletnog kisika.....   | 2  |
| 1.2.   | Stvaranje singletnog kisika .....   | 3  |
| 1.3.   | Singletni kisik u biološkim sustavima i njegovo citotoksično djelovanje.....  | 6  |
| 1.3.1. | Lipidna peroksidacija singletnim kisikom.....   | 7  |
| 1.3.2. | Reakcije s proteinima .....   | 8  |
| 1.3.3. | Genotoksičnost singletnog kisika .....  | 9  |
| 1.4.   | Singletni kisik u fotodinamičkoj terapiji (PDT) .....   | 10 |
| 1.4.1. | Porfirini kao fotosenzibilizatori.....  | 10 |
| 1.5.   | Detekcija i kvantifikacija singletnog kisika .....  | 11 |
| 1.5.1. | Apsolutne metode detekcije singletnog kisika .....  | 12 |
| 1.5.2. | Relativne metode detekcije singletnog kisika.....   | 12 |
| 1.5.3. | Mjerenje nastanka $^1\text{O}_2$ fotodegradacijskom metodom .....   | 13 |
| 2.     | Cilj rada .....   | 16 |
| 3.     | Materijali i metode .....   | 17 |
| 3.1.   | Opće napomene .....   | 17 |
| 3.2.   | Priprema otopina .....  | 17 |
| 3.3.   | Mjerenje UV-Vis apsorpcijskih spektara DPBF-a i porfirina .....   | 18 |
| 3.4.   | Određivanje optimalne koncentracije DPBF-a za svako otapalo.....  | 18 |
| 3.5.   | Mjerenje stabilnosti DPBF-a .....   | 19 |
| 3.6.   | Mjerenje produkcije singletnog kisika ( $^1\text{O}_2$ ) fotodegradacijskom metodom .....                                   | 19 |
| 4.     | Rezultati i diskusija .....   | 21 |
| 4.1.   | Mjerenje UV-Vis apsorpcijskih spektara .....  | 21 |
| 4.1.1. | Mjerenje UV-Vis apsorpcijskih spektara DPBF-a za svako od otapala .....   | 21 |
| 4.1.2. | Mjerenje UV-Vis apsorpcijskih spektara <i>N</i> -metiliranih i <i>N</i> -oksidiranih porfirina u različitim otapalima<br>24 | 24 |
| 4.2.   | Određivanje optimalne koncentracije DPBF-a za svako otapalo.....  | 29 |
| 4.3.   | Mjerenje stabilnosti DPBF-a u ispitivanim otapalima.....  | 30 |
| 4.4.   | Mjerenje produkcije singletnog kisika ( $^1\text{O}_2$ ) fotodegradacijskom metodom .....                                   | 32 |
| 4.4.1. | Mjerenje produkcije singletnog kisika u DMSO-u.....   | 34 |
| 4.4.2. | Mjerenje produkcije singletnog kisika u etanolu.....  | 35 |
| 4.4.3. | Mjerenje produkcije singletnog kisika u DCM-u.....  | 37 |
| 4.4.4. | Mjerenje produkcije singletnog kisika u DMF-u .....   | 39 |
| 4.4.5. | Usporedba produkcije singletnog kisika po otapalima .....   | 41 |
| 5.     | Zaključak .....   | 44 |
| 6.     | Literatura .....  | 45 |
|        | Zahvala.....  | 48 |

# 1. Uvod

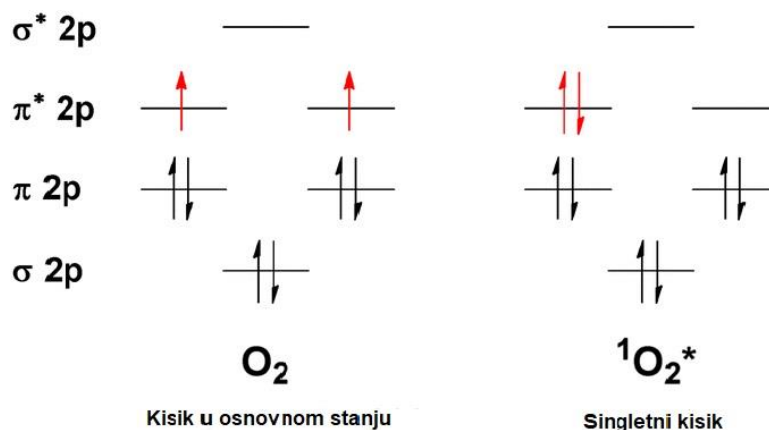
Singletni kisik,  $^1\text{O}_2$ , došao je u središte pozornosti laboratorijskih studija nakon što je 60-tih godina prošlog stoljeća uočena njegova sposobnost kemiluminescencije. Singletni kisik, kao pobuđeno stanje molekularnog kisika, nastaje primanjem odgovarajuće energije<sup>1</sup>. U biološkim sustavima singletni kisik se stvara na dva načina: reakcijama „na svjetlu“ (fotoekscitacijski) i reakcijama „u tami“ (kemoekscitacijski)<sup>2</sup>. Njegova je važnost posebno došla do izražaja u područjima fotooksidacije, oštećenja DNA, fotodinamičke terapije te znanosti o polimerima<sup>1</sup>. Za razliku od kisika u osnovnom stanju, singletni kisik je snažan elektrofil i oksidans. Njegova fizikalno-kemijska svojstva čine ga izrazito citotoksičnim agensom, te je povezan s brojnim patološkim procesima unutar organizma, uključujući lipidnu peroksidaciju, oštećenja DNA, lipida i proteina, te iniciranje apoptoze<sup>2</sup>. Unatoč tome, u posljednjih nekoliko desetljeća sve se više primjenjuje u medicini, između ostalog i u fotodinamičkoj terapiji (PDT), upravo zato što se njegovom kontroliranom generacijom u tumorskom tkivu može nadići neka od ograničenja klasične kemoterapije, poput teških sistemskih nuspojava, nastanka mehanizama rezistencije, te nemogućnosti ciljanja više mehanizama onkogeneze istovremeno (proliferacija stanica karcinoma, angiogeneza)<sup>3</sup>. U fotodinamičkoj terapiji koriste se fotosenzibilizatori, molekule koje pod utjecajem svjetlosti prelaze u pobuđeno energetska stanje, najprije singletno, a zatim tripletno. Reakcijom tipa II, gdje se energija tripletnog stanja PS-a prenosi na molekularni kisik, generira se singletni kisik, te se efikasnost tog procesa razlikuje s obzirom na kemijska svojstva fotosenzibilizatora, kao i otapalo, tj. medij u kojem se reakcija odvija<sup>4</sup>. Težnja ka što uspješnijim terapijskim ishodima zahtijeva probiranje učinkovitih metoda produkcije singletnog kisika, kao i njegovu vjerodostojnu detekciju.

## 1.1. Svojstva singletnog kisika

Singletni kisik je topiv u vodi i organskim otapalima. Budući da se radi o nestabilnoj, kratkoživućoj vrsti, priprema se *in situ* neposredno prije uporabe<sup>7</sup>.

Kisik,  $^3\text{O}_2$ , je u osnovnom stanju kinetički inertan zato što elektroni u njegovoj vanjskoj ljusci imaju isti kvantni broj, te stoga podliježu spinskoj restrikciji reaktivnosti. Tripletni molekularni kisik je paramagnetički biradikal sa dva elektrona koji zauzimaju zasebne  $\pi^*$  orbitale s paralelnim spinovima (slika 1)<sup>8</sup>. Većina neradikalnih biomolekula su dijamagnetične, s elektronskim parovima suprotnih spinova. Da bi sudjelovao u redoks reakcijama s biomolekulama, kisik bi od reducensa morao prihvatiti dva elektrona istog spina (tj. također paramagnetična) kako bi popunio praznine u  $\pi^*$  orbitalama. Iz tog razloga, kisik u osnovnom stanju ne može efikasno oksidirati biomolekule u reakcijama koje zahtijevaju 2-elektronski proces (npr. adicija)<sup>8</sup>.

Apsorpcijom energije ( $h\nu$ ) jedan od elektrona vanjske ljuske može nadići spinsku restrikciju, te prijeći u pobuđeno energetske stanje. Molekularni kisik može postići dva niska singletna ekscitirana stanja iznad osnovnog tripletnog stanja,  $^1\Delta_g$  i  $^1\Sigma_g^+$ ; 95 (22.5 kcal mol<sup>-1</sup>) i 158 kJ mol<sup>-1</sup> (31.5 kcal mol<sup>-1</sup>)<sup>5</sup>. Premda različitih svojstava, njihove elektronske konfiguracije razlikuju se samo po strukturi  $\pi$ -protuveznih orbitala<sup>1</sup>. Razlikujemo i pobuđeno tripletno  $^3\Sigma_g^-$  stanje. Prvo ekscitirano stanje,  $^1\Delta_g$  (u daljnjem tekstu navedeno kao „singletni kisik“ ili  $^1\text{O}_2$ ), važno je za biološke sustave zbog svog relativno dugog poluživota ( $10^{-6}$  s). Nasuprot tome, drugo ekscitirano stanje,  $^1\Sigma_g^+$ , je relativno kratkoživuće ( $10^{-9}$  –  $10^{-12}$  s) i zbog spinski dozvoljene tranzicije prelazi u prvo ekscitirano stanje<sup>5</sup>. Singletna stanja kisika ne smatraju se radikalima zbog toga što nemaju nesparene slobodne elektrone (slika 1), ali spadaju pod reaktivne kisikove vrste (ROS, eng. *reactive oxygen species*)<sup>2</sup>.



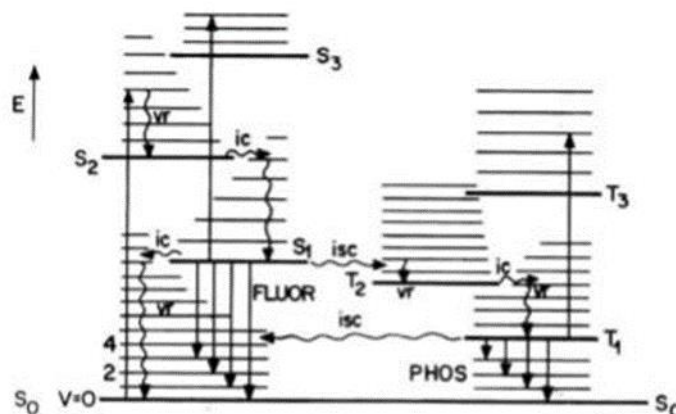
Slika 1: Molekularni orbitalni dijagrami elektronske konfiguracije kisika u osnovnom stanju (lijevo) i pobuđenom singletnom stanju (desno); modificirano prema<sup>8</sup>

## 1.2. Stvaranje singletnog kisika

Premda se singletni kisik ( $^1O_2$ ) može proizvesti brojnim metodama, samo je mali broj prikladan za biomedicinsku primjenu. Direktna optička stimulacija  $O_2$  nije dovoljno efikasna zbog spinske restrikcije, a metode poput zagrijavanja ili plinske ionizacije, koje su poznate i vrlo učinkovite, nisu biološki primjenljive zbog toga što proces ekscitacije zahtijeva visoke temperature ili je popraćen nastankom atomskog kisika i/ili ozona<sup>9</sup>.

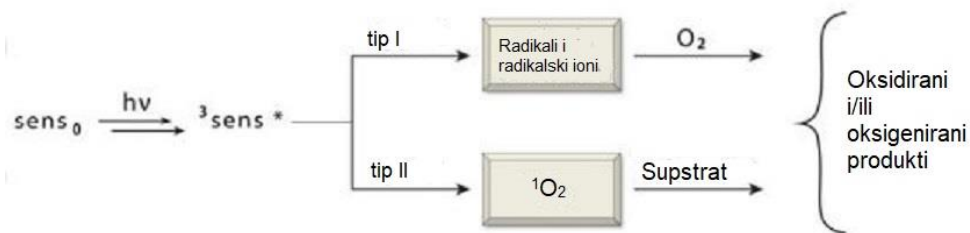
Singletni kisik se u biološkim sustavima stvara na dva načina – fotoekscitacijom („reakcijama na svjetlu“) i kemoekscitacijom („reakcijama u tami“). Reakcije na svjetlu pretežno se odvijaju po reakciji fotosenzibilizacije tipa II prilikom koje dolazi do prijenosa energije s tripletnog pobuđenog stanja fotosenzibilizatora na molekularni kisik<sup>2</sup>. Fotosenzibilizacijska generacija singletnog kisika jednostavna je metoda koja zahtijeva samo kisik, izvor svjetlosti prikladne valne duljine i fotosenzibilizator koji može apsorbirati energiju, te je prenijeti na kisik kako bi ga ekscitirao na njegovo singletno stanje<sup>1</sup>. Fotoreakcije PS-a prikazane su na slici 2, koja predstavlja Jablonski dijagram. Apsorpcijom svjetlosti određene valne duljine elektron iz osnovnog singletnog stanja  $^1S_0$  prelazi u pobuđeno vibrirajuće stanje ( $^1S_1$ ,  $^1S_2$ ,  $^1S_3\dots$ ) bez promjene spina. Taj proces traje  $10^{-15}$  s<sup>9</sup>. Vibracijska pobuđena stanja horizontalnom unutarnjom

pretvorbom (na slici *ic*) prelaze na vibracijski ekscitirano  $^1S_1$  stanje, nakon čega se vibracijskom relaksacijom (na slici *vr*) otpušta energija u obliku topline, što traje  $10^{-11}$  s. Nakon toga, molekula je u pobuđenom  $^1S_1$  stanju, ili fluorescentnom stanju,  $10^{-9}$ - $10^{-8}$  s. Energija pobuđenog  $^1S_1$  stanja može se otpustiti na nekoliko načina, što ovisi o molekulskoj strukturi PS-a i uvjetima reakcije; može doći do emisije fotona fluorescencijom,  $^1S_1$  ekscitacije druge molekule ili međusustavnog križanja. Međusustavnim križanjem (eng. *intersystem crossing*, skraćeno ISC) nastaje pobuđeno tripletno stanje,  $T_1$ . Pobuđeno tripletno stanje ima relativno dugo vrijeme relaksacije u osnovno stanje jer je konverzija u singletno stanje spinski zabranjena, pa su zato PS-ovi u tripletnom stanju kemijski reaktivni, te na taj način reagiraju i s  $^1O_2$ <sup>9</sup>.



Slika 2: Jablonski dijagram optičke ekscitacije fotosenzibilizatora<sup>9</sup>

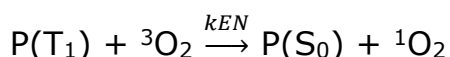
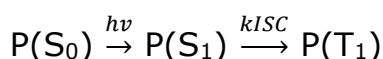
Poluživot  $T_1$  stanja je značajno dulji od poluživota  $S_1$  stanja, što mu daje mogućnost da reagira s drugim vrstama na dva moguća načina, poznatima pod nazivom Tip I i Tip II mehanizmi fotosenzibilizacije<sup>6</sup>. Oba tipa fotosenzibilizacije uključuju degradaciju biomolekula, ali tip I to postiže prijenosom elektrona, a tip II prijenosom energije, te se razlikuju u dobivenim reakcijskim produktima (slika 3).



Slika 3: Shematski prikaz fotosenzibilizacije tipa I i tipa II, modificirano prema<sup>6</sup>

Mehanizam fotosenzibilizacije tipa I uključuje prijenos elektrona između pobuđenog fotosenzibilizatora i njegovog supstrata, stvarajući pritom slobodne radikale. Ti radikali mogu u reakciji s kisikom formirati ROS-ove (eng. *reactive oxygen species*, skraćeno ROS) kao što je superoksidni radikalni anion,  $O_2^{\bullet-}$ , iz kojeg može nastati vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), prekursor izuzetno reaktivnog hidroksilnog radikala ( $\bullet OH$ )<sup>6</sup>. U ovaj mehanizam spada i adicija kisika na kationske radikale nukleotidnih baza, kao i njihova oksidacija, uz nastanak specifičnih produkata. Mehanizam tipa I nije energetski povoljan za generaciju singletnog kisika<sup>6</sup>.

Kod mehanizma tipa II, singletni kisik ( $^1O_2$ ) je dominantna specija koja može reagirati s nezasićenim lipidima, nukleinskim kiselinama (specifično gvaninom), te aminokiselinama (specifično Trp, His, Met, Tyr, Cys)<sup>6</sup>. U mehanizmu tipa II singletni kisik je produkt prijenosa energije prilikom kolizije pobuđenog fotosenzibilizatora s tripletnim kisikom<sup>1</sup>, prema shemi 1;



Fotosenzibilizator (P) u osnovnom stanju ( $S_0$ ) primanjem energije u obliku fotona prelazi u pobuđeno singletno ( $S_1$ ) stanje, a zatim međusustavnim križanjem u pobuđeno tripletno ( $T_1$ ) stanje. Konstanta brzine međusustavnog križanja naznačena je s  $k_{ISC}$ <sup>1,6</sup>. Biološkim reakcijama singletnog kisika često nastaju endoperoksidi ([2+4] cikloadicijom),

dioksietani putem mehanizma [2+2] cikloadicije, hidroperoksidi oksidacijom diena i fenola, te sulfoksidi oksidacijom sulfida<sup>6</sup>.

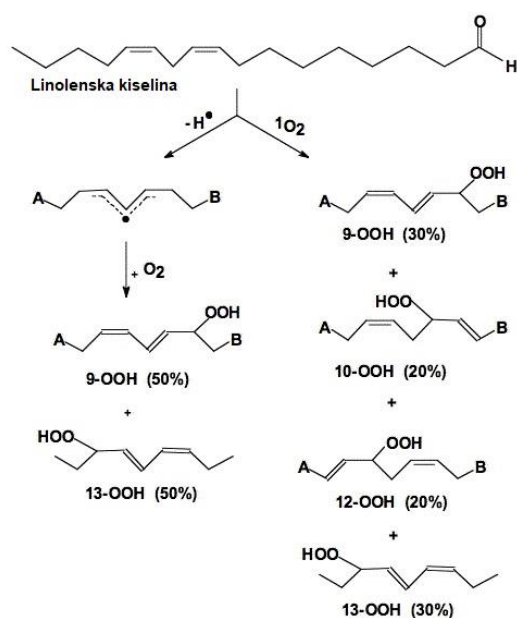
### 1.3. Singletni kisik u biološkim sustavima i njegovo citotoksično djelovanje

Mnogi spojevi prisutni u stanici, kao i brojni biološki aktivni lijekovi, mogu stvarati singletni kisik pod utjecajem svjetlosti. Na tom procesu se zasnivaju razne enzimatske reakcije, metabolizam arahidonske kiseline, peroksidacija lipida, metabolički procesi neutrofila i dr.<sup>2</sup>. Također, postoje mnoge organske molekule u intracelularnom ili ekstracelularnom mediju, koje imaju ulogu antioksidansa – tzv. utišavača (eng. *quencher*) oksidativnog stresa, te mogu zaustaviti razorni učinak singletnog kisika i ostalih ROS-ova.<sup>10,11,12</sup>

Relativno dug poluživot  $^1\text{O}_2$  (1-50  $\mu\text{s}$  u vodenim otopinama) omogućuje mu kretanje unutar staničnog okoliša i sposobnost oštećenja biomolekula. Singletni kisik se može slobodno kretati kako kroz vodu, tako i kroz lipidne membrane te reagirati s lipidima, proteinima i nukleinskim kiselinama, pri čemu nastaju specifični intermedijeri i produkti reakcija. Budući da se radi o jakom elektrofilu, može reagirati s biomolekulama koje posjeduju regije visoke elektronske gustoće, poput gvanina u DNA, ili nezasićenih masnih kiselina<sup>13,14</sup>.

### 1.3.1. Lipidna peroksidacija singletnim kisikom

Lipidi su izuzetno podložni oksidativnim oštećenjima, ali samo ako su nezasićeni. Reakcijom s masnim kiselinama singletni kisik stvara hidroperokside koji se dalje lome stvarajući brojne produkte lipidne peroksidacije. Procesi lipidne peroksidacije uočeni su kod hemolize eritrocita, oštećenja kardiomiocita, te degeneracije stanične membrane raznih tkiva<sup>2</sup>. Međuprodukti lipidne peroksidacije, lipidni hidroperoksidi (često obilježavani kao LOOH), koriste se pri određivanju potječe li primarna reakcija peroksidacije od singletnog kisika ili slobodnih radikala. Naime, mehanizmi tih reakcija se razlikuju (slika 4), te iz radikalnih reakcija možemo očekivati pretežito 9-OOH i 13-OOH produkte, a kod lipidne peroksidacije singletnim kisikom uz njih se pojavljuju 16-OOH i 12-OOH, na primjeru linolenske kiseline. Sličan se princip može primijeniti i kod oksidacije kolesterola jer određeni hidroperoksidi (5- $\alpha$ -COOH, 6- $\alpha$ -COOH, 6- $\beta$ -COOH) nastaju specifično  $^1\text{O}_2$  adicijom<sup>2,16</sup>.



Slika 4: Oksidacija linolenske kiseline slobodnim radikalom (lijevo) i singletnim kisikom (desno); modificirano prema<sup>16</sup>

Inkorporacijom LOOH intermedijera u staničnu membranu mijenjaju se njena fizikalna svojstva, točnije smanjuje se njena fluidnost, a povećava permeabilnost. Gubi se konzistencija membrane, te se pojavljuju „procjepi“ (eng. *gaps*) kao posljedica oštećenja masnih kiselina. Nastaju poprječne veze (eng. *cross-link*) između dviju masnih kiselina, te masnih kiselina i proteina. Dolazi do gubitka membranskih enzima koji se više ne mogu „usidriti“ u fosfolipidni dvosloj<sup>2</sup>. Također nastaju i toksični, često radikalni međuprodukti koji mogu oštetiti druge stanične komponente. Za neke od

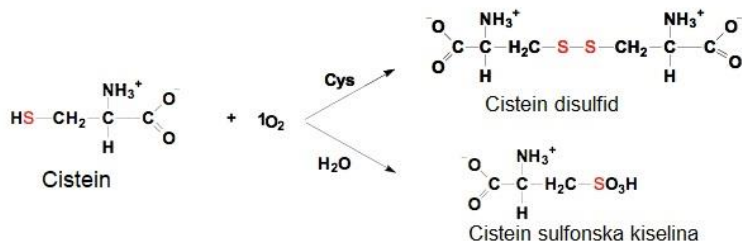


njih (4-hidroksinonenal, malonaldehid) pokazalo se da induciraju apoptozu<sup>2,15</sup>.

### 1.3.2. Reakcije s proteinima

Proteini koji su podložni reakciji s  $^1\text{O}_2$  su oni koji sadrže značajan udio aminokiselina čija je bočna skupina visoke elektronske gustoće (dvostruke veze, sumporni ostaci i sl.). Dakle, djelovanje  $^1\text{O}_2$  se može uočiti na aminokiselinama histidinu, triptofanu, metioninu, tirozinu i cisteinu. Reakcije sa singletnim kisikom mogu dovesti do promjene ukupnog naboja proteina, inaktivacije enzima, povećane sklonosti proteolizi, te nakupljanja proteinskih agregata<sup>20</sup>. Postoje indikacije da su oštećenja uzrokovana singletnim kisikom odgovorna za nastanak lipofuscina, agregata peroksidiranih lipida i proteina, koji se akumulira u lizosomima ostarjelih stanica, neuronima zahvaćenih Alzheimerovom bolešću i hepatocitima preopterećenima željezom<sup>2</sup>. Oštećenja na proteinima mogu biti nespecifična (globalna) i specifična, tj. lokalizirana na specifični organel ili dio stanice.

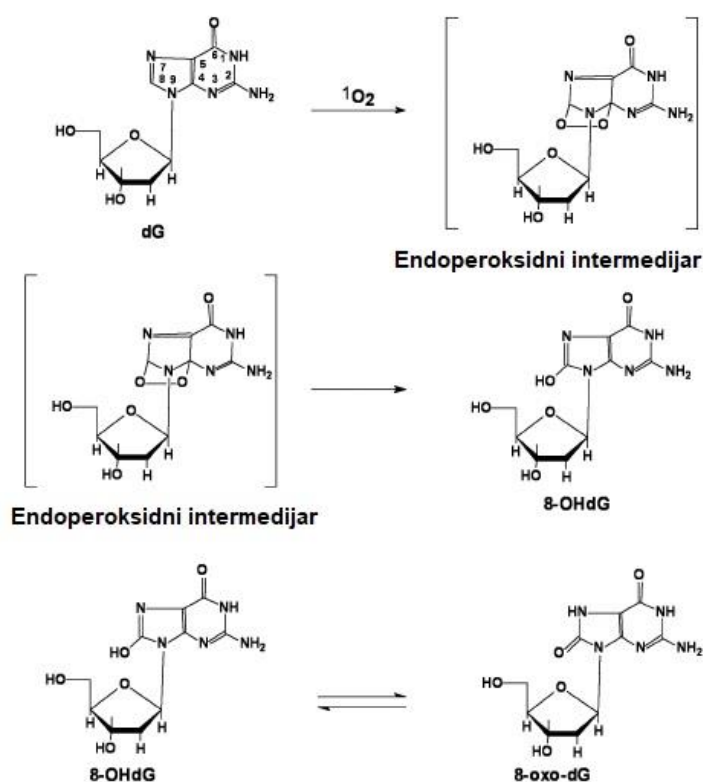
Reakcija cisteina sa singletom (slika 5) zanimljiv je primjer reakcije u kojoj ishod ovisi o koncentraciji aminokiseline. Tiolna skupina cisteina ima visoku elektronsku gustoću pa lako reagira s elektrofilom kao što je singletni kisik. Reakcija s deprotoniranim tiolom je kinetički povoljnija, premda dolazi i do reakcije s protoniranom formom. Ukoliko je koncentracija sulfidrilnih komponenti relativno visoka, nastaje disulfid, dok niža koncentracija sulfhidrilnih komponenti i veća koncentracija vode rezultira nastankom sulfonske kiseline<sup>17,18,19</sup>.



Slika 5: Oksidacija cisteina singletnim kisikom, modificirano prema<sup>17</sup>

### 1.3.3. Genotoksičnost singletnog kisika

Singletni kisik gotovo isključivo reagira s gvanozinskim ostacima nukleinskih kiselina uz nastanak 8-hidroksideoksigvanozina (slika 6). Zbog svog redoks-potencijala, gvanozin je nukleobaza koja najlakše reagira s  $^1\text{O}_2$ . Reakcija rezultira oksigenacijom 8'-C ugljika gvanozina čime nastaje produkt 8-hidroksi-2'-deoksigvanozin.<sup>21,22</sup> Genotoksični efekt proizlazi iz prisutnosti 8-hidroksideoksigvanozina koji dovodi do nasumične terminacije DNA lanca zbog krivog čitanja DNA polimerazom prilikom replikacije<sup>23</sup>. Dolazi do DNA-DNA ili DNA-protein poprječnih veza (eng. *cross-links*). Posljedice genotoksičnog djelovanja singletnog kisika su mutagenaza i karcinogeneza, te preuranjena terminacija replikacije<sup>23,24</sup>. Obrambeni mehanizmi koji štite nukleinske kiseline od oštećenja singletnim kisikom jesu FPG protein, endonukleaza koja inače prepoznaje i uklanja formamidopirimidine, a prepoznaje i 8-hidroksideoksigvanozin, te histoni, koji štite nereplicirajuću DNA tako da je drže čvrsto namotanu i kondenziranu, što joj smanjuje podložnost reakcijama oksidacije<sup>2</sup>.



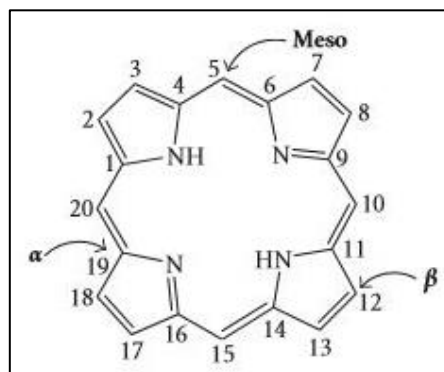
Slika 6: Prikaz puta formacije 8-OHdG/8-oxo-dG; modificirano prema<sup>21</sup>

## 1.4. Singletni kisik u fotodinamičkoj terapiji (PDT)

PDT ili fotodinamička terapija se oslanja na interakciju svjetlosti sa molekulom fotosenzibilizatora (PS-a) koja potom djeluje na molekularni kisik pobuđujući ga na više energetska stanje. PDT se primarno koristi kao lokalizirana onkološka terapija, no važna je i njena primjena kod dermatoloških poremećaja i infektivnih bolesti. U praksi, fotosenzitivni lijek se administrira intravenozno, oralno ili topikalno, zatim slijedi aktivacija fotosenzibilizatora svjetlošću određene valne duljine i intenziteta. Zatim dolazi do fotodinamičke reakcije koja razara tumor i tumorsku vaskulaturu<sup>25</sup>. Da bi se singletni kisik ponašao kao citotoksični agens, moraju se dogoditi dvije reakcije; prvo, ekscitirani fotosenzibilizator mora predati energiju molekuli kisika. Nakon toga, generirani ROS mora reagirati s ciljanim supstratom i izazvati oksidativnu štetu. Terapijski efekt fotodinamičke terapije se postiže nastankom ROS-ova, primarno  $^1\text{O}_2$ , čime se stvaraju uvjeti oksidativnog stresa lokalizirani na tumorsko tkivo.

### 1.4.1. Porfirini kao fotosenzibilizatori

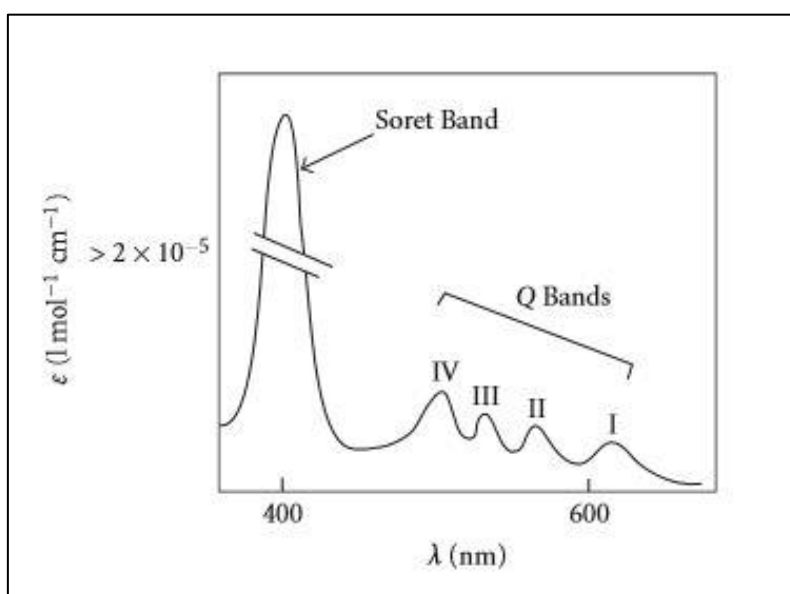
Fotosenzibilizatori su molekule prirodnog ili sintetičkog porijekla koje mogu donirati svjetlosnu energiju supstratu. Da bi se neki spoj smatrao uspješnim fotosenzibilizatorom, mora zadovoljavati slijedeće kriterije: netoksičnost prije



Slika 7: Struktura porfirinskog makrocikla<sup>27</sup>

aktivacije, hidrofilitnost za lakšu sistemska aplikaciju, aktivacija klinički prikladnom valnom duljinom svjetlosti, te stvaranje značajne količine singletnog kisika<sup>25</sup>. Također je poželjno da se selektivno akumulira u tumorskom tkivu, eliminira iz organizma relativno brzo, ne stvara toksične nusprodekte, ne izaziva bol, te da je komercijalno dostupan<sup>25,26</sup>. Porfirini, tetrapirrolne makrocikličke molekule (slika 7), zbog svog su karakterističnog apsorpcijskog i emisijskog spektra fotosenzibilizatori prikladni za kliničku primjenu. Apsorpcijski spektar (slika 8) se raspoznaje po intenzivnoj, uskoj

vrpca pri valnoj duljini od 400 nm ( $\epsilon > 200\,000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) koja se naziva Soretova ili B vrpca, te po četiri vrpce slabijeg intenziteta pri valnim duljinama od 450 do 700 nm ( $\epsilon > 20\,000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) koje se nazivaju Q vrpca i označavaju se rimskim brojevima IV-I<sup>27</sup>. Soretova vrpca je posljedica jake elektronske tranzicije iz osnovnog stanja porfirina u  $S_2$  singletno ekscitirano stanje ( $S_0 \rightarrow S_2$ ), a Q vrpce su rezultat slabe elektronske tranzicije u prvo ekscitirano singletno stanje ( $S_0 \rightarrow S_1$ ). Rasap energije unutarnjom pretvorbom (eng. *internal conversion*, IC) toliko je brz da se fluorescencija uočava samo  $S_1 \rightarrow S_0$  relaksacijom<sup>27</sup>.



Slika 8: Tipični apsorpcijski spektar porfirina<sup>27</sup>

## 1.5. Detekcija i kvantifikacija singletnog kisika

Razvijene su brojne metode detekcije i kvantifikacije singletnog kisika. Probir efikasnog fotosenzibilizatora zahtijeva razvitak metoda detekcije i kvantifikacije singletnog kisika koje su brze, pristupačne i pouzdane.

Singletni kisik ima slabo vidljivi emisijski pik pri 1270 nm koji nastaje emisijom energije povratkom s pobuđenog singletnog u osnovno tripletno stanje. Metode detekcije klasificiraju se na apsolutne i relativne, pri čemu

se apsolutne metode oslanjaju na mjerenje emisijskog spektra singletnog kisika, a relativne na korištenje molekulskih „zamki“ i mjerenja nastajanja ili nestajanja specifičnog produkta<sup>2</sup>.

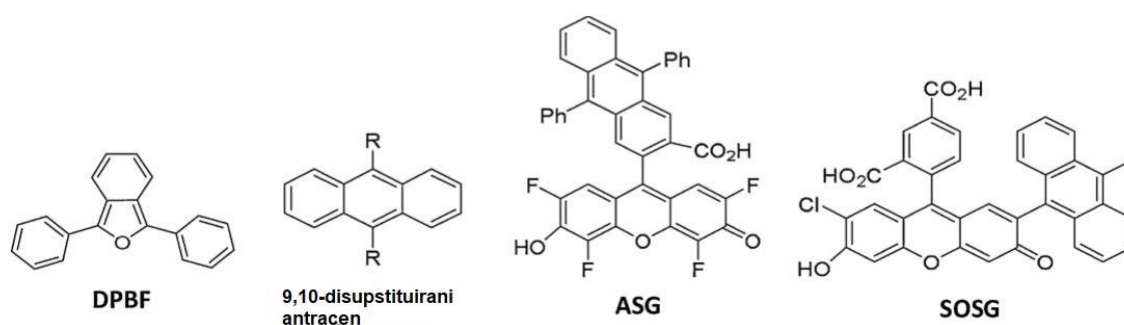
### 1.5.1. Apsolutne metode detekcije singletnog kisika

Apsolutne metode detekcije obično se temelje na luminiscenciji emitiranoj radijacijskim raspadom  $^1\Delta$  stanja  $^1\text{O}_2$  pri 1270 nm i  $2^1(^1\Delta)$  stanja pri 634 nm. Slab emisijski intenzitet zahtijeva visoko osjetljive optičke detekcijske metode i intenzivne izvore svjetlosti za ekscitaciju, a rezultati koji se očitavaju ovise o poluživotu singletnog stanja, koje je kratkotrajno, što otežava dobivanje značajne količine  $^1\text{O}_2$  koja se može detektirati. Ukoliko je korištena oprema izuzetno osjetljiva, mogu se očitati i slabe vrpce na 477 i 381 nm nastale kooperativnim tranzicijama singletnih i tripletnih stanja kisika<sup>9</sup>. U vodenom mediju fosforescencija je također oslabljena zbog prijenosa energije sa  $^1\text{O}_2$  na O-H vibracije u molekuli vode; voda reapsorbira dio emitirane energije, pa se u kemiluminescencijskim sustavima stoga pretežito koristi  $\text{D}_2\text{O}$ <sup>9,29</sup>. Vrijeme raspada  $^1\text{O}_2$  uvelike ovisi o mediju (3  $\mu\text{s}$  u vodi, 30  $\mu\text{s}$  u  $\text{D}_2\text{O}$ )<sup>9,29</sup>. Kvantni prinos (eng. *quantum yield*) često je toliko nizak da je teško razaznati signal od šuma, posebice u slučaju interferencije s emisijskim spektrom nekih fotosenzibilizatora, pa se zato koriste filteri za interferenciju umjesto običnih monokromatora. Unatoč ovim nedostacima, spektralna detekcija se smatra superiornom detekcijskom metodom zbog toga što daje brze, jednoznačne i točne rezultate. Prilikom mjerenja kinetike određenog procesa, koristi se manje precizna „*time resolved*“ metoda mjerenja, dok je, ukoliko je potrebna visoka preciznost i raspoznavanje vrlo slabog signala, poželjna „*steady-state*“ metoda mjerenja<sup>29</sup>.

### 1.5.2. Relativne metode detekcije singletnog kisika

Indirektne metode detekcije  $^1\text{O}_2$  obično su utemeljene na kemijskoj reakciji  $^1\text{O}_2$  s molekulom koja ima ulogu sonde što dovodi do promjene apsorpcijskog spektra, fluorescencijskog spektra, ili kvantnog prinosa

fluorescencije te molekule. Nedostatak indirektnih metoda je njihova ovisnost o brojnim parametrima poput reakcijskog medija, temperature, korištenog uređaja, koncentracije tvari i izvora svjetlosti. Metode utišavanja (eng. *quenching*) oslanjaju se na spektroskopsko mjerenje utišavanja  $^1\text{O}_2$  antioksidansima kao što su natrijev azid, DABCO (1,4-diazabicyklo-[2.2.2]oktan), askorbinska kiselina, triptofan i kolesterol<sup>9</sup>. Koristi se i velik broj molekularnih „zamki“ (eng. *traps*) pri čemu se napredak reakcije mjeri promjenom apsorpcijskog ili emisijskog spektra spoja. Neki od često korištenih spojeva su 1,3-difenilizobenzofuran (DPBF) i 9,10-dimetilantracenski derivati (slika 9)<sup>30</sup>. Razvijene su i metode molekularnih zamki kojima se  $^1\text{O}_2$  detektira vidljivom fluorescencijom. Te molekule, poput Aarhus Sensor Green (ASG) i Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) (slika 9), obično sadrže fluorescinsku jezgru sa 9,10-supstituiranim antracenom koja reagira s  $^1\text{O}_2$ . SOSG je pokazao visoku selektivnost naspram  $^1\text{O}_2$  u usporedbi s ostalim ROS-ovima. Međutim, rezultati mogu biti nepouzdana budući da SOSG stvara malu količinu  $^1\text{O}_2$  kad je ekscitiran<sup>30</sup>. Ove se metode smatraju indirektnima zato što mjere koncentraciju molekularne zamke ili sonde, umjesto koncentracije samog singletnog kisika.



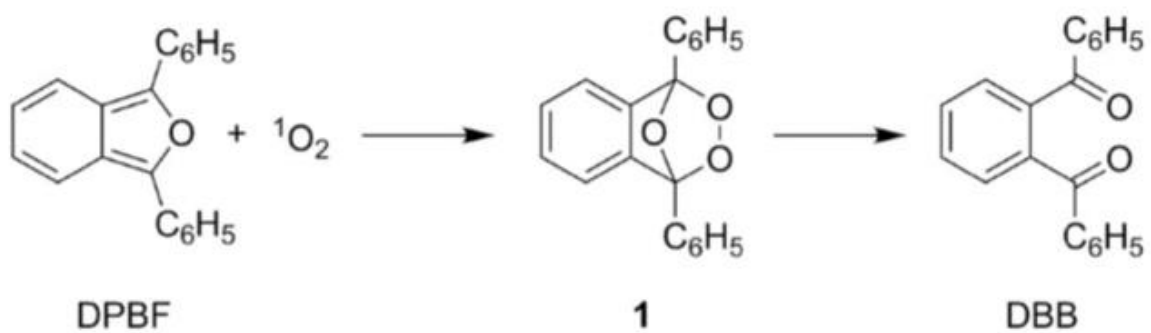
Slika 9: Strukturne formule molekularnih zamki za detekciju  $^1\text{O}_2$ ; modificirano prema<sup>30</sup>

### 1.5.3. Mjerenje nastanka $^1\text{O}_2$ fotodegradacijskom metodom

U ovom radu je korištena fotodegradacijska metoda mjerenja produkcije singletnog kisika. Kod mjerenja produkcije  $^1\text{O}_2$  fotodegradacijskom metodom koriste se organske boje čija se

fluorescencijska svojstva mijenjaju prilikom reakcije sa singletnim kisikom. Organske boje korištene za fotodegradacijsku metodu postižu svoj učinak zbog posjedovanja karakteristične antracenske ili furanske „jezgre“ koja reagira sa singletnim kisikom [4 + 2] cikloadicijom, što mijenja njezina fluorescencijska svojstva<sup>31</sup>. Intenzitet emisije kontrolne boje opada s porastom koncentracije singletnog kisika zato što on ima fotodegradacijsko djelovanje. Postoji nekolicina komercijalno dostupnih i praktičnih boja, a mjerenje se može provesti standardnim fluorescentnim spektrofotometrom. Kod provođenja mjerenja nastanka  $^1\text{O}_2$  fotodegradacijskom metodom testira se niz fotoreaktivnih molekula koje stvaraju različite količine singletnog kisika, što ovisi o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima, kao i korištenom reakcijskom mediju. Opadanje intenziteta emisije kontrolne boje podatak je prema kojem se neizravno može ustanoviti kvantni prinos singletnog kisika. Kao što je već navedeno, nedostatak ove metode jest ovisnost rezultata o nizu parametara (temperatura, pH, svjetlost...) te oni nikada neće biti u potpunosti točni, već samo dovoljno vjerodostojni za usporedbu produkcije singletnog kisika ispitivanih fotoreaktivnih spojeva.

Jedna od često korištenih boja za mjerenje singletnog kisika fotodegradacijskom metodom jest 1,3-difenilizobenzofuran, DPBF. Za reakciju sa singletnim kisikom ključan je furanski prsten (slika 10). DPBF nije u potpunosti selektivan za singletni kisik, te može reagirati i s drugim ROS-ovima ukoliko su prisutni u mediju, ali zbog svoje jake reaktivnosti s  $^1\text{O}_2$  može uhvatiti većinu singletnog kisika nastalog u otopini<sup>31</sup>. Budući da DPBF nije topljiv u vodi, njegova topivost se povećava korištenjem micelarne otopine ili mješavine alkohola i vode. Dobro je topiv u velikom broju organskih otapala<sup>31</sup>.



Slika 10: Reakcija singletnog kisika s DPBF-om<sup>31</sup>



## 2. Cilj rada

Uporaba singletnog kisika u PDT-u ima veliki potencijal. Singletni kisik se u nizu istraživanja pokazao uspješnim citotoksičnim agensom uslijed induciranja oksidativnog stresa na tumorsko tkivo. Cilj ovog rada je ispitati produkciju singletnog kisika fotodegradacijskom metodom kod dvaju *N*-metiliranih i dvaju *N*-oksidiranih tripiridilporfirina u različitim otapalima korištenjem kontrolne boje 1,3-difenilizobenzofurana i povezati dobivene rezultate s topivošću ispitivanih porfirina u ispitivanim otapalima (EtOH, DCM, DMF i DMSO). Uspoređivan je utjecaj supstituenta (18C lanca ili amido skupine) na topivost i lipofilnost, te produkciju  $^1\text{O}_2$ . Također je razmatran i utjecaj *N*-supstituenta, te samim time i polarnosti molekule, na topivost, lipofilnost i produkciju  $^1\text{O}_2$  u određenom otapalu. Ova metoda može ukazati na potencijalno korisne spojeve čija je produkcija singletnog kisika značajna za daljnja testiranja i kliničku primjenu. Nove rezultate u ovom području važno je oplemeniti i što sistematičnijom primjenom detekcijskih metoda kako bi se osigurala vjerodostojnost dobivenih podataka.

## 3. Materijali i metode

### 3.1. Opće napomene

**Kemikalije i reagensi:** Za mjerenja su korišteni komercijalno dostupni spojevi i otapala. Korištene su kemikalije proizvođača Grammol (Zagreb, Hrvatska), Sigma-Aldrich, Co. (Njemačka).

**UV-Vis spektrofotometrija:** UV-Vis spektri su snimani u kvarcnoj kiveti (Hellma Analytics) na spektrofotometru Agilent Cary 60 UV-Vis (SAD) u valnom području apsorpcije od 300 do 800 nm.

**Fluorescentna spektrofotometrija:** Emisijski spektri su snimljeni na fluorescentnom spektrofotometru Agilent Cary Eclipse (SAD) koristeći kvarcnu kivetu (Hellma Analytics, ) u valnom području 415 do 480 nm.

**Lampa:** Fotoekscitacija uzoraka provedena je pomoću lampe s kućištem koja emitira crvenu svjetlost ( $\lambda = 647$  nm). Korišten je difuzor br. 5.

**Računalne metode:** Za sve je izračune korišten program Microsoft Excel (Microsoft Corporation)

### 3.2. Priprema otopina

Pripremljene su otopine DPBF-a u etanolu, diklormetanu, dimetilformamidu i dimetilsulfoksidu. Suhi DPBF najprije je odvagano na analitičkoj vagi (Radwag AS 22.R2) u vijalicama, te je otopljen u 5 ml otapala dodanog pomoću automatske pipete. Nakon toga je iz poznatog volumena otopine, te mase i molarne mase DPBF-a, izračunata koncentracija dobivene otopine fluorescentne boje u svakom od otapala.

Prema istom principu pripremane su i otopine četiriju porfirina: 18C-M (5-(4-oktadekanamidofenil)-10,15,20-tris(N-metilpiridin-3-il)porfirin triklorid), 18C-O (5-(4-oktadekanamidofenil)-10,15,20-tris(1-oksipiridin-3-il)porfirin), Amido-M (5-(4-acetamidofenil)-10,15,20-tris(N-metilpiridin-3-il)porfirin triklorid), Amido-O (5-(4-acetamidofenil)-10,15,20-tris(1-

oksidopiridin-3-il)porfirin) u svakom od otapala (EtOH, DCM, DMF, DMSO), te je iz poznatog volumena otopine (0.5 ml), te mase i molarne mase porfirina, dobivena njihova koncentracija. U daljnjem tekstu porfirini su naznačeni kraticama u svrhu jednostavnijeg navođenja podataka.

Iz izvornih otopina pripremljene su stock otopine DPBF-a u svakom od otapala koncentracije 50  $\mu\text{M}$ . Isti je postupak ponovljen i za porfirine. Vijalice s otopinama zaštićene su aluminijskom folijom da bi se reducirala fotodegradacija sobnim svjetlom, a skladištene su u hladnjaku.

### 3.3. Snimanje UV-Vis apsorpcijskih spektara DPBF-a i porfirina

Za snimanje UV-Vis apsorpcijskih spektara DPBF-a najprije je pripremljen niz razrjeđenja otopine u zatamnjenim vijalicama, u rasponu od 1 do 10  $\mu\text{M}$ , za svako od četiri otapala. Prije svakog snimanja, snimljena je bazna linija, apsorpcijski spektar kivete s čistim otapalom. Apсорpcijski spektri su snimani u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm. Skenirani su spektri DPBF-a različitih koncentracija za svako otapalo, kako bi se naknadno mogao analizirati odnos apsorbance o koncentraciji (Lambert-Beerov zakon) uzevši u obzir valnu duljinu apсорpcijskog maksimuma („apsorpcijski peak“).

Na isti su način snimljeni i apсорpcijski spektri četiriju porfirina u svakom od otapala, te se iz dobivenih apсорpcijskih spektara pri različitim koncentracijama porfirina analizirao odnos apsorbance o koncentraciji pri valnoj duljini apсорpcijskog maksimuma.

### 3.4. Određivanje optimalne koncentracije DPBF-a za svako otapalo

Optimalna koncentracija DPBF-a određena je za svako od otapala kako bi se osiguralo da prilikom mjerenja produkcije singletnog kisika, emisijski spektar boje ima dovoljno jak intenzitet emisije (400 i više). Na taj način se lakše može raspoznati i analizirati pad fluorescencije kontrolne

boje prilikom provedbe fotodegradacijske metode. Pripremljene su otopine kontrolne boje u etanolu, DCM-u, DMF-u i DMSO-u u koncentracijskom rasponu od 1 do 10  $\mu\text{M}$ . Izmjereni su emisijski spektri uzoraka u rasponu valnih duljina od 400 do 800 nm, uz ekscitaciju pri 415 nm, sve do intenziteta 1000, uz povećavanje koncentracije po potrebi.

### 3.5. Mjerenje stabilnosti DPBF-a

Pripremljena su razrjeđenja DPBF-a u svakom od otapala koja su prilikom određivanja optimalne koncentracije kontrolne boje imala optimalan intenzitet emisije. U kivetu je stavljen magnet, uključena je lampa i upaljena magnetska miješalica (400 rpm). U programu za skeniranje emisijskih spektara postavljen je raspon valnih duljina (440-480 nm), uz ekscitaciju pri 415 nm. Prije svake serije mjerenja izmjerena je bazična vrijednost, tj. emisijski spektar kivete s čistim otapalom (funkcija Zero). Mjerenje stabilnosti provedeno je u 16 ciklusa, tako da je najprije skeniran fluorescencijski spektar kontrolne boje prije ekscitacije lampom, a zatim 15 ciklusa osvjetljavanja crvenim svjetlom ( $\lambda = 647 \text{ nm}$ ) u periodima od 60 s. Iz dobivenih grafova analiziran je pad fluorescencije računanjem AUC (eng. *area under curve*), tj, površine ispod krivulje.

### 3.6. Mjerenje produkcije singletnog kisika ( $^1\text{O}_2$ ) fotodegradacijskom metodom

Pripremljena su razrjeđenja DPBF-a za svako otapalo (EtOH, DCM, DMF, DMSO). Pripremljeno je i nekoliko razrjeđenja svakog od porfirina u svakom od otapala, te je nakon nekoliko pokusnih mjerenja odabrana optimalna koncentracija kontrolne boje u odnosu na porfirin. Uzorci su pripremljeni pipetiranjem 1  $\mu\text{L}$  otopine s kontrolnom bojom i 1  $\mu\text{L}$  otopine s određenim porfirinom. U kivetu je stavljen magnet, uključena je lampa i upaljena magnetska miješalica (400 rpm). Raspon valnih duljina postavljen je od 440 do 480 nm, uz ekscitaciju na 415 nm. Prije svake serije mjerenja u određenom otapalu, izmjerena je baseline, spektar kivete s čistim otapalom

(funkcija Zero). Mjerenje produkcije singletnog kisika provedeno je u 16 ciklusa, tako da je najprije skeniran fluorescencijski spektar uzorka prije ekscitacije lampom, a zatim 15 ciklusa osvjetljavanja crvenim svjetlom ( $\lambda = 647 \text{ nm}$ ) u periodima od 60 s. Iz dobivenih grafova analiziran je pad fluorescencije računanjem površine ispod krivulje, AUC.

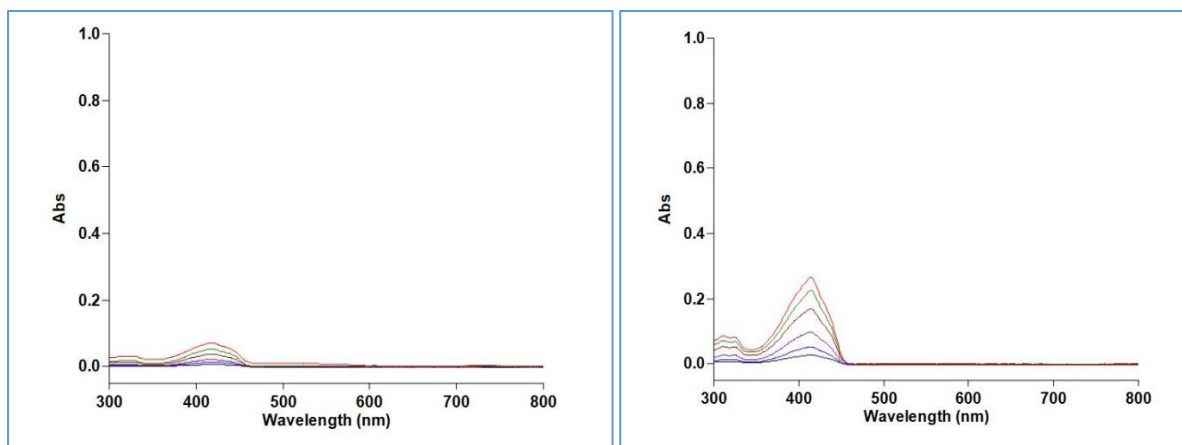
## 4. Rezultati i diskusija

### 4.1. Snimanje UV-Vis apsorpcijskih spektara

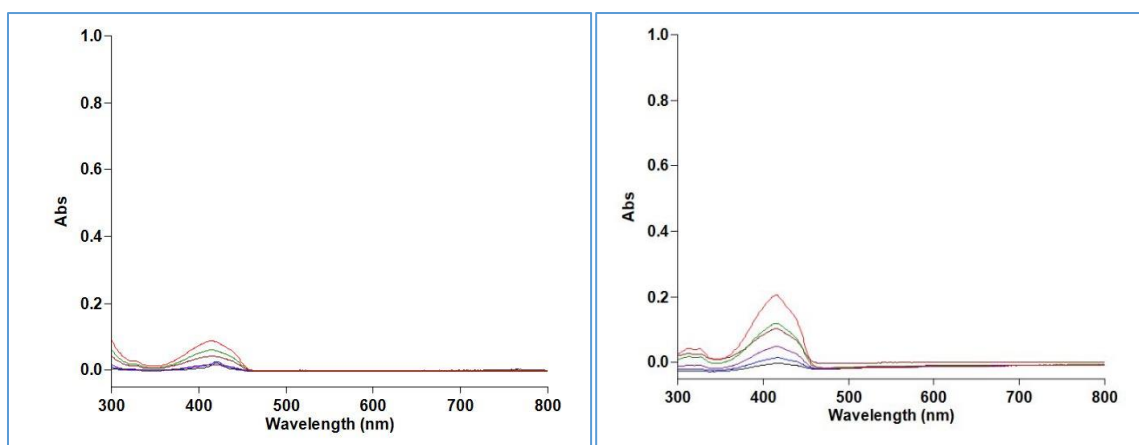
Snimanje apsorpcijskih spektara kontrolne boje u svakom od korištenih otapala provedeno je kako bi se ustanovilo pri kojoj je valnoj duljini dosegnut apsorpcijski maksimum. Promjena apsorbance je mjerena kao funkcija valne duljine. Molekule koje sadrže vezne (HOMO) i protuvezne (LUMO) orbitale mogu apsorbirati energiju u obliku ultraljubičaste ili vidljive svjetlosti čime se pobuđuju elektroni koji prelaze iz veznih u prazne protuvezne molekulske orbitale. Što je razlika energija među HOMO i LUMO orbitalama manja, to je veća valna duljina svjetlosti koju molekula apsorbira.

#### 4.1.1. Snimanje UV-Vis apsorpcijskih spektara DPBF-a za svako od otapala

DPBF, standardni reagens za mjerenje produkcije singletnog kisika, u većini organskih otapala maksimalnu apsorpciju postiže oko 410 nm, nakon čega intenzivno fluorescira<sup>32,33</sup>. Problem koji se često pojavljuje prilikom spektroskopskih mjerenja DPBF-a jest njegova osjetljivost na zrak i svjetlost. U prisutnosti sobnog svjetla i/ili zraka, uslijed radikalskih reakcija brzo dolazi do fotolize što utječe i na točnost rezultata. Unatoč tome, DMF i DMSO pokazali su se pouzdanim otapalima za mjerenje apsorpcije i fluorescencije DPBF-a zbog toga što je DPBF u njima stabilan<sup>33</sup>. U etanolu pokazuje sklonost dimerizaciji, pri čemu prilikom iradijacije nastaje bezbojni fotodimer<sup>34</sup>.



Slika 11: Prikaz UV-Vis spektra DPBF-a koncentracijskog raspona 1-10  $\mu\text{M}$  u DMSO-u i EtOH-u



Slika 12: Prikaz UV-Vis spektra DPBF-a koncentracijskog raspona 1-10  $\mu\text{M}$  u DCM-u i DMF-u

Očitavanjem podataka apsorpcijskih maksimuma dobivene su sljedeće vrijednosti:

Tablica 1: Očitane vrijednosti valnih duljina za apsorpcijske maksimume DPBF-a u ispitivanim otapalima

| Otapalo | Valna duljina/nm |
|---------|------------------|
| DMSO    | 416.014          |
| EtOH    | 413.986          |
| DCM     | 419.989          |
| DMF     | 417.015          |

Promatranjem grafova (Slika 11 i 12) može se uočiti da je apsorbanca DPBF-a značajno veća u etanolu i DMF-u u odnosu na DMSO i DCM. Apсорpcijski maksimum kontrolne boje je najbliži literaturnoj vrijednosti u DCM-u. Najveće odstupanje od literaturne vrijednosti apсорpcijskog maksimuma uočeno je u etanolu. Za drugi dio eksperimenta dogovorena je ekscitacijska valna duljina od 415 nm za sve uzorke stoga što malena odstupanja od literaturne vrijednosti u ovom slučaju neće značajno utjecati na dobivene rezultate prilikom mjerenja pada fluorescencije.

Primjenom Beer-Lambertovog zakona su izračunati molarni apсорpcijski koeficijenti DPBF-a u svakom od otapala. U praktičnoj uporabi često je korišten izraz Beer-Lambertovog zakona koji povezuje apсорpciju svjetlosti uzorka određene koncentracije s duljinom puta koju svjetlost mora prijeći prilikom osvjetljavanja uzorka. Taj izraz glasi:

$$A = \varepsilon * l * c,$$

pri čemu  $\varepsilon$  predstavlja molarni apсорpcijski koeficijent uzorka,  $l$  predstavlja duljinu puta svjetlosti kroz uzorak, a  $c$  je oznaka za molarnu koncentraciju ispitivanog uzorka.

Vrijednosti apсорpcijskih maksimuma DPBF-a u ispitivanim otapalima prikazane su u linearnoj ovisnosti ( $y = ax + b$ ) o koncentraciji ispitivanih uzoraka. Kao što je ranije navedeno, apсорpcijski su spektri mjereni u konc. rasponu 1-10  $\mu\text{M}$ . Iz jednadžbi pravaca, koje se u ovom slučaju mogu poistovjetiti s Beer-Lambertovim zakonom, iz poznate koncentracije i apsorbanca, te duljine zrake svjetlosti koja prolazi kroz kvarcnu kivetu (1 cm), izračunati su molarni apсорpcijski koeficijenti kontrolne boje za svako otapalo (Tablica 2).

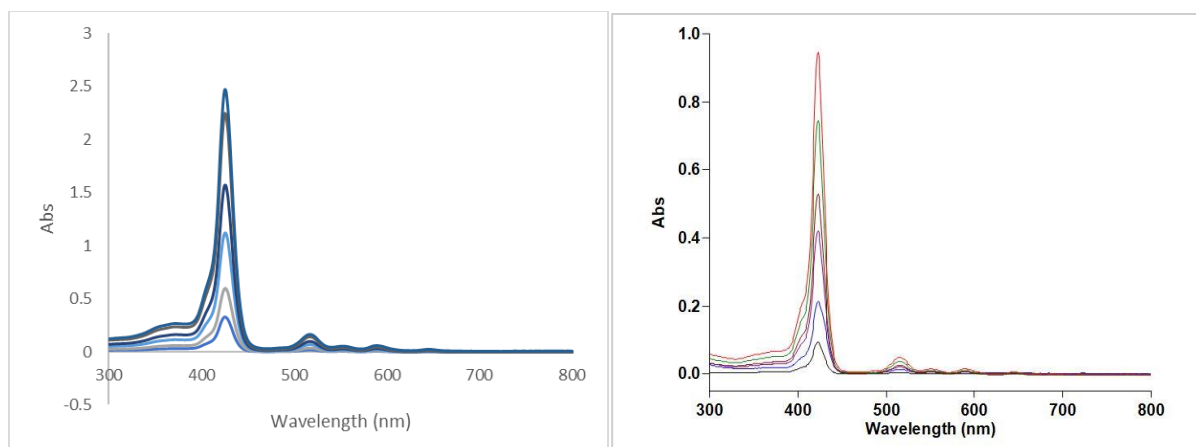


| c(DPBF)/<br>mol $\text{dm}^{-3}$ | $\epsilon/\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ |          |          |          |
|----------------------------------|---|----------|----------|----------|
|                                  | DMSO                                      | EtOH     | DCM      | DMF      |
| 1.00E-06                         | 9.381E-13                                 | 1.03E-12 | 1.46E-12 | -7.6E-14 |
| 2.00E-06                         | 3.844E-12                                 | 3.83E-12 | 3.67E-12 | 1.41E-12 |
| 4.00E-06                         | 1.244E-11                                 | 1.43E-11 | 7.46E-12 | 9.15E-12 |
| 6.00E-06                         | 3.221E-11                                 | 3.71E-11 | 3.15E-11 | 2.86E-11 |
| 8.00E-06                         | 6.041E-11                                 | 6.58E-11 | 5.9E-11  | 4.43E-11 |
| 1.00E-05                         | 1.005E-10                                 | 9.71E-11 | 1.03E-10 | 9.47E-11 |

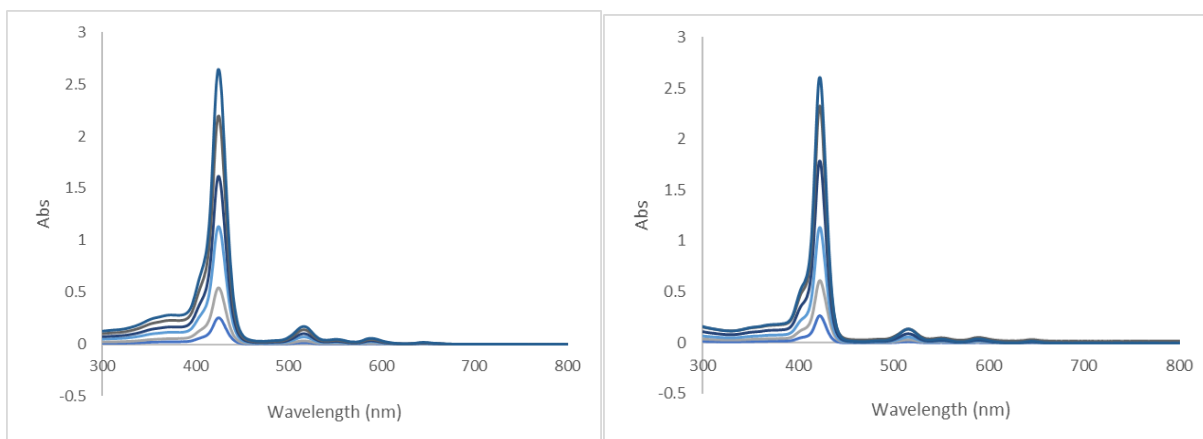
Tablica 2: Izračunate vrijednosti molarnih apsorpcijskih koeficijenata DPBF-a u ispitivanim otapalima u koncentracijskom rasponu 1-10  $\mu\text{M}$

#### 4.1.2. Snimanje UV-Vis apsorpcijskih spektara *N*-metiliranih i *N*-oksidiranih porfirina u različitim otapalima

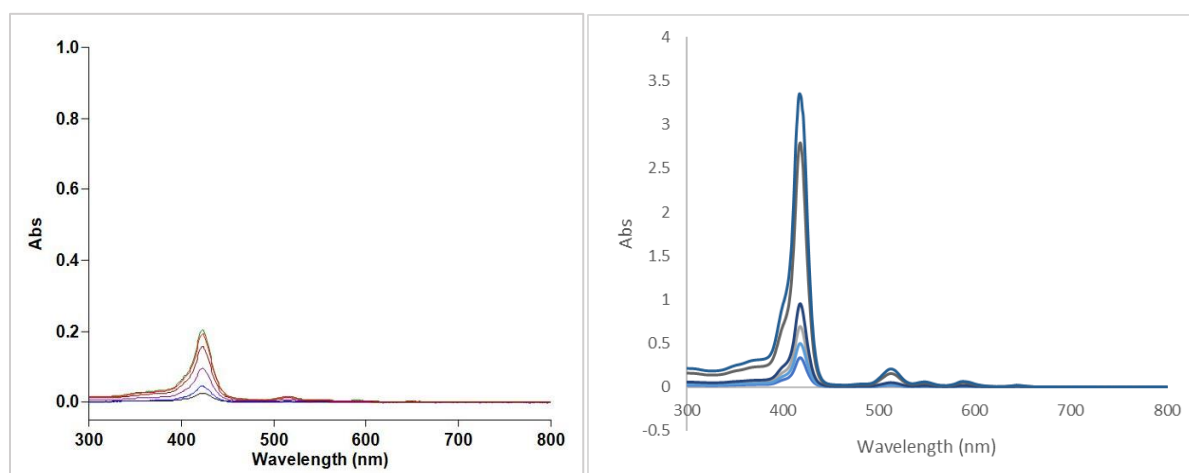
Spektrofotometrijskom analizom porfirina u UV-Vis području elektromagnetskog zračenja može se uočiti njihov karakteristični apsorpcijski spektar. Pri valnoj duljini od 400 nm svi su ispitivani porfirini imali intenzivnu Soretovu vrpce, te slabije uočljive četiri Q vrpce (Slike 13-20).



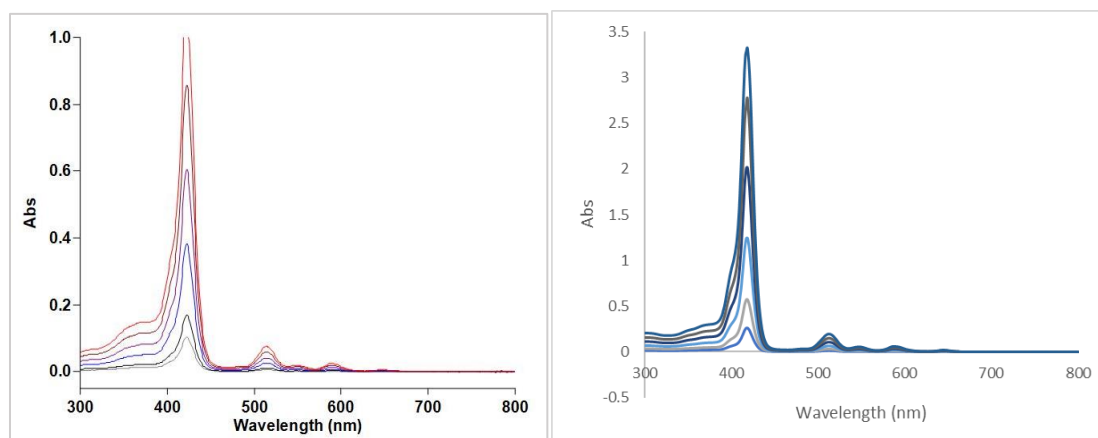
Slika 13: Apсорpcijski spektri koncentracijskog raspona 1-10  $\mu\text{M}$  za 18C-M (lijevo) i 18C-O (desno) porfirine u DMSO-u



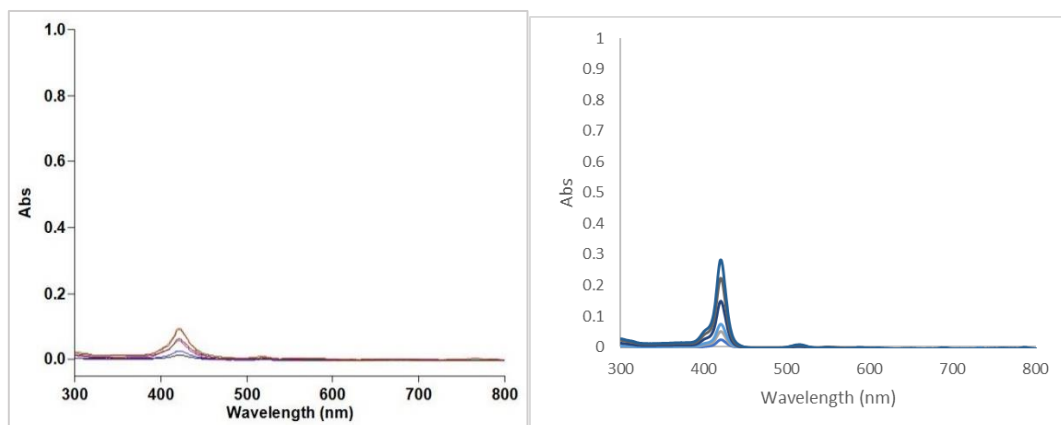
Slika 14: Apsorpcijski spektri koncentracijskog raspona 1-10  $\mu\text{M}$  za Amido-M (lijevo) i Amido-O (desno) porfirine u DMSO-u



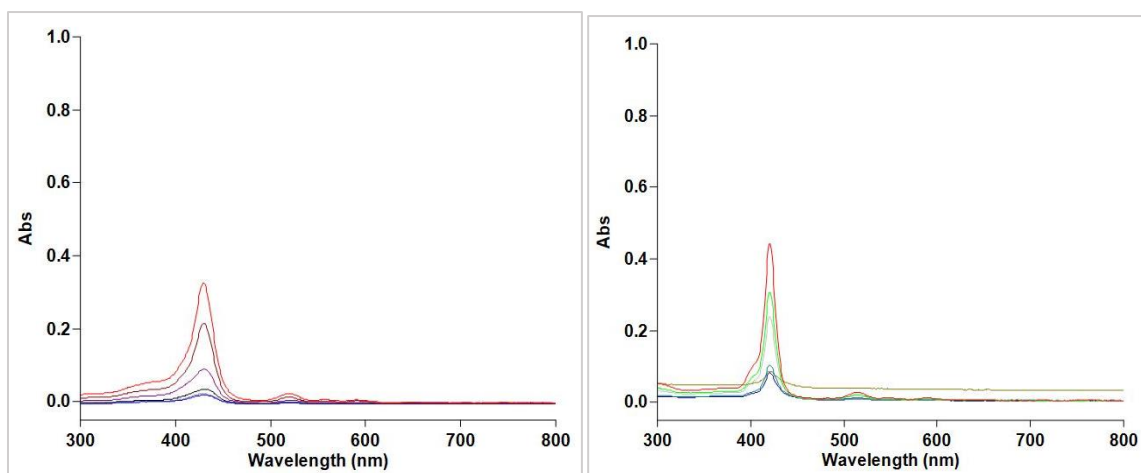
Slika 15: Apsorpcijski spektri koncentracijskog raspona 1-10  $\mu\text{M}$  za 18C-M (lijevo) i 18C-O (desno) porfirine u etanolu



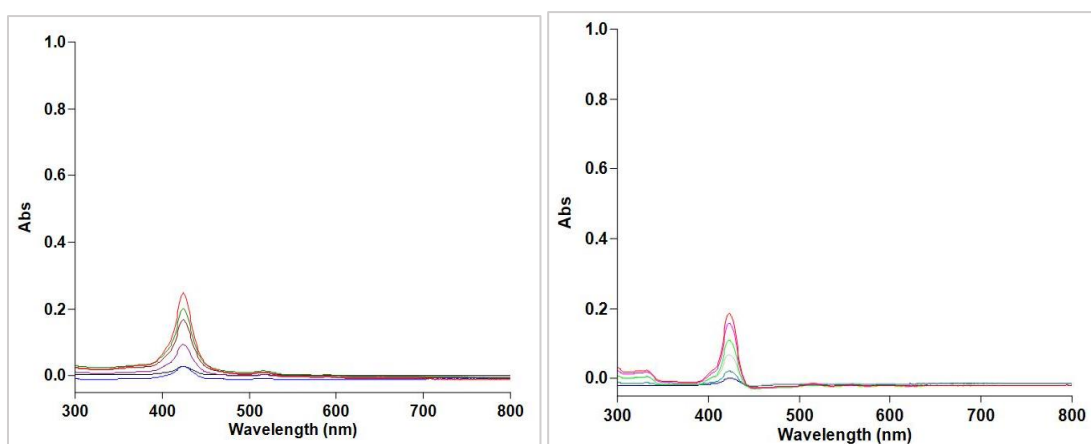
Slika 16: Apsorpcijski spektri koncentracijskog raspona 1-10  $\mu\text{M}$  za Amido-M (lijevo) i Amido-O (desno) porfirine u etanolu



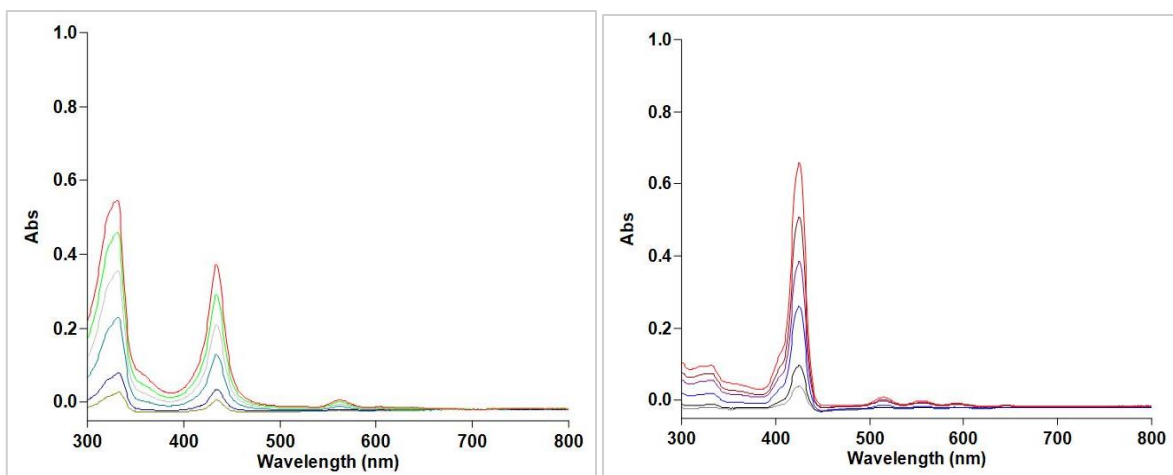
Slika 17: Apsorpcijski spektri koncentracijskog raspona 1-10  $\mu\text{M}$  za 18C-M (lijevo) i 18C-O (desno) porfirine u DCM-u



Slika 18: Apsorpcijski spektri koncentracijskog raspona 1-10  $\mu\text{M}$  za Amido-M (lijevo) i Amido-O (desno) porfirine u DCM-u



Slika 19: Apsorpcijski spektri koncentracijskog raspona 1-10  $\mu\text{M}$  za 18C-M (lijevo) i 18C-O (desno) porfirine u DMF-u



Slika 20: Apsorpcijski spektri koncentracijskog raspona 1-10  $\mu\text{M}$  za Amido-M (lijevo) i Amido-O (desno) porfirine u DMF-u

Soretove vrpce nekolicine porfirina dosegle su značajno visok intenzitet apsorpcije; to su redom 18C-M, AMIDO-M i AMIDO-O porfirini u DMSO-u, te 18C-O, AMIDO-M i AMIDO-O u etanolu (Slike 13-16). Nasuprot tome, 18C-M i 18C-O (Slika 17) su u DCM-u pokazali niske vrijednosti apsorpcije, prilikom čega čak niti maksimalna apsorbanca u području Soretove vrpce nije prešla vrijednost od 0.2. Mjerenjem apsorpcije AMIDO-M u DMF-u (Slika 20) dobiven je neobičan spektar sa vrpcom jakog intenziteta u području od 300 nm. Slična je vrpca, premda manjeg intenziteta, uočena i za AMIDO-O u istom otapalu. Moguć uzrok tome jest fotoliza uzorka čime bi se promijenila njegova spektroskopska svojstva.

Usporedbom apsorpcijskih spektara *N*-metiliranih i *N*-oksidiranih porfirina možemo uočiti da je 18C-M porfirin u DMSO-u jače apsorbirao svjetlost od 18C-O porfirina. Nasuprot tome, AMIDO-M porfirin dosegaao je niži apsorpcijski maksimum od svog *N*-oksidiranog ekvivalenta. Nadalje, 18C-O je u etanolu pokazao značajno veći apsorpcijski maksimum od metiliranog porfirina. Primijećen je slabiji intenzitet AMIDO-M porfirina u etanolu u odnosu na AMIDO-O. Intenzitet apsorpcije u diklormetanu generalno je nizak, pri čemu su apsorpcije 18C-M i 18C-O porfirina slabijeg intenziteta u odnosu na AMIDO-porfirine. Najveći maksimum apsorpcije u diklormetanu imao je AMIDO-O porfirin. Kod usporedbe porfirina u dimetilformamidu, uočeno je da 18C-M i 18C-O imaju malen intenzitet

apsorpcije, a AMIDO-M i AMIDO-O veći, pri čemu je AMIDO-O pokazao veći intenzitet od *N*-metiliranog ekvivalenta. Očitane vrijednosti valne duljine svjetlosti pri apsorpcijskom maksimumu u ispitivanim otapalima za sve su porfirine iznosile približno 420 nm. Iregularna vrpca na 300 nm za Amido-M u dimetilformamidu je zanemarena jer ne pripada Soretovoj vrpici. Beer-Lambertovim zakonom izračunate su vrijednosti molarnih apsorpcijskih koeficijenata *N*-metiliranih i *N*-oksidiranih porfirina za svako od otapala (Tablice 3 i 4).

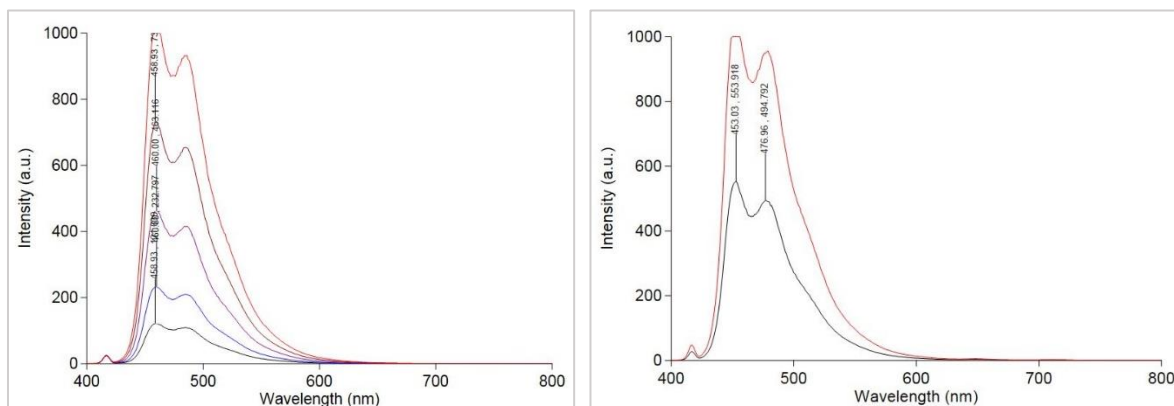
| c(porfirin)/<br>/mol $\text{dm}^{-3}$ | $\epsilon/\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ |          |          |          | c(porfirin)/<br>/mol $\text{dm}^{-3}$ | $\epsilon/\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ |          |          |          |
|---------------------------------------|---|----------|----------|----------|---------------------------------------|---|----------|----------|----------|
|                                       | 18C-M                                     | 18C-O    | AMIDO-M  | AMIDO-O  |                                       | 18C-M                                     | 18C-O    | AMIDO-M  | AMIDO-O  |
| 1.00E-06                              | 1.32E-12                                  | 1.02E-12 | 9.61E-13 | 9.98E-13 | 1.00E-06                              | 1.26E-12                                  | 9.96E-13 | 9.09E-13 | 7.44E-13 |
| 2.00E-06                              | 4.80E-12                                  | 4.65E-12 | 4.09E-12 | 4.54E-12 | 2.00E-06                              | 4.35E-12                                  | 4.06E-12 | 2.99E-12 | 3.3E-12  |
| 4.00E-06                              | 1.80E-11                                  | 1.83E-11 | 1.69E-11 | 1.69E-11 | 4.00E-06                              | 1.82E-11                                  | 5.90E-12 | 1.36E-11 | 1.43E-11 |
| 6.00E-06                              | 3.81E-11                                  | 3.47E-11 | 3.63E-11 | 3.99E-11 | 6.00E-06                              | 4.48E-11                                  | 1.69E-11 | 3.22E-11 | 3.47E-11 |
| 8.00E-06                              | 7.25E-11                                  | 6.51E-11 | 6.59E-11 | 6.94E-11 | 8.00E-06                              | 7.81E-11                                  | 6.57E-11 | 6.1E-11  | 6.36E-11 |
| 1.00E-05                              | 9.98E-11                                  | 1.03E-10 | 9.91E-11 | 9.73E-11 | 1.00E-05                              | 9.19E-11                                  | 9.83E-11 | 9.77E-11 | 9.51E-11 |

Tablica 3: Izračunate vrijednosti molarnih apsorpcijskih koeficijenata *N*-metiliranih i *N*-oksidiranih porfirina u DMSO-u (lijevo) i etanolu (desno) u koncentracijskom rasponu 1-10  $\mu\text{M}$

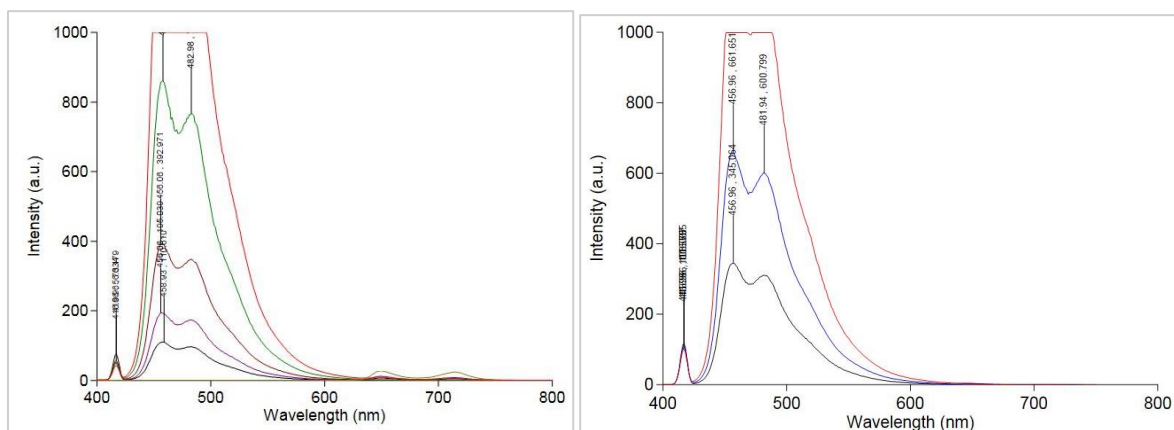
| c(porfirin)/<br>/mol $\text{dm}^{-3}$ | $\epsilon/\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ |          |          |          | c(porfirin)/<br>/mol $\text{dm}^{-3}$ | $\epsilon/\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ |          |          |          |
|---------------------------------------|---|----------|----------|----------|---------------------------------------|---|----------|----------|----------|
|                                       | 18C-M                                     | 18C-O    | AMIDO-M  | AMIDO-O  |                                       | 18C-M                                     | 18C-O    | AMIDO-M  | AMIDO-O  |
| 1.00E-06                              | 1.53E-12                                  | 8.16E-13 | 6.51E-13 | 2.14E-12 | 1.00E-06                              | 1.07E-12                                  | 2.85E-14 | 1.41E-13 | 5.56E-13 |
| 2.00E-06                              | 5.76E-12                                  | 3.39E-12 | 2.07E-12 | 4.05E-12 | 2.00E-06                              | 2.19E-12                                  | 1.95E-12 | 1.70E-12 | 2.78E-12 |
| 4.00E-06                              | 2.49E-11                                  | 1.01E-11 | 2.18E-12 | 1.03E-11 | 4.00E-06                              | 1.43E-11                                  | 1.29E-11 | 1.25E-11 | 1.52E-11 |
| 6.00E-06                              | 4.11E-11                                  | 3.08E-11 | 1.60E-11 | 3.51E-11 | 6.00E-06                              | 3.86E-11                                  | 3.08E-11 | 3.05E-11 | 3.36E-11 |
| 8.00E-06                              | 7.86E-11                                  | 6.10E-11 | 5.12E-11 | 6.05E-11 | 8.00E-06                              | 6.16E-11                                  | 5.94E-11 | 5.64E-11 | 5.93E-11 |
| 1.00E-05                              | 1.04E-10                                  | 9.66E-11 | 9.75E-11 | 1.09E-10 | 1.00E-05                              | 9.47E-11                                  | 8.79E-11 | 9.01E-11 | 9.58E-11 |

Tablica 4: Izračunate vrijednosti molarnih apsorpcijskih koeficijenata *N*-metiliranih i *N*-oksidiranih porfirina u DCM-u (lijevo) i DMF-u (desno) u koncentracijskom rasponu 1-10  $\mu\text{M}$

## 4.2. Određivanje optimalne koncentracije DPBF-a za svako otapalo



Slika 21: Fluorescencijski spektri kontrolne boje DPBF-a pri variranim koncentracijama u DMSO-u (lijevo) i etanolu (desno)



Slika 22: Fluorescencijski spektri kontrolne boje DPBF-a pri variranim koncentracijama u DCM-u (lijevo) i DMF-u (desno)

Promatranjem fluorescencijskih spektara DPBF-a (Slike 21 i 22) u različitim otapalima određene su optimalne koncentracije kontrolne boje, a to su one čije vrijednosti intenziteta variraju od 600 (400) do 800. Koncentracije su zbog preglednosti navedene u tablici:

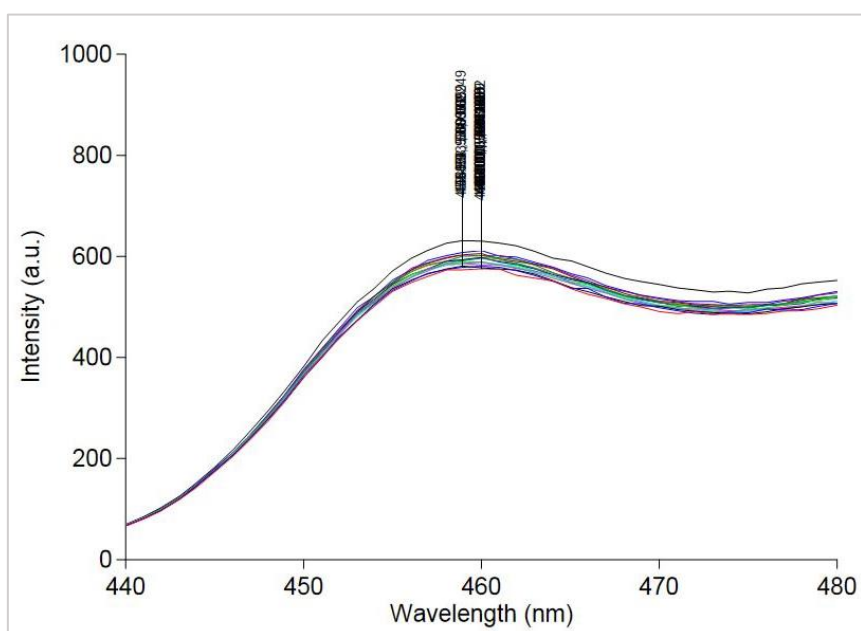
Tablica 4: Optimalne koncentracije kontrolne boje DPBF-a za svako otapalo

| Otapalo | Optimalna koncentracija/ $\mu\text{M}$ |
|---------|--|
| DMSO    | 4-6                                    |
| EtOH    | 1-2                                    |
| DCM     | 4-6                                    |
| DMF     | 2                                      |

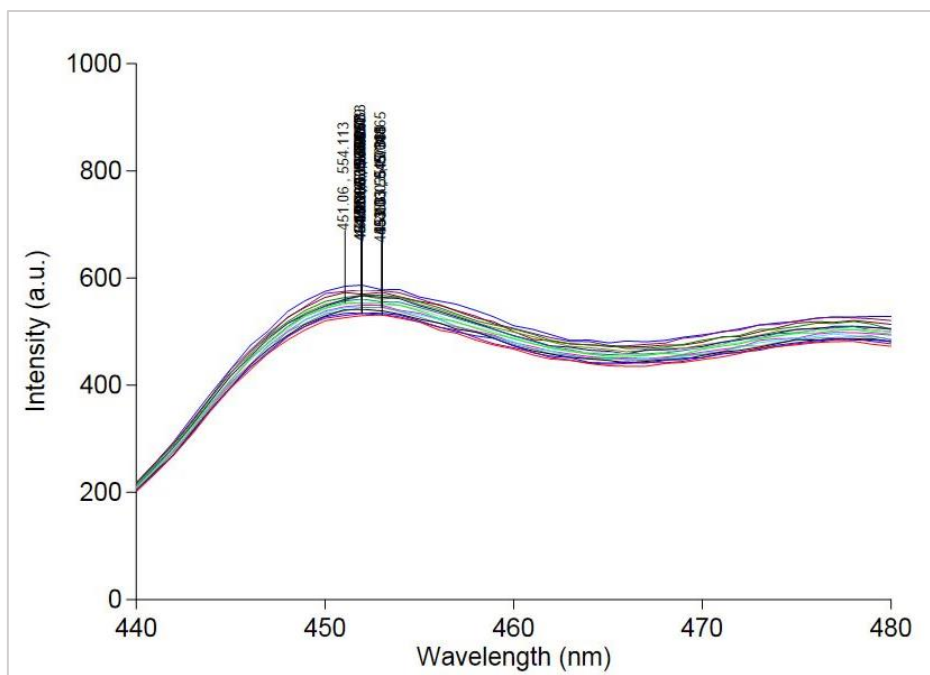
Ove su vrijednosti nadalje korištene kao smjernice prilikom mjerenja stabilnosti kontrolne boje i mjerenja pada fluorescencije. Međutim, treba uzeti u obzir da su moguća odstupanja stoga što je DPBF u nekima od otapala (EtOH, DCM) izuzetno nestabilan.

#### 4.3. Mjerenje stabilnosti DPBF-a u ispitivanim otapalima

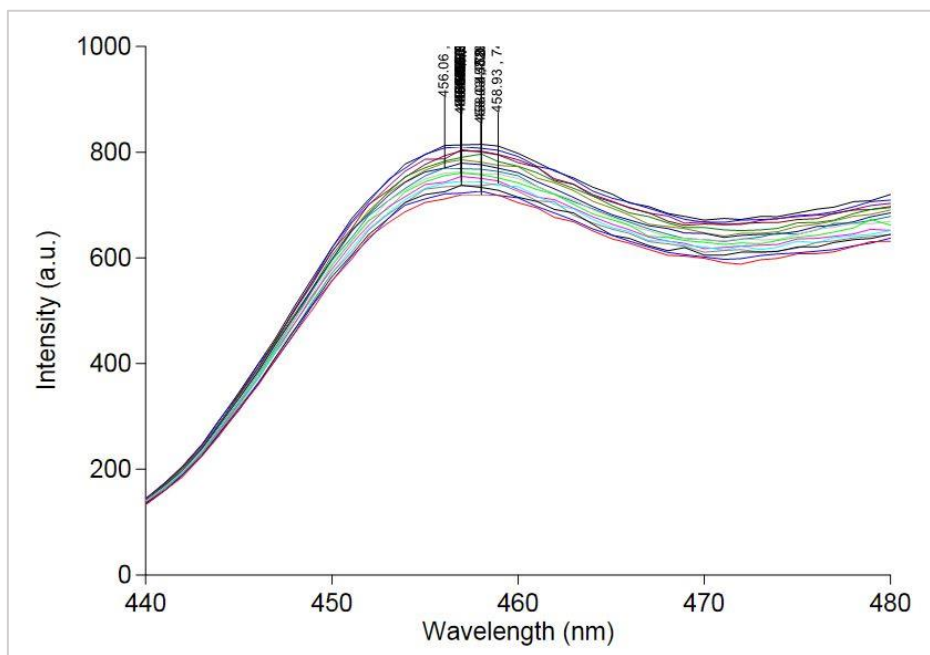
Prije same provedbe mjerenja produkcije singletnog kisika fotodegradacijskom metodom, važno je ustanoviti koliko je kontrolna boja stabilna u određenom otapalu bez interakcije sa singletnim kisikom.



Slika 23: Izmjereni emisijski spektri DPBF-a pri konc.  $6 \mu\text{M}$  u DMSO-u

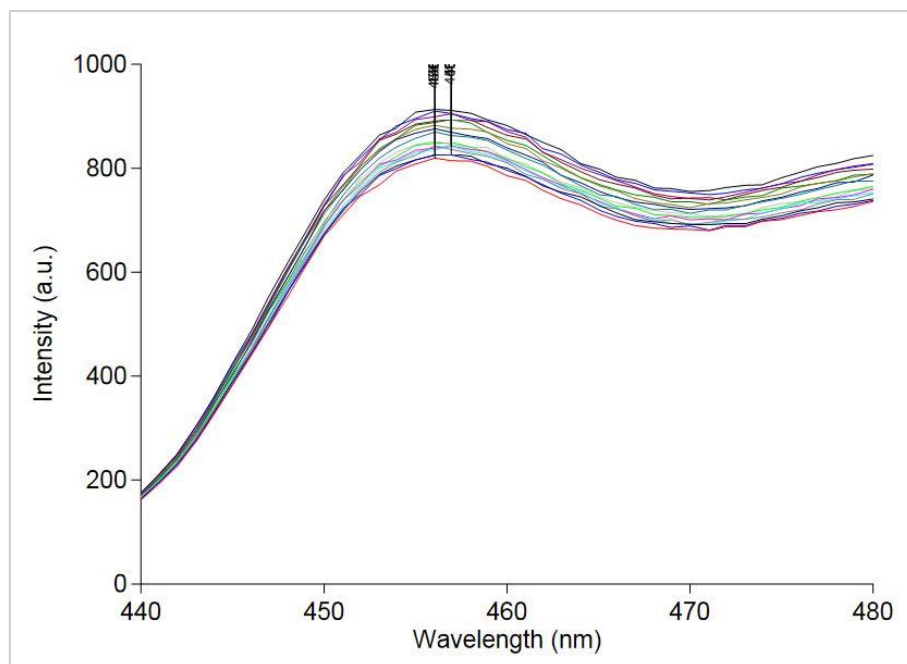


Slika 24: Izmjereni emisijski spektri DPBF-a pri konc. 8  $\mu\text{M}$  u EtOH



Slika 25: Izmjereni emisijski spektri DPBF-a pri konc. 4  $\mu\text{M}$  u DCM-u





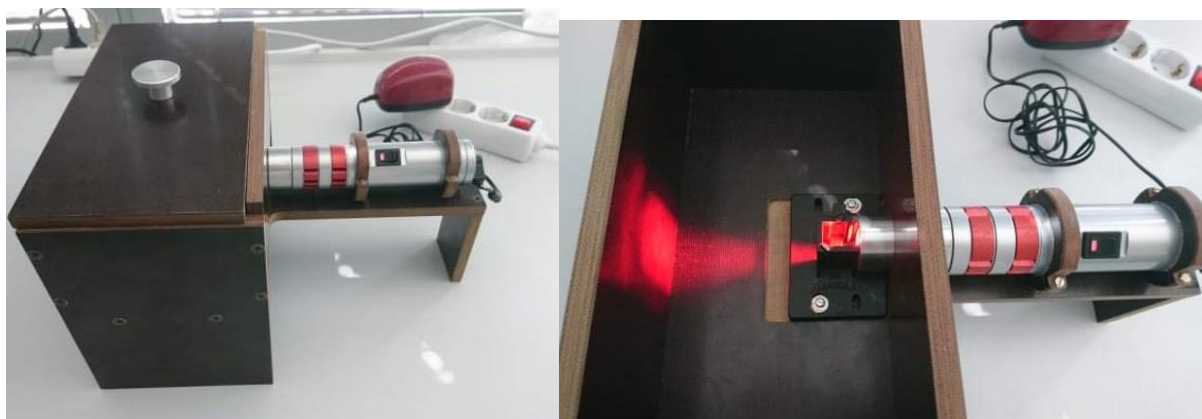
Slika 26: Izmjereni emisijski spektri DPBF-a pri konc. 2  $\mu\text{M}$  u DMF-u

Promatranjem emisijskih spektara DPBF-a prilikom osvjetljavanja lampom (Slike 23-26) možemo uočiti da je boja najstabilnija u DMSO-u pri koncentraciji 6 $\mu\text{M}$  (Slika 23). Opadanje fluorescencije u DCM-u i DMF-u nešto je izraženije u odnosu na pad u DMSO-u (Slike 25 i 26). Prilikom mjerenja stabilnosti u etanolu bilo je potrebno nekoliko pokušaja variranih koncentracija, iako je prilikom optimizacije metode izmjereni emisijski spektar indicirao da je optimalan koncentracijski raspon DPBF-a u etanolu 1-2  $\mu\text{M}$  (Slika 24). Treba uzeti u obzir da je DPBF u etanolu izuzetno sklon fotolizi, što znači da s vremenom opada njegova koncentracija u radnoj otopini koja je korištena za pripremu uzoraka.

#### 4.4. Mjerenje produkcije singletnog kisika ( $^1\text{O}_2$ ) fotodegradacijskom metodom

Produkcija singletnog kisika ( $^1\text{O}_2$ ) pomoću *N*-metiliranih i *N*-oksidiranih pofirina pobuđenih crvenom svjetlošću ( $\lambda = 647 \text{ nm}$ ) mjerena je eksperimentom fotodegradacije 1,3-difenilizobenzofurana (DPBF), fluorescentno žute boje koja je topiva u organskim otapalima. Očekuje se da će DPBF reagirati s većinom singletnog kisika nastalog u otopini, pri

čemu nastaje bezbojni produkt 1,2-dibenzoil-benzen. Premda DPBF nije topiv u vodi, topiv je u mnogim organskim otapalima kao što su diklormetan i dimetilsulfoksid. DPBF je prilikom mjerenja pobuđivan pri  $\lambda = 415 \text{ nm}$ , budući da je u poglavlju 4.1.1. „Mjerenje UV-Vis apsorpcijskih spektara DPBF-a za svako od otapala“ zaključeno da većina apsorpcijskih maksimuma varira oko te vrijednosti. Eksperiment je proveden miješanjem, u kvarcnoj kivetici, 1 ml otopine DPBF-a, te 1 ml otopine svakog od porfirina. Koncentracije uzoraka navedene su u tablici 5. Uzorak je osvjetljavao lampom crvene svjetlosti ( $\lambda = 647 \text{ nm}$ ) kroz 15 minuta, uz konstantno miješanje magnetskom miješalicom (Slika 27). Kućište je korišteno za smanjenje utjecaja sobne svjetlosti. Intenzitet fluorescencije DPBF-a mjereno je svakih 60 sekundi u 15 ciklusa osvjetljavanja.

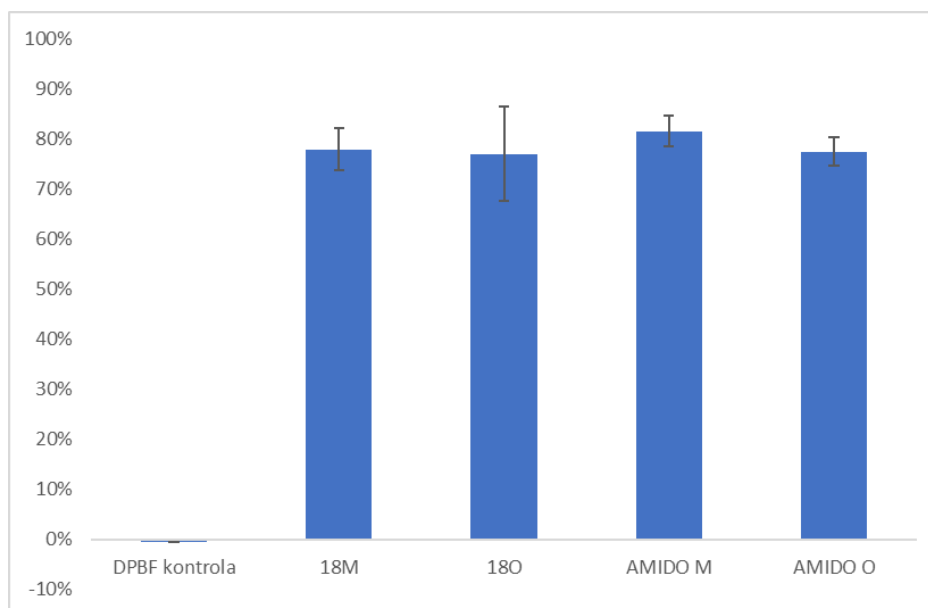


Slika 27: Lampa i kućište korišteni za mjerenje singletnog kisika izvana (lijevo) i iznutra (desno)

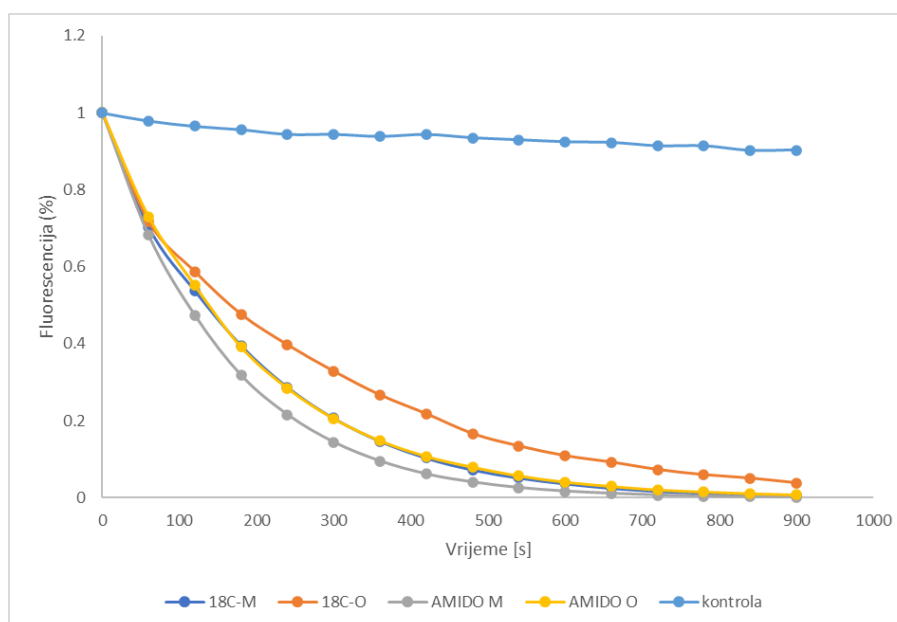
Tablica 5: Koncentracije ispitivanih porfirina i kontrolne boje DPBF u  $\mu\text{M}$ , za svako od otapala

| Otapalo | Konc. porfirina/ $\mu\text{M}$ | Konc. DPBF/ $\mu\text{M}$ |
|---------|--------------------------------|---------------------------|
| DMSO    | 6                              | 3                         |
| EtOH    | 8                              | 2                         |
| DCM     | 6                              | 4                         |
| DMF     | 6                              | 2                         |

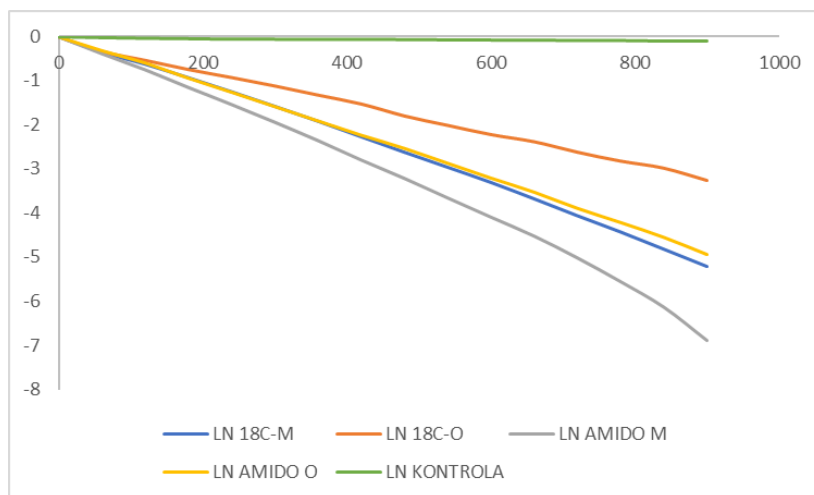
#### 4.4.1. Mjerenje produkcije singletnog kisika u DMSO-u



Slika 28: Grafički prikaz izračuna pada fluorescencije u DMSO-u za porfirine 18C-M, 18C-O, AMIDO-M i AMIDO-O u odnosu na DPBF kontrolu. Rezultati mjerenja prikazani su kao aritmetička sredina dvaju mjerenja, uz standardnu pogrešku.



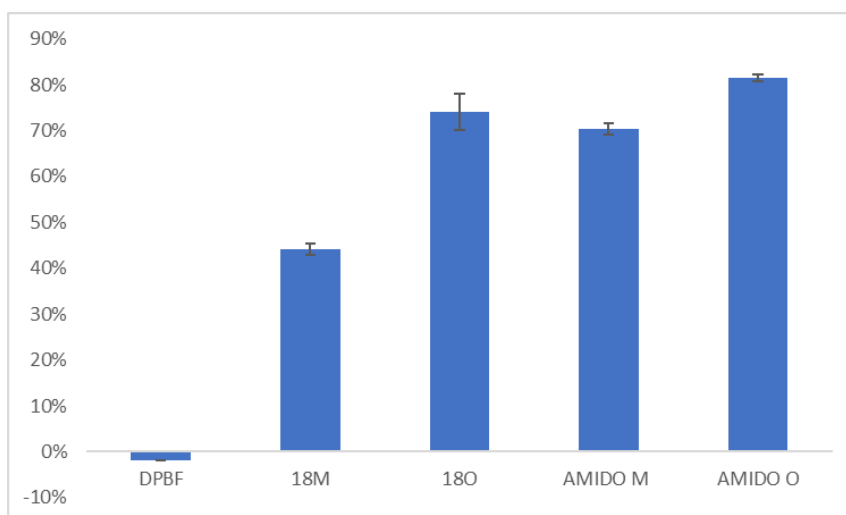
Slika 29: Krivulje dobivene eksperimentom fotodegradacije DPBF-a za određivanje produkcije singletnog kisika ispitivanih *N*-metiliranih i *N*-oksidiranih porfirina u DMSO-u, u odnosu na DPBF kontrolu



Slika 30: Linearizacija krivulja dobivenih eksperimentom fotodegradacije DPBF-a za određivanje produkcije singletnog kisika ispitivanih *N*-metiliranih i *N*-oksidiranih porfirina u DMSO-u u odnosu na DPBF kontrolu

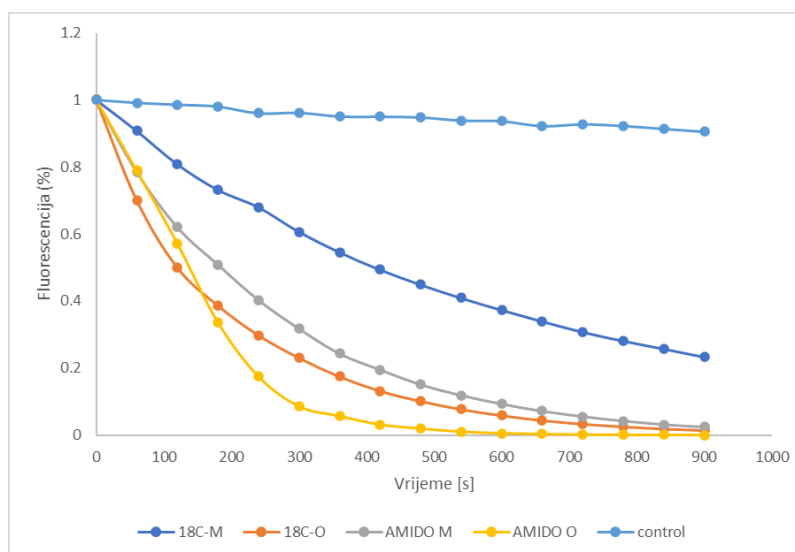
Izmjereni padovi fluorescencije prikazani su kao funkcija vremena (slika 29). Rezultati ukazuju da su svi porfirini u DMSO-u učinkoviti proizvođači singletnog kisika (Slika 28). Promatranjem krivulja (Slike 29 i 30) možemo poredati porfirine od najvećeg do najmanjeg pada fluorescencije; uočeno je da AMIDO-M porfirin ima najveći izmjereni pad, zatim slijede 18C-M, AMIDO-O, te posljednji 18C-O.

#### 4.4.2. Mjerenje produkcije singletnog kisika u etanolu

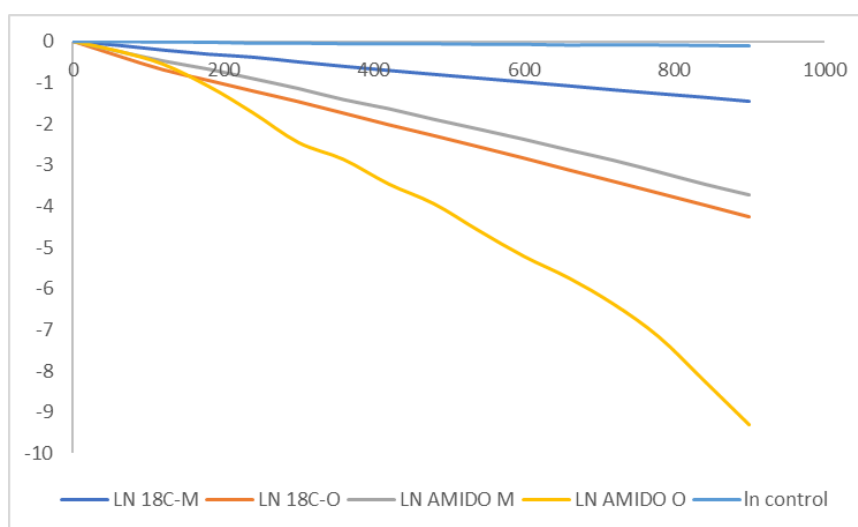


Slika 31: Grafički prikaz izračuna pada fluorescencije u EtOH-u za porfirine 18C-M, 18C-O, AMIDO-M i AMIDO-O u odnosu na DPBF kontrolu.

Rezultati mjerenja prikazani su kao aritmetička sredina dvaju mjerenja, uz standardnu pogrešku.



Slika 32: Krivulje dobivene eksperimentom fotodegradacije DPBF-a za određivanje produkcije singletnog kisika ispitivanih *N*-metiliranih i *N*-oksidiranih porfirina u etanolu, u odnosu na DPBF kontrolu



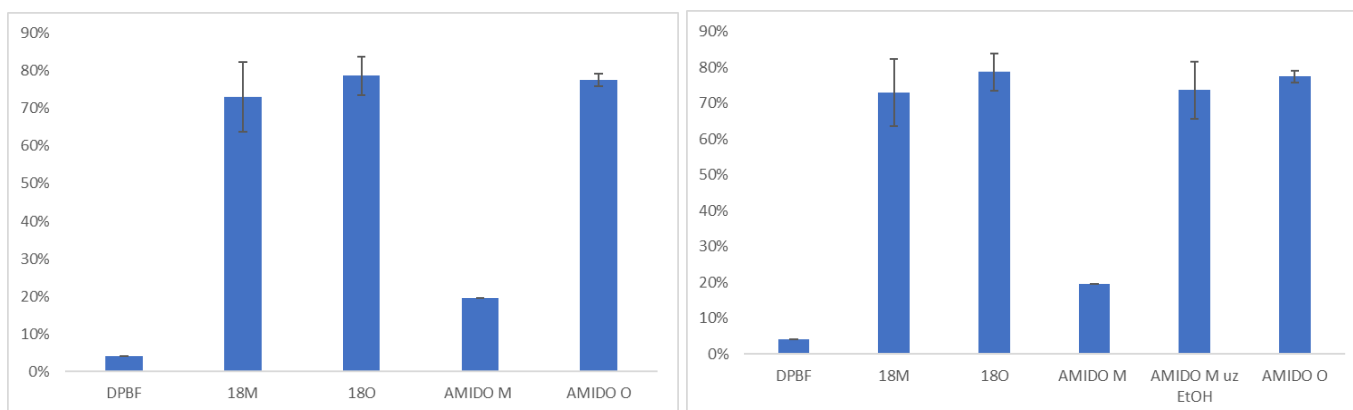
Slika 33: Linearizacija krivulja dobivenih eksperimentom fotodegradacije DPBF-a za određivanje produkcije singletnog kisika ispitivanih *N*-metiliranih i *N*-oksidiranih porfirina u EtOH-u, u odnosu na DPBF kontrolu

Mjerenje produkcije singletnog kisika u etanolu pokazalo se zahtjevnim zbog nestabilnosti kontrolne boje. Da bi se prevladala ta prepreka, svježja radna otopina koncentracije 50  $\mu$ M pripremana je svaki put kada je uočen nagli pad intenziteta fluorescencije koji nije uzrokovan

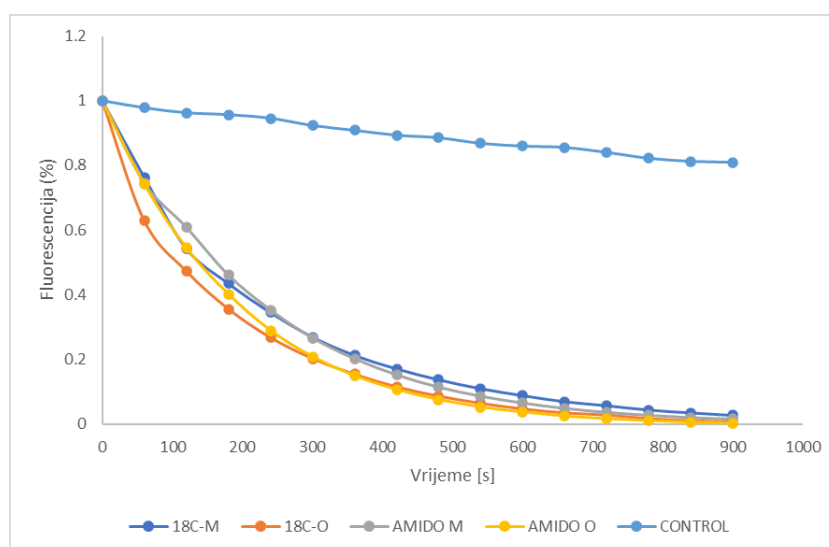
produkcijom singletnog kisika (tj. prilikom prvog mjerenja prije iradijacijskih ciklusa).

Promatranjem krivulja uočeno je da AMIDO-O porfirin ima najveći izmjereni pad fluorescencije, zatim slijede 18C-O, AMIDO-M, te posljednji 18C-M (slike 30-33).

#### 4.4.3. Mjerenje produkcije singletnog kisika u DCM-u

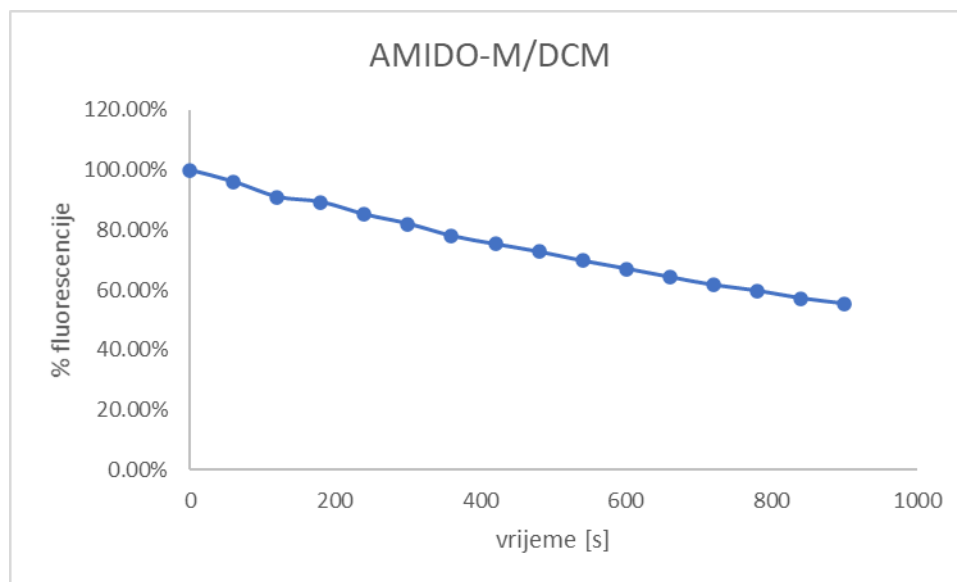


Slika 34: Grafički prikaz izračuna pada fluorescencije u DCM-u za porfirine 18C-M, 18C-O, AMIDO-M i AMIDO-O u odnosu na DPBF kontrolu (lijevo) prikaz AMIDO-M porfirina u modificiranoj otopini (DCM:EtOH 50:50) (desno). Rezultati mjerenja prikazani su kao aritmetička sredina dvaju mjerenja, uz standardnu pogrešku.

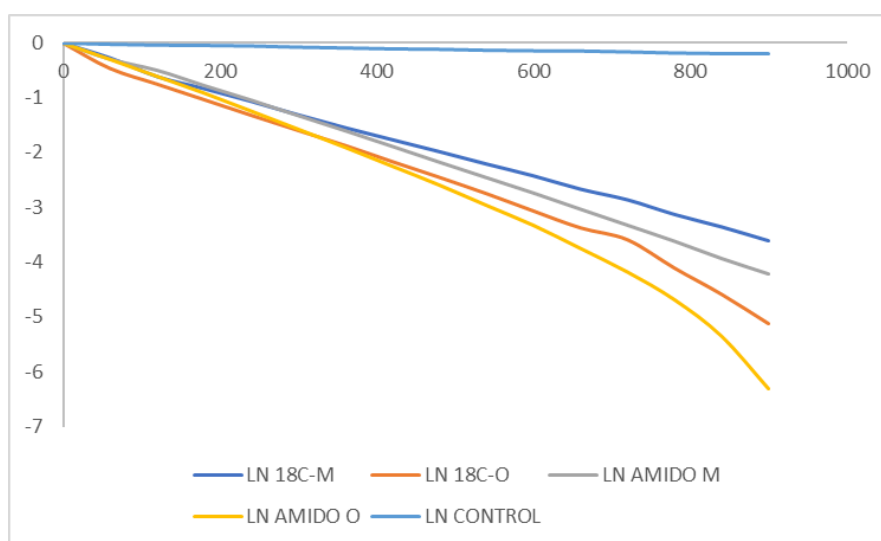


Slika 35: Krivulje dobivene eksperimentom fotodegradacije DPBF-a za određivanje produkcije singletnog kisika ispitivanih *N*-metiliranih i *N*-

oksidiranih porfirina u DCM-u, u odnosu na DPBF kontrolu (Napomena: krivulja pada fluorescencije za AMIDO-M odnosi se na modificiranu otopinu (DCM:EtOH 50:50))



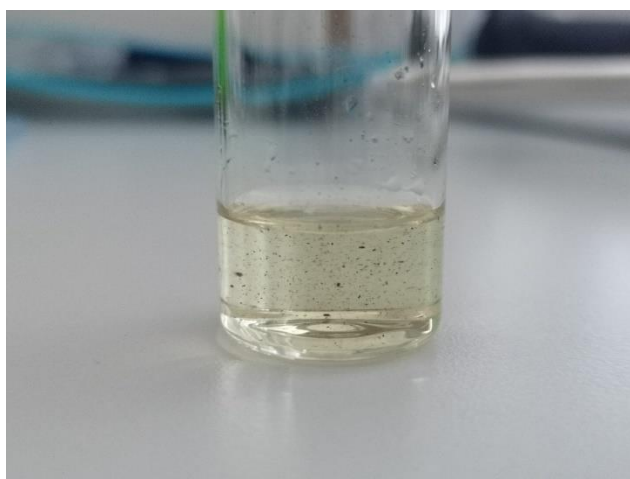
Slika 36: Grafički prikaz ovisnosti pada fluorescencije o vremenu za AMIDO-M porfirin u DCM-u



Slika 37: Linearizacija krivulja dobivenih eksperimentom fotodegradacije DPBF-a za određivanje produkcije singletnog kisika ispitivanih *N*-metiliranih i *N*-oksidiranih porfirina u DCM-u, u odnosu na DBPF kontrolu

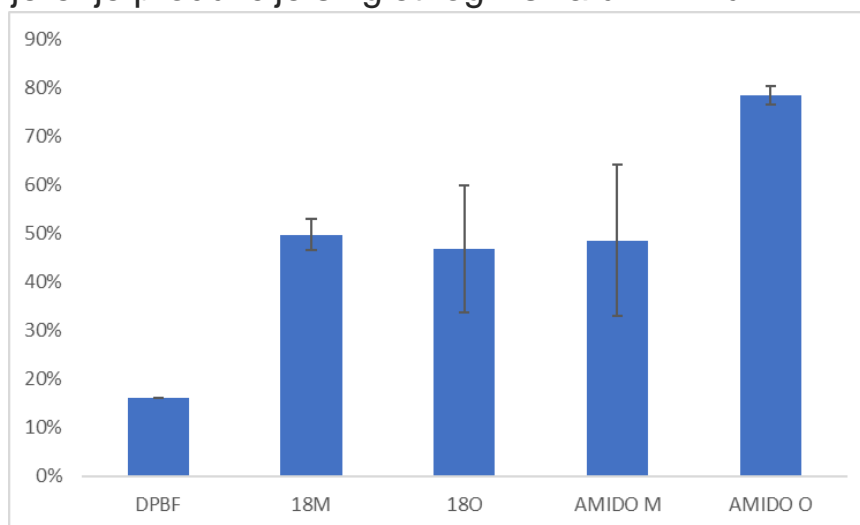
Promatranjem krivulja (Slike 34, 35 i 37) može se uočiti da su *N*-metilirani porfirini postigli nešto manji pad fluorescencije u odnosu na *N*-oksidirane porfirine. Međutim, prilikom mjerenja pada fluorescencije za

AMIDO-M porfirin, uočeno je da on nije u stanju proizvesti značajnu količinu singletnog kisika stoga što nije topiv u DCM-u, kao što je vidljivo na slici 36. Uočen je i crvenkastosmeđi talog (Slika 38). Zbog toga je provedeno mjerenje u modificiranoj otopini pripremljenoj miješanjem diklormetana i etanola u omjeru 50:50, budući da je AMIDO-M dobro topljiv u etanolu. Na slikama 35 i 37 su, dakle, uvrštene krivulje za AMIDO-M u modificiranoj otopini.



Slika 38: Prikaz otopine Amido-M porfirina u diklormetanu. Osim blago žućkastog obojenja tekućine, uočljiv je i crvenkastosmeđi talog slabo topivog porfirina.

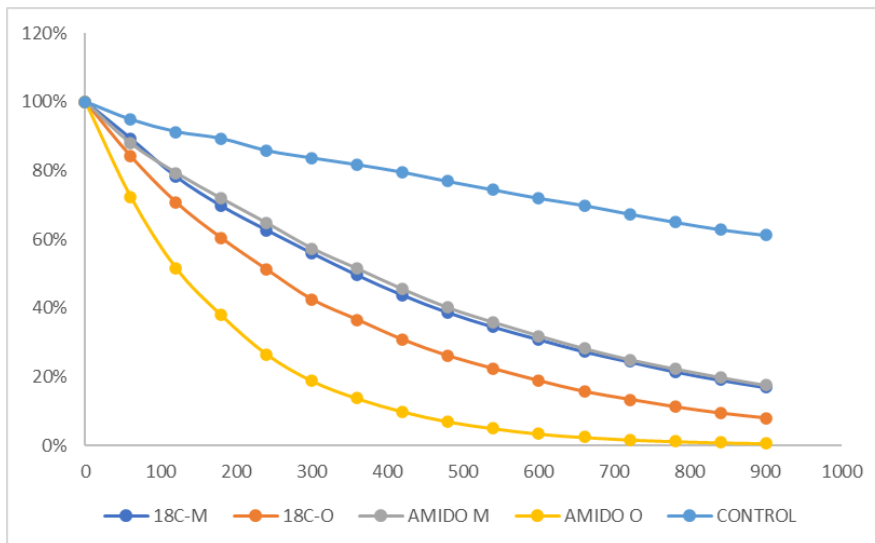
#### 4.4.4. Mjerenje produkcije singletnog kisika u DMF-u



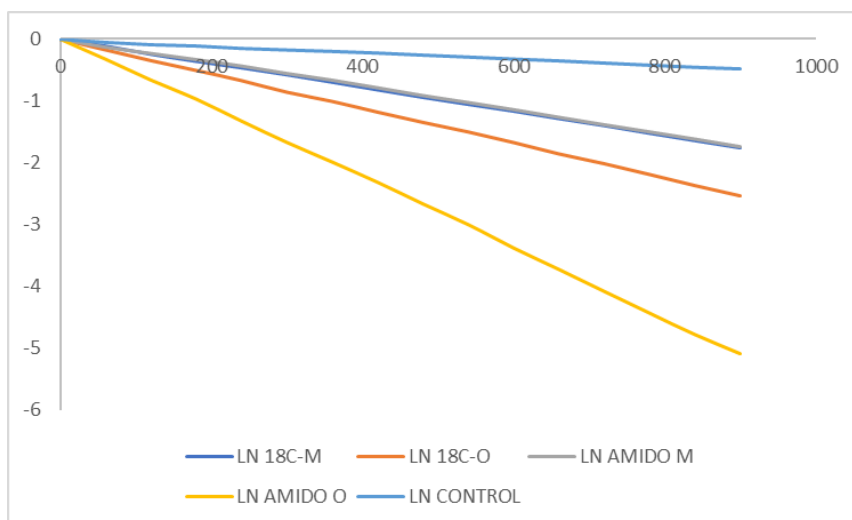
Slika 39: Grafički prikaz izračuna pada fluorescencije u DMF-u za porfirine 18C-M, 18C-O, AMIDO-M i AMIDO-O u odnosu na DPBF kontrolu.



Rezultati mjerenja prikazani su kao aritmetička sredina dvaju mjerenja, uz standardnu pogrešku.



Slika 40: Krivulje dobivene eksperimentom fotodegradacije DPBF-a za određivanje produkcije singletnog kisika ispitivanih *N*-metiliranih i *N*-oksidiranih porfirina u DMF-u, u odnosu na DPBF kontrolu

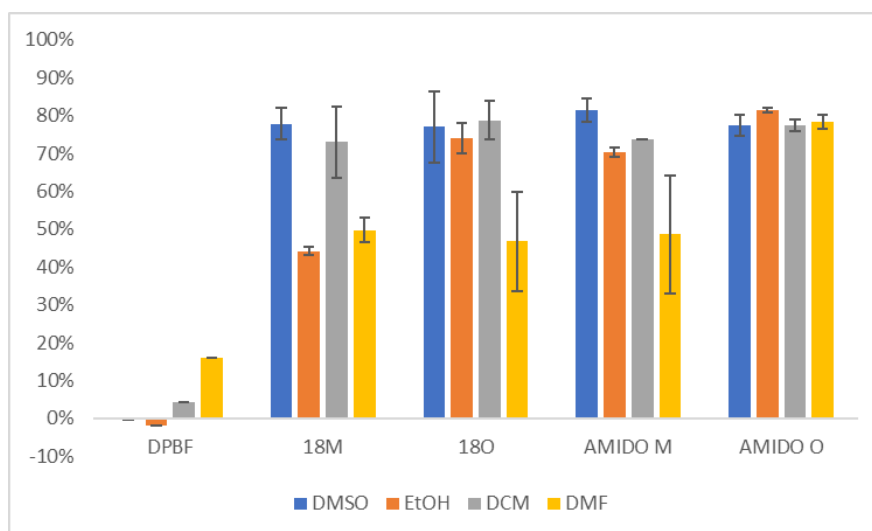


Slika 41: Linearizacija krivulja dobivenih eksperimentom fotodegradacije DPBF-a za određivanje produkcije singletnog kisika ispitivanih *N*-metiliranih i *N*-oksidiranih porfirina u DMF-u, u odnosu na DBPF kontrolu

Promatranjem krivulja dobivenih mjerenjem pada fluorescencije u dimetilformamidu (slike 40 i 41) vidljiv je značajno veći pad intenziteta fluorescencije za Amido-O porfirin u odnosu na ostale porfirine. Također,

oba *N*-metilirana porfirina su imala gotovo jednak pad intenziteta fluorescencije, koji je manji u odnosu na *N*-oksidirane porfirine (slika 39).

#### 4.4.5. Usporedba produkcije singletnog kisika po otapalima



Slika 42: Grafički prikaz izračuna pada fluorescencije u ispitivanim otapalima za porfirine 18C-M, 18C-O, AMIDO-M i AMIDO-O, u odnosu na DPBF kontrolu. Rezultati mjerenja prikazani su kao aritmetička sredina dvaju mjerenja, uz standardnu pogrešku. Napomena: Prilikom mjerenja AMIDO-M u DCM-u korištena je smjesa DCM:MeOH = 50:50.

Zbog lakše usporedbe vrijednosti pada fluorescencije *N*-metiliranih i *N*-oksidiranih porfirina u ispitivanim otapalima prikazane su na slici 42.

Rezultati mjerenja produkcije  $^1\text{O}_2$  u poglavlju 4.4. prikazani su kao krivulje ovisnosti pada fluorescencije o vremenu. Da bi se pojednostavnila interpretacija dobivenih rezultata, krivulje su linearizirane funkcijom  $\ln(x)$ , pri čemu je  $x$  vrijednost pada fluorescencije. Dobiveni pravci odgovaraju izrazu  $y = ax + b$ , pri čemu je vrijednost nagiba pravca ( $a$ ) tim veća, što je veći pad fluorescencije izmjeren za ispitivani porfirin (Tablica 7).

Tablica 7: Prikaz nagiba pravaca dobivenih linearizacijom krivulja pada fluorescencije. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina dvaju mjerenja.

|                | <b>DMSO</b> | <b>EtOH</b> | <b>DCM</b> | <b>DMF</b> |
|----------------|-------------|-------------|------------|------------|
| <b>18C-M</b>   | -0.3463     | -0.0968     | -0.2348    | -0.1180    |
| <b>18C-O</b>   | -0.2112     | -0.2781     | -0.3166    | -0.1683    |
| <b>AMIDO-M</b> | -0.4434     | -0.2470     | -0.2819    | -0.1161    |
| <b>AMIDO-O</b> | -0.3277     | -0.5814     | -0.3888    | -0.3421    |

Pad fluorescencije, te stoga i produkcija singletnog kisika, veći je za *N*-oksidirane porfirine u odnosu na *N*-metilirane porfirine. Amido-O tripiridilporfirin imao je najviše vrijednosti pada fluorescencije u svim ispitivanim otapalima, a ponajviše u etanolu. Karbonilni (C=O) dio amido skupine snažan je dipol zbog elektronegativnosti kisika, što amide čini dobrim akceptorima vodikove veze, a N-H dipol čini ih dobrim proton-donorima, odakle potječu bazična svojstva ove skupine. Zbog navedenih svojstava ovi amido-porfirini su dobro toplivi u većini protičkih otapala, kao što je etanol. Porfirini s alkilnom skupinom ponašaju se amfifilno, budući da ugljikovodični lanac ima lipofilna svojstva, a tetrapirolni dio molekule ima hidrofilna svojstva (kvaternizirani atomi dušika). 18C-O porfirin također je efikasan proizvođač singletnog kisika u svim otapalima osim DMF-a. Moguć razlog slabije produkcije singleta u DMF-u za 18C-O porfirin jest stvaranje agregata<sup>35</sup>, budući da se radi o izuzetno polarnom otapalu. Agregiranje bi moglo predstavljati problem kod porfirina s alkilnom skupinom zbog toga što se agregacijom smanjuje njihova fotodinamička aktivnost<sup>35</sup>. Kod *N*-metiliranih porfirina uočen je slabiji pad fluorescencije kontrolne boje, pa se može pretpostaviti da su slabije toplivi.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da topivost porfirina u ispitivanim otapalima ovisi o njihovom naboju i supstituentima, te da bolja topivost u određenom otapalu omogućava efikasniju produkciju singletnog kisika. Bolji rezultati produkcije singletnog kisika postignuti kod *N*-oksidiranih porfirina u svim ispitivanim otapalima u odnosu na *N*-metilirane porfirine nalažu da su testirani *N*-oksidirani porfirini perspektivni kandidati za fotosenzibilizatore.

Unatoč tome, potrebno je još istraživanja kojima bi se ustanovila jasna korelacija između produkcije singletnog kisika određenog porfirina i njegovih hidrofilnih i lipofilnih svojstava, kao i ispitivanje na staničnim kulturama kako bi se utvrdilo koliko je djelotvoran u biološkim sustavima.

## 5. Zaključak

Fotodinamička terapija se zasniva na citotoksičnom djelovanju singletnog kisika. Singletni kisik je energetski pobuđeno stanje molekularnog kisika koje nastaje primanjem energije u obliku fotona elektromagnetskog zračenja ili međusustavnim prijelazom energije sa pobuđenog tripletnog stanja molekule fotosenzibilizatora. Visoko efektivni fotosenzibilizatori su oni koji imaju visoku produkciju singletnog kisika. Brojna istraživanja ukazuju da fizikalna i kemijska svojstva poput topivosti i lipofilnosti *N*-supstituiranih porfirina utječu na razine produkcije singletnog kisika, te da su dobro razvijene analitičke metode ključne za probir porfirina prikladnih za fotodinamičku terapiju. Porfirini amfifilnih svojstava izuzetno su praktični za PDT jer mogu biti topivi u vodi za intravenoznu administraciju, ali i prodrijeti u tumorsko tkivo zbog lipofilnog dijela molekule.

Fotodegradacijskom metodom mjerenja produkcije singletnog kisika nastoji se odabrati porfirin čija ga svojstva čine učinkovitim fotosenzibilizatorom. Što je porfirin u nekom otapalu topljiviji, to je efikasnija produkcija singletnog kisika, što se uočava kao veći pad intenziteta fluorescencije kontrolne boje. Utvrđeno je da ispitivani porfirini daju jasno uočljiv pad fluorescencije kontrolne boje DPBF-a nakon ekscitacije crvenom svjetlošću ( $\lambda = 647 \text{ nm}$ ). Tripiridilporfirini sa 18-C ugljikovodičnim lancem kao supstituentom imaju amfifilna svojstva što ih čini topivima u polarnim otapalima poput diklormetana i etanola, ali i nepolarnim medijima, poput fosfolipidne membrane, čineći ih dobrim potencijalnim kandidatima za PDT. Od svih ispitivanih porfirina, AMIDO-oksidirani i 18C-oksidirani tripiridilporfirini su najuspješniji proizvođači singletnog kisika u svim ispitivanim otapalima.

## 6. Literatura

1. DeRosa, M., Crutchley, R. J., Photosensitized singlet oxygen and its applications, *Coordination Chemistry Reviews*, November **2002.**, 1, 351-371
2. Devasagayam, T., Kamat, J., Biological significance of singlet oxygen, *Indian journal of experimental biology*, **2002.**, 40, 680-692
3. Callaghan, S., Senge, M., The good, the bad, and the ugly – controlling singlet oxygen through design of photosensitizers and delivery systems for photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2018.**, 17, 1490-1514
4. Schmidt, R., Photosensitized Generation of Singlet Oxygen. *Photochemistry and Photobiology*, **2006.**, 82, 1161-1177
5. Wasserman, H. H., Ives, J. L., Singlet oxygen in organic synthesis, *Tetrahedron*, **1981.**, 37, 10, 1825-1852
6. Baptista, M.S., Cadet, J., Di Mascio, P., et al., Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways. *Photochem Photobiol.* **2017.**, 93, 4,912-919
7. Wasserman, H.H., DeSimone, R.W., Chia, K., Banwell, M., Singlet Oxygen; *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, Copyright © **2013.** John Wiley & Sons, Ltd
8. Krumova K., Cosa G., Chapter 1:Overview of Reactive Oxygen Species, *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences*, From Book Series: *Comprehensive Series in Photochemical & Photobiological Sciences* **2016.**, 1, 1-21
9. Timoshenko, V., Singlet Oxygen Generation and Detection for Biomedical Applications, **2009.**, *Sensors for Environment, Health and Security* 295-309
10. Lindig, B.A., Rodgers, M.A.J., Rate parametes for the quenching of singlet molecular oxygen by water-soluabe and lipid-soluabe substrates in aqueous and micellar systems, **1981.**, *Photochemistry and Photobiology* 33,5,627–634
11. Ogryzlo, E.A., Tang, C.W., Quenching of oxygen by amines, *J. Am. Chem. Soc.*, **1970.**, 92, 17, 5034–5036

12. DiMascio, P., Kaiser, S., Sies, H., Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys.*, **1989.**, 274, 532-538
13. Fukazawa, K., Singlet oxygen scavenging in phospholipid membrane, *Meth Enzymol.* **2000.**, 319, 101-110
14. Michaeli, A., Feitelson, J., Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides, *Photochem Photobiol.*, **1994.**, 59,284-298
15. Girotti, A.W., Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems, *J Lipid Res*, **1998.**, 39 1529
16. Frankel, E.N., Photooxidation of unsaturated fats. In: *Lipid Oxidation*, **1998.**, Chapter 3,43-54, The Oil Press LTD, Dundee, Scotland
17. Rougee, M., Bensasson, R.V., Land, E.J., Pariente, R., Deactivation of singlet molecular oxygen by thiols and related compounds, possible protectors against skin photosensitivity, *Photochem Photobiol.*, **1988.**, 47, 485-489
18. Buettner, G.R., Hall, R.D., Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in hematoporphyrin derivative-cysteine, -NADH and -light systems, *Biochim Biophys Acta*, **1987.**, 823, 501-507
19. Stadtman, E.R., Barlett, B.S., Free radical-mediated modification of proteins. In *Free Radical Toxicology*, **1997.**, CRC Press Boca Raton, 71-87
20. Michaeli, A., Feitelson, J., Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides, *Photochem Photobiol.*, **1994.**, 59,284-299
21. Sheu, C., Foote, C.S., Reactivity toward singlet oxygen of a 7,8-dihydro-8-oxoguanosine ("8-hydroxyguanosine") formed by photooxidation of a guanosine derivative, *J Am Chem Soc.*, **1995.**, 117, 6439-6442
22. Devasagayam, T.P.A., Steenken, S., Obendorf, M.S.W., Schulz, W.A., Sies, H., Formation of 8-hydroxy(deoxy)guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen, *Biochemistry*, **1991.**, 30,6283-6289
23. Kuchino, Y., Mori, Kasai et al., Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues, *Nature*, **1987.**, 327, 77
24. Epe, B., Genotoxicity of singlet oxygen, *Chemico-Biological Interactions*, **1991.**, 80(3), 239-260

25. Allison, R., Moghissi, K., Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms, *Clin Endosc*, **2013** Jan, 46(1), 24-29
26. Allison, R., Downie, G.H., et al., Photosensitizers in clinical PDT, *Photodiagnosis and Photodynamic therapy*, **2004.**, 1, 27-42
27. Joseffsen, L., Boyle, R., Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitisers, Hindawi Publishing Corporation, *Metal-Based Drugs*, **2008**, Article ID 276109
28. Bonnet, R., Berenbaum, M., Porphyrins as photosensitizers, *Novartis Foundation Symposium*, **1989.**, Ciba Foundation
29. Bilski, P., Daub, M.E., Chignell, C.F., Direct detection of singlet oxygen via its phosphorescence from cellular and fungal cultures, *Methods Enzymol.* **2002.** 352, 41-52.
30. Lutkus, L. V., Rickenbach, S. S., McCormick, T. M., Singlet oxygen quantum yields determined by oxygen consumption, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2019.**, 378, 131–135
31. Entradas, T., Waldron, S., Volk, M., The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **2020.**, 111787
32. Wozniak, M., Tanfani, F., Bertoli, E., Zolese, G., Antosiewicz, J., A new fluorescence method to detect singlet oxygen inside phospholipid model membranes, *Biochim Biophys Acta.* **1991.**, 1082,1,94-100
33. Zhang, X.F., Li, X., The photostability and fluorescence properties of diphenylisobenzofuran, *Journal of Luminescence* **2011.**, 131, 2263-2266
34. Schönberg, A., Mustafa, A., Aziz, G., Diels-Alder Reaction. II. Experiments with 2-Styrylchromones. On the Nature of the Dimer of 1,3-Diphenylisobenzofuran, *Journal of the American Chemical Society*, **1954.**, 76 (18), 4576-4577
35. Malatesti, N., Munitić, I., Jurak I., Porphyrin-based cationic amphiphilic photosensitisers as potential anticancer, antimicrobial and immunosuppressive agents, *Biophys Rev*, **2017.**, 9, 149–168



## Zahvala

Ovim putem se zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Neli Malatesti, na pruženoj prilici za pisanje završnog rada i iskazanom povjerenju.

Također se zahvaljujem i kolegici Martini Mušković na pomoći u provedbi eksperimenta, te na svim informacijama, smjernicama i uputama.



# Rafaela Pokrajac

Datum rođenja: 19/10/1995 | Državljanstvo: hrvatsko | Spol: Žensko |

(+385) 0915702738 | [rpokrajac@student.uniri.hr](mailto:rpokrajac@student.uniri.hr) |

Pod Borići 4, 51219 Čavle, Čavle, Hrvatska

## ● RADNO ISKUSTVO

26/09/2018 – 29/09/2018 – Svilno, Rijeka, Hrvatska

**POMOĆNA RADNICA U PROIZVODNJI - FINALIZACIJA – Jadran Galenski Laboratorij DD**

10/07/2017 – 01/09/2017 – Rijeka, Hrvatska

**PRODAVAČICA U TRGOVINI NA MALO – "Fabian" d.o.o. Export-Import**

01/08/2014 – 01/09/2014 – Rijeka, Hrvatska

**PROMOTORICA – Orbico d.d.**

Promocija dekorativnih kozmetičkih proizvoda

01/10/2017 – TRENUTAČNO – Industrijska zona Kukuljanovo, Hrvatska

**KONOBARICA – UO Poki**

## ● OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2010 – 2014 – Rijeka, Hrvatska

**Jezična gimnazija – Prva Sušačka Hrvatska Gimnazija**

## ● JEZIČNE VJEŠTINE

---

Materinski jezik/jezici: HRVATSKI

|           | RAZUMIJEVANJE |         | GOVOR              |                     | PISANJE |
|-----------|---------------|---------|--------------------|---------------------|---------|
|           | Slušanje      | Čitanje | Govorna produkcija | Govorna interakcija |         |
| ENGLISKI  | C2            | C2      | C2                 | C2                  | C2      |
| NJEMAČKI  | B1            | B2      | B1                 | B1                  | B1      |
| FRANCUSKI | A2            | B1      | A2                 | A2                  | B1      |

Razine: A1 i A2: temeljni korisnik; B1 i B2: samostalni korisnik; C1 i C2: iskusni korisnik

## ● DIGITALNE VJEŠTINE

---

Windows | Social Media | MS Office (MS Word MS Exel MS PowerPoint MS Outlook MS Publisher MS Access) | Osnovno služenje Adobe Photoshopom | poznavanje programa PyMOL, Avogadro, ChemAxon Marvin, VMD, GAMESS, MacMOLPit

## ● VOZAČKA DOZVOLA

---

Vozačka dozvola: B

Vozačka dozvola: BE

## ● KONFERENCIJE I SEMINARI

---

20/04/2018 – 22/04/2018 – Rijeka, Rab

**NeuRi - 8th Student Congress of Neuroscience**

05/06/2018 – 06/06/2018 – Rijeka

**2. studentski kongres Okolišnog zdravlja s međunarodnim sudjelovanjem**

Sudjelovala kao aktivni sudionik kongresa sa radom "Predstavlja li kontaminacija antibioticima rizik za onečišćenje otpadnih voda u Republici Hrvatskoj?" u posterskoj sekciji

25/05/2018 – 27/05/2018 – Zagreb

## **1. Kongres studenata biotehnologije**

09/11/2018 – 11/11/2018 – Rijeka, Opatija

## **BRIK - International biomedical student congress Rijeka**

### ● **HOBIJI I INTERESI**

---

#### **Fotografiranje**

Dugi niz godina bavljena amaterskom fotografijom i izučavanjem računalnih programa za uređivanje fotografija

#### **Klasična gitara**

Pohađanje tečaja klasične gitare i glazbene notacije u periodu 2008-2012

### ● **KOMUNIKACIJSKE I MEĐULJUDSKE VJEŠTINE**

---

#### **Komunikacijske vještine**

Dobre komunikacijske vještine razvijene radom u uslužnim djelatnostima, te aktivnim sudjelovanjem na konferencijama.