

# O-Alkiliranje (oksido)piridilporfirina

---

**Beletić, Ema**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*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:193:233960>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-28**

*Repository / Repozitorij:*



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



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
Istraživanje i razvoj lijekova

Ema Beletić  
O-Alkiliranje (oksid)piridilporfirina  
Diplomski rad

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
Istraživanje i razvoj lijekova

Ema Beletić  
O-Alkiliranje (oksido)piridilporfirina  
Diplomski rad

Rijeka, 2023.

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

UNIVERSITY OF RIJEKA  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY  
Graduate programme  
Drug research and development

Ema Beletić  
*O*-Alkylation of (oxido)pyridylporphyrins  
Master thesis

Rijeka, 2023.

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

Diplomski rad obranjen je dana 26.9.2023.

pred povjerenstvom:

1. prof. dr. sc. Jasminka Giacometti
2. izv. prof. dr. sc. Duško Čakara
3. izv. prof. dr. sc. Nela Malatesti

Rad ima 58 stranica, 27 slika, 3 tablice i 33 literaturna navoda.

## Zahvala

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Neli Malatesti na širini prenesenog znanja, korisnim savjetima, uloženom vremenu, strpljenju i ugodnoj komunikaciji. Hvala doktorandici Martini Mušković na vodstvu kroz laboratorijski rad, neiscrpnoj pozitivnoj energiji, pruženoj podršci i pomoći. Zahvaljujem laboratorijskoj partnerici i prijateljici Karmen na raspjevanoj, vedroj atmosferi i svakodnevnom osloncu. Hvala obitelji koja je još jedan izazovan period života uvelike olakšala i uljepšala.

## Sažetak

Fotodinamička terapija (PDT) je vrsta terapije tumora koja uključuje akumulaciju fotosenzibilizatora u tumorskom tkivu gdje nakon osvjetljavanja određenom valnom duljinom uz prisutnost kisika dolazi do izravne smrti tumorskih stanica, oštećenja mikrovaskulature i indukcije lokalne upalne reakcije. Spojevi porfirinskog tipa se zbog pogodnih fizikalnih i kemijskih svojstava često koriste kao fotosenzibilizatori u PDT-u. Prilikom odabira fotosenzibilizatora poželjne karakteristike uključuju netoksičnost bez zračenja, učinkovitu apsorpciju svjetlosti u vidljivom dijelu spektra, mogućnost generiranja singletnog kisika i drugih reaktivnih kisikovih vrsta, ali i optimalan omjer hidrofilnih i lipofilnih svojstava za djelotvornu intravenoznu primjenu i olakšano prodiranje u tumorska tkiva.

Osim hidrofilnih i lipofilnih obilježja, struktura i naboj fotosenzibilizatora određuju njegova farmakokinetička i farmakodinamička svojstva. U odnosu na zwitterionske (oksid)piridilporfirine, kationski *O*-alkilirani (oksid)piridilporfirini imaju potencijal bolje topljivosti u biološkim otapalima te učinkovitijeg prodiranja i vezanja za tumorska tkiva.

*O*-Etilirani (oksid)piridilporfirini sintetizirani uz diklormetan kao otapalo i etil-tosilat kao alkilirajući reagens uspješno su izolirani. Sintetizirani 5-(4-acetamidofenil)-10,15,20-tris(1-etoksidopiridin-3-il)porfirin triklorid (porfirin **8**) dokazao je bolju topljivost u biološkim medijima i viši intenzitet apsorpcijskih i emisijskih vrpca spektara u usporedbi s porfirinom **4** te nižu  $IC_{50}$  vrijednost na stanicama raka dojke (MDA-MB-231) nakon osvjetljavanja lampom crvenog osvjetljenja ( $\lambda = 645 \text{ nm}$ ,  $3,6 \text{ J/cm}^2$ ) u usporedbi sa svojim prekursorima (porfirin **4** i porfirin **P**).

Ključne riječi: fotosenzibilizator, porfirin, *O*-alkiliranje, etil-tosilat, topljivost

## Summary

Photodynamic therapy (PDT) is a type of tumor therapy that involves the accumulation of photosensitizers in the tumor tissue where, after illumination with a certain wavelength in the presence of oxygen leads to the direct death of the tumor cell, damage to the microvasculature and the induction of a local inflammatory reaction. Due to their favorable physical and chemical properties, porphyrin-type compounds are often used as photosensitizers in PDT. When choosing photosensitizers, desired characteristics include non-toxicity without radiation, efficient absorption of the light in the visible spectrum, generation of singlet oxygen and other reactive oxygen species, but also an optimal ratio of hydrophilic and lipophilic properties for effective intravenous administration and facilitated penetration into the tumor tissue.

In addition to hydrophilic and lipophilic properties, the structure and the charge of the photosensitizer determine its pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. Compared to zwitterionic (oxido)pyridylporphyrins, cationic *O*-alkylated (oxido)pyridylporphyrins have the potential for better solubility in biological solvents and more effective penetration and binding to tumor tissues.

*O*-Ethylated (oxido)pyridylporphyrins synthesized with dichloromethane as solvent and ethyl tosylate as alkylating reagent were successfully isolated. Synthesized 5-(4-acetamidophenyl)-10,15,20-tris(1-ethoxydopyridin-3-yl)porphyrin trichloride (porphyrin **8**) showed a better solubility in the biological medium and higher intensity of the absorption and emission spectrum compared with porphyrin **4** and lower  $IC_{50}$  values on breast cancer cells (MDA-MB-231) after illumination with a red light lamp ( $\lambda = 645 \text{ nm}$ ,  $3,6 \text{ J/cm}^2$ ) compared to their precursors (porphyrin **4** and porphyrin **P**).

Key words: photosensitizer, porphyrin, *O*-alkylation, ethyl tosylate, solubility



# Sadržaj

1.	Uvod.....	1
1.1	Fotodinamička terapija .....	1
1.1.1	Razvoj fotosenzibilizatora u fotodinamičkoj terapiji.....	5
1.2	Porfirini.....	6
1.2.1	Fotofizikalna svojstva porfirina.....	8
1.2.2	Sinteza porfirina.....	9
1.3	<i>N</i> -oksidacija i <i>O</i> -alkiliranje.....	10
1.3.1	Postignuća <i>N</i> -oksidacije i <i>O</i> -alkiliranja porfirina u dosadašnjim istraživanjima.....	12
2.	Cilj rada .....	15
3.	Materijali i metode .....	16
3.1	Opće napomene .....	16
3.1.1	Kemikalije i reagensi .....	16
3.1.2	Metode .....	16
3.2	Adler-Longo sinteza .....	18
3.3	<i>N</i> -oksidacija piridilporfirina .....	20
3.4	Metilacija (oksid)piridilporfirina metil-jodidom.....	22
3.4.1	Bez otapala.....	23
3.4.2	Otapalo DMF .....	23
3.4.2.1	Metoda 1 .....	23
3.4.2.2	Metoda 2 .....	23
3.4.2.3	Metoda 3 .....	24
3.4.3	Mješavina otapala DCM/MeOH.....	25
3.4.4	Otapalo DCM.....	25
3.5	Etilacija (oksid)piridilporfirina metil-jodidom.....	27
3.5.1	Otapalo DMF .....	27
3.5.2	Otapalo DCM.....	28
3.6	Etilacija (oksid)piridilporfirina etil-tosilatom.....	29
3.7	Stanična kultura .....	30
3.7.1	MTT test citotoksičnosti s izoliranim fotosenzibilizatorima .....	31
4.	Rezultati i rasprava .....	33
4.1	Sinteza (oksid)piridilporfirina .....	34
4.2	Optimizacija reakcijskih uvjeta <i>O</i> -alkiliranja (oksid)piridilporfirina.....	36

4.2.1	Metilacija (oksido)piridilporfirina .....	36
4.2.2	Etilacija (oksido)piridilporfirina.....	39
4.3	Lipofilna svojstva sintetiziranih porfirina .....	42
4.4	UV-Vis i fluorescentna spektroskopija izoliranih porfirina.....	43
4.5	<sup>1</sup> H NMR spektri izoliranih porfirina .....	49
4.6	Analiza MTT testa citotoksičnosti.....	54
5.	Zaključak.....	57
6.	Literatura.....	59
7.	Životopis.....	64

# 1. Uvod

## 1.1 Fotodinamička terapija

Iako su razvojem medicine i farmacije otklonjene mnoge prekretnice u iskorjenjivanju različitih smrtonosnih bolesti tijekom proteklih desetljeća, maligne bolesti i dalje ostaju izazov zbog kojeg se gube životi milijuna ljudi i koje negativno utječu na kvalitetu života preživjelih. Za što veću učinkovitost, a što manje štetne posljedice liječenja, onkolozi i znanstvenici diljem svijeta traže načine isporuke lijekova izravno u maligne stanice, zaobilazeći zdrava tkiva. Relativno mlada, ali brzo razvijajuća terapijska metoda koja bi se mogla pokazati zlatnim standardom u liječenju neoplastičnih promjena u odnosu na konvencionalne metode je fotodinamička terapija (PDT). PDT je klinički odobren, minimalno invazivan terapijski pristup koji ima selektivno citotoksično djelovanje prema malignim stanicama. Temelji se na dinamičkoj interakciji između pojedinačno netoksičnih komponenti: svjetlosti, fotosenzibilizatora i molekularnog kisika. (1,2)

Izlaganje suncu cijelog tijela (helioterapija) smatralo se važnim za obnovu zdravlja u staroj Grčkoj. Danski liječnik Niels Finsen razvio je „fototerapiju“ ili korištenje svjetlosti za liječenje bolesti. Uspješno je liječio male boginje crvenom svjetlosti i kožnu tuberkulozu ultraljubičastom svjetlosti čime je označio početak moderne svjetlosne terapije. Finsen je 1903. godine dobio Nobelovu nagradu za svoja otkrića. (3,4) Induciranje citotoksičnosti interakcijom svjetlosti i kemikalije prvi je izvijestio Oskar Raab, student medicine iz grupe profesora Herman Von Tappeinera. Opisao je smrtonosni učinak izazvan kombinacijom svjetlosti i heterocikličke baze akridina na protozoi *Paramecium*. Ovo istraživanje opisuje fotokemijski fenomen poznat kao fotodinamičko djelovanje ili kemijski senzibiliziranu fototoksičnost. Najvažnija biomedicinska primjena fotodinamičkog djelovanja upravo je PDT. (5)

Sve je veći broj klinički odobrenih fotosenzibilizatora, fotoosjetljivih molekula netoksičnih u odsutnosti svjetlosti. Odlikuje ih sposobnost lokalizacije na ciljnu stanicu i/ili tkivo nakon čega se aktiviraju izvorom svjetlosti što dovodi do uništavanja tumorskih stanica. Fotosenzibilizatori koji ulaze u stanice koncentriraju se u podstaničnim područjima kao što su unutarnja mitohondrijska membrana, lizosomi ili jezgra, ovisno o lipofilnosti i vezanju na serumske proteine. Prednosti fotosenzibilizatora uključuju mogućnost selektivnog ciljanja, lokaliziranog djelovanja i stimulacije imunoloških odgovora. Osim jednostavne administracije i distribucije, fotosenzibilizator bi trebao biti visoko selektivan za ciljno tkivo i imati brzu i učinkovitu akumulaciju u ciljnom tkivu, ali i mogućnost brzog uklanjanja iz tijela kako bi se izbjegla sistemska toksičnost i fotoosjetljivost kože. Mora biti stabilan, čist spoj koji je nakon aktivacije crvenom svjetlosti učinkovit u stvaranju toksičnih kisikovih spojeva. (6)

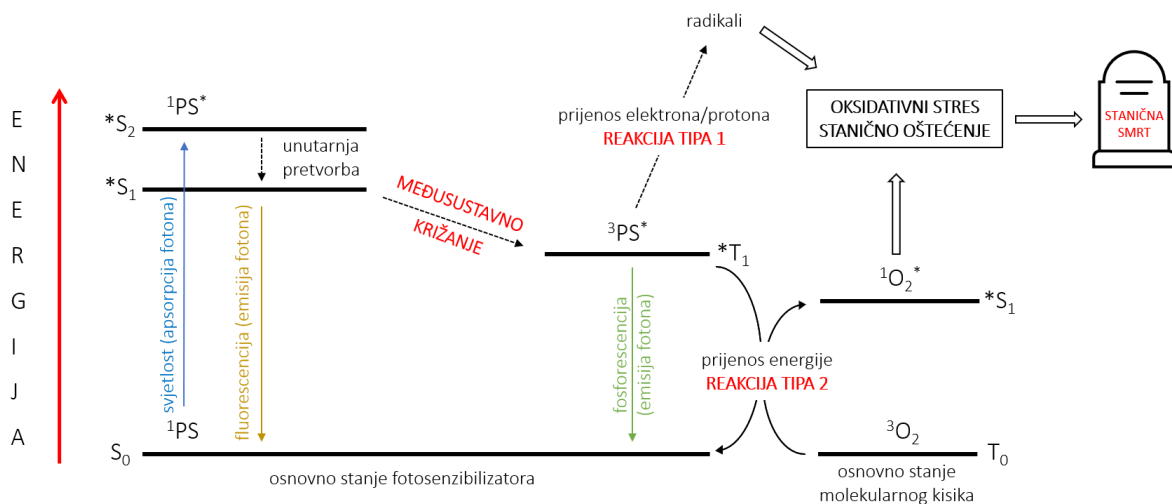
Kisik u neoplastičnim tkivima i stanicama je ključna komponenta za proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) tijekom PDT-a. ROS staničnu smrt najčešće uzrokuju procesima apoptoze i nekroze. Koncentracija kisika u tkivima utječe na učinkovitost PDT-a, značajno varirajući između različitih tumora ili različitih regija istog tumora, ovisno o gustoći vaskulature. (7) Lokalna primjena svjetlosti na fotosenzibilizator u tumoru dovodi do stvaranja citotoksičnog singletnog kisika ( $^1O_2$ ). Količina  $^1O_2$  generirana fotosenzibilizatorom određena je brzinom apsorpcije fotona, tripletnim kvantnim prinosom koji opisuje vjerojatnost stvaranja tripletnog stanja po apsorbiranom fotonu i učinkovitošću procesa prijenosa energije. (8,9) Osobito kod dubljih, čvrstih tumora često karakteriziranih hipoksičnim ili anoksičnim mikrokruženjem, nedostatak kisika može biti ograničavajući faktor. (7)

Liječenje PDT-om započinje primjenom fotosenzibilizatora u nedostatku svjetlosti (lokalno ili intravenozno). Kada se postigne optimalan omjer fotosenzibilizatora u bolesnom naspram zdravog tkiva, fotosenzibilizator se aktivira izlaganjem reguliranoj dozi svjetlosti koja određeno vrijeme izravno

obasjava bolesno tkivo. (10) Izlaganjem svjetlosti odgovarajućeg intenziteta i valne duljine potiče se stvaranje  $^1\text{O}_2$  i ROS-a. Učinkovitost terapije ovisi o vrsti stanica raka, vrsti i koncentraciji fotosenzibilizatora te valnoj duljini svjetlosti. (1) Uspjeh PDT-a očituje se u produljenom nakupljanju fotosenzibilizatora u oboljelom tkivu u odnosu na normalne stanice tkiva kao i na njegovom brzom uklanjanju po završetku terapije što smanjuje mogućnosti nastajanja nuspojava. (10)

Fotofizički i fotokemijski mehanizmi PDT-a grafički su prikazani pomoću dijagrama Jablonskog koji opisuje procese apsorpcije svjetlosti i prijenosa energije (Slika 1). Osnovno stanje fotosenzibilizatora koje ima dva elektrona suprotnih spinova naziva se singletno stanje ( $S_0$ ) i nalazi se u niskoenergetskoj molekularnoj orbitali. Apsorpcijom svjetlosti (fotona), jedan od elektrona prelazi u visokoenergetsku orbitalu i prvo pobuđeno singletno stanje ( $^*S_1$ ) zadržavajući svoj spin. Ovo kratkotrajno (nanosekundno) stanje može izgubiti energiju emitiranjem svjetlosti (fluorescencija) ili unutarnjom pretvorbom u toplinu. Fotosenzibilizator u pobuđenom singletnom stanju također može proći proces međusustavnog križanja pri čemu se spin pobuđenog elektrona invertira da bi se formiralo dugotrajno (mikrosekundno) pobuđeno tripletno stanje ( $^*T_1$ ) s paralelnim spinovima elektrona. Dug životni vijek tripletnog stanja fotosenzibilizatora objašnjava se činjenicom da je gubitak energije emisijom svjetlosti (fosforescencija) „spinski zabranjen“ proces budući da bi fotosenzibilizator prešao izravno iz tripletnog u singletno stanje. Fotosenzibilizator u pobuđenom tripletnom stanju može potaknuti dvije vrste reakcija. Reakcijom tipa 1 može reagirati izravno sa supstratom (stanična membrana ili biomolekule) i prenijeti proton ili elektron kako bi se formirali slobodni radikali, radikalni anioni ili radikalni kationi (hidroksilni radikali  $\text{OH}^\cdot$ , superoksidni anioni  $\text{O}_2^{\cdot -}$ ). Radikali mogu reagirati s kisikom stvarajući ROS-ove koji uzrokuju specifična oštećenja biomolekula. Reakcijom tipa 2 fotosenzibilizator može prenijeti energiju izravno na molekularni kisik kojem je osnovno stanje također tripletno ( $T_0$ ) kako bi se formirao izuzetno

reaktivni  $^1\text{O}_2$  u pobuđenom stanju ( $^*S_1$ ). (11) On može oštetiti stanične proteine i DNA na nekoliko načina: 1. izravnim, ireverzibilnim citotoksičnim djelovanjem na stanice raka procesima apoptoze i nekroze 2. oštećenjem tumorske vaskulature prekidajući opskrbu stanica raka kisikom i hranjivim tvarima te 3. poticanjem imunskog sustava domaćina aktivacijom upalnog odgovora unutar tumora. (1) Potonje pridonosi dugoročnoj kontroli bolesti i predstavlja veliku prednost u odnosu na tradicionalne terapije uključujući operaciju ili kemoterapiju koje su imunološki tihe ili imunosupresivne. (12) Reakcije tipa 1 i tipa 2 mogu se odvijati istovremeno, a omjer između ovih procesa ovisi o vrsti korištenog fotosenzibilizatora te koncentracijama supstrata i kisika.  $^1\text{O}_2$  je najvažniji čimbenik u uništavanju dovoljno oksigeniranih tumorskih stanica, dok je reakcija tipa 1 zastupljenija u hipoksičnim uvjetima. Budući da temeljni mehanizmi PDT-a zahtijevaju prisutnost kisika, smatra se da je reakcija tipa 2 primarni put oštećenja tumorskih stanica putem PDT-a. (2,6,11)



Slika 1. Pojednostavljena shema dijagrama Jablonskog. Strelice pune linije označavaju radijacijske prijenose energije, a strelice isprekidane linije neradijacijske.  $S_0$ : osnovno singletno stanje,  $^*S_1$  i  $^*S_2$ : pobuđena singletna stanja,  $T_0$ : osnovno tripletno stanje,  $^*T_1$ : pobuđeno tripletno stanje,  $^1\text{PS}$ : fotosenzibilizator u osnovnom singletnom stanju,  $^1\text{PS}^*$ : fotosenzibilizator u pobuđenom singletnom stanju,  $^3\text{PS}^*$ : fotosenzibilizator u pobuđenom tripletnom

stanju,  $^3\text{O}_2$  : molekularni kisik u osnovnom tripletnom stanju,  $^1\text{O}_2^*$ : molekularni kisik u pobuđenom singletnom stanju.

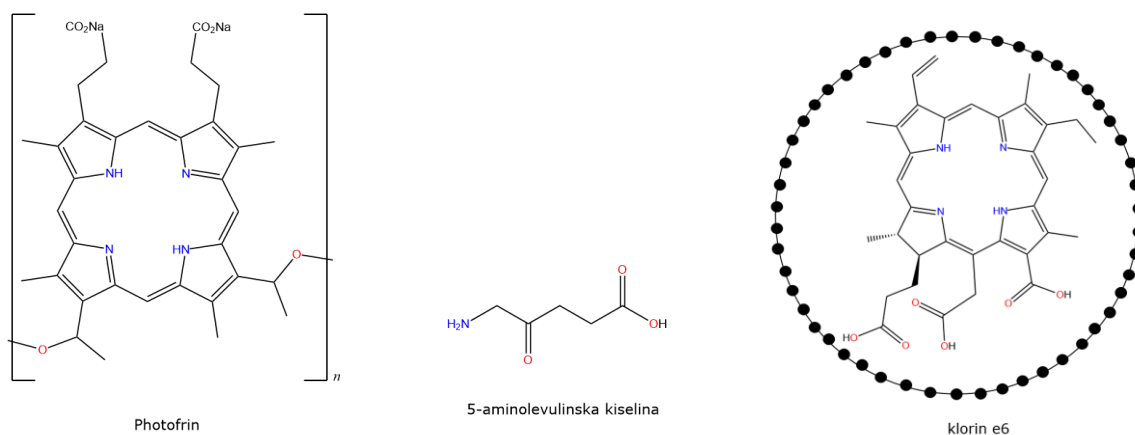
Obzirom da se tumori liječe lokalno, PDT je uglavnom neučinkovit protiv metastaza. Takva ograničenja se prevladavaju kombiniranjem PDT-a s drugim terapijama kao što su kemoterapija, radioterapija ili kirurški zahvati. PDT se može opetovano koristiti prije ili nakon drugog tretmana bez rizika od induciranja unakrsne rezistencije. (13)

### 1.1.1 Razvoj fotosenzibilizatora u fotodinamičkoj terapiji

Smjesa porfirina topljivih u vodi nazvana derivat hematoporfirina (HpD) dobivena je 1970-ih godina pročišćavanjem i kemijskom modifikacijom prvog porfirina korištenog kao fotosenzibilizatora - hematoporfirina (Hp; derivat hema porijeklom iz krvi). Spoj dimera i oligomera porfirina izoliranih iz HpD-a bio je dostupan pod registriranim imenom „Photofrin“ i pripadao je prvoj generaciji fotosenzibilizatora. Unatoč širokoj primjeni u PDT-u, pripravak je imao ograničenja niske kemijske čistoće, slabog prodiranja u tkiva i višetjedne preosjetljivosti kože na svjetlost zbog spore eliminacije iz organizma. (14)

Nedostaci prve generacije fotosenzibilizatora potaknuli su razvoj druge generacije fotosenzibilizatora koji uključuju HpD i nove, sintetske fotosenzibilizatore poput 5-aminolevulinske kiseline, derivata benzoporfirina, teksafirina, derivata tiopurina, analoga klorina i bakterioklorina te ftalocijanina. Karakterizirani su većom kemijskom čistoćom, većim kvantnim prinosom stvaranja  $^1\text{O}_2$ , boljim prodiranjem u duboko smještena tkiva i smanjenim nuspojavama. Iako pružaju mnoge prednosti, glavni nedostatak fotosenzibilizatora druge generacije je slaba topljivost u vodi što predstavlja ograničavajući faktor u intravenskoj primjeni. (14)

Novе metode dostave lijekova dovele su do razvoja fotosenzibilizatora treće generacije. (14) Većina fotosenzibilizatora pasivno se nakuplja u tumorskim tkivima (pasivna selektivnost), ali neki fotosenzibilizatori pasivnom akumulacijom ne postižu dovoljan terapijski učinak. Biokonjugacijom spojeva često se postiže viša razina ciljane terapije (aktivna selektivnost). (6) Pojavljuju se sustavi koji učinkovito povećavaju bioraspodjelivost fotodinamičke metode poput kombinacije fotosenzibilizatora druge generacije s molekulama usmjerenim na ciljni receptor (npr. nanočesticama). Fotosenzibilizatori se mogu konjugirati s monoklonskim antitijelom selektivnim na specifični antigen stanice raka. (14) Primjer fotosenzibilizatora treće generacije predstavlja klorin e6 ugrađen u nanočesticu stvaranjem ionskih kompleksa u svrhu poboljšanja apsorpcije od strane tumora i povećanja razine stvaranja ROS-a (Slika 2). (15)



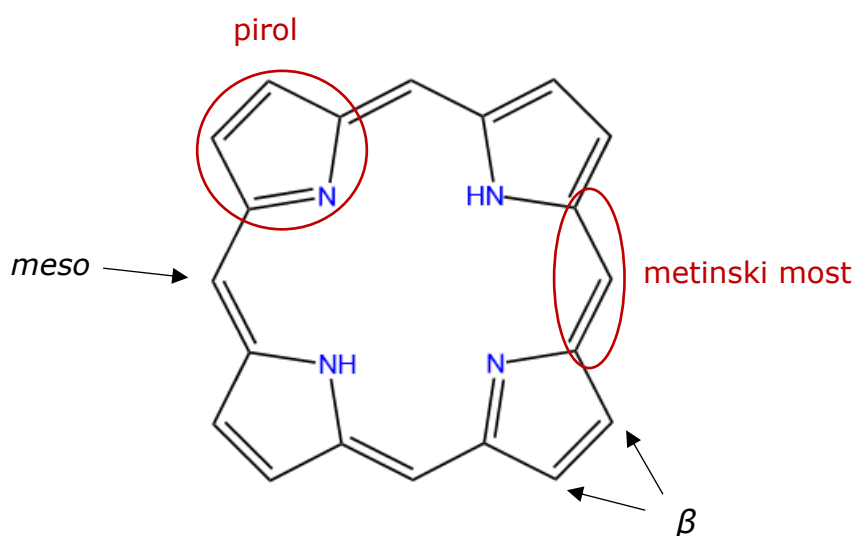
Slika 2. Primjeri prve (Photofrin,  $n \leq 8$ ), druge (5-aminolevulinska kiselina) i treće (klorin e6 ugrađen u nanočesticu) generacije fotosenzibilizatora.

## 1.2 Porfirini

Porfirini su skupina organskih heterocikličkih spojeva koji se sastoje od četiri modificirane podjedinice pirola povezane metinskim mostovima. Visoko konjugirani  $22\pi$ -elektronski sustav od kojih aromatičnu jezgru čini njih 18



delokaliziranih prema Hückelovom pravilu aromatičnosti, objašnjava apsorpciju dugih valnih duljina i intenzivnu boju porfirina. (16) Stabilnost aromatske makrocikličke strukture porfirina olakšava odvijanje reakcija elektrofilne supstitucije. Različitom reaktivnošću supstituenti se najčešće vežu na  $\beta$  položaje, karakteristične u prirodi ili na *meso* položaje, karakteristične kod sintetskih molekula (Slika 3). Kemijske karakteristike supstituenata određuju topljivost, reaktivnost, vaskularnu permeabilnost, intenzitet i pomak apsorpcijskih vrpci porfirina. (17)



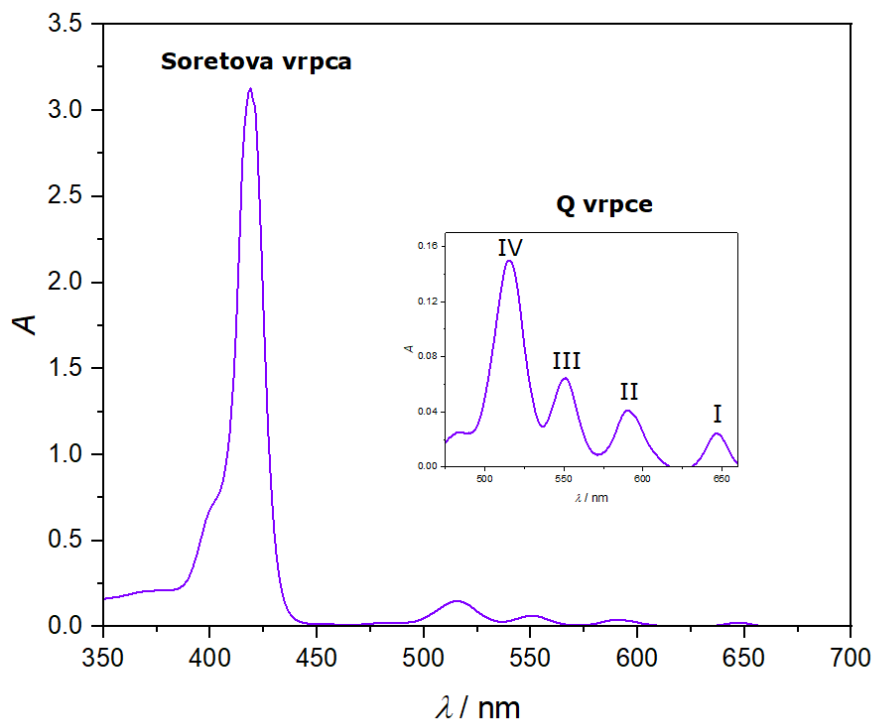
Slika 3. Struktura porfina s označenim podjedinicama i položajima najčešćih supstitucija.

Poznavanje porfirinskih sustava ključno je za razumijevanje širokog spektra bioloških procesa kao što su vezanje kisika, prijenos elektrona, kataliza i fotosinteza. (17) Osim značajnih uloga u prirodi, sintetski ili prirodno modificirani ciklički tetrapiroli (derivati porfirina, (bakterio)klorina i ftalocijanina) imaju gotovo idealna fizikalna i kemijska svojstva za terapijske svrhe PDT-a. Uglavnom su netoksični bez zračenja, učinkovito apsorbiraju svjetlost u vidljivom ili bliskom infracrvenom području i mogu generirati singletni kisik. Potencijal ciljane terapije i sposobnost oslobađanja fluorescencije omogućuju primjenu cikličkih tetrapirola u teranostici. (6)

Ljudsko tkivo najučinkovitije propušta svjetlost u crvenom području vidljivog spektra stoga se fotosenzibilizatori s jakim apsorpcijskim pojasom u ovom području „terapeuskog okvira“ (650-800 nm) mogu aktivirati za dublje prodiranje u tkiva. Suprotno, molekule u ljudskom organizmu poput vode, hemoglobina ili melanina slabo apsorbiraju u području od 650-800 nm predstavljajući dodatnu prednost „terapeuskog okvira“. (16)

### 1.2.1 Fotofizikalna svojstva porfirina

Karakteristični apsorpcijski spektri porfirina sastoje se od bliskog ultraljubičastog (UV) i vidljivog (Vis) područja. Apsorpcijske vrpce porfirinskih sustava proizlaze iz prijelaza između dvije HOMO (engl. Highest Occupied Molecular Orbital) i dvije LUMO (engl. Lowest Unoccupied Molecular Orbital) orbitale. Prijelazi dovode do dva pobuđena stanja različite energije koja su posljedica orbitalnog miješanja. Stanje više energije, Soretova ili B vrpca uključuje prijelaz iz osnovnog stanja u drugo pobuđeno stanje ( $S_0 \rightarrow S_2$ ) s rasponom apsorpcije od 380-500 nm ovisno je li porfirin  $\beta$ - ili *meso*-supstituiran. Stanje niže energije kojeg opisuju Q vrpce (IV, III, II, I) sastoji se od slabog prijelaza iz osnovnog u prvo pobuđeno stanje ( $S_0 \rightarrow S_1$ ) u području apsorpcije od 500-750 nm (Slika 4). Različite konjugacije i simetrije porfirina mogu utjecati na njegov UV-Vis apsorpcijski spektar. Varijacije perifernih supstituenata često uzrokuju manje promjene dok protonacija dva unutarnja atoma dušika ili umetanje metalnih atoma u makrociklu obično snažno mijenjaju vidljivi apsorpcijski spektar. (17)



Slika 4. Karakteristični prikaz UV-Vis spektra jednog od sintetiziranih derivata porfirina.

### 1.2.2 Sinteza porfirina

Povijest sintetskog svijeta porfirina započela je sredinom tridesetih godina 20. stoljeća. Najpoznatiji put polimerizacije monopirola za dobivanje porfirina uključuje sintezu tetrafenilporfirina. Rothemund je 1935. godine prvi sintetizirao tetrafenilporfirin reakcijom benzaldehida i pirola u piridinu u zatvorenoj tikvici pri strogim eksperimentalnim uvjetima (150 °C, 24 h). Budući da je glavni nusproizvod reakcije bio *meso*-supstituirani klorin, prinosi su bili niski. Adler, Longo i suradnici su 1966. godine preispitali sintezu *meso*-supstituiranih porfirina i razvili alternativni pristup metodom koja uključuje kondenzaciju pirola i aldehida kataliziranu refluksirajućom propanskom kiselinom (141 °C, 30 min). Reakcija se odvijala u staklenom otvorenom posuđu uz prisutnost zraka. Kontaminacija klorinom bila je manja od one dobivene Rothemund sintezom, a reakcija je podložna sintezama velikih razmjera. Iako je Adler-Longo metoda najučinkovitija za

sintezu temperaturno stabilnih aldehida, u periodu od 1979.-1986. godine Lindsey je razvio inovativnu dvostupanjsku metodu. Reakcije su provedene na sobnoj temperaturi u blagim uvjetima s ciljem postizanja ravnoteže tijekom kondenzacije i izbjegavanja stvaranja nusprodukata u svim koracima procesa formiranja porfirina. (17,18)

### 1.3 *N*-oksidacija i *O*-alkiliranje

Prilikom dizajniranja lijekova preporuka je težiti stvaranju što optimalnijih farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava. Struktura fotosenzibilizatora, lipofilnost i naboj određuju farmakokinetička i farmakodinamička svojstva kao i staničnu lokalizaciju lijeka. Različiti mehanizmi stanične smrti povezuju se s različitim lokalizacijama. (6) Budući da se najučinkovitija stanična smrt pokazala ciljanjem mitohondrija čija je unutarnja membrana negativno nabijena, kationski fotosenzibilizatori povećavaju preferencijalnu akumulaciju i posljedično učinkovitost PDT-a. (19) Prednost predstavlja i djelotvorno stupanje kationskih fotosenzibilizatora u interakciju s negativno nabijenim nukleinskim kiselinama. Specifične skupine kationskih porfirina često se dobivaju alkilacijom piridilnih supstituenata. Zbog kratkog životnog vijeka  $^1\text{O}_2$ , molekule fotosenzibilizatora trebale bi biti u neposrednoj blizini staničnih ciljeva. Stoga je uspostavljanje optimalnog omjera lipofilnih i hidrofilnih supstituenata ključno za napredak distribucije, ulaska u tumorsko tkivo i internalizacije lijeka. (6)

Lipofilnost utječe na interakcije lijeka s biomolekulama u krvi, olakšava prolazak lijeka kroz biološke membrane i ulazak fotosenzibilizatora u stanicu što povećava učinkovitost PDT-a, ali može povećati tendenciju agregacije u otopini što smanjuje topljivost u vodi, proizvodnju  $^1\text{O}_2$  i posljedično učinkovitost PDT-a. (6,13) Također, visoko hidrofobnim fotosenzibilizatorima potrebni su liposomi ili druge vrste nanonosača za učinkovitu isporuku i distribuciju. (13) Suprotno, hidrofilni fotosenzibilizatori

koji imaju polarne ili nabijene bočne lance, često su previše polarni da bi prošli kroz biološke membrane. (19)

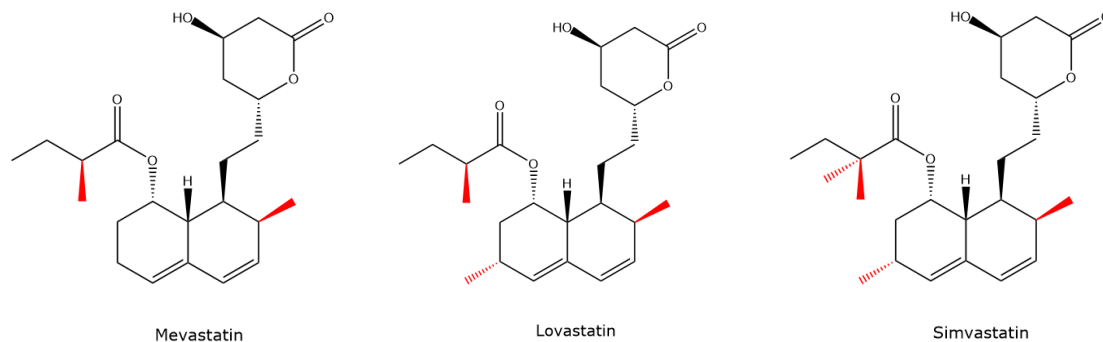
Fotosenzibilizatori s lipofilnim i hidrofilnim strukturnim dijelovima mogu biti topljivi u vodi za intravenoznu primjenu, kao i prodrijeti u tkivo tumora za snažnu učinkovitost PDT-a. (13) Mogu difundirati kroz membrane i slobodno se raspodijeliti između membrana različitih organela. (19) Stoga je amfifilnost porfirina jedna od glavnih značajki najučinkovitijih fotosenzibilizatora u pasivnom ciljanju PDT-a. (13)

Manje steričke smetnje piridilnih supstituenata na *meso*-porfirinskim položajima povećavaju učinkovitost porfirina. (6,13) Topljivost porfirina u vodi može se postići kvaternizacijom dušikovih atoma na piridilnim prstenovima na *meso* poziciji metilacijom ili *N*-oksidacijom. Metilacija doprinosi većoj topljivosti u vodi, a heterociklički *N*-oksidi pokazali su se kao selektivni spojevi za hipoksiju i isporuku u neoplastična tkiva. (20)

Niz metoda kemijske oksidacije pretvara porfirine u niz  $\beta$ -, *meso*- i *N*-oksidiranih derivata. Poznati protokol *N*-oksidacije 3-piridila odvija se reakcijom porfirina s *meta*-klorperbenzojevom kiselinom (*m*-CPBA), dok se nastavak reakcije zaustavlja dodatkom trietilamina (TEA). Nastali (oksido)piridilporfirini su topljiviji od njihovih matičnih porfirina u polarnim otapalima što olakšava intravenoznu primjenu. (20,21)

Metilacija je dobro poznata, široko korištena strukturna modifikacija u organskoj i medicinskoj kemiji. Nedavno istraživanje (Thomson Reuters Integrity) otkrilo je preko 526 *N*-metiliranih i 437 *O*-metiliranih lijekova u različitim aktivnim fazama razvoja. (22) Pokazalo se da među 200 najupotrebljavanijih farmaceutskih proizvoda u 2016. više od 77% lijekova malih molekula ima barem jednu metilnu skupinu. Konformacijske promjene koje proizlaze iz metilacije i koncept „čarobnog“ metila doživjele su nekoliko uspješnih primjera. Hipolipidemičar Mevastatin nikada nije plasiran na tržište. Lovastatin, metilirani analog mevastatina, bio je prvi

statinski lijek na tržištu. Simvastatin, statin s dodatnom metilnom skupinom i poboljšanim svojstvima lansiran je na tržište 1992. godine (Slika 5). (22)



Slika 5. Strukturni prikaz Mevastatina, Lovastatina i Simvastatina s crveno označenim metilnim skupinama.

### 1.3.1 Postignuća *N*-oksidacije i *O*-alkiliranja porfirina u dosadašnjim istraživanjima

Heterociklički *N*-oksidi privlače veliku pozornost zbog uloge sintetskih intermedijera i biološke važnosti. *N*-*O* dio piridin *N*-oksida posjeduje jedinstvenu funkcionalnost učinkovitog djelovanja kao elektron donorska i akceptorska grupa („push-pull“). Ovo snažno svojstvo omogućava jednako laku sintezu piridin *N*-oksid supstituiranih derivata s donorskim kao i akceptorskim skupinama. (23) Na temelju dokazanog selektivnog djelovanja heterocikličkih *N*-oksida (tirapazamin, RB90740) na hipoksiju, provedeno je ispitivanje porfirina koji uključuju heterocikličke *N*-okside kojim je dokazana poboljšana isporuka u neoplastična tkiva. (20)

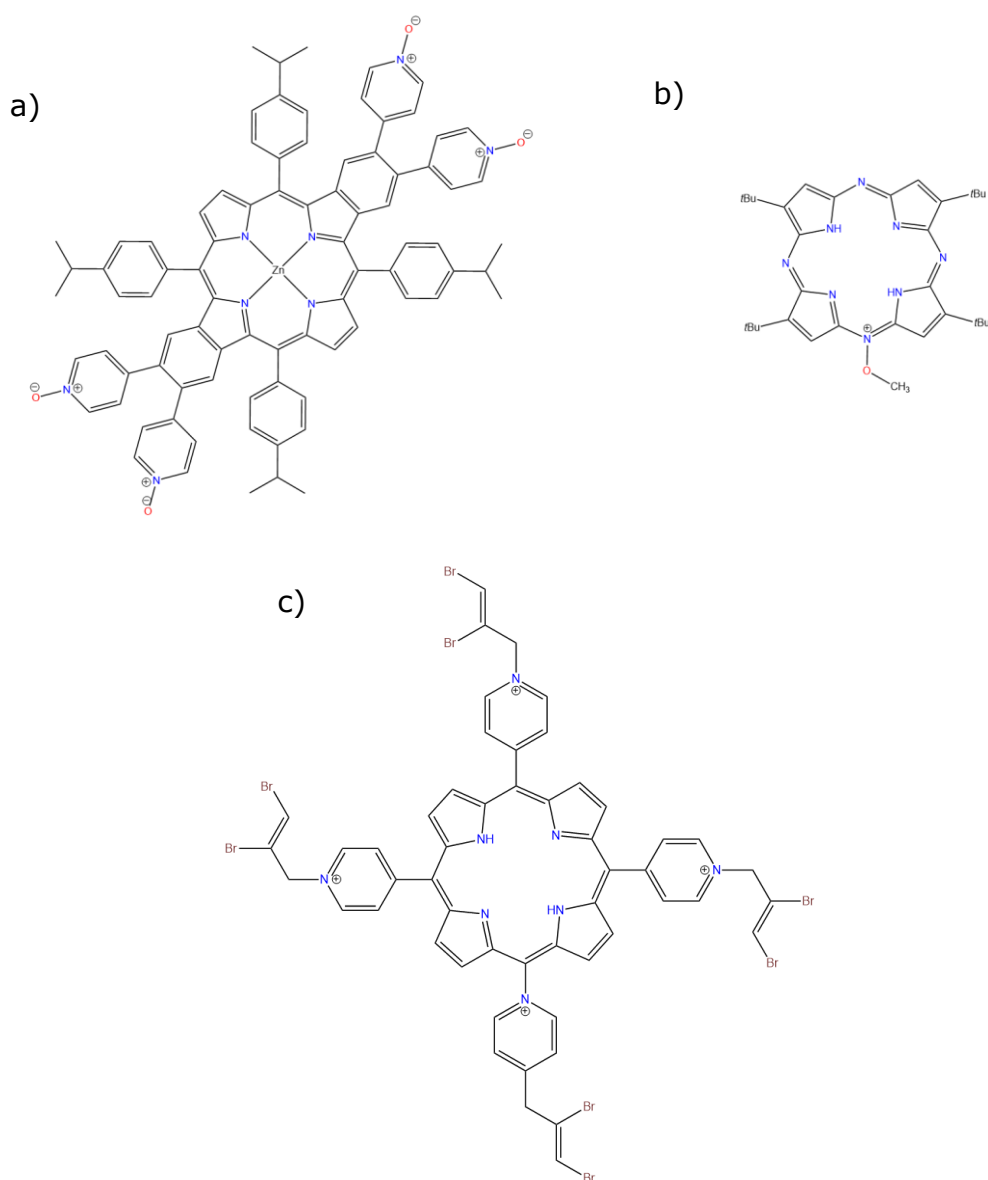
Osim učinkovitih fotosenzibilizatora u PDT-u, porfirini kao senzibilizatori korisni su i u solarnim ćelijama. Solarne ćelije osjetljive na boju (DSSC) jeftinom i fleksibilnom fotonaponskom tehnologijom pretvaraju sunčevu u električnu energiju. Budući da među svim komponentama (poluvodičke elektrode, boje, elektroliti i protuelektrode), boje imaju primarnu ulogu u apsorpciji sunčeve svjetlosti i pretvaranju iste u električnu energiju, učinak

DSSC-a u potpunosti ovisi o vrsti boje koja se koristi kao senzibilizator. Unatoč povoljnim svojstvima, porfirinske boje desetljećima su imale nisku učinkovitost. Uvođenjem donor-akceptorskih značajki na *meso* položajima porfirina postignuta je veća učinkovitost pretvorbe solarno-elektronske energije. Senzibilizatori koji se koriste u DSSC-ima moraju imati skupinu za sidrenje kako bi se adsorbirali na površinu poluvodičke elektrode (obično TiO<sub>2</sub>). Iako piridinska skupina po prirodi snažno privlači elektrone, pretvorbom u piridin *N*-oksid, sposobnost privlačenja elektrona se značajno poboljšava u usporedbi s tradicionalnom, slabom i nestabilnom sidrišnom skupinom karboksilne kiseline. Benzoporfirini s piridin *N*-oksidnim skupinama (Slika 6a) pokazali su bolje fotonaponske performanse i veću učinkovitost pretvorbe energije od benzoporfirina s piridin skupinama za sidrenje. (23)

Budući da je *N*-oksidacija dobro uspostavljena strategija za modificiranje reaktivnosti heteroaromatika koji sadrže četiri atoma dušika na *meso* pozicijama, ispitani su kvantni prinosi tetraazaporfirina i *N*-oksidiranih tetraazaporfirina. Kvantni prinosi singletnog kisika bili su znatno povećani *N*-oksidacijom tetraazaporfirina. Sukladno tome, dobiveni niski kvantni prinosi fluorescencije ( $\Phi_{FL}$ ) *N*-oksida impliciraju mogućnost olakšanog međusustavnog križanja iz stanja  $^*S_1$  u stanje  $^*T_1$  nakon *N*-oksidacije što dovodi do povećanog stvaranja singletnog kisika. Zatim su ispitana svojstva nakon metilacije atoma kisika na *N*-oksidnom ostatku koristeći Meerweinovu sol. Apsorpcijski i fluorescencijski spektri metiliranih *N*-oksida (Slika 6b) nakon dodatka kiseline (0.2% TsOH-CHCl<sub>3</sub>) pokazali su znatno intenzivnije Q vrpce od neutralnih oblika, vjerojatno zbog strukturnih promjena uzrokovanih protonacijom atoma kisika. (24)

Kationski porfirini izazivaju interes zbog dobre topivosti u vodi, selektivnosti za tumorske stanice, interakcije s DNA i potencijalne inhibicije telomeraza. S ciljem razvoja poboljšanih senzibilizatora s dvostrukim djelovanjem za PDT i za radioterapiju, ispitani su kationski porfirini sa i bez metala, bromirani na  $\beta$ - ili *N*-alil pozicijama. Nebromirani porfirini pokazali su veći

kapacitet za proizvodnju singletnog kisika u usporedbi s njihovim bromiranim analogima. Testiranjem metaboličke aktivnosti nakon PDT-a ili preživljavanja stanica nakon gama zračenja kolorimetrijskim (MTT) odnosno testom klonogenosti na stanicama raka dojke (MDA-MB-231), dokazana je najveća fotocitotoksičnost nemetalnog *N*-alil-bromoporfirina (Slika 6c). Svi testirani kationski porfirini pokazali su uspješni unos u jezgru iako je najveća substancična akumulacija pronađena u mitohondrijima. (25)



Slika 6. Strukturni primjeri sintetiziranih *N*-oksidiranih, *O*-alkiliranih i kationskih porfirina u dosadašnjim istraživanjima.



## 2. Cilj rada

Cilj rada uključuje optimizaciju alkiliranja (metiliranje, etiliranje) *N*-oksidiranih tetrapiridinporfirina i tripiridinporfirina koristeći reagense metil-jodid, etil-jodid i etil-tosilat u svrhu sinteze kationskih fotosenzibilizatora koje karakterizira dobra topljivost u vodi za intravenoznu administraciju i učinkovita akumulacija u tumorskim tkivima esencijalna za uspješnu provedbu PDT-a. Testom citotoksičnosti na stanicama raka dojke analizirana je djelotvornost poznatih porfirinskih derivata i novosintetiziranog porfirina.

## 3. Materijali i metode

### 3.1 Opće napomene

#### 3.1.1 Kemikalije i reagensi

U svim reakcijama su korištena komercijalno dostupna otapala i reagensi bez prethodne manipulacije. Potječu od proizvođača: Acros chemicals (Njemačka), VWR chemicals (SAD), Carlo Erba reagents (Italija) i Sigma-Aldrich (Njemačka).

#### 3.1.2 Metode

**Tankoslojna kromatografija (TLC):** Tankoslojnom kromatografijom na aluminijskim pločicama presvučenim slojem silika gela (Macherey-Nagel (Njemačka), 0,20 mm silika gel, 60 Å) praćen je tijek reakcije i provjera prisutnih spojeva.

**Kromatografija na stupcu:** Kromatografijom na stupcu pročišćeni su produkti od interesa. Kolone su punjene silika gelom (Macherey-Nagel (Njemačka), silika 60 Å, 0,04-0,06 mm), a produkti eluirani različitim omjerima otopine diklormetan/metanol (DCM/MeOH).

**Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC):** Pročišćavanje produkata tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (Agilent Technologies, 1260 Infinity) pomoću otapala vode (mili-Q grade) + 0,1% trifluoroacetene kiseline (TFA) i metanola (HPLC grade).

**NMR spektroskopija:** <sup>1</sup>H NMR spektri produkata snimljeni su Advance 600 Brüker (SAD) spektrometrom u Laboratoriju za NMR spektroskopiju na Prirodoslovno matematičkom fakultetu u Zagrebu. Otapala korištena za NMR spektroskopiju su deuterirani kloroform i metanol.

**UV-Vis spektrofotometrija:** UV-Vis spektri produkata su snimljeni na spektrofotometru Agilent Cary 60 UV-Vis (SAD) u kvarcnim kivetama (Hellma, Njemačka) pri valnom području apsorpcije od 350-700 nm. Normalizacija spektara proveda se dijeljenjem vrijednosti apsorpcije ( $y$ ) s maksimalnom vrijednosti ( $y_{0max}$ ).

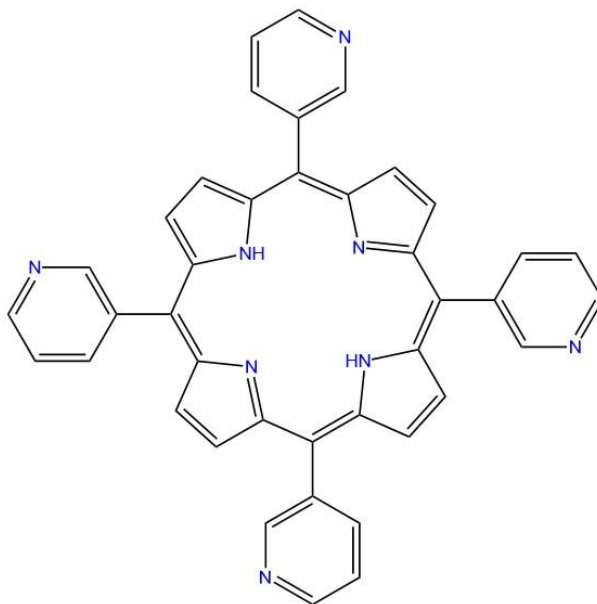
**Fluorescentna spektrofotometrija:** Fluorescencijski spektri produkata su snimljeni na Agilent Cary Eclipse (SAD) spektrofotometru u kvarcnim kivetama (Hellma, Njemačka) pri valnom području emisije od 550-800 nm. Kvantni prinos fluorescencije ( $\Phi_{FL}$ ) izračunat je prema formuli (1) uz tetrafenilporfirin (TPP) kao kalibracijski standard otopljen u toluenu čiji kvantni prinos fluorescencije iznosi 0,11 ( $\Phi_{ref}$ ). (26) Formula uključuje podatke indeksa loma otapala ispitivanog ( $\eta$ ) i referentnog spoja ( $\eta_{ref}$ ), integraciju ispod krivulje ispitivanog ( $I$ ) i referentnog spoja ( $I_{ref}$ ) te apsorbanciju na valnoj duljini ekscitacije ispitivanog ( $A$ ) i referentnog spoja ( $A_{ref}$ ).

$$(1) \quad \Phi_{FL} = \Phi_{ref} \times \frac{\eta^2}{\eta_{ref}^2} \times \frac{I}{A} \times \frac{A_{ref}}{I_{ref}}$$

**Stanična kultura:** Za kulturu MDA-MB-231 stanica raka dojke u biološkim eksperimentima korišten je Dulbeccov modificirani Eagleov medij (Pan Biotech, Njemačka) obogaćen 1% faktorom rasta, L-glutaminom (Pan Biotech, Njemačka), 1% otopinom antibiotika penicilin/streptomycin (Pan Biotech, Njemačka) te 10% fetalnog goveđeg seruma (Pan Biotech, Njemačka). Za brojanje stanica korištene su Neubauerove komorice (Hirschmann, Njemačka). Apsorbancija je mjerena pri  $\lambda = 570$  nm na čitaču pločica Tecan sunrise monokromator (Švicarska).

## 3.2 Adler-Longo sinteza

### (1) 5,10,15,20-tetrakis(3-piridil)porfirin



Molekulska formula:  $C_{40}H_{26}N_8$

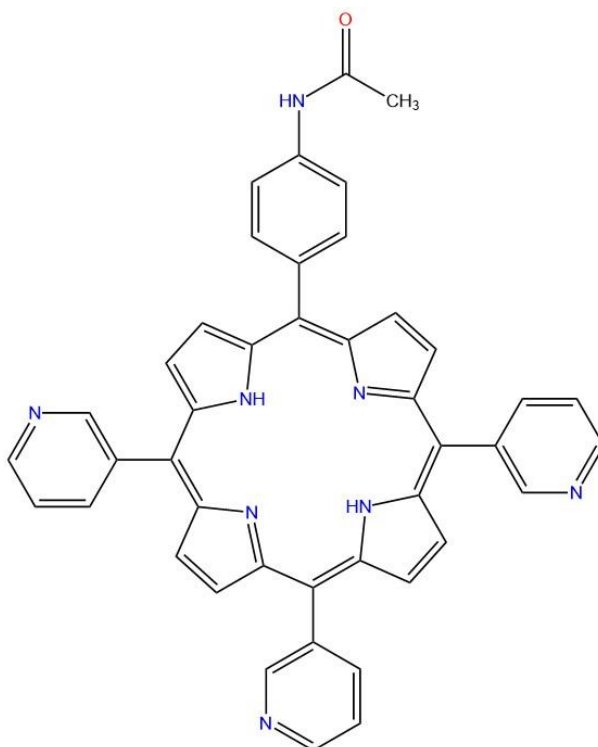
Molekulska masa: 618,70 g/mol

3-piridinkarboksialdehid (1,8 g, 0,02 mol, 3 ekv.) i 4-acetamidobenzaldehid (0,9 g, 0,01 mol, 1 ekv.) su otopljeni u propanskoj kiselini (70 mL). Prethodno destilirani pirol (1,5 g, 0,02 mol, 4 ekv.) je kroz 10 min dokapavan u otopinu koja se miješala i postepeno zagrijavala u vodenoj kupelji. Reakcijska smjesa je grijana 45 min ( $\approx 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) uz pristup zraka i svjetlosti potrebnih za aromatizaciju. Smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu, a otapalo je uklonjeno *in vacuo*. Produkt je pročišćen dvjema kolonskim kromatografijama uz silika gel (stacionarna faza) i mješavinu otapala DCM:MeOH u omjeru 30:1 (mobilna faza). Prva frakcija porfirina **1** dobivena je precipitacijom nakon otapanja u diklormetanu (DCM) i dodatkom heksana u suvišku. Nastali kristalni produkt je filtriran i izoliran kao ljubičasta krutina (161,7 mg, 5%).

UV-Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$  ( $\epsilon \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) = 417 (294,9), 514 (13,4), 549 (5,3), 590 (4,2), 646 (2,4).

Fluorescencija (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,  $\lambda_{\text{ex}} = 417 \text{ nm}$ ):  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm} = 649, 715$ ;  $\Phi_{\text{FL}} = 0,04$ .

**(2)** 5-(4-acetamidofenil)-10,15,20-tris(3-piridil)porfirin



Molekulska formula: C<sub>43</sub>H<sub>30</sub>N<sub>8</sub>O

Molekulska masa: 674,77 g/mol

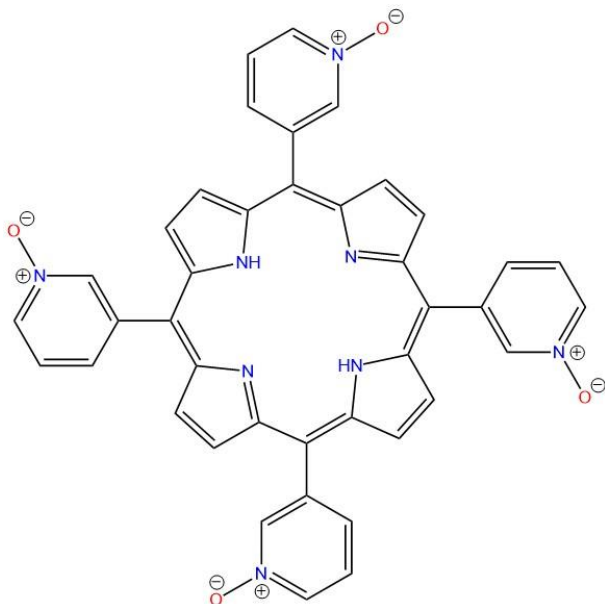
Sljedeća frakcija porfirina **2** također je dobivena nakon postupka precipitacije otapanjem u DCM-u te dodatkom heksana u suvišku. Nakon filtracije precipitirani produkt je izoliran kao ljubičasta krutina (91,3 mg, 2%).

UV-Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$  ( $\epsilon \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) = 419 (309,4), 515 (15,3), 551 (6,8), 590 (4,6), 647 (3,1).

Fluorescencija (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,  $\lambda_{\text{ex}} = 419 \text{ nm}$ ):  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm} = 651, 716$ ;  $\Phi_{\text{FL}} = 0,09$ .

### 3.3 N-oksidacija piridilporfirina

#### (3) 5,10,15,20-tetrakis(1-oksipiridin-3-il)porfirin



Molekulska formula:  $C_{40}H_{26}N_8O_4$

Molekulska masa: 682,70 g/mol

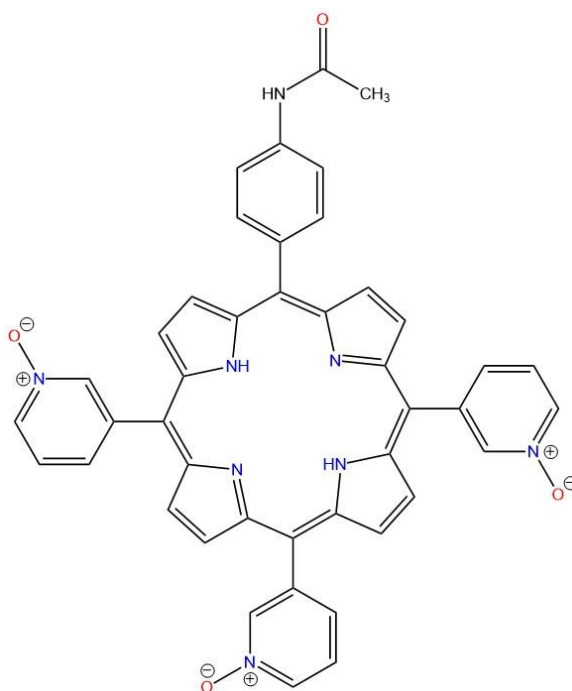
Porfirin **1** (200,9 mg, 0,32 mmol, 1 ekv.) je otopljen u bezvodnom DCM-u (100 mL) nakon čega je u otopinu tijekom 30 min dodavana *m*-CPBA (1,4 g, 0,01 mol, 24 ekv.). Reakcija se kontinuirano miješala na sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetlosti. Tijek reakcije provjeravan je tankoslojnom kromatografijom (TLC), a po završetku reakcije dodan je TEA (1,7 mL). Reakcija je miješana na sobnoj temperaturi dodatnih 30 min. Nakon ukupno 1,5 h reakcije, otapalo je uklonjeno *in vacuo*. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na silika gelu uz mješavinu otapala DCM:MeOH u omjerima od 15:1 do završnih 5:1 kao mobilnu fazu. Oksidirani simetrični porfirin **3** je prekrizaliziran otapanjem i zagrijavanjem u etanolu, zatim hlađenjem na ledu 30 min. Produkt je izoliran kao ljubičasta krutina nakon vakuum filtracije (207,6 mg, 94%).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{Cl}$ ): 7,74-7,78 (m, 4H; Py-5-*H*), 8,05-8,15 (m, 4H, Py-6-*H*), 8,72 (d,  $J = 6,6$  Hz, 4H, Py-4-*H*), 8,97 (d,  $J = 9$  Hz, 8H,  $\beta$ -*H*), 9,07 (t,  $J = 10,8$  Hz, 4H, Py-2-*H*).

UV-Vis ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 1:1$ ):  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$  ( $\epsilon \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) = 417 (196,3), 511 (105,1), 544 (1,8), 587 (3,2), 641 (0,4).

Fluorescencija ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 1:1$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 417 \text{ nm}$ ):  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm} = 645, 712$ ;  
 $\Phi_{\text{FL}} = 0,03$ .

**(4)** 5-(4-acetamidofenil)-10,15,20-tris(1-oksipiridin-3-il)porfirin



Molekulska formula:  $\text{C}_{43}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{O}_4$

Molekulska masa: 722,77 g/mol

Porfirin **2** (51,3 mg, 0,13 mmol, 1 ekv.) je otopljen u bezvodnom DCM-u (40 mL) nakon čega je u otopinu tijekom 30 min dodavana *m*-CPBA (396,3 mg, 2,29 mmol, 18 ekv.). Reakcija se kontinuirano miješala na sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetlosti. Tijek reakcije provjeren je TLC-om,

a po završetku reakcije dodan je TEA (1 mL). Reakcija je dodatno miješana 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon 1,5 h reakcije, otapalo je uklonjeno *in vacuo*. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na silika gelu uz mješavinu otapala DCM:MeOH u omjerima od 15:1 do 5:1 kao mobilnu fazu. Oksidirani asimetrični porfirin **4** je izoliran kao ljubičasta krutina (28,4 mg, 59%).

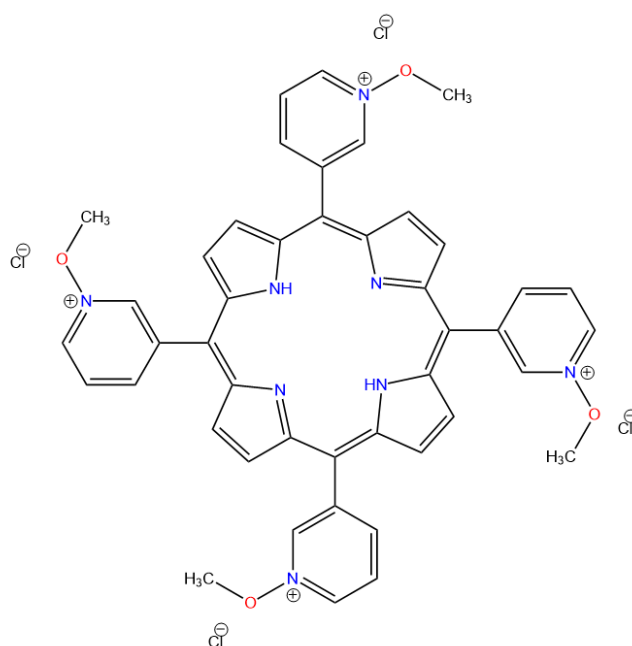
<sup>1</sup>H NMR (MeOH): 2,31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7,95-8,00 (m, 5H, preklapanje Ar-3,5-H, Py-5-H), 8,09 (d, *J* = 6 Hz, 2H, Ar-2,6-H), 8,38-8,44 (m, 3H, Py-6-H), 8,83 (t, *J* = 5,4 Hz, 3H, Py-4-H), 9,01 (br s, 8H, β-H), 9,17 (d, *J* = 12 Hz, 3H, Py-2-H).

UV-Vis (MeOH): λ<sub>max</sub>/nm (ε x 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) = 417 (105,6), 512 (5,5), 546 (1,5), 586 (1,7), 649 (0,4).

Fluorescencija (MeOH, λ<sub>ex</sub> = 417 nm): λ<sub>max</sub>/nm = 648, 714; Φ<sub>FL</sub> = 0,05.

### 3.4 Metilacija (oksid)piridilporfirina metil-jodidom

#### **(5)** 5,10,15,20-tetrakis(1-metoksidopiridin-3-il)porfirin tetraklorid





Molekulska formula:  $C_{44}H_{38}N_8O_4Cl_4$

Molekulska masa: 884,64 g/mol

### 3.4.1 Bez otapala

Porfirinu **3** (6,4 mg, 0,01 mmol, 1 ekv.) u okrugloj, dvogrloj tikvici je špricom odjednom dodan metil-jodid (MeI; 0,2 mL, 3,81 mmol, 400 ekv.). Otopina je miješana na sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetlosti pod dušikovom atmosferom. Porfirin **3** nije topljiv u MeI, a produkt od interesa, porfirin **5**, nije sintetiziran.

### 3.4.2 Otapalo DMF

#### 3.4.2.1 Metoda 1

Porfirin **3** (13,1 mg, 0,02 mmol, 1 ekv.) otopljen je u bezvodnom dimetilformamidu (DMF; 7,5 mL) nakon čega mu je špricom dodan MeI (0,5 mL, 0,01 mol, 520 ekv.). Reakcija je miješana na sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetlosti pod dušikovom atmosferom. Tijek reakcije provjeravan je TLC-om. Nakon 24 h reakcije, otapalo je uklonjeno *in vacuo*. Dio reakcijske smjese otopljen je u MeOH (HPLC grade) te filtriran. Filtrirani uzorak se pokušao pročititi HPLC analitičkom zatim preparativnom metodom (pumpa A – voda + 0,1% TFA, pumpa B – HPLC MeOH; metoda: 0 min - 5% MeOH, 5 min – 5% MeOH, 6 min – 50% MeOH, 30 min - 100% MeOH, 40 min – 100% MeOH, 42 min – 5% MeOH, 45 min – 5% MeOH). Za uklanjanje trifluorooctene kiseline sakupljeni uzorak se dodatno pročitio Sep Pak plus short tC18 kolonom. TLC-om je pokazano da produkt od interesa, porfirin **5**, nije izoliran.

#### 3.4.2.2 Metoda 2

Porfirin **3** (34,7 mg, 0,05 mmol, 1 ekv.) je otopljen u bezvodnom DMF-u (15 mL) nakon čega mu je špricom tijekom dana dodavano po 40 ekv. MeI (0,8 mL, 0,01 mol, 240 ekv.). Reakcija je miješana na sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetlosti pod dušikovom atmosferom. Tijek reakcije provjeravan je TLC-om. Nakon 24 h reakcije, otapalo je uklonjeno *in vacuo*. Reakcijska smjesa je otopljena u MeOH te se pokušala pročititi na koloni punjenoj aktiviranim, neutralnim aluminijevim oksidom razreda II uz MeOH kao mobilnu fazu. Produkt (porfirin **5**) nije izoliran.

### 3.4.2.3 Metoda 3

Porfirin **3** (11,2 mg, 0,02 mmol, 1 ekv.) je otopljen u bezvodnom DMF-u (6 mL) nakon čega mu je špricom tijekom dva dana dodavano po 40 ekv. MeI (0,4 mL, 0,01 mol, 360 ekv.). Reakcija je miješana na sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetlosti pod dušikovom atmosferom. Tijek reakcije provjeravan je TLC-om. Reakcija je dodatno zagrijavana na 60 °C, 1 h zatim na 90 °C, 1 h. Daljnje zagrijavanje je prekinuto zbog nastanka dodatnih nečistoća. Nakon 48 h reakcije na sobnoj temperaturi, otapalo je uklonjeno *in vacuo*. Izmjena jodidnih iona provedena je precipitacijama. Reakcijska smjesa je otopljena u miliQ vodi gdje je precipitacija potaknuta dodatkom zasićene otopine amonijeva heksafluorofosfata (NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>) nakon čega je talog filtriran. Sljedeći dan je filtrirani talog otopljen u acetonu gdje je precipitacija potaknuta dodatkom zasićene otopine tetrabutilamonijeva klorida (TBAC) u acetonu nakon čega je talog sakupljen filtracijom. Dan nakon dobiveni talog je otopljen u MeOH te je precipitirao u dietil-eteru. Precipitat je dodatno 3x ispran dietil-eterom. TLC kromatogram ispranog produkta pokazao je većinski spoj od interesa uz minimalne nečistoće, ali količina produkta bila je premala za daljnje analize i postupke. Isti postupak sinteze ponovljen je još dva puta, ali zbog nastale veće količine produkta koja je doprinijela većim količinama nečistoća, spoj od interesa, porfirin **5**, nije izoliran.

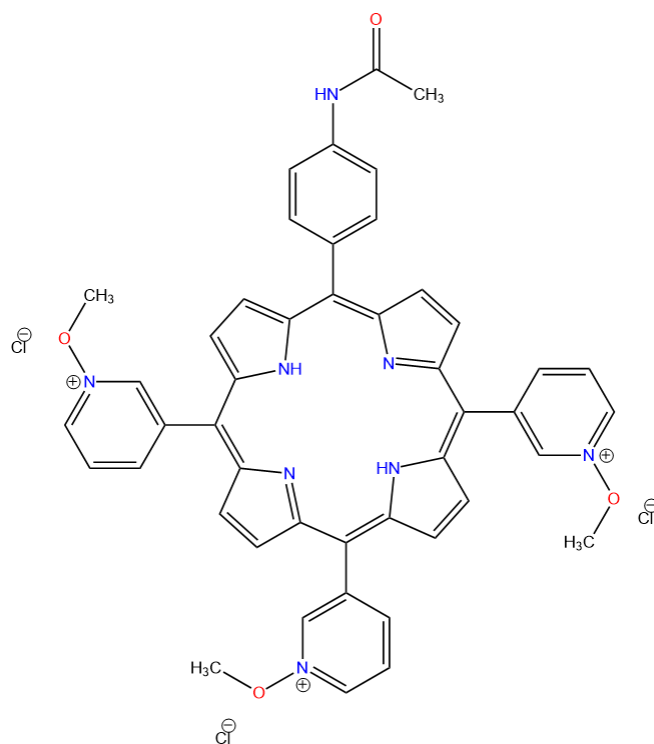
### 3.4.3 Mješavina otapala DCM/MeOH

Porfirin **3** (45,8 mg, 0,07 mmol, 1 ekv.) je otopljen u bezvodnom DCM:MeOH = 20:1 (7 mL) nakon čega mu je prvi i drugi dan špricom dodano po 200 ekv. MeI (2,1 mL, 0,03 mol, 400 ekv.). Reakcija je miješana na sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetlosti pod dušikovom atmosferom. Tijek reakcije provjeravan je TLC-om. Reakcija je zagrijavana 3 h na 40 °C, bez značajnih promjena s velikom količinom neizreagiranog reaktanta. Otapalo je uklonjeno *in vacuo*.

### 3.4.4 Otapalo DCM

Prethodno opisana, uparena reakcijska smjesa je otopljena u bezvodnom DCM-u (6,5 mL) nakon čega joj je u periodu od 26 dana špricom dodavano po 40 ekv. MeI (1,3 mL, 0,02 mol, 320 ekv.). Reakcija je miješana na sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetlosti pod dušikovom atmosferom. Tijek reakcije provjeravan je TLC-om. Otapalo je uklonjeno *in vacuo*. Izmjena jodidnih iona izvršila se otapanjem reakcijske smjese u MeOH (25 mL) i dodatkom Amberlite IRA-402(Cl) ionskog izmjenjivača (1,6 g). Reakcija je miješana 2 h na sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetlosti. Amberlite smola je uklonjena filtracijom, a otapalo *in vacuo*. Analizom TLC kromatograma i <sup>1</sup>H NMR spektra pokazano je da nije izoliran čisti produkt, porfirin **5**.

**(6)** 5-(4-acetamidofenil)-10,15,20-tris(1-metoksidopiridin-3-il)porfirin triklorid



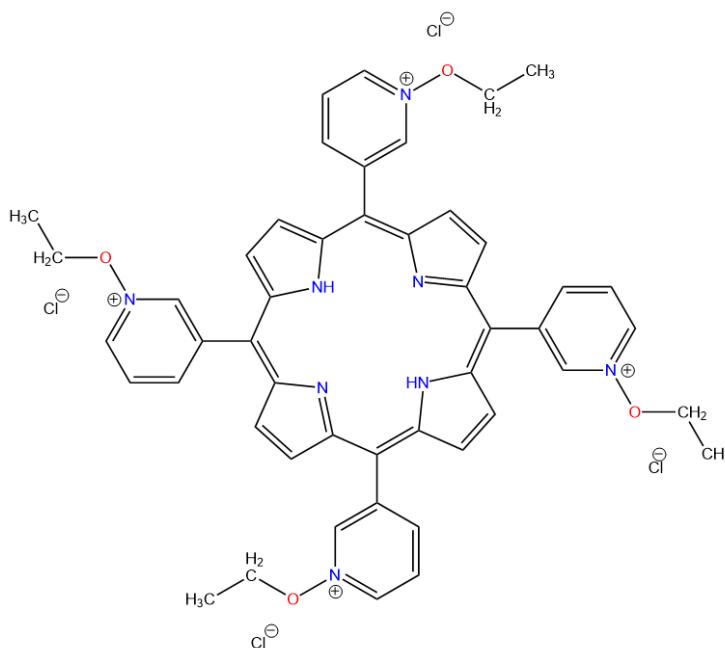
Molekulska formula:  $C_{46}H_{39}N_8O_4Cl_3$

Molekulska masa: 874,22 g/mol

Profirin **4** (20,4 mg, 0,03 mmol, 1 ekv.) otopljen je u bezvodnom DCM-u (4 mL) nakon čega mu je tijekom 28 dana špricom dodavano po 30 ekv. MeI (0,7 mL, 0,01 mol, 420 ekv.). Reakcija je miješana na sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetlosti pod dušikovom atmosferom. Tijek reakcije provjeravan je TLC-om. Nakon 28 dana reakcije, otapalo je uklonjeno *in vacuo*. Izmjena jodidnih iona izvršila se otapanjem reakcijske smjese u MeOH (18 mL) i dodatkom Amberlite IRA-402(Cl) ionskog izmjenjivača (1,3 g). Reakcija je miješana 2 h na sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetlosti. Amberlite smola je uklonjena filtracijom, a otapalo *in vacuo*. Analizom TLC kromatograma i  $^1H$  NMR spektra pokazano je da nije izoliran čisti porfirin **6** od interesa.

### 3.5 Etilacija (oksid)piridilporfirina metil-jodidom

#### (7) 5,10,15,20-tetrakis(1-etoksidopiridin-3-il)porfirin tetraklorid



Molekulska formula:  $C_{48}H_{46}N_8O_4Cl_4$

Molekulska masa: 940,75 g/mol

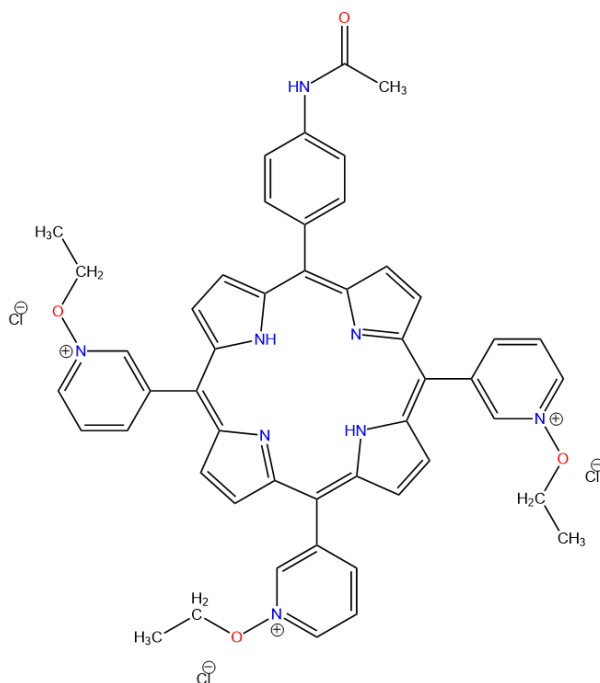
#### 3.5.1 Otapalo DMF

Porfirin **3** (28,4 mg, 0,04 mmol, 1 ekv.) je otopljen u bezvodnom DMF-u (5 mL) nakon čega mu je tijekom dana špricom dodavan etil-jodid (EtI; 0,7 mL, 0,01 mol, 200 ekv.). Reakcija je miješana na sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetlosti pod dušikovom atmosferom. Provjera tijekom reakcije TLC-om pokazala je nastanak čistog produkta. Međutim, nakon uklanjanja otapala *in vacuo* (95 °C), TLC-om je dokazano prisustvo neizreagiranog reaktanta i dodatnih nečistoća. Spoj od interesa, porfirin **7**, nije izoliran.

### 3.5.2 Otapalo DCM

Porfirin **3** (23,6 mg, 0,03 mmol, 1 ekv.) je otopljen u bezvodnom DCM-u (10 mL) nakon čega mu je špricom tijekom 33 dana dodavano po 40 ekv. EtI (1,1 mL, 0,01 mol, 400 ekv.). Reakcija je miješana na sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetlosti pod dušikovom atmosferom. Tijek reakcije provjeravan je TLC-om. Otapalo je uklonjeno *in vacuo*. Izmjena jodidnih iona izvedena je precipitacijama. Reakcijska smjesa je otopljena u miliQ vodi gdje je precipitacija potaknuta dodatkom zasićene otopine NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> nakon čega je talog filtriran. Sljedeći dan je nastali talog otopljen u acetonu gdje je precipitacija potaknuta dodatkom TBAC nakon čega je talog filtriran. Dan nakon je nastali talog 1x ispran dietil-eterom. Analiza <sup>1</sup>H NMR-om pokazala je da porfirin **7** nije izoliran.

**(8)** 5-(4-acetamidofenil)-10,15,20-tris(1-etoksidopiridin-3-il)porfirin triklorid



Molekulska formula: C<sub>49</sub>H<sub>45</sub>N<sub>8</sub>O<sub>4</sub>Cl<sub>3</sub>

Molekulska masa: 916,30 g/mol

Porfirin **4** (28,5 mg, 0,04 mmol, 1 ekv.) otopljen je u bezvodnom DCM-u (5 mL) nakon čega mu je špricom tijekom 15 dana dodavano po 30 ekv. EtI (1,1 mL, 0,01 mol, 360 ekv.). Reakcija je miješana na sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetlosti pod dušikovom atmosferom. Tijek reakcije provjeravan je TLC-om. Izmjena jodidnih iona izvedena je precipitacijama uz  $\text{NH}_4\text{PF}_6$  u mili-Q vodi te TBAC u acetonu. Nastali se talog 3x isprao dietil-eterom. Analizom TLC kromatograma pokazana je čistoća željenog produkta dok je analiza  $^1\text{H}$  NMR-om pokazala da se nije uspio izolirati čisti porfirin **8**.

### 3.6 Etilacija (oksid)piridilporfirina etil-tosilatom

Porfirin **3** (22,2 mg, 0,03 mmol, 1 ekv.) je otopljen u bezvodnom DCM-u (6 mL). Tijekom 27 dana reakcijskoj smjesi je dodavan etil-tosilat (196,2 mg, 0,98 mmol, 30 ekv.) te je preko vodene kupelji postepeno zagrijavana (50 °C) ukupno 24 h. Reakcija se odvijala zaštićena od svjetlosti i pod dušikovom atmosferom. Tijek reakcije provjeravan je TLC-om. Otapalo je uklonjeno *in vacuo*. Izmjena jodidnih iona izvršila se otapanjem reakcijske smjese u MeOH (15 mL) i dodatkom Amberlite IRA-402(Cl) ionskog izmjenjivača (1,1 g). Reakcija je miješana 2 h na sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetlosti. Amberlite smola je uklonjena filtracijom, a otapalo *in vacuo*. Analiza  $^1\text{H}$  NMR-a pokazala je izoliran produkt od interesa, porfirin **7**, uz dodatne nečistoće (18,1 mg, 59%).

$^1\text{H}$  NMR (MeOH): 1,67 (t,  $J = 2,4$  Hz, 12H, etilni  $\text{CH}_3$ ), 5,07-5,10 (m, 8H, etilni  $\text{CH}_2$ ), 8,22 (d, 4H,  $J = 6$  Hz, Py-5-H), 9,20 (br s, preklapanje 8H,  $\beta$ -H i 4H, Py-6-H), 9,88 (d,  $J = 6$  Hz, 4H, Py-4-H), 10,46 (s, 4H, Py-2-H).

Napomena: u  $^1\text{H}$  NMR spektru su prisutni pikovi nečistoća:  $\delta$ /ppm 2,07 (s, 8H), 6,84 (s, 8H), 7,28 (s, 8H), 8,69 (t,  $J = 6,6$  Hz, 8H), 9,48 (d,  $J = 7,3$  Hz, 8H).

Porfirin **4** (31,1 mg, 0,04 mmol, 1 ekv.) je otopljen u bezvodnom DCM-u (5 mL). Tijekom 15 dana reakcijskoj smjesi je dodavan etil-tosilat (360,2 mg, 1,79 mmol, 40 ekv.) te je preko vodene kupelji postepeno zagrijavana ukupno 12 h (50 °C). Reakcija se odvijala zaštićena od svjetlosti i pod dušikovom atmosferom. Tijek reakcije provjeravan je TLC-om. Otapalo je uklonjeno *in vacuo*. Izmjena jodidnih iona izvršila se otapanjem reakcijske smjese u MeOH (15 mL) i dodatkom Amberlite IRA-402(Cl) ionskog izmjenjivača (1,1 g). Reakcija je miješana 2 h na sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetlosti. Amberlite smola je uklonjena filtracijom, a otapalo *in vacuo*. Analiza TLC kromatograma i <sup>1</sup>H NMR spektra pokazala je da se uspio izolirati većinski čisti produkt od interesa, porfirin **8** (9,3 mg, 24%).

<sup>1</sup>H NMR (MeOH): 1,69 (t,  $J = 6,6$  Hz, 9H, etilni  $CH_3$ ), 2,35 (d,  $J = 3,6$  Hz, 3H,  $CH_3$ ), 5,10-5,14 (m, 6H, etilni  $CH_2$ ), 8,25 (d,  $J = 5,4$  Hz, 2H, Ar-3,5- $H$ ), 8,42 (s, 2H, Ar-2,6- $H$ ), 8,78 (s, 3H, Py-5- $H$ ), 8,99 (s, 2H,  $\beta$ - $H$ ), 9,01 (s, 2H,  $\beta$ - $H$ ), 9,23 (d,  $J = 7,2$  Hz, 4H,  $\beta$ - $H$ ), 9,62 (s, 3H, Py-6- $H$ ), 9,92 (d,  $J = 4,8$  Hz, 3H, Py-4- $H$ ), 10,60 (s, 3H, Py-2- $H$ ).

UV-Vis (MeOH):  $\lambda_{max}/nm$  ( $\epsilon \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$ ) = 423 (110,6), 516 (8,4), 550 (2,6), 590 (3,1), 646 (0,9).

Fluorescencija (MeOH,  $\lambda_{ex} = 423$  nm):  $\lambda_{max}/nm = 650, 715$ ;  $\Phi_{FL} = 0,06$ .

UV-Vis (PBS):  $\lambda_{max}/nm$  ( $\epsilon \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$ ) = 420 (128,2), 518 (7,8), 555 (2,4), 582 (3,3), 640 (0,8).

Fluorescencija (PBS,  $\lambda_{ex} = 420$  nm):  $\lambda_{max}/nm = 660, 705$ ;  $\Phi_{FL} = 0,04$ .

### 3.7 Stanična kultura

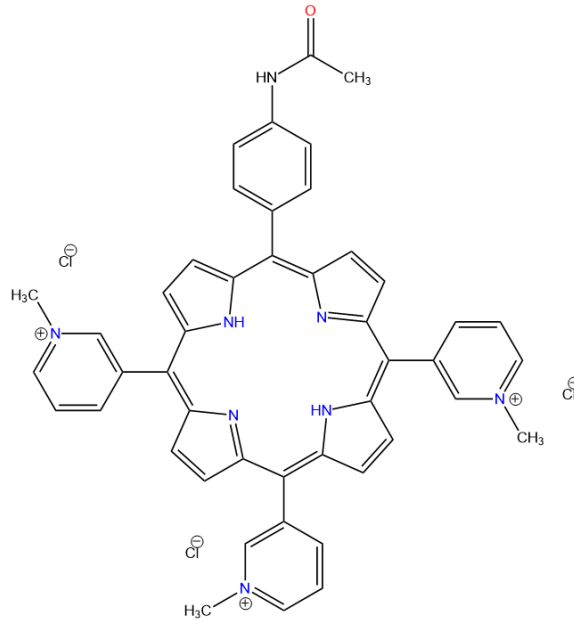
MDA-MB-231 stanice raka dojke su kultivirane u petrijevim posudama za kulturu stanica u Dulbecco modificiranom Eagle mediju (DMEM) s 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS), 1% L-glutamina i 1% otopine antibiotika penicilin/streptomycin. Kultura stanica inkubirana je na 37 °C i 5% CO<sub>2</sub> i



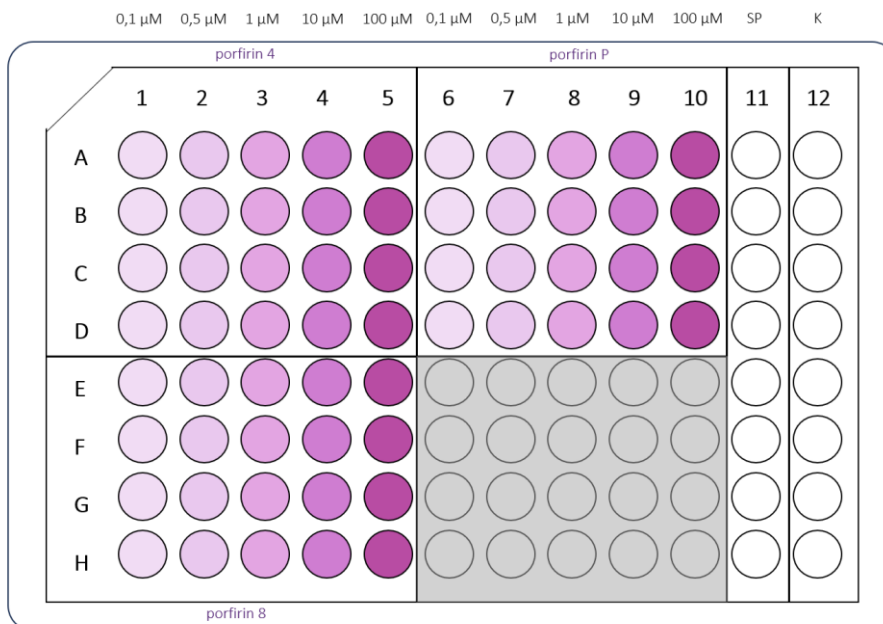
korištena pri konfluentnosti većoj od 80%. Nakon uklanjanja medija iz stanične kulture, stanice su isprane Dulbecco fiziološkom otopinom s fosfatnim puferom (DPBS), a podignute dodatkom 1,5 mL tripsina te inkubirane 5 min na 37 °C. Da bi se inhibiralo djelovanje tripsina, dodano je 8-9 mL svježeg medija i stanice su isprane. Prebačene su u bocu i centrifugirane 5 min, 4 °C na 1500 rpm (okretaja u minuti). Nakon centrifuge uklonjen je supernatant, a pelet resuspendiran u novom mediju. Stanice su izbrojane u Neubauerovim komoricama uz otopinu tripan plavog (1:5).

### 3.7.1 MTT test citotoksičnosti s izoliranim fotosenzibilizatorima

Stanice raka dojke su nasađene na dvije pločice od kojih svaka sadrži 96 jažica (150  $\mu$ L stanica/jažica). Nakon 48 h inkubacije (37 °C i 5% CO<sub>2</sub>) dodani su fotosenzibilizatori: porfirin **4**, porfirin **8** i dobiven već sintetizirani asimetrični, *N*-metilirani porfirin **P** (Slika 7). Porfirini su dodani u koncentracijama 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M i 0,1  $\mu$ M (Slika 8). Za početne otopine porfirina (20 mM) korišten je dimetil sulfoksid (DMSO) kao otapalo. Otapanjem početne otopine u DMEM-u i daljnjim razrjeđenjem dobivene su testirane koncentracije (10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M i 0,1  $\mu$ M). Sve koncentracije porfirina nanese su u kvadruplikatu. Sljedeći dan nakon promjene medija, jedna pločica je odmah stavljena na inkubaciju bez osvjetljenja, a druga nakon 30 min osvjetljavanja lampom crvenog osvjetljenja (doza crvene svjetlosti = 3,6 J/cm<sup>2</sup>) uz stalan protok svjetlosti 2 mW/cm<sup>2</sup>. Nakon 36 h inkubacije, dodan je 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (MTT; 40  $\mu$ L/jažica). Pločice su zamotane u aluminijsku foliju i inkubirane 3 h (37 °C) nakon čega je po jažici dodano 160  $\mu$ L DMSO-a. Izmjerena je apsorbancija pri 570 nm (valna duljina formazana) koristeći Tecan Sunrise monokromator.



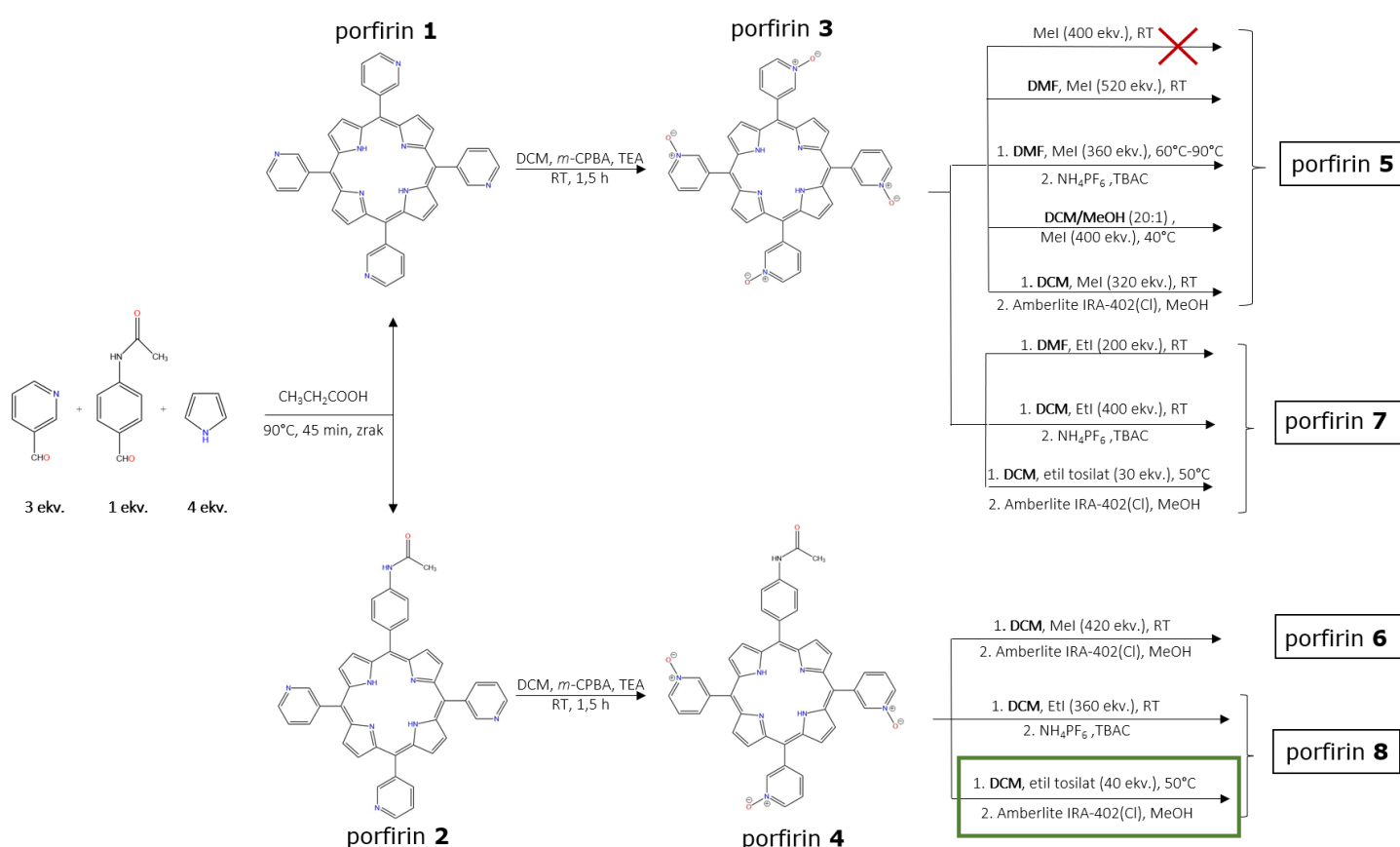
Slika 7. Struktura porfirina **P**, 5-(4-acetamidofenil)-10,15,20-tris(1-metilpiridin-3-il)porfirin triklorida, jednog od spojeva ispitanih u biološkom eksperimentu.



Slika 8. Shematski prikaz korištenih pločica za test citotoksičnosti s pripadajućim koncentracijama. Svaki od tri kvadranta predstavlja prostor u kojem se nalazio svaki od ispitivanih porfirina. Prikazani raspored jažica bio je jednak za pločicu koja je osvijetljena ( $\lambda = 645 \text{ nm}$ ) i za onu koja nije osvijetljena. SP: slijepa proba, K: kontrola (stanice ne-tretirane porfirinom).

## 4. Rezultati i rasprava

Rad uključuje reakcije *N*-oksidacije i *O*-alkiliranja na izoliranim simetričnim i asimetričnim piridilporfirinima dobivenim modificiranom Adler-Longo metodom. Reakcijski uvjeti *O*-alkiliranja i naknadnog pročišćavanja optimizirani su u svrhu izolacije čistih, kationskih produkata sa što većim iskorištenjima. Sve reakcije alkilacije odvijale su se pod dušikovom atmosferom, a cijeli sintetski put prikazan je na Shemi 1.



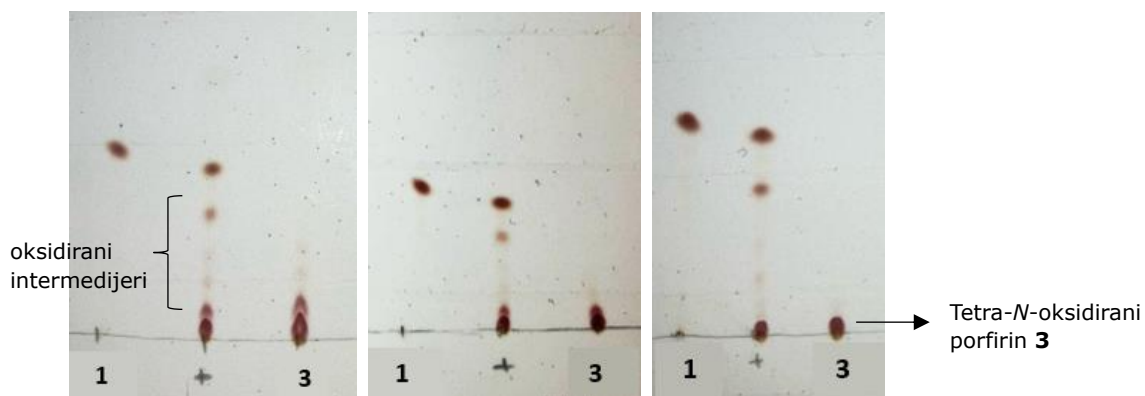
Shema 1. Sintetski put svih spojeva ovoga rada. Zeleni pravokutnik označava reakciju kojom je nastao porfirin **8** uključen u daljnje biološko ispitivanje citotoksičnosti. RT (engl. room temperature).

## 4.1 Sinteza (oksido)piridilporfirina

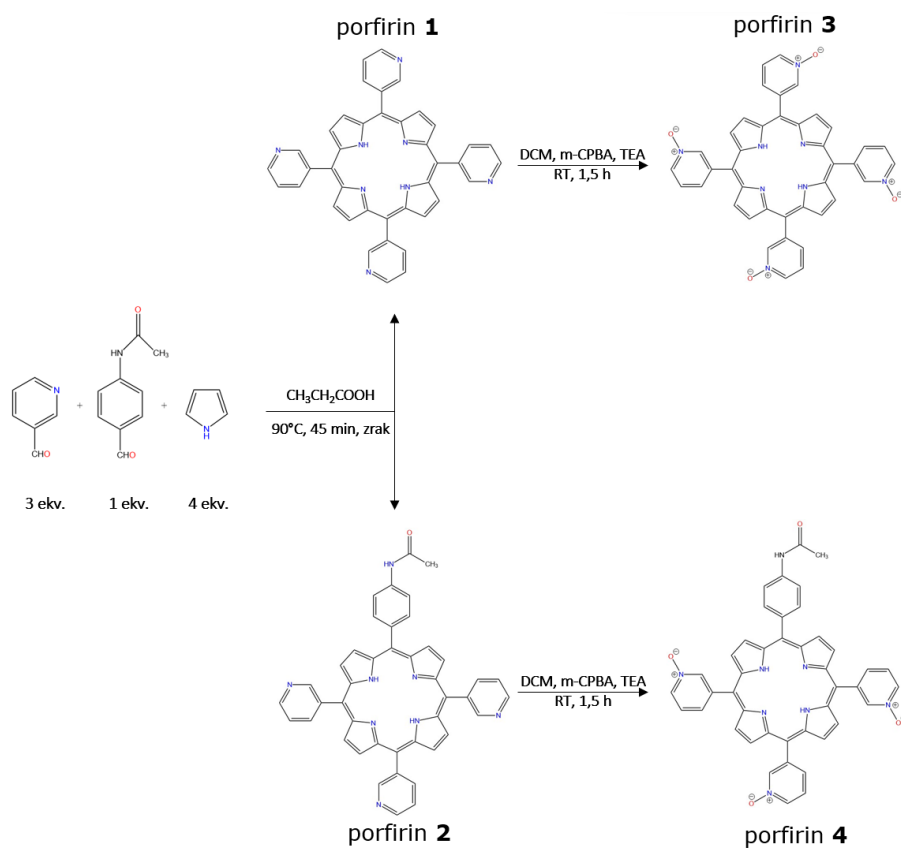
Simetrični i asimetrični prekursori (oksido)piridilporfirina (porfirin **1** i porfirin **2**) dobiveni su modificiranom Adler-Longo sintezom. Aldehidi (3-piridinkarboksialdehid i 4-acetamidobenzaldehid) i propanska kiselina miješani su i zagrijavani uz postepeno dokapavanje pirola i održavanje temperature na 90 °C, 45 min. Reakcija se odvijala u prisustvu svjetlosti i kisika potrebnog za oksidaciju porfirinogena u porfirin. Nastanak porfirina, ali i različitih nečistoća potvrdila je promjena boje reakcijske otopine iz prozirne u smeđe/crnu. Iako je modificirana Adler-Longo metoda jednostavna i brza, nedostatak predstavlja zahtjevno pročišćavanje produkata od interesa iz dobivene smjese porfirinskih derivata. U ovom slučaju bile su potrebne dvije kolonske kromatografije za izolaciju porfirina **1** koji proizlazi iz manje reaktivnog 4-acetamidobenzaldehida i porfirina **2** koji proizlazi iz reaktivnijeg 3-piridinkarboksialdehida (Shema 2). Stoga je iskorištenje porfirina **1** (5%) bilo veće od iskorištenja porfirina **2** (2%). (27)

Piridilne skupine u *meso* položajima omogućavaju povećanje topljivosti kvaternizacijom piridilnog dušika pritom zadržavajući sposobnost produkcije ROS-a. Porfirin **1** i porfirin **2** su podvrgnuti kvaternizaciji piridilnog dušika procesom oksidacije (Shema 2). Porfirinima otopljenim u DCM-u postupno je dodavana *m*-CPBA (bijela krutina i jaki oksidans) u značajnom suvišku (24 ekv.). Proces oksidacije pojedinačnih dušika na piridinu vidljiv je provedbom TLC kromatograma, a daljnja oksidacija se zaustavlja dodatkom TEA nakon što na baznoj liniji ostane prisutan samo najpolarniji, potpuno *N*-oksidirani porfirin (Slika 9). Oksidirani porfirini **3** i **4** su pročišćeni pomoću jedne, dugotrajne kolonske kromatografije uz visoke prinose (94% i 59%). Analizom <sup>1</sup>H NMR spektra potvrđeni su izolirani porfirini **3** i **4**. Sintetizirani porfirini su zbog svoje zwitterionske prirode topljiviji u polarnim otapalima poput alkohola od svojih prekursora, ali nisu topljivi u biološkim otapalima poput vode ili PBS-a te su relativno nestabilni. Stoga su se *O*-alkiliranjem pokušali prirediti novi, kationski derivati koje

osim dobre topljivosti u alkoholima karakterizira dobra topljivost u biološkim otapalima s ciljem buduće analize i primjene u biološkim sustavima.



Slika 9. Postupni proces *N*-oksidacije piridilporfirina **1** i sinteza porfirina **3** na TLC kromatogramima.



Shema 2. Sintetski put dobivanja (oksid)piridilporfirina (porfirin **3** i porfirin **4**).

## 4.2 Optimizacija reakcijskih uvjeta O-alkiliranja (oksidopiridilporfirina)

### 4.2.1 Metilacija (oksidopiridilporfirina)

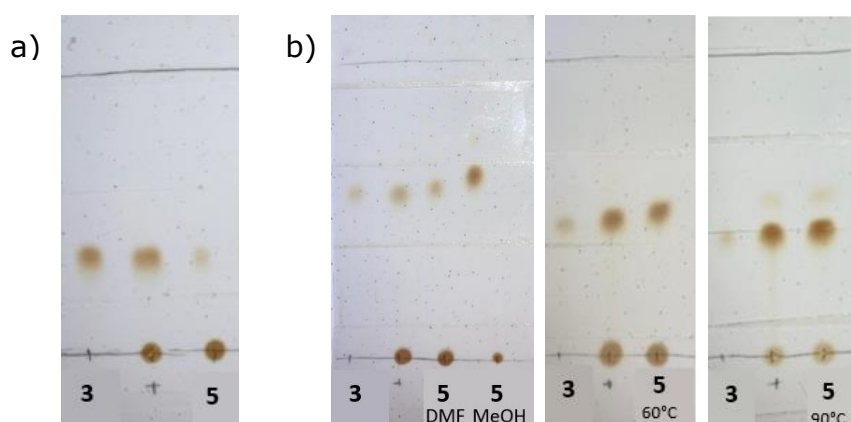
Slaba topljivost u vodi uzrokuje agregaciju porfirina čime se potencijalno smanjuje kvantni prinos  $^1\text{O}_2$  i posljedično učinkovitost PDT-a. (28) Metilacijom (oksidopiridilporfirina) dobivaju se kationski derivati koje karakterizira dobra topljivost u vodi i učinkovito vezanje za ciljna tumorska tkiva. MeI je uobičajeni reagens za metilaciju u organskoj sintezi, a zbog jodida kao vrlo dobre izlazne skupine, izvrstan je supstrat za  $\text{S}_{\text{N}}2$  reakcije nukleofilne supstitucije. (22) Optimizirani su reakcijski uvjeti uz MeI kao reagens s ciljem sinteze metiliranih (oksidopiridilporfirina).

Pokušaj reakcije O-metilacije bez otapala, dodatkom MeI (400 ekv.) u tikvicu s porfirinom **3**, bio je neuspješan. Porfirin **3** se nije otapao unatoč polarnim svojstvima reagensa. Stoga su sljedeće reakcije O-metilacije porfirina **3** postavljene uz otapalo. Obzirom na prethodnu literaturu o metilaciji porfirina (2,6,11), odabrano je polarno, aprotosko otapalo DMF. Budući da su nukleofili gotovo nesolvatirani i lakše napadaju supstrat, aprotoska otapala pogoduju  $\text{S}_{\text{N}}2$  reakcijama.

Prvoj reakciji je nakon otapanja porfirina **3** u bezvodnom DMF-u odjednom dodan MeI u suvišku (520 ekv.). Većinski dobiveni, polarniji produkt, porfirin **5**, vidljiv je na baznoj liniji uz količinski manje primjese porfirina **3** iznad. (Slika 10a.) Reakcija se odvijala ukupno 24 h. Pročišćavanjem HPLC preparativnom i analitičkom metodom prisutne nečistoće nisu uklonjene, a produkt nije izoliran.

Tijekom druge reakcije MeI u suvišku (360 ekv.) je postepeno dodavan u otopinu porfirina **3** i bezvodnog DMF-a. Reakcija se odvijala 48 h, a rezultati TLC kromatograma približno su jednaki rezultatu prethodne reakcije (Slika 10b, lijevo). Nakon što dodatni ekvivalenti MeI nisu doprinijeli daljnjem tijeku reakcije, dovršetak reakcije pokušao se potaknuti zagrijavanjem na

60 °C, 1 h potom na 90 °C, 1 h. Zagrijavanjem se razotkrila veća količina početnog porfirina **3** u odnosu na krajnji metilirani porfirin **5** uz novonastala raspadanja prikazana iznad porfirina **3** na TLC kromatogramu (Slika 10b, sredina i desno) nakon čega je reakcija zaustavljena. Jodidni ioni su zbog slabe topljivosti u vodi i posljedične slabe učinkovitosti u biološkim sustavima zamijenjeni kloridnim ionima u procesu precipitacija potaknutih s  $\text{NH}_4\text{PF}_6$  i TBAC. Precipitacije nisu uspjele u potpunosti pročistiti produkt od interesa za daljnju analizu. Prilikom odvijanja reakcije, nekoliko kapi reakcijske smjese je odvojeno i ispitano u otapalu MeOH. Prisutnost MeOH uzrokovala je otkrivanje veće količine početnog porfirina **3** u usporedbi s prisutstvom DMF-a kao otapala (Slika 10b, lijevo). Uz pretpostavku da MeOH učinkovitije otapa početni porfirin **3**, a u prisutnosti DMF-a dio porfirina **3** se ne može u potpunosti otopiti niti reagirati, u sljedećoj reakciji MeOH je bio uključen u početno otapalo.

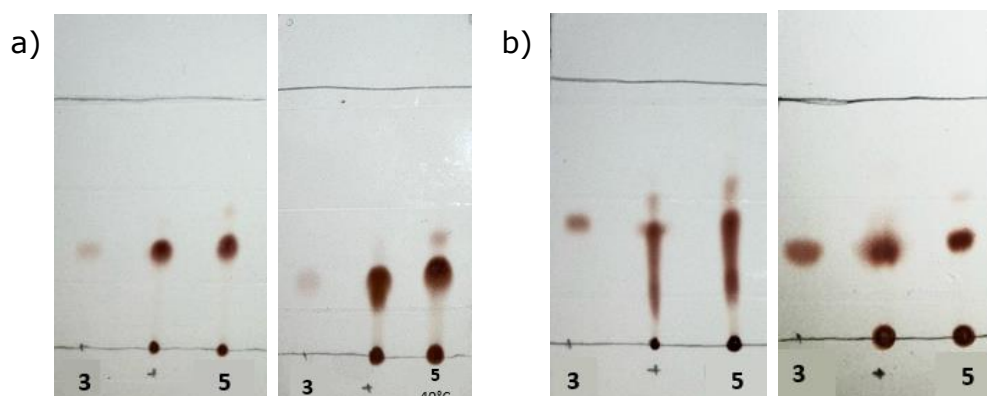


Slika 10. Prikaz dvije reakcije metilacije porfirina **3** uz bezvodni DMF kao početno otapalo i MeI kao reagens. Brojevi ispod bazne linije označavaju brojeve u imenu sintetiziranih porfirina.

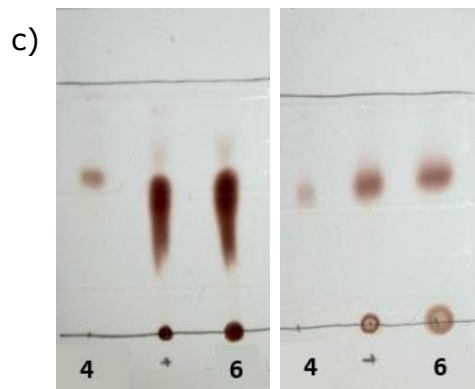
Porfirinu **3** otopljenom u smjesi otapala bezvodnog  $\text{DCM}:\text{MeOH} = 20:1$  je kroz dva dana dodavan MeI u suvišku (400 ekv.). Nakon što se poslije tri dana količina produkata i reaktanata nije mijenjala (Slika 11a, lijevo), nastavak reakcije pokušao se potaknuti zagrijavanjem na 40 °C kroz 3 h

(Slika 11a, desno). Nema značajne razlike u količini početnog porfirina **3** i nastalog metiliranog porfirina **5** prije i nakon zagrijavanja. Budući da zagrijavanje reakcijskih smjesa nije pridonijelo tijeku reakcije, htjelo se izbjeći dodatno zagrijavanje na visokim temperaturama prilikom uklanjanja otapala rotacijskim uparivačem (DMF – vrelište 153 °C, MeOH – vrelište 65 °C). Stoga se tijekom reakcije nastavio otapanjem reakcijske smjese u bezvodnom DCM-u (vrelište 40 °C). MeI je dodavan u suvišku (320 ekv.) tijekom 26 dana. TLC kromatogram prije uklanjanja otapala (Slika 11b, lijevo) za razliku od prethodnih reakcija prikazuje postepeno nastajanje metilnih skupina tragom vidljivim između neizreagiranog, početnog porfirina **3** i većinski nastalog metiliranog porfirina **5** na baznoj liniji. Analiza TLC kromatograma (Slika 11b, desno) i <sup>1</sup>H NMR spektra nakon izmjene iona Amberlite IRA-420(Cl) ionskim izmjenjivačem pokazala je da se nije uspio izolirati čisti produkt od interesa.

Reakcijski uvjeti prethodne reakcije koji su pokazali najveću stabilnost ponovljeni su s asimetričnim porfirinom **4**. Reakcija se odvijala 28 dana uz postepeno dodavanje MeI u suvišku (420 ekv.) u reakcijsku otopinu porfirina **4** i bezvodnog DCM-a. Kao i tijekom reakcije simetričnog porfirina, vidljiv je trag postepenog vezanja metilnih skupina uz većinski nastali porfirin **6** na baznoj liniji (Slika 11c, lijevo). Analiza TLC kromatograma (Slika 11c, desno) i <sup>1</sup>H NMR spektra nakon izmjene iona Amberlite IRA-420(Cl) ionskim izmjenjivačem pokazala je da se nije uspio izolirati čisti produkt od interesa.







Slika 11. Reakcije metilacije porfirina **3** (a i b) i porfirina **4** (c) uz smjesu otapala bezvodni DCM:MeOH=20:1 i bezvodni DCM kao početno otapalo te MeI kao reagens. Brojevi ispod bazne linije označavaju brojeve u imenu sintetiziranih porfirina.

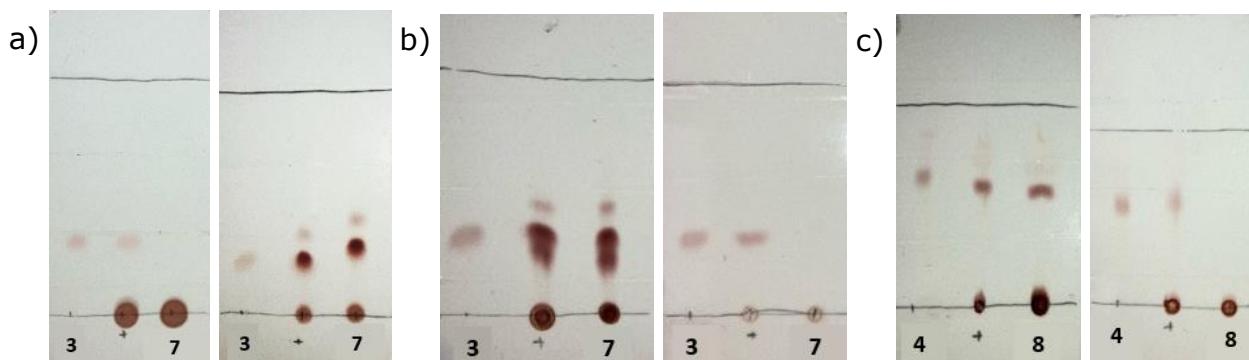
Iako je napredak reakcije *O*-metilacije porfirina otopljenih u DMF-u trajao značajno kraće od reakcije s DCM-om kao otapalom, promjene temperaturnih uvjeta prilikom odvijanja reakcija i pročišćavanje reakcijske smjese s DCM-om kao otapalom je dokazalo veću stabilnost produkata. Za razliku od otapala DMF, uz DCM kao otapalo se tijekom različitih uvjeta odvijanja reakcije i pročišćavanja nije povećavala količina neizreagiranih početnih (oksid)piridilporfirina.

#### 4.2.2 Etilacija (oksid)piridilporfirina

Različite strukturne promjene spojeva različito utječu na njihova fizikalna i kemijska svojstva. Stoga su se priredili etilirani derivati (oksid)piridilporfirina s ciljem analize utjecaja pojedinih dijelova molekule na tijek reakcije, mogućnosti pročišćavanja i prinose porfirina. Jedan od reagensa korištenih za etilaciju porfirina je EtI koji je poput MeI izvrstan supstrat za  $S_N2$  reakcije zbog jodida kao vrlo dobre izlazne skupine. U prvom pokušaju porfirinu **3** otopljenom u bezvodnom DMF-u je dodavan EtI u suvišku (200 ekv.). Za razliku od metilacije porfirina **3** uz DMF kao otapalo, nakon dva dana odvijanja etilacije porfirina **3** uz DMF kao otapalo, TLC

kromatogram je potvrdio nastanak čistog porfirina **7** bez ostataka neizreagiranog početnog porfirina **3** (Slika 12a, lijevo). Međutim, uklanjanjem otapala *in vacuo* (95 °C) otkriveno je postojanje početnog porfirina **3** uz dodatna raspadanja prikazana iznad porfirina **3** na TLC kromatogramu (Slika 12a, desno). Iako je za razliku od reakcije metilacije u DMF-u ova reakcija prije uklanjanja otapala pokazala bolje rezultate, nakon uklanjanja otapala je potvrđena nestabilnost produkata nastalih u reakcijama s otapalom DMF. Stoga DMF kao otapalo nije korišten u sljedećim reakcijama.

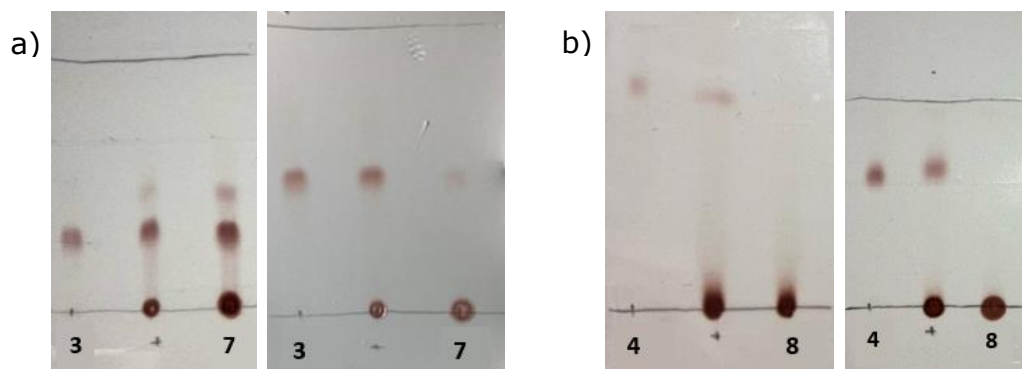
Budući da je prilikom reakcija metilacije otapalo DCM potpomoglo većoj stabilnosti produkta, korišteno je i u reakcijama etilacije koje slijede. S ciljem usporedbe, porfirinu **3** i porfirinu **4** je nakon otapanja u bezvodnom DCM-u postepeno dodavan EtI u suvišku (400 ekv. i 360 ekv.) tijekom 33 i 15 dana. TLC kromatogram reakcija s porfirinom **3** prikazuje vidljiv trag postepenog formiranja etilnih skupina uz zaostali početni porfirin **3** i dodatna raspadanja iznad (Slika 12b, lijevo), dok TLC kromatogram reakcije s porfirinom **4** ne prikazuje trag formiranja etilnih skupina, ali prikazuje većinski nastanak etiliranog porfirina **8** (Slika 12c, lijevo). Nakon izmjene jodidnih iona kloridnima precipitacijama potaknutih s  $\text{NH}_4\text{PF}_6$  i TBAC, TLC kromatogram pokazuje nastale male, ali pročišćene količine etiliranih produkata od interesa, porfirina **7** i **8** (Slika 12b i 12c, desno). Međutim, rezultati  $^1\text{H}$  NMR spektroskopske analize u oba su slučaja dokazali prisutnost nečistoća nevidljivih na TLC kromatogramima koje bi vjerojatno bile vidljivije s nastalom većom količinom produkta.



Slika 12. Rezultati reakcija etilacije porfirina **3** i porfirina **4** prije i nakon izmjene iona uz bezvodni DMF (lijevo) i bezvodni DCM (sredina i desno) kao otapalo te EtI kao reagens. Brojevi ispod bazne linije označavaju brojeve u imenu sintetiziranih porfirina.

U daljnjim reakcijama ispitana je promjena alkilirajućeg reagensa. Budući da su i tosilatne skupine izvrsne izlazne skupine u reakcijama nukleofilne supstitucije, etil-tosilat se pokazao kao potencijalni kandidat. Prethodna literatura o *O*-alkilaciji piridin-*N*-oksida uz etil-tosilat kao reagens (29) navodi acetonitril kao otapalo za uspješnu reakciju etiliranja. Budući da se porfirin **3** i porfirin **4** ne otapaju u potpunosti u acetonitrilu, korišten je bezvodni DCM kao otapalo. Porfirinu **3** je tijekom 27 dana dodavan etil-tosilat u suvišku (30 ekv.) uz postepeno zagrijavanje ukupno 24 h, dok je porfirinu **4** tijekom 15 dana dodavan etil-tosilat u suvišku (40 ekv.) uz postepeno zagrijavanje ukupno 12 h. Prije i nakon izmjene tosilatnih iona u kloridne pomoću Amberlite IRA 420(Cl) ionskog izmjenjivača rezultati TLC kromatograma reakcije s porfirinom **3** prikazuju većinski nastanak porfirina **7** uz zaostale manje količine početnog porfirina **3** i dodatnih raspadanja (Slika 13a), dok u reakciji s porfirinom **4** pokazuju potpuni nastanak porfirina **8** bez zaostajanja početnog spoja i raspadanja (Slika 13b). Analiza  $^1\text{H}$  NMR spektara potvrdila je izolaciju porfirina **7** (59%) uz prisutne nečistoće i većinski čistog porfirina **8** (24%). Prilikom reakcija etilacije porfirina **3** i **4** uz DCM kao otapalo i EtI kao reagens, kao i prilikom reakcija etilacije porfirina **3** i **4** uz DCM kao otapalo i etil-tosilat kao reagens, asimetričnom porfirinu **4** bio je potreban upola kraći period odvijanja

reakcije i zagrijavanja u usporedbi s porfirinom **3** za približno jednake rezultate.



Slika 13. Rezultati reakcija etilacije porfirina **3** i porfirina **4** prije i nakon izmjene iona uz bezvodni DCM kao otapalo te etil-tosilat kao reagens. Brojevi ispod bazne linije označavaju brojeve u imenu sintetiziranih porfirina.

### 4.3 Lipofilna svojstva sintetiziranih porfirina

Pouzdan alat za karakterizaciju hidrofilnih/lipofilnih svojstava lijekova se pokazao koeficijent raspodjele oktanol-voda ( $\log P$ ). Osim slabe topljivosti i slabe oralne apsorpcije uzrokovane visokom lipofilnosti ( $\log P > 5$ ), takvi spojevi imaju tendenciju vezati se na nepoželjna hidrofobna ciljna mjesta povećavajući toksičnost. (30) Budući da je izazovno eksperimentalno reproducirati vrijednost  $\log P$ , upotrijebljena su tri različita, dostupna kalkulatora za izračun (Molinspiration Cheminformatics, ALOGPS 2.1 i Calculators Playground). (27)

Dobivene vrijednosti  $\log P$  variraju s obzirom na odabrani kalkulator, ali prisutan je isti redoslijed vrijednosti  $\log P$  između uspoređivanih spojeva unutar pojedinog kalkulatora (tablica 1). Iz izračunatih podataka je vidljivo da su simetrični tetrapiridilporfirini (porfirini **1**, **3**, **5** i **7**) manje lipofilni od jednako supstituiranih asimetričnih tripiridilporfirina (porfirini **2**, **4**, **6** i **8**). Metilirani i etilirani (oksid)piridilporfirini (porfirini **5**, **6**, **7** i **8**) imaju najniže  $\log P$  vrijednosti, zatim (oksid)piridilporfirini (porfirini **3** i **4**), a početne

piridilporfirine (porfirini **1** i **2**) karakteriziraju najviše  $\log P$  vrijednosti uz najveću lipofilnost. Poredak je sukladan strukturnim svojstvima porfirina budući da su zwitterionski (oksid)piridilporfirini topljiviji u polarnim otapalima od matičnih, nenabijenih porfirina dok kationska svojstva metiliranih i etiliranih porfirina povećavaju topljivost u polarnim otapalima u odnosu na zwitterionska svojstva (oksid)piridilporfirina.

Tablica 1. Koeficijent raspodjele oktanol/voda ( $\log P$ ) porfirina **1-8** dobiveni izračunom različitih „online“ kalkulatora.

porfirin	$\log P$ (Molinspiration Cheminformatics)	$\log P$ (ALOGPS 2.1)	$\log P$ (Calculators Playground)
<b>1</b>	7,86	4,73	6,27
<b>2</b>	8,14	5,58	6,90
<b>3</b>	2,20	1,69	0,98
<b>4</b>	3,90	2,52	2,26
<b>5</b>	-5,14	-0,23	-3,11
<b>6</b>	-2,33	0,72	-0,13
<b>7</b>	-4,48	0,12	-1,74
<b>8</b>	-1,21	1,27	0,90

#### 4.4 UV-Vis i fluorescentna spektroskopija izoliranih porfirina

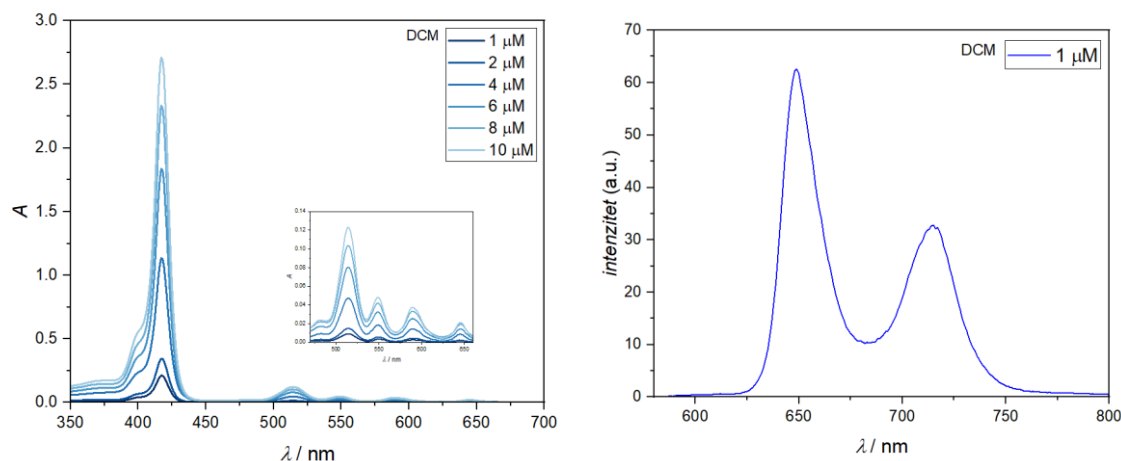
Porfirinski apsorpcijski spektar bliskog ultraljubičastog i vidljivog zračenja može ovisiti o različitim konjugacijama i simetriji porfirina. (17) Rezultati analize UV-Vis i fluorescentne spektroskopije izoliranih porfirina različitih konjugacija i simetrija prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Prikaz maksimalnih valnih duljina karakterističnih pikova UV-Vis i fluorescentne spektroskopije uz pripadajući  $\Phi_{FL}$  za izolirane porfirine **1, 2, 3, 4 i 8**.

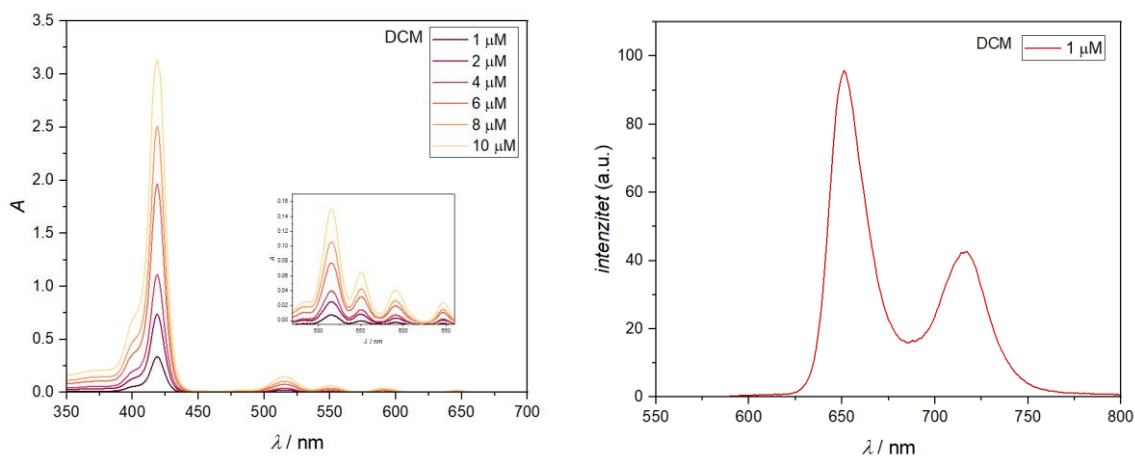
	apsorpcija $\lambda_{\max}$ (nm) ( $\epsilon \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )					emisija $\lambda_{\max}$ (nm)		$\Phi_{\text{FL}}$
	Soret	Q <sub>IV</sub>	Q <sub>III</sub>	Q <sub>II</sub>	Q <sub>I</sub>			
<b>1<sub>DCM</sub></b>	417 (294,9)	514 (13,4)	549 (5,3)	590 (4,2)	646 (2,4)	649	715	0,04
<b>2<sub>DCM</sub></b>	419 (309,4)	515 (15,3)	551 (6,8)	590 (4,6)	647 (3,1)	651	716	0,09
<b>3<sub>DCM/MeOH</sub></b>	417 (196,3)	511 (105,1)	544 (1,8)	587 (3,2)	641 (0,4)	645	712	0,03
<b>4<sub>MeOH</sub></b>	417 (105,6)	512 (5,5)	546 (1,5)	586 (1,7)	649 (0,4)	648	714	0,05
<b>8<sub>MeOH</sub></b>	423 (110,6)	516 (8,4)	550 (2,6)	590 (3,1)	646 (0,9)	650	715	0,06
<b>8<sub>PBS</sub></b>	420 (128,2)	518 (7,8)	555 (2,4)	582 (3,3)	640 (0,8)	660	705	0,04

Analizom rezultata UV-Vis i fluorescentne spektroskopije (tablica 2) može se zaključiti da se emisijski spektar porfirina **8<sub>PBS</sub>** izdvaja s najvećom valnom duljinom manje intenzivnog pika i s najmanjom valnom duljinom intenzivnijeg pika, dok nema značajne razlike u valnim duljinama ostalih porfirina.  $\Phi_{\text{FL}}$  koji u procesu fluorescencije predstavlja omjer apsorbiranih i emitiranih fotona prikazan je u tablici 2 za svaki izolirani porfirin. Manji kvantni prinos upućuje na djelotvornije stvaranje tripletnog stanja fotosenzibilizatora i posljedično učinkovitiju PDT.

Tablični podaci su prikazani grafički i analizirani. UV-Vis spektre početnih porfirina **1** i **2** karakteriziraju uobičajene Soretova i četiri Q vrpce *etio*-tipa (IV>III>II>I). Fluorescencijski spektri sastoje se od intenzivnije emisijske vrpce na približno 650 nm i manje intenzivne emisijske vrpce na približno 715 nm. Asimetrični tripiridilporfirin, porfirin **2**, ima intenzivnije vrpce UV-Vis i fluorescencijskog spektra od simetričnog tetrapiridilporfirina, porfirina **1** (Slike 14 i 15).

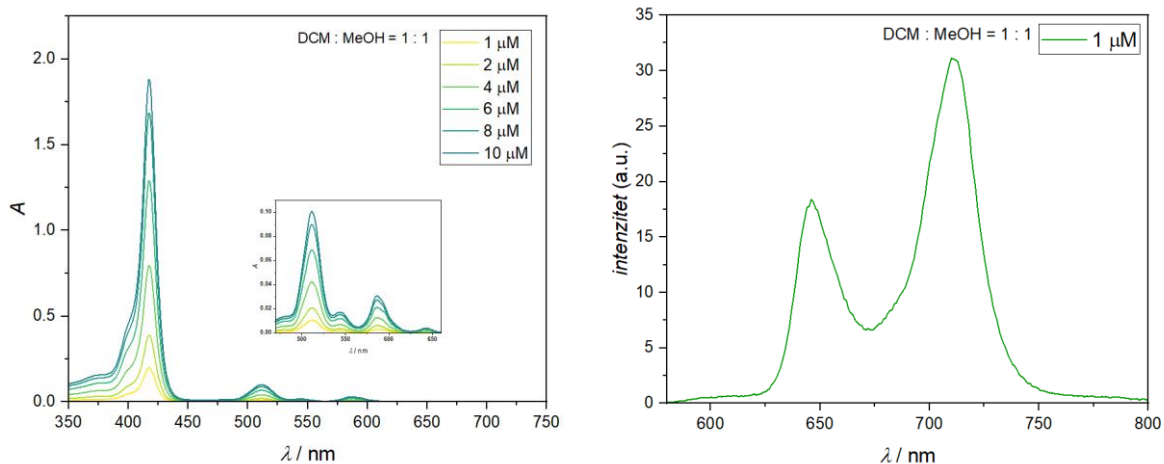


Slika 14. UV-Vis (lijevo) i fluorescencijski spektar (desno) porfirina **1**.

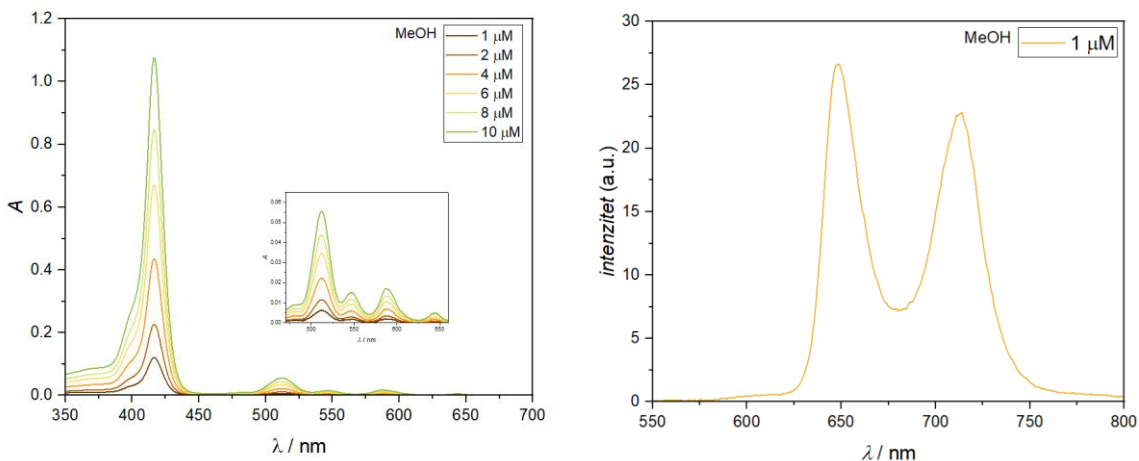


Slika 15. UV-Vis (lijevo) i fluorescencijski spektar (desno) porfirina **2**.

UV-Vis spektre porfirina **3** i **4** karakteriziraju Soretova i četiri Q vrpce *filo*-tipa (IV>II>III>I). Fluorescencijski spektar porfirina **3** sastoji se od manje intenzivne emisijske vrpce na približno 650 nm i intenzivnije emisijske vrpce na približno 715 nm (Slika 16). Porphirin **4** ima obrnuti intenzitet fluorescencijskih vrpca, ali s manjom razlikom između njih (Slika 17). Suprotno od početnih porfirina **1** i **2**, simetrični porfirin **3** (1,88 a.u. – 10 μM) ima intenzivniju Soretovu vrpcu UV-Vis spektra od asimetričnog porfirina **4** (1,08 a.u. - 10 μM).



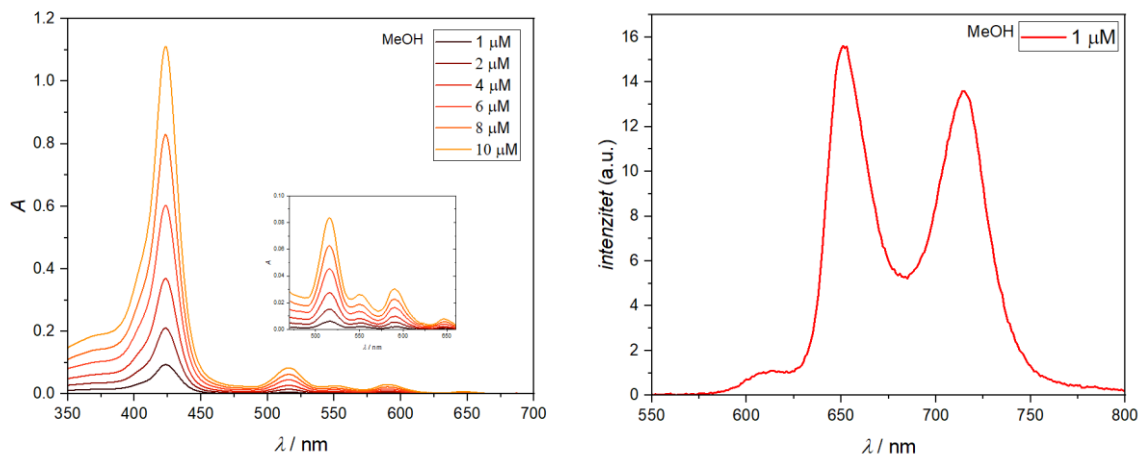
Slika 16. UV-Vis (lijevo) i fluorescencijski spektar (desno) porfirina **3**.



Slika 17. UV-Vis (lijevo) i fluorescencijski spektar (desno) porfirina **4**.

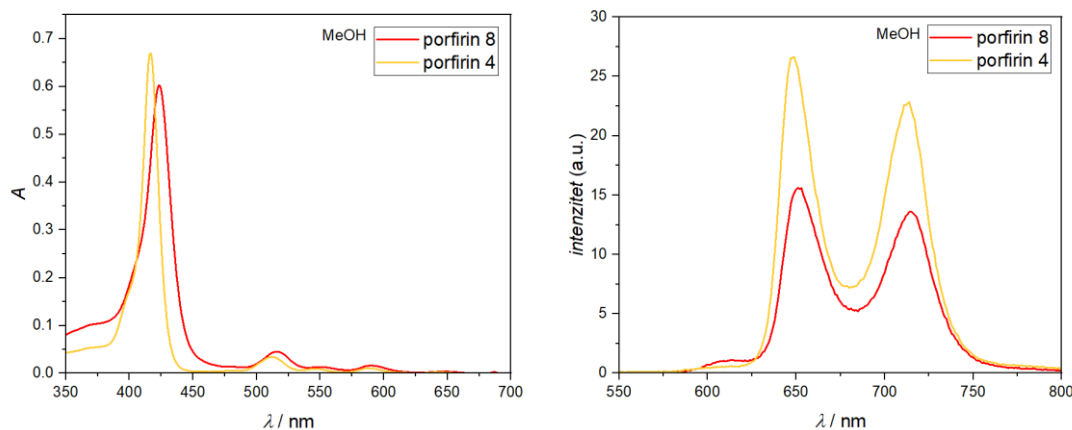
UV-Vis spektar asimetričnog, etiliranog porfirina **8** karakteriziraju Soretova i četiri Q vrpce *filo*-tipa (IV>II>III>I). Fluorescencijski spektar se sastoji od intenzivnije emisijske vrpce na približno 650 nm i manje intenzivne emisijske vrpce na približno 715 nm (Slika 18).





Slika 18. UV-Vis (lijevo) i fluorescencijski spektar (desno) porfirina **8**.

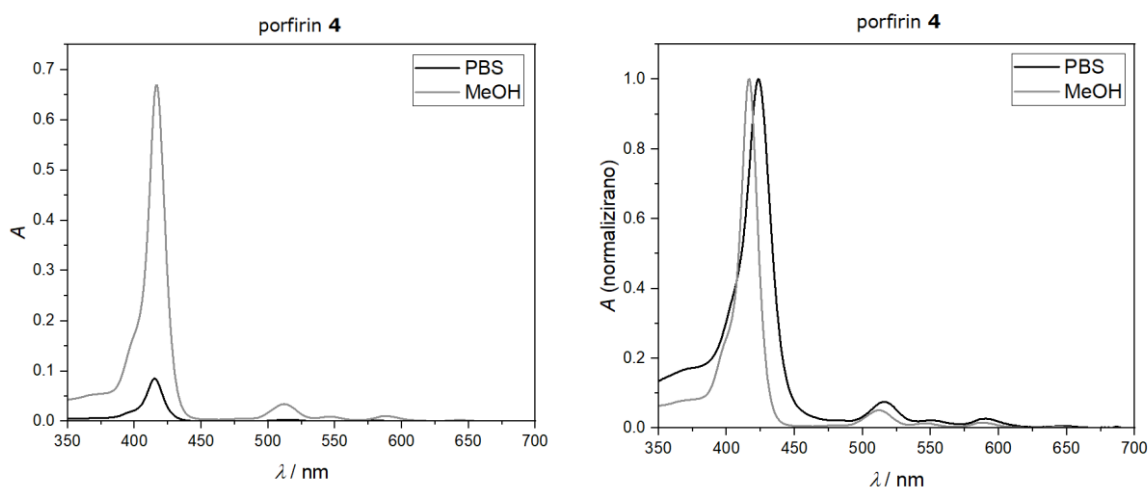
Usporedbom UV-Vis spektara porfirina **4** i porfirina **8** otopljenih u MeOH (Slika 19, lijevo) uočen je manji intenzitet Soretove vrpce uz minimalno povećan intenzitet Q vrpce porfirina **8** koji je blago pomaknut prema većim valnim duljinama u odnosu na porfirin **4**. Fluorescencijski spektar sastoji se od jednakih oblika oba karakteristična pika, ali sa značajnim povećanjem intenziteta porfirina **4** u usporedbi s porfirinom **8** (Slika 19, desno).

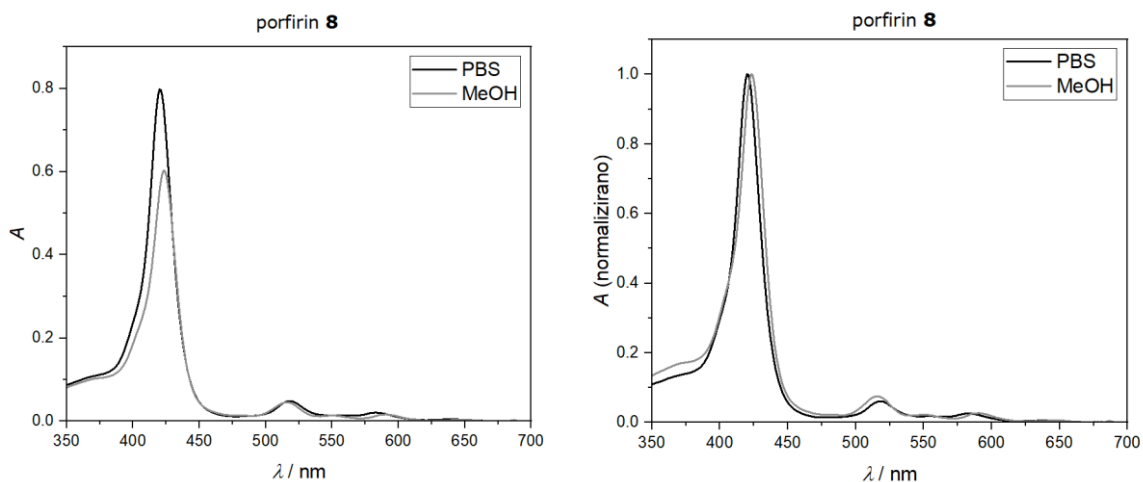


Slika 19. Usporedba UV-Vis (lijevo, u koncentraciji 6  $\mu\text{M}$ ) i fluorescencijskog spektra (desno, u koncentraciji 1  $\mu\text{M}$ ) porfirina **4** i porfirina **8** otopljenih u MeOH.

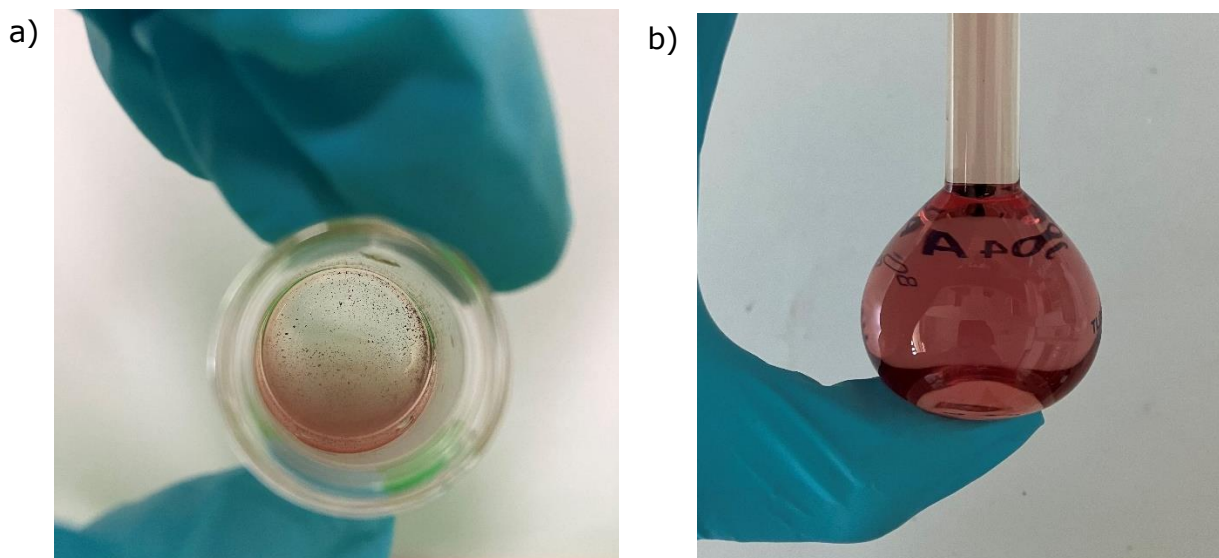
Budući da se PBS pufer obično koristi prilikom bioloških ispitivanja, provedena je usporedba UV-Vis spektara porfirina **4** otopljenog u PBS-u ili

MeOH te porfirina **8** otopljenog u PBS-u ili MeOH s ciljem analize apsorpcije spojeva u vodenom mediju. Uočen je značajno veći intenzitet karakterističnih vrpci porfirina **4** otopljenog u MeOH u usporedbi s PBS-om kao otapalom što potvrđuje potrebu za sintezom i analizom kationskog, etiliranog porfirina **8** (Slika 20, gore, lijevo). Suprotno, sukladno očekivanjima, intenzitet vrpci UV-Vis spektra porfirina **8** otopljenog u PBS-u je veći od intenziteta vrpci porfirina **8** otopljenog u MeOH (Slika 20, dolje, lijevo). Zaključno, u PBS-u kao otapalu je uočen značajno veći intenzitet vrpci porfirina **8** u usporedbi s porfirinom **4** što upućuje na bolju topljivost u PBS-u i potencijalno bolju aktivnost prilikom ispitivanja u biološkim sustavima. Normalizirani prikaz UV-Vis spektra porfirina **4** otopljenog u PBS-u pokazuje pomak prema većim valnim duljinama u odnosu na spektar porfirina **4** otopljenog u MeOH kao i lagano širenje Soretove vrpce (Slika 20, gore, desno). Smanjenje intenziteta apsorpcije te pomak i širenje Soretove vrpce indiciraju stvaranje agregata porfirina **4** u PBS-u. Normalizirani prikaz UV-Vis spektra porfirina **8** otopljenog u PBS-u nema značajnog pomaka u odnosu na spektar porfirina **8** otopljenog u MeOH (Slika 20, dolje, desno).





Slika 20. Usporedba UV-Vis spektra porfirina **4** u otapalima PBS i MeOH (gore) i porfirina **8** u otapalima PBS i MeOH (dolje). Svaka usporedba je prikazana i normaliziranim UV-Vis spektrom. Svi rezultati prikazani su pri koncentracijama 6  $\mu\text{M}$ .

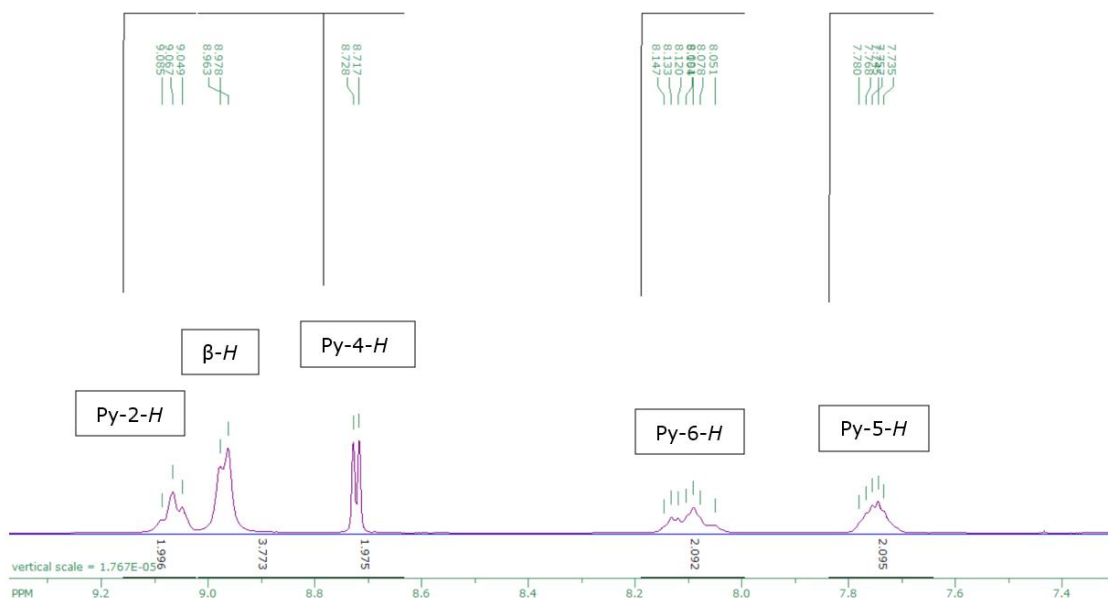


Slika 21. Prikaz porfirina **4** otopljenog u PBS-u (a) i porfirina **8** otopljenog u PBS-u (b).

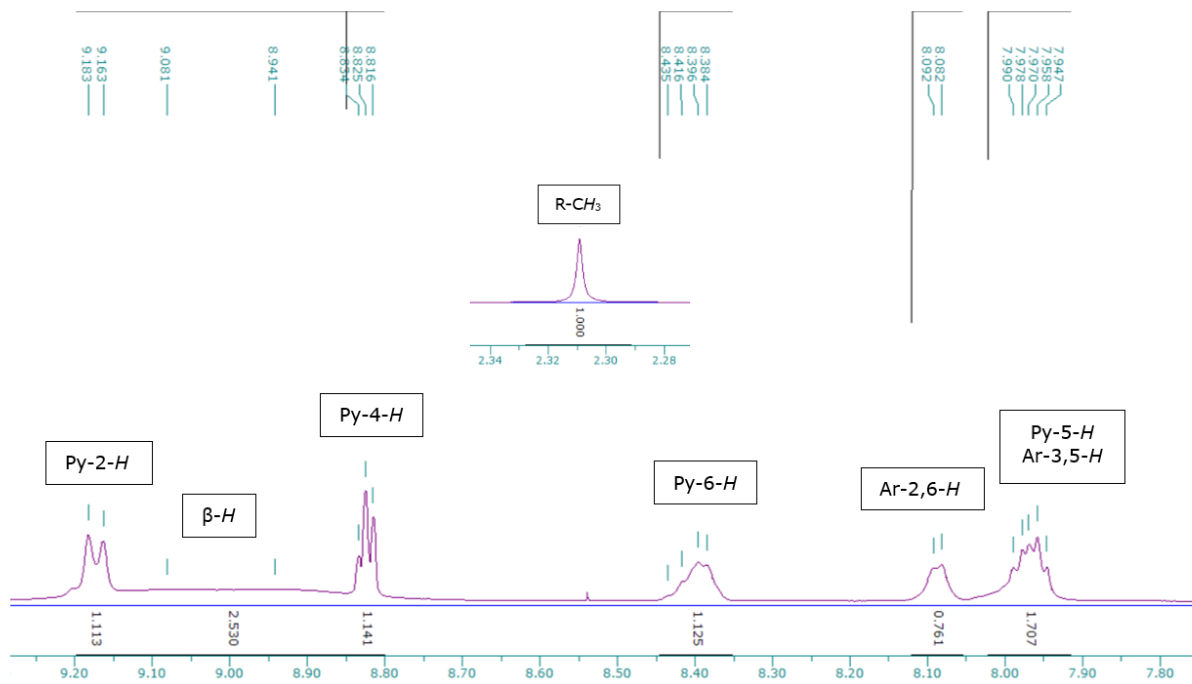
#### 4.5 $^1\text{H}$ NMR spektri izoliranih porfirina

$^1\text{H}$  NMR spektrometrija je metoda koja se temelji na mjerenju apsorpcije energije jezgri vodikovih atoma nakon izlaganja magnetskom polju i

ozračivanja frekvencijom radiovalova. Apсорbirana energija određenih frekvencija ovisi o kemijskom okolišu atoma, a izražava se pozicijom signala u spektru koja se naziva kemijski pomak (s mjernom jedinicom „parts per milion“ - ppm). (31) Broj različitih vrsti jezgri vodika kao i informacije o neposrednom okolišu svake vrste potvrđeni su  $^1\text{H}$  NMR spektrima za strukture izoliranih porfirina **3**, **4**, **7** i **8**. Spektri porfirina obično se sastoje od aromatskog dijela na većim vrijednostima kemijskih pomaka i alifatskog dijela na manjim vrijednostima kemijskih pomaka. Aromatski dio  $^1\text{H}$  NMR spektra porfirina **3** sastoji se od karakterističnih signala za protone piridinskog prstena te signala vodika na  $\beta$  pirolnim pozicijama (Slika 22). Aromatski dio  $^1\text{H}$  NMR spektra porfirina **4** se osim signala za protone piridinskog prstena te signala  $\beta$  pirolnih protona sastoji i od arilnih protona na pozicijama 2,6 te 3,5 u benzenskom prstenu ( $\approx 8$  ppm). Uz aromatski dio prikazan je i isječak karakterističnog signala amidnih protona na oko 2,30 ppm (Slika 23). Aromatski dio porfirina **3** kao i porfirina **4** nalazi se u rasponu oko 7,5-9,5 ppm.

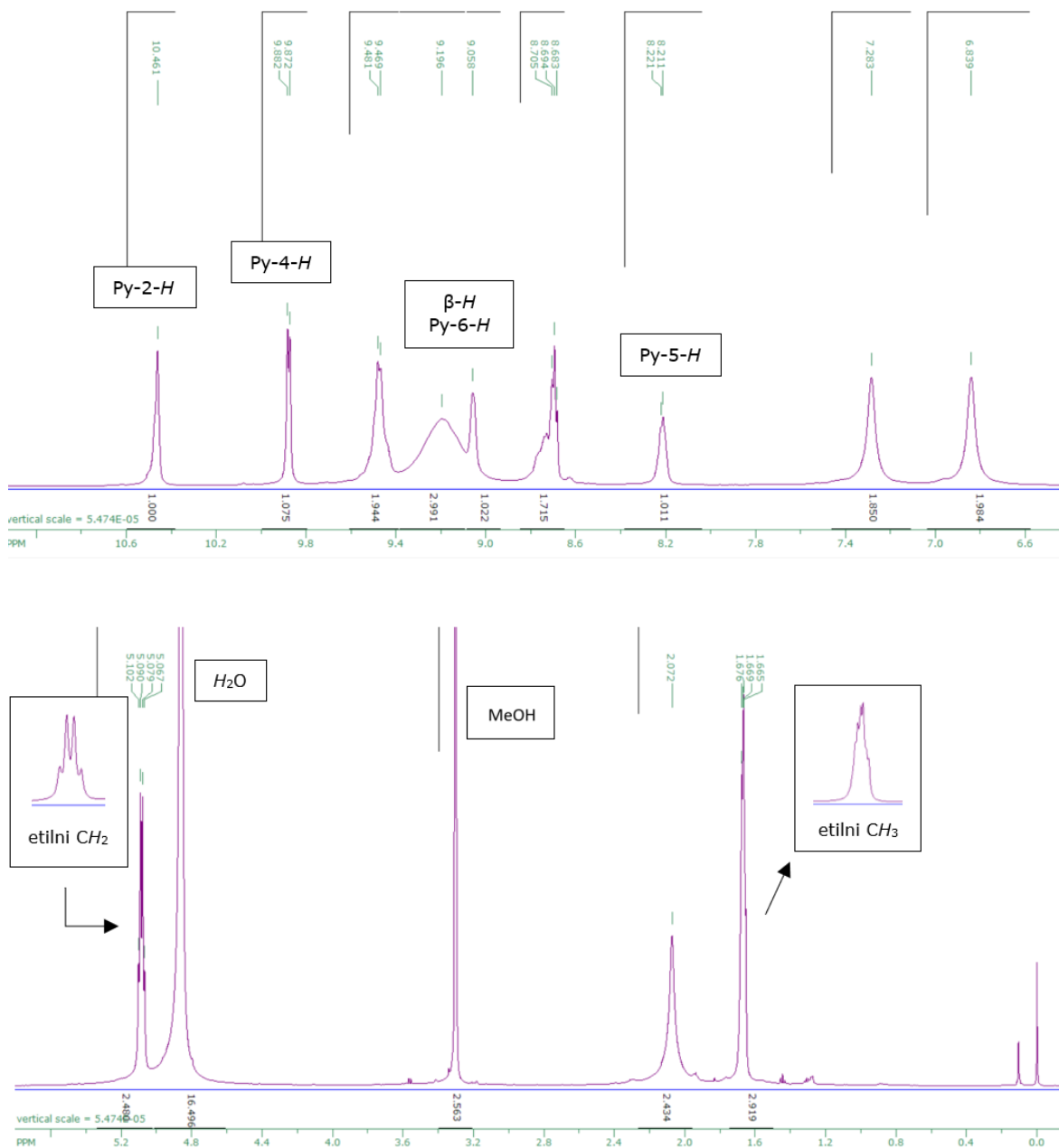


Slika 22. Aromatski dio  $^1\text{H}$  NMR spektra porfirina **3**.



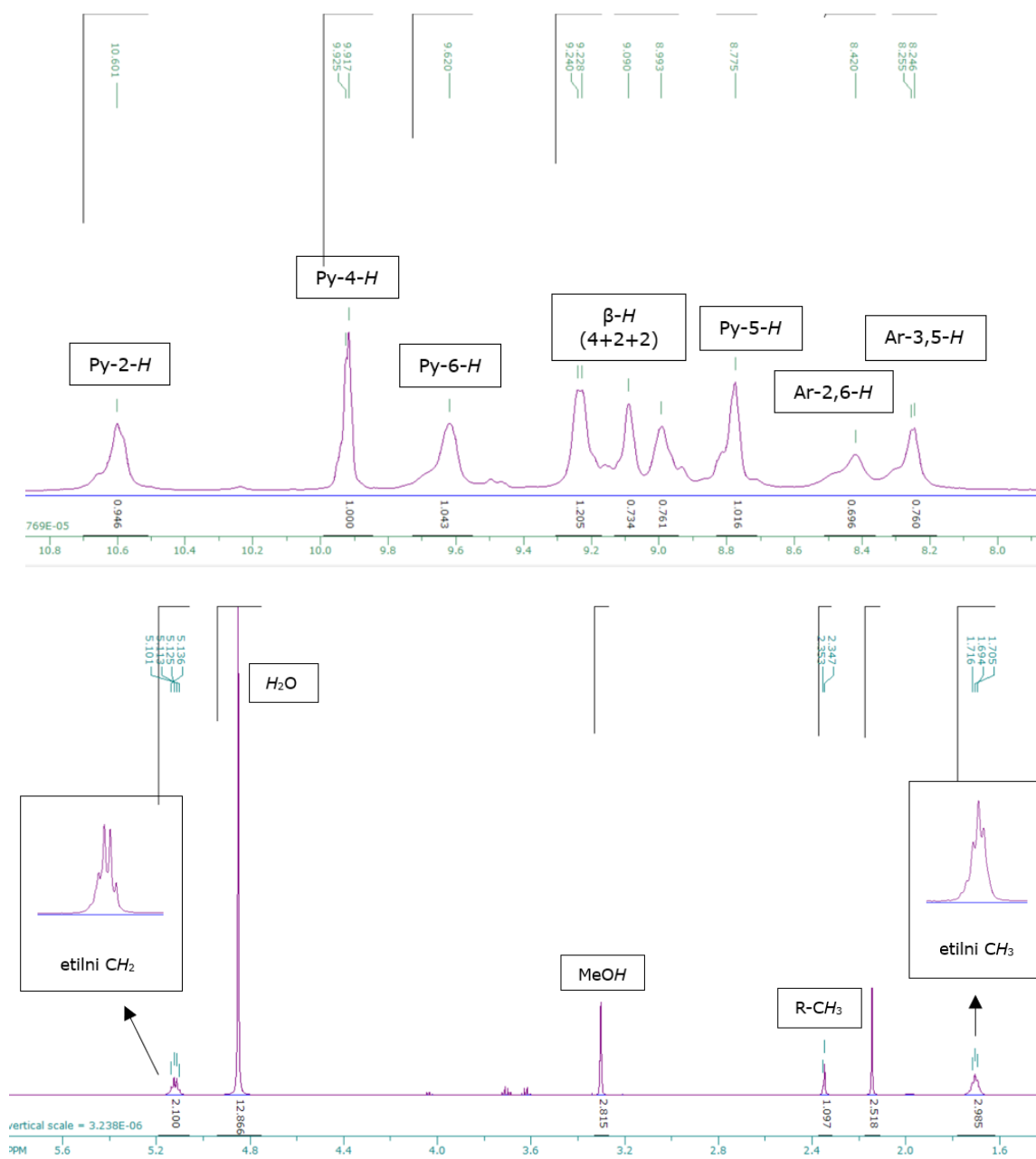
Slika 23. Aromatski dio  $^1\text{H}$  NMR spektra porfirina **4** uz isječak signala protona na amidnom dijelu strukture.

Na aromatskom dijelu  $^1\text{H}$  NMR spektra porfirina **7** su zbog viška signala i pojedinih neodgovarajućih integracija s pretpostavkom označeni signali za protone piridinskog prstena te signali vodika na  $\beta$  pirolnim pozicijama (Slika 24, gore). Spektar alifatskog dijela porfirina **7** se osim uobičajenih signala otapala sastoji od etilnih  $\text{CH}_2$  i  $\text{CH}_3$  protona koji bi se s obzirom na izračunate integracije mogli nalaziti na približno 5 ppm i 1,6 ppm (Slika 24, dolje).



Slika 24. Aromatski (gore) i alifatski (dolje) dio <sup>1</sup>H NMR spektra porfirina **7**.

Aromatski dio <sup>1</sup>H NMR spektra porfirina **8** se poput porfirina **4** osim signala za protone piridinskog prstena te signala β pirolnih protona sastoji i od arilnih protona na pozicijama 2,6 te 3,5 u benzenskom prstenu (Slika 25, gore). Alifatski dio uz protone otapala na amidnom dijelu strukture sadrži i protone etilnog CH<sub>2</sub> i CH<sub>3</sub> (Slika 25, dolje) koji se nalaze na približno jednakim pomacima kao i u porfirinu **7** (5,1 i 1,7 ppm).



Slika 25. Aromatski (gore) i alifatski (dolje) dio <sup>1</sup>H NMR spektra porfirina **8**.

Za razliku od oksidiranih porfirina **3** i **4**, aromatski dio porfirina **7** i **8** nalazi se u rasponu 8-11 ppm, pomaknut prema većim vrijednostima kemijskog pomaka uslijed smanjene zasjenjenosti potaknute nastankom elektronski siromašnog piridinskog kationa. Budući da se <sup>1</sup>H NMR spektrom aromatski dio porfirina **8** pokazao čistim od aromatskog dijela porfirina **7**, daljnje biološke analize provedene su s porfirinom **8**.

#### 4.6 Analiza MTT testa citotoksičnosti

MTT test je jedan od najsvestranijih i najpopularnijih testova široko korištenih za mjerenje stanične vitalnosti/citotoksičnosti lijeka. Test uključuje pretvorbu u vodi topljivog MTT-a žute boje u netopljivi ljubičasti formazan djelovanjem mitohondrijske reduktaze preživjelih stanica. Koncentracija stanica se određuje monokromatorom uz optičku gustoću na 570 nm, u ovom radu s ciljem usporedbe optičke gustoće stanica tretiranih različitim toksičnim agensima. (32,33) MDA-MB-231 stanice raka dojke (150  $\mu$ L stanica/jažica) su tretirane u kvadruplikatu porfirinom **4**, porfirinom **8** i *N*-metiliranim porfirinom **P** u različitim koncentracijama (100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M i 0,1  $\mu$ M). Apsorbancija je izmjerena nakon što je jedna pločica bila bez osvjetljenja, a druga 30 min tretirana lampom crvenog osvjetljenja ( $\lambda = 645$  nm, doza crvene svjetlosti = 3,6 J/cm<sup>2</sup>).

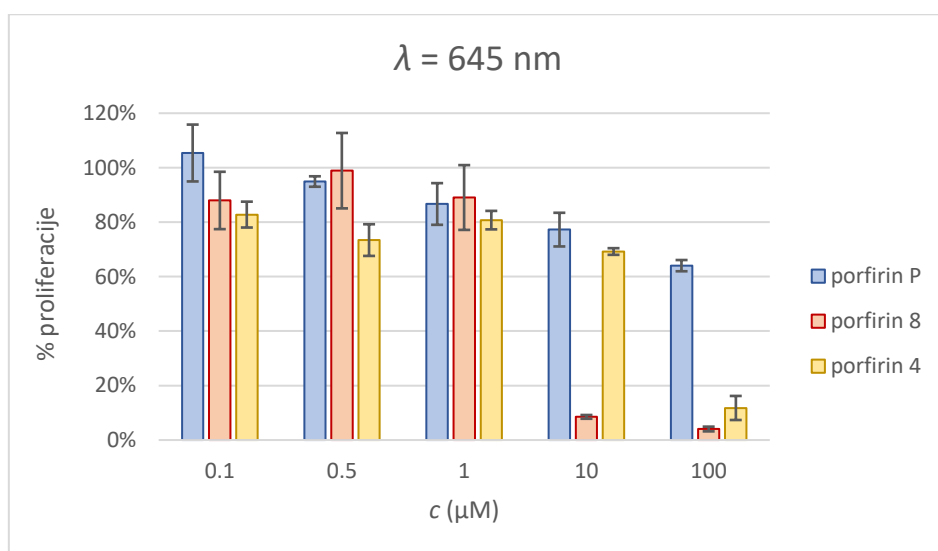
Izračunata  $IC_{50}$  vrijednost nakon izlaganja stanica lampi crvenog osvjetljenja za porfirin **P** veća je od 100  $\mu$ M, za porfirin **8** iznosi 5,3  $\mu$ M, a za porfirin **4** 39,8  $\mu$ M (tablica 3). Iako i zwitterionski porfirin **4** pokazuje antiproliferativni efekt, može se zaključiti da je koncentracija kationskog porfirina **8** potrebna za *in vitro* inhibiciju stanica raka dojke značajno manja od potrebne koncentracije porfirina **4** ili porfirina **P**.  $IC_{50}$  vrijednosti stanica bez osvjetljenja svih porfirina prelaze najveću testiranu koncentraciju što dokazuje nepostojanje tamne toksičnosti, nije pokazana toksičnost fotosenzibilizatora na tumorske stanice bez prisutnosti svjetlosti.

Tablica 3. Prikaz  $IC_{50}$  vrijednosti ispitivanih porfirina osvjetljenih lampom crvenog osvjetljenja ( $\lambda = 645$  nm, doza crvene svjetlosti = 3,6 J/cm<sup>2</sup>) i bez osvjetljenja.

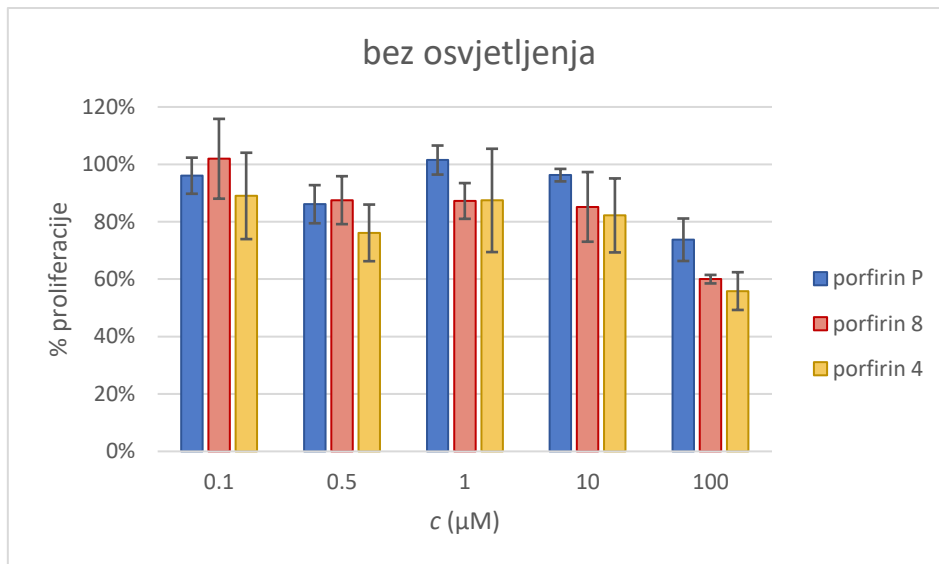
	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)	
	$\lambda = 645$ nm	bez osvjetljenja
porfirin <b>P</b>	>100	>100
porfirin <b>8</b>	5,25 $\pm$ 0,65	>100
porfirin <b>4</b>	39,76 $\pm$ 3,83	>100



Rezultati  $IC_{50}$  vrijednosti potkrijepljeni su grafičkim prikazima postotka proliferacije za svaku ispitivanu koncentraciju. Najznačajniji pad proliferacije osvijetljenih stanica tretiranih porfirinom **8** vidljiv je pri 10  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  koncentraciji, dok je za porfirin **4** vidljiv pri 100  $\mu\text{M}$  koncentraciji. (Slika 26). Iako je najmanja proliferacija stanica bez osvijetljenja kod svih porfirina zabilježena pri 100  $\mu\text{M}$  koncentraciji i dalje je više od 55% stanica bilo vitalno (Slika 27). Zbog minimalnih nečistoća prisutnih na  $^1\text{H}$  NMR spektru porfirina **8**, biološki rezultati i aktivnost porfirina ne mogu se potvrditi sa 100%-tnom pouzdanošću.



Slika 26. Rezultati postotka proliferacije za svaku ispitivanu koncentraciju nakon fotodinamičkog tretiranja stanica raka dojke porfirinom **P**, porfirinom **8** i porfirinom **4** uz lampu crvenog osvjetljenja.



Slika 27. Rezultati postotka proliferacije za svaku ispitanu koncentraciju nakon tretiranja stanica raka dojke porfirinom **P**, porfirinom **8** i porfirinom **4** bez osvjetljenja.

## 5. Zaključak

Rad opisuje optimizaciju *O*-alkiliranja *N*-oksidiranih tetrapiridinporfirina i tripiridinporfirina korištenjem MeI, EtI i etil-tosilata kao reagensima u svrhu dobivanja kationskih derivata s povećanom topljivosti i sposobnošću produkcije ROS-a potrebnih za PDT. Produkti *O*-alkiliranja nastali reakcijom u bezvodnom DCM-u pokazali su veću stabilnost od produkata *O*-alkiliranja nastalih reakcijom u bezvodnom DMF-u kao otapalu. Zagrijavanje reakcijske smjese s jodidnim reagensima pogoršalo je ili nije utjecalo na tijek reakcije, dok je zagrijavanje reakcijske smjese s etil-tosilatom kao reagensom ubrzalo tijek reakcije. Unatoč zahtjevnom odvajanju produkata od nečistoća u svim provedenim reakcijama, <sup>1</sup>H NMR spektrima potvrđena je izolacija kationskih porfirina **7** i porfirina **8** nastalih reakcijom s etil-tosilatom u suvišku uz postepeno zagrijavanje. Reaktanti koji su stupili u reakciju s jodidnim reagensima nisu uspješno izolirani.

Ispitana su spektroskopska svojstva (oksid)piridilporfirina, porfirina **4** te *O*-etiliranog (oksid)piridilporfirina, porfirina **8**. Otapanjem u MeOH karakteristične UV-Vis vrpce porfirina **4** su intenzivnije od vrpce porfirina **8** dok su otapanjem u PBS-u karakteristične UV-Vis vrpce porfirina **8** intenzivnije od vrpce porfirina **4**. Normalizirani UV-Vis spektar porfirina **4** otopljenog u PBS-u ukazuje na smanjenje intenziteta apsorpcije te pomak i širenje Soretove vrpce u odnosu na otapanje u MeOH dokazujući stvaranje agregata. Rezultati potvrđuju bolju topljivost kationskog porfirina **8** u vodenom mediju. Testom citotoksičnosti porfirina **4**, porfirina **8** i porfirina **P** na stanicama raka dojke (MDA-MB-231), novosintetizirani porfirin **8** pokazao je najznačajniji pad proliferacije stanica, a time i najveću učinkovitost nakon izlaganja crvenom svjetlosti. Niti jedan od testiranih porfirina nije pokazao toksičnost u mraku. U budućim istraživanjima težilo bi se daljnjoj optimizaciji sinteze metiliranih (oksid)piridilporfirina kao i pokušajem sinteze drugih reakcija *O*-alkiliranja poput propilacije ili

benzoilacije te međusobnim usporedbama stabilnosti, lipofilnosti i produkcije ROS-a.

## 6. Literatura

1. Gustalik J, Aebisher D, Bartusik-Aebisher D. Photodynamic therapy in breast cancer treatment. *J Appl Biomed.* 2022;20:98–105. doi:10.32725/jab.2022.013
2. Gunaydin G, Gedik ME, Ayan S. Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches. *Front Chem.* 2021;9. doi:10.3389/fchem.2021.691697
3. Pushpan S, Venkatraman S, Anand V, Sankar J, Parmeswaran D, Ganesan S, et al. Porphyrins in Photodynamic Therapy - A Search for Ideal Photosensitizers. *Curr Med Chem-Anticancer Agents.* 2002;2:187–207. doi:10.2174/1568011023354137
4. Dolmans DEJGJ, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:380–387. doi: 10.1038/nrc1071
5. Juarranz Á, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, Cuevas J, González S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin Transl Oncol.* 2008;10:148–154. doi:10.1007/s12094-008-0172-2
6. Malatesti N, Munitic I, Jurak I. Porphyrin-based cationic amphiphilic photosensitisers as potential anticancer, antimicrobial and immunosuppressive agents. *Biophys Rev.* 2017;9:149–168. doi:10.1007/s12551-017-0257-7
7. Correia JH, Rodrigues JA, Pimenta S, Dong T, Yang Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics.* 2021;13:1309-1332. doi:10.3390/pharmaceutics13091332
8. Kochevar IE, Redmond RW. Photosensitized production of singlet oxygen. *Methods Enzymol.* 2000;319:20–28. doi:10.1016/s0076-6879(00)19004-4

9. MacRobert AJ, Theodossiou T. CHEMICAL APPLICATIONS OF LASERS | Photodynamic Therapy of Cancer. In: Encyclopedia of Modern Optics. Elsevier; 2005;53–62. doi: 10.1016/B0-12-369395-0/00950-7
10. Josefsen LB, Boyle RW. Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitisers. *Met Based Drugs*. 2008;2008:1–23. doi: 10.1155/2008/276109
11. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2004;1:279–293. doi:10.1016/S1572-1000(05)00007-4
12. Donohoe C, Senge MO, Arnaut LG, Gomes-da-Silva LC. Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2019;1872:188308. doi:10.1016/j.bbcan.2019.07.003
13. Jelovica M, Grbčić P, Mušković M, Sedić M, Pavelić SK, Lončarić M, et al. In Vitro Photodynamic Activity of N-Methylated and N-Oxidised Tripyridyl Porphyrins with Long Alkyl Chains and Their Inhibitory Activity in Sphingolipid Metabolism. *ChemMedChem*. 2018;13:360–372. doi:10.1002/cmdc.201700748
14. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, et al. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother*. 2018;106:1098–1107. doi:10.1016/j.biopha.2018.07.049
15. Kou J, Dou D, Yang L. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget*. 2017;8:81591–81603. doi:10.18632/oncotarget.20189
16. Pushpan S, Venkatraman S, Anand V, Sankar J, Parmeswaran D, Ganesan S, et al. Porphyrins in Photodynamic Therapy - A Search for

- Ideal Photosensitizers. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2002;2:187–207. doi:10.2174/1568011023354137
17. Giovannetti R. The Use of Spectrophotometry UV-Vis for the Study of Porphyrins. In: *Macro To Nano Spectroscopy*. InTech; 2012;87–108. doi: 10.5772/38797
  18. Lindsey JS, Schreiman IC, Hsu HC, Kearney PC, Marguerettaz AM. Rothmund and Adler-Longo reactions revisited: synthesis of tetraphenylporphyrins under equilibrium conditions. *J Org Chem*. 1987;52:827–836. doi: 10.1021/jo00381a022
  19. Bonneau S, Vever-Bizet C. Tetrapyrrole photosensitisers, determinants of subcellular localisation and mechanisms of photodynamic processes in therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Pat*. 2008;18:1011–1025. doi: 10.1517/13543776.18.9.1011
  20. Posakony JJ, Pratt RC, Rettig SJ, James BR, Skov KA. Porphyrins incorporating heterocyclic *N*-oxides: (oxidopyridyl)porphyrins, porphyrin-*N*-oxides, and a tirapazamine-porphyrin conjugate. *Can J Chem*. 1999;77:182–198. doi: 10.1139/v98-238
  21. Brückner C, Hewage N. Oxidation and Reduction of Porphyrins. In: *Fundamentals of Porphyrin Chemistry*. Wiley; 2022;303–347. doi: 10.1002/9781119129301.ch6
  22. Chen Y. Recent Advances in Methylation: A Guide for Selecting Methylation Reagents. *Chemistry – A European Journal*. 2019;25:3405–3439. doi: 10.1002/chem.201803642
  23. Schmitz B, Li B, Waruna Jinadasa RG, Lalvani SB, Kerr LL, Wang H. Benzoporphyrins bearing pyridine or pyridine-*N*-oxide anchoring groups as sensitizers for dye-sensitized solar cell. *J Porphyr Phthalocyanines*. 2016;20:542–555. doi: 10.1142/S108842461650036X

24. Toriumi N, Yanagi S, Muranaka A, Hashizume D, Uchiyama M. Effects of N-Oxidation on Heteroaromatic Macrocycles: Synthesis, Electronic Structures, Spectral Properties, and Reactivities of Tetraazaporphyrin *meso* - *N* -Oxides. *Chemistry - A European Journal*. 2017;23:8309–8314. doi: 10.1002/chem.201701300
25. Picard N, Ali H, van Lier JE, Klarskov K, Paquette B. Bromines on N-allyl position of cationic porphyrins affect both radio- and photosensitizing properties. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2009;8:224–232. doi: 10.1039/B812623B
26. Seybold PG, Gouterman M. Porphyrins: XIII: Fluorescence spectra and quantum yields. *J Mol Spectrosc*. 1969;31:1–13. doi: 10.1016/0022-2852(69)90335-X
27. Malatesti N, Harej A, Kraljević Pavelić S, Lončarić M, Zorc H, Wittine K, et al. Synthesis, characterisation and in vitro investigation of photodynamic activity of 5-(4-octadecanamidophenyl)-10,15,20-tris(N-methylpyridinium-3-yl)porphyrin trichloride on HeLa cells using low light fluence rate. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2016;15:115–126. doi:10.1016/j.pdpdt.2016.07.003
28. Tian Z, Li H, Liu Z, Yang L, Zhang C, He J, et al. Enhanced Photodynamic Therapy by Improved Light Energy Capture Efficiency of Porphyrin Photosensitizers. *Curr Treat Options Oncol*. 2023; doi:10.1007/s11864-023-01120-0
29. Jeon J, He Y, Shin S, Hong S. Visible-Light-Induced *ortho* -Selective Migration on Pyridyl Ring: Trifluoromethylative Pyridylation of Unactivated Alkenes. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2020;59:281–285. doi:10.1002/anie.201912746
30. Pajouhesh H, Lenz GR. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRX*. 2005;2:541–553. doi:10.1602/neurorx.2.4.541



31. Mlynárik V. Introduction to nuclear magnetic resonance. *Anal Biochem.* 2017;529:102-166. doi:10.1016/j.ab.2016.05.006
32. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018;2018:469-471. doi:10.1101/pdb.prot095505
33. Stepanenko AA, Dmitrenko VV. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene.* 2015;574:193–203. doi:10.1016/j.gene.2015.08.009

## 7. Životopis



europass

### EMA BELETIĆ

**Datum rođenja:** 29/10/1999 | **Državljanstvo:** hrvatsko | **Spol:** Žensko | **Telefonski broj:**

(+385) 997900702 (Mobilni telefon) | **E-adresa:** [ema.beletic@gmail.com](mailto:ema.beletic@gmail.com) | **E-adresa:** [ema.beletic@student.uniri.hr](mailto:ema.beletic@student.uniri.hr) |

**Adresa:** Pehlin 78, 51000, Rijeka, Hrvatska (Kućna)

#### ● RADNO ISKUSTVO

01/12/2022 – 23/12/2022 Rijeka, Hrvatska

**DEMONSTRATURE - KOLEGIJ ORGANSKA KEMIJA SVEUČILIŠTE U RIJECI, ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU**

Pomoć u pripremi kemikalija i radnih mjesta za laboratorijske vježbe te pomoć i dijeljenje savjeta studentima tijekom izvođenja laboratorijskih vježbi.

05/09/2022 – 16/09/2022 Rijeka, Hrvatska

**STRUČNA PRAKSA JADRAN GALENSKI LABORATORIJ**

Odjel Razvojne analitike i stabilnosti unutar Istraživanja i razvoja.  
Instrumentalno mjerenje gustoće, osmolalnosti, pH i ispitivanje stabilnosti proizvoda.

02/08/2021 – 13/08/2021 Rijeka, Hrvatska

**KNJIGOVODSTVO RIJEČKI USLUŽNI SERVIS**

Organizacija financijskih aktivnosti servisa.

14/06/2021 – 30/06/2021 Rijeka, Hrvatska

**STRUČNA PRAKSA NASTAVNI ZAVOD ZA JAVNO ZDRAVSTVO PGŽ**

Prikupljanje informacija o protokolu, organizaciji i načinu rada odsjeka za kontrolu hrane, predmeta opće uporabe, unapređenja prehrane i mikrobiologiju.

#### ● OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

04/10/2021 – TRENUTAČNO Rijeka, Hrvatska

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ "ISTRAŽIVANJE I RAZVOJ LIJEKOVA" Odjel za biotehnologiju**

**Adresa** Ul. Radmile Matejčić 2, 51000, Rijeka, Hrvatska

10/2018 – 07/2021 Rijeka, Hrvatska

**SVEUČILIŠNA PRVOSTUPNICA BIOTEHNOLOGIJE I ISTRAŽIVANJA LIJEKOVA** Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci

Magna cum laude sa svim pohvalama, častima i pravima.

**Adresa** Ul. Radmile Matejčić 2, 51000, Rijeka, Hrvatska

09/2014 – 07/2018 Rijeka, Hrvatska

**OPĆA GIMNAZIJA** Prva sušačka hrvatska gimnazija

**Adresa** Ul. Ljudevita Gaja 1, 51000, Rijeka, Hrvatska

#### ● JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik/jezici: **HRVATSKI**

Drugi jezici:

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna produkcija	Govorna interakcija	
<b>ENGLISKI</b>	C1	C1	B2	B2	B2
<b>TALIJSKI</b>	B1	B1	A2	A2	A2

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

## ● **DIGITALNE VJEŠTINE**

Komunikacijski programi (Skype Zoom TeamViewer) | MS Office (Word Excel PowerPoint) | Canva | VMD - Visual Molecular Dynamics | AVOGADRO | MarvinSketch | PyMOL | UCSF Chimera | General Atomic and Molecular Electronic Structure System (GAMESS) | Društvene mreže | poznavanje računalnog programa Origin | SpinWorks (osnove)

## ● **DODATNE INFORMACIJE**

### **VOZAČKA DOZVOLA**

**Vozačka dozvola:** AM

**Vozačka dozvola:** B

### **KONFERENCIJE I SEMINARI**

05/12/2019 – 06/12/2019 – Odjel za biotehnologiju - Rijeka, Hrvatska  
**Konferencija budućnost i perspektiva pasivni sudionik**

### **VOLONTIRANJE**

01/09/2021 – TRENUTAČNO Rijeka, Hrvatska

**Volonterski centar Rijeka** Sudjelovanje u organizaciji i provođenju gradskih događanja.

06/2022 – 12/2022 Rijeka, Hrvatska

**Projekt "Putujući znanstvenici"** Fotografiranje i sudjelovanje u radionicama kemijskih i bioloških pokusa za osnovnoškolsku i vrtičku dob.

30/09/2019 – 18/07/2021 Odjel za biotehnologiju - Rijeka, Hrvatska

**Projekt "Student mentor"** Pomoć prilagodbe i upoznavanja studenata prve godine preddiplomskog studija s načinom rada fakulteta.

2022 – 2023 Rijeka, Hrvatska

**Otvoreni dan Odjela za biotehnologiju** Sudjelovanje u pripremi i provođenju kemijskih pokusa za posjetitelje.

### **OSOBNI RAZVOJ**

06/07/2022 – 17/08/2022

**Professional development: Improve yourself, always**

Online tečaj ovlašten od Macquarie University (Australia), proveden putem Coursera-e (pružatelj online tečajeva).

### **NAGRADE**

10/2022 – 06/2023

**Stipendija za izvrsnost grada Rijeke**

10/2019 – 06/2021

**STEM stipendija**