

Učinak piridilporfirina na mitohondrije

Janković, Patrizia

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:193:768949>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-24**

Repository / Repozitorij:

BIotech

[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

Patrizia Janković

Učinak piridilporfirina na mitohondrije

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij

Istraživanje i razvoj lijekova

Patrizia Janković

Učinak piridilporfirina na mitohondrije

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

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

Komentor rada: Izv. prof. dr. sc. Ivana Munitić

Diplomski rad je obranjen dana 16.09.2019. pred povjerenstvom:

1. Doc. dr. sc. Ivana Ratkaj
2. Doc. dr. sc. Daniela Kalafatović
3. Izv. prof. dr. sc. Nela Malatesti
4. Izv. prof. dr. sc. Ivana Munitić

Rad sadrži 69 stranica, 18 slika, 8 priloga i 22 literaturnih navoda.

Popis kratica

PDT - fotodinamička terapija

PS - fotosenzibilizator

Hp - hematoporfirin

HpD - derivat hematoporfirina

PPIX – protoporfirin IX

5-ALA - 5-aminolevulinska kiselina

TPPH2 - *mezo*-tetrafenilporfirin

ROS- reaktivne kisikove vrste

AIF- *engl.* Apoptosis-Inducing Factor

ATP- adenzin trifosfat

TOM- *engl.* Translocase of Outer Membrane

HSP- *engl.* Heat Shock Protein

DCM- diklormetan

MeOH- metanol

TEA- trietilamin

m-CPBA- *meta*-klorperbenzojeva kiselina

DMF - dimetilformamid

TBAC - tetrabutilamonijev klorid

PBS - fosfatni pufer

EMEM - *engl.* Eagle Minimum Essential Medium

BSA - Albumin goveđeg seruma

DAPI - 4',6-diamidin-2-fenillidon

PFA - paraformaldehid

Sažetak

Fotodinamička terapija (PDT) je novi terapijski pristup za liječenje tumorskih bolesti te bakterijskih, gljivičnih i virusnih infekcija. PDT uključuje preferencijalni unos fotosenzibilizatora (PS) u ciljane stanice ili tkiva, nakon čega slijedi ozračivanje tog područja vidljivom svjetlošću. Nakon apsorpcije svjetlosti, PS prelazi u pobuđeno stanje te generira reaktivne kisikove vrste (*engl.* reactive oxygen species, ROS). ROS reagiraju sa staničnim komponentama te uzrokuju staničnu smrt. Porfirini su prirodni intenzivno obojeni spojevi koji se zbog mogućnosti apsorpcije vidljive svjetlosti koriste kao fotosenzibilizatori. Protutumorski učinci fotodinamičke terapije uključuju tri glavna mehanizma uništavanja tumora, a to su oštećenje tumorskih krvnih žila i sprječavanje daljnje angiogeneze, inicijacija lokalnog upalnog i imunosnog odgovora te direktna stanična smrt posredovana ROS-om. Od samih početaka eksperimentiranja s PDT-om, uočeno je da oštećuje mitohondrije, a primjećeno je i da kationski fotosenzibilizatori imaju povećan afinitet za kolokalizaciju s mitohondrijima. Iz tog razloga, u ovom radu cilj je bio ispitati učinak kationskih amfifilnih piridilporfirina na mitohondrije. Sintetizirani su 5-(4-acetamidofenil)-10,15,20-tris(1-oksidopiridin-3-il)porfirin, 5-(4-acetamidofenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin triklorid, 5-(4-oktanamidofenil)-10,15,20-tris(1-oksopiridin-3-il)porfirin te 5-(4-oktanamidofenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin triklorid. Struktura spojeva je potvrđena NMR spektroskopijom, ali NMR spektri su pokazali prisutnost nečistoća koje se nisu uspjele ukloniti, stoga ovi spojevi nisu korišteni za daljnja biološka istraživanja. Ispitan je učinak sličnog spoja, 5-(4-oktanamidofenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin triklorida. Dokazano je da testirani spoj uspješno ulazi u stanice. Pokazana je i njegova toksičnost na mitohondrije analizom markera vanjske mitohondrijske membrane, ali ne i direktno nakupljanje porfirina u mitohondrijima. Nadalje, ispitano je da li navedena oštećenja dovode do stanične smrti te je dokazano da stanice koje su tretirane porfirinom, a

potom osvijetljene, umiru apoptozom. Dakle, u ovom radu je dokazano da testirani spoj ulazi u stanice i uzrokuje oštećenje mitohondrija bez da direktno kolokalizira s njima te u konačnici dovodi do apoptoze stanica.

Ključne riječi: fotodinamička terapija, fotosenzibilizator, amfifilni porfirini, test internalizacije, kolokalizacija s mitohondrijima, apoptoza

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) is a new therapeutic approach for the treatment of tumor diseases, but also for bacterial, fungal and viral infections. PDT involves preferential uptake of a photosensitizer (PS), in the cells / tissues, followed by irradiation of the selected region by visible light. After the absorption of light, the PS reaches an excited state and generates reactive oxygen species (ROS). ROS react with cellular components and irreversibly modify them causing cell death. Porphyrins are natural, intensely colored compounds and are used as photosensitizers due to their ability to absorb visible light. The antitumor effects of photodynamic therapy include three major mechanisms of tumor destruction: damage to the tumor blood vessels and prevention of further angiogenesis, local inflammation and immune response, and direct cell death mediated by reactive oxygen species. From the beginning of experimentation with PDT, the damage to the mitochondria has been observed. Furthermore, it is known that cationic photosensitizers have an increased affinity for targeting the mitochondria. In this work, the aim was to investigate the effect of cationic amphiphilic tripyridylporphyrins on mitochondria. 5-(4-acetamidophenyl)-10,15,20-tris(1-oxidopyridin-3-yl) porphyrin, 5-(4-acetamidophenyl)-10,15,20-tris(N-methylpyridin-3-yl) porphyrin trichloride, 5-(4-octanamidophenyl)-10,15,20-tris(1-oxopyridin-3-yl) porphyrin and 5-(4-octanamidophenyl)-10,15,20-tris(N-methylpyridin-3-yl) porphyrin trichloride were synthesized. Their structure was confirmed by NMR spectroscopy, however, NMR spectra showed also impurities that could not be removed, thus these compounds were not used for further biological research. The effect of a similar compound, 5-(4-octanamidophenyl)-10,15,20-tris(N-methylpyridin-3-yl)porphyrin trichloride, was tested. The tested compound has shown successful internalization into cells. Its toxicity to the mitochondria has also been demonstrated by the analysis of markers of the outer mitochondrial membrane, but the direct accumulation of porphyrins in the

mitochondria has not been shown. Ultimately, it was investigated if the damage that porphyrins are causing leads to cell death and it was proven that cells treated with porphyrin, after illumination, die by apoptosis. Thus, in this work, it is proven that the tested compound is able to enter cells, causes damage to the mitochondria, but does not colocalize with the mitochondria and ultimately leads to apoptosis.

Keywords: photodynamic therapy, photosensitizer, amphiphilic porphyrins, internalization test, colocalization with mitochondria, apoptosis

SADRŽAJ

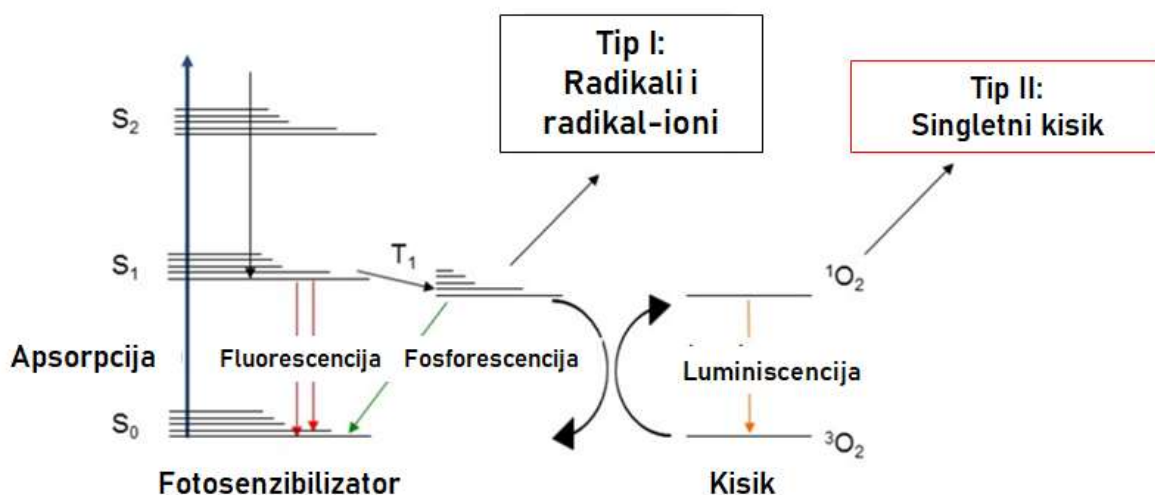
1.	UVOD	1
1.1.	Fotodinamička terapija	1
1.2.	Fotosenzibilizatori	5
1.2.1.	Prva generacija fotosenzibilizatora	5
1.2.2.	Druga generacija fotosenzibilizatora	5
1.2.3.	Treća generacija fotosenzibilizatora	7
1.3.	Porfirini kao fotosenzibilizatori	7
1.3.1.	Sinteza porfirina.....	8
1.4.	Učinak fotodinamičke terapije na stanice.....	9
1.4.1.	Oštećenje tumorskih krvnih žila posredovano reaktivnim kisikovim vrstama 10	
1.4.2.	Lokalni upalni odgovor i prezentacija tumorskih antigena	11
1.4.3.	Izravno ubijanje tumorskih stanica posredovano citotoksičnim reaktivnim kisikovim vrstama.....	12
1.5.	Učinak porfirina na mitohondrije.....	13
2.	CILJ RADA	17
3.	MATERIJALI I METODE	18
3.1.	Opće napomene.....	18
3.2.	Sinteza spojeva.....	19
3.3.	Stanična linija Neuro2A.....	31
3.3.1.	Brojanje i nasađivanje stanica za biokemiju i fluorescentnu mikroskopiju.....	31
3.4.	Metode detekcije porfirina i njegovog učinka na stanice.....	32
3.4.1.	Fotosenzibilizatori za fluorescentnu mikroskopiju.....	32
3.4.2.	<i>In vitro</i> priprema stanica za fluorescentnu mikroskopiju i fluorescentna mikroskopija	33
3.4.3.	Western blot analiza	35
3.5.	Kvantifikacija i statistička obrada podataka	37
4.	REZULTATI.....	38

4.1.	Sinteza spojeva.....	38
4.2.	Internalizacija porfirina u Neuro2A stanice.....	42
4.3.	Ispitivanje kolokalizacije porfirina s mitohondrijima.....	44
4.4.	Vanjska membrana mitohondrija narušena je uslijed djelovanja aktiviranog porfirina	46
4.5.	Stanice tretirane porfirinom umiru apoptozom	50
5.	RASPRAVA.....	52
5.1.	Sinteza piridilporfirina.....	52
5.2.	Internalizacija porfirina u Neuro2A stanice.....	53
5.3.	Kolokalizacija porfirina s mitohondrijima.....	54
5.4.	Učinak porfirina na mitohondrije.....	58
6.	ZAKLJUČAK.....	61
7.	LITERATURA	63
8.	PRILOZI.....	66
9.	ZAHVALA	70
10.	ŽIVOTOPIS.....	71

1. UVOD

1.1. Fotodinamička terapija

Fotodinamička terapija (PDT) je minimalno invazivni terapijski pristup za liječenje neoplastičnih bolesti te bakterijskih, gljivičnih i virusnih infekcija [1]. PDT se sastoji od preferencijalnog unosa fotosenzitivne boje tj. fotosenzibilizatora (PS) u ciljane stanice/tkiva, nakon čega slijedi ozračivanje odabranog područja vidljivom svjetlošću. Nakon apsorpcije svjetlosti, PS prelazi u pobuđeno stanje nakon kojeg mogu uslijediti dvije vrste reakcija: prijenos elektrona ili prijenos vodikovog atoma (reakcija tipa I) na/iz susjedne organske molekule te nastajanje radikala i radikal-iona (npr. superoksid-radikal i hidroksilni radikal-ion) ili prijenos energije na kisik (reakcija tipa II) što posljedično dovodi do stvaranja singletnog kisika (**Slika 1**).



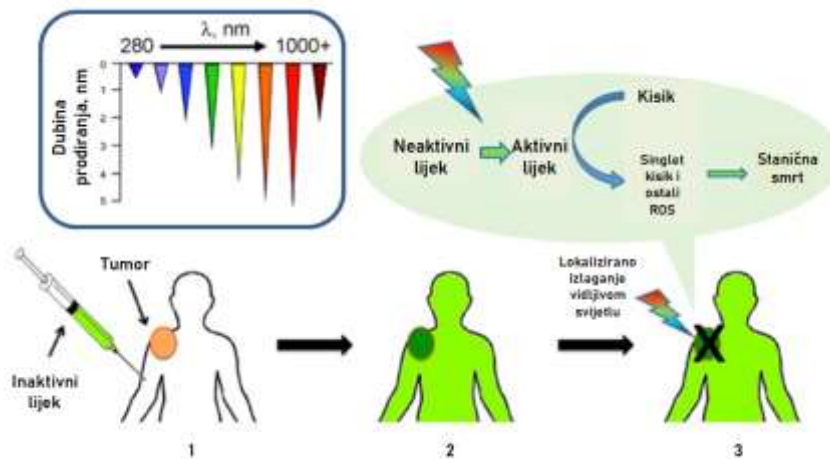
Slika 1. Pojednostavljeni dijagram Jablonskog, modificiran prema slici iz literature [2].

Ove toksične vrste (radikali, radikal-ioni te singletni kisik) reagiraju s raznim staničnim komponentama uključujući nezasićene lipide, aminokiselinske ostatke te nukleinske kiseline [3]. Kao rezultat tih interakcija, biomolekule i stanične strukture mogu se nepovratno modificirati do stupnja koji uzrokuje staničnu smrt (**Slika 2**). Budući da većina vrsta koje generiraju pobuđeni PS imaju kratak život u staničnom okruženju, raspon neposrednih oštećenja ograničena su lokalizacijom PS-a. Pokazalo se da su ukupni naboj, raspodjela naboja i lipofilnost molekule među najvažnijim parametrima koji kontroliraju stanični unos i substaničnu lokalizaciju PS-a [1].

Fotosenzibilizatori sami po sebi trebaju biti bezopasni, tj. u odsutnosti svjetla i kisika nemaju učinka na zdravo ni na abnormalno tkivo: samo njihovi fotoaktivirani oblici imaju citotoksični učinak [4]. U idealnom slučaju, fotosenzibilizatori bi se trebali zadržavati dulje u malignim stanicama u odnosu na zdravo tkivo; stoga je ključno pažljivo odrediti vremenski period nakon primjene fotosenzibilizatora za ozračivanje kako bi se osigurala aktivacija fotosenzibilizatora samo kada je omjer fotosenzibilizatora u abnormalnom tkivu veći od onog prisutnog u zdravom tkivu; time minimizirajući neželjeno oštećenje zdravih stanica.

Drevne civilizacije su tisućama godina znale da mogu kombinirati različite biljke sa sunčevom svjetlošću za liječenje različitih kožnih bolesti, no pojam fotodinamičke terapije skovao je Hermann von Tappeiner (1847.–1927.), ravnatelj farmakološkog instituta sveučilišta Ludwig Maximilian u Münchenu [5]. Von Tappeiner se bavio ispitivanjem svojstva akridina (derivata ugljenog katrana), testirajući njegovu toksičnost na papučici (lat. *Paramecium*) *in vitro* serijskim razrjeđivanjem. Međutim, naišao je na očigledan paradoks. Isprva su sve papučice umrle 60 minuta nakon dodavanja akridina u razrjeđenjima 1-20000. U sljedećem eksperimentu živjele su 800-1000 minuta, što je znatno drugačiji rezultat. Jedina razlika u protokolu bila je velika grmljavina koja se dogodila tijekom prvog eksperimenta, uzrokujući izrazito različite svjetlosne uvjete,

pa je postavljena hipoteza da je upravo svjetlost uzrokovala razliku u rezultatima. Međutim, objašnjenje zamijećenih pojava bilo je nepotpuno, dijelom i zbog ograničenog razumijevanja fizikalne prirode fluorescencije u to vrijeme. U narednim godinama, pojavile su se daljnje studije gdje je von Tappeiner opisivao fotodinamičku terapiju kao reakciju ovisnu o kisiku nakon fotosenzibilizacije [6]. Primijetio je da u odsutnosti kisika, fotosenzibilizator i svjetlost zasebno ne uzrokuju staničnu smrt. Nastavio je razvijati koncept fotodinamičke terapije, te u konačnici opisao i prve slučajeve kod ljudi, koristeći eozin kao fotosenzibilizator za liječenje različitih kožnih stanja. Počevši od 1920-ih godina fokus se prebacio na proučavanje porfirina zbog njihovog iznimnog učinka fotosenzibilizacije i lokalizacije u tumorima, a 1966. godine je fotodinamička terapija prvi put primijenjena u liječenju raka dojke [4]. Pacijentica je liječena višestrukim injekcijama derivata hematoporfirina i lokalnom izloženošću tumora filtriranom svjetlu iz ksenonske lampe [5]. Tumor se ponovo pojavio nakon nekoliko tjedana, ali su pronađeni objektivni dokazi eliminacije tumora fotodinamičkom terapijom što je potaklo daljnji interes za razvojem kvalitetnijih i učinkovitih fotosenzibilizatora.



Slika 2. *Mehanizam fotodinamičke terapije: (1) Sistemska primjena inaktivnog lijeka; (2) Lijek se nakuplja preferencijalno u tumorskom, ali i zdravom tkivu; (3) Lokalizirano ozračivanje tumorskog tkiva što dovodi do stvaranja singletnog kisika /ROS te uzrokuje staničnu smrt; modificirano prema slici iz literature [7].*

PDT pruža nekoliko prednosti u odnosu na konvencionalnu terapiju tumora, a to su manja invazivnost od kirurškog zahvata, minimalna sistemska toksičnost, mogućnost ponavljanja tretmana te kombiniranja s drugim tretmanima [6]. Međutim, PDT još uvijek ima nedostataka poput ograničenja u prodiranju svjetlosti u tkiva tumora smještenih dublje u tijelu, razvoja fotosenzitivnosti kože nakon liječenja i poteškoća u liječenju metastatskih karcinoma.

1.2. Fotosenzibilizatori

1.2.1. Prva generacija fotosenzibilizatora

Kao što je prethodno spomenuto, primjena fotodinamičke terapije u liječenju solidnih tumora počinje početkom 20. stoljeća kada su von Tappeiner i suradnici u Münchenu liječili pacijente s karcinomom kože koristeći eozin, fluorescentnu boju na bazi fluorescina [4]. Ubrzo nakon toga njemački liječnik Mayer Betz proučavao je fotosenzibilizator hematoporfirin (Hp) te je izvijestio o glavnoj prepreci fotodinamičke terapije - akutnoj kožnoj fotosenzibilizaciji. Radi se o problemu koji još i danas postoji, to jest osjetljivosti kože nakon izlaganja sunčevoj svjetlosti uslijed primjene fotosenzibilizatora. Daljnja istraživanja hematoporfirina i njegovog pročišćenog derivata (HpD) na tumorima rezultirala su prvim klinički odobrenim fotosenzibilizatorom, Photofrinom®. Međutim, Photofrin® ima dobro dokumentirane probleme - osim pacijenata koji pokazuju produljenu fotosenzitivnost, sam lijek ima slabu apsorpciju svjetla dugih valnih duljina (630nm). Daljnja istraživanja na fotosenzibilizatorima te poboljšavanje njihovih karakteristika dovela su do razvoja fotosenzibilizatora druge generacije i fotosenzibilizatora treće generacije usredotočenih na ciljanje specifičnih stanica, kao što su fotosenzibilizatori vezani na protutijela i nanočestice.

1.2.2. Druga generacija fotosenzibilizatora

Fotosenzibilizatori druge generacije razvijeni su kako bi se povećala snaga i učinkovitost fotodinamičke terapije te proširio spektar tkiva koji se može liječiti [4]. Kako bi se potonje ostvarilo, istraživanja su usmjerena na razvoj agenasa s apsorpcijom pri višim valnim duljinama. Povećavanje apsorpcijske valne duljine te ekstinkcijskog koeficijenta u crveno/infracrveno područje elektromagnetskog spektra (*engl.* EMS, 600-850 nm) omogućava dublje prodiranje svjetlosti u kožu, čime se povećavaju dubine pri kojima se mogu ciljati tumorske stanice.

Fotosenzibilizatori druge generacije koji su odobreni za kliničku upotrebu uključuju porfirine (npr. Visudyne® gdje je aktivna tvar verteporfin®), klorine, teksafirine, purpurine te ftalocijanine. Nadalje, još jedan primjer druge generacije fotosenzibilizatora je prolijek 5-aminolevulinska kiselina (ALA, koja se prodaje kao Levulan®) koja, jednom kada je internalizirana u stanice, generira fotosenzibilizator protoporfirin IX (PPIX) putem biosintetskog puta hema. Naime, prirodni prekursor u biosintezi hema, 5-aminolevulinska kiselina (5-ALA) nastaje u mitohondriju iz sukcinil-CoA i glicina. Ta sinteza je regulirana mehanizmom povratne sprege, no primijećeno je da se u slučaju egzogene opskrbe ALA stvaraju porfirini, osobito protoporfirin IX (PPIX). S obzirom na relativno sporo formiranje hema (crvenog krvnog pigmenta) umetanjem atoma željeza u PPIX katalizirano enzimom ferokelatonom, PPIX se akumulira i senzibilizira stanicu. To je posebno slučaj u tumorskim stanicama. One imaju veću tendenciju akumuliranja PPIX zbog njihove povećane potrebe za hemom i relativnog unutarstaničnog nedostatka željeza. Susjedne stanice mezenhimalnog podrijetla (npr. fibroblasti) ne pokazuju ovo ponašanje, tako da je omjer između unosa PPIX u tumorima i okolnog normalnog tkiva posebno visok. Upravo iz tog razloga, 5-aminolevulinska kiselina je svoju primjenu pronašla u označavanju i liječenju širokog spektra površinskih tumora. Također, korištena je kao topikalni tretman za razna dermatološka stanja.

Poboljšanja koja su vidljiva u drugoj generaciji fotoenzibilizatora uključuju dublje prodiranje u tkiva uslijed apsorpcije pri većim valnim duljinama te kraća neželjena fotosenzitivnost [4]. Također, promjena periferne funkcionalne skupine fotosenzibilizacijskog makrocikla može imati učinak na potencijalnu fotosenzibilizacijsku učinkovitost molekule. Primjerice, porfirini konjugirani s diamin-platinom pokazuju veću antitumorsku aktivnost, objedinjujući učinke citotoksičnosti kompleksa platine i fotosenzibilizacijske aktivnosti porfirinskih vrsta. Kationski porfirinski derivati također su pokazali terapijski potencijal. Naime, pozitivno nabijene porfirinske vrste preferencijalno kolokaliziraju s

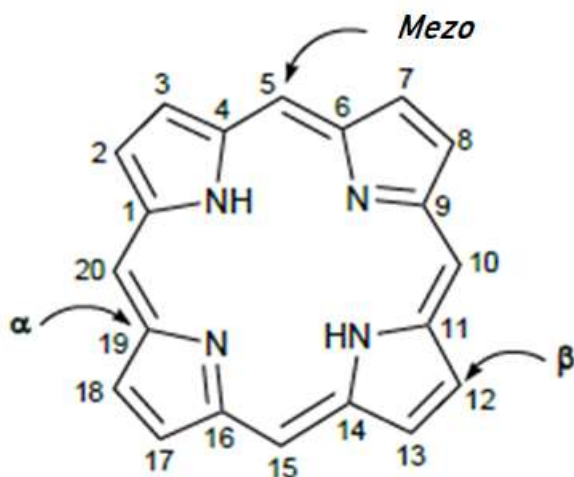
mitohondrijima te narušavaju njihovu funkciju, a poznato je da je to mjesto gdje se odvija oksidativna fosforilacija te je pravilna funkcija istih ključna za preživljavanje stanica.

1.2.3. Treća generacija fotosenzibilizatora

Slaba topljivost mnogih fotosenzibilizatora prve i druge generacije (u vodenim medijima, osobito pri fiziološkom pH) sprječava njihovo izravno unošenje u krvotok [4]. Upravo iz tog razloga počeli su se razvijati modeli koji omogućuju transport slabo topljivih fotosenzibilizatora u ciljano tkivo. Istraživanja su se uglavnom usredotočila na razvoj sustava koji omogućavaju veću selektivnost i specifičnost fotosenzibilizatora kako bi se povećao njihov unos u ciljane stanice. Cilj u razvoju treće generacije fotosenzibilizatora je konjugacija fotosenzibilizatora na komponente poput protutijela ili molekulskih nosača koje omogućuju selektivno lokaliziranje i nakupljanje fotosenzibilizatora u ciljane stanice. Međutim, zbog kompleksnosti sinteze takvih fotosenzibilizatora te nedovoljne istraženosti istih, većina ispitivanja koja se vrše u kontekstu fotodinamičke terapije i dalje se provode koristeći fotosenzibilizatore druge generacije.

1.3. Porfirini kao fotosenzibilizatori

Porfirini su skupina prirodnih, intenzivno obojenih spojeva čije ime je dobiveno iz grčke riječi *porphura* (ljubičasta) [4]. Porfirini su uključeni u brojne biološki važne funkcije, uključujući prijenos kisika i fotosintezu, ali imaju i mnogo drugih primjena, od fluorescentnog označavanja do raznih terapijskih primjena poput liječenja površinskih tumora. Porfirini su tetrapirrolne molekule s osnovnom strukturom heterocikličkog makrocikla, poznatog kao porfin. Temeljna porfinska struktura sastoji se od četiri pirolne podjedinice koje su međusobno povezane na α -ugljicima putem četiri metinska (-CH) mosta poznata kao *mezo*-ugljikovi atomi /položaji.



Slika 3. Shematski prikaz temeljne porfinske strukture [4].

Spomenuti konjugirani planarni makrocikl može biti supstituiran na *mezo*- i /ili β -položajima; ako se na *mezo*- i β -položaju nalazi atom vodika, a dva od unutarnjih dušikovih atoma su protonirani, spoj je tzv. slobodna baza - porfin. S druge strane, u slučaju da je porfin supstituiran na *mezo*- i /ili β -položajima ne-vodikovim atomom ili funkcionalnom skupinom dobiveni spojevi su poznati kao porfirini.

1.3.1. Sinteza porfirina

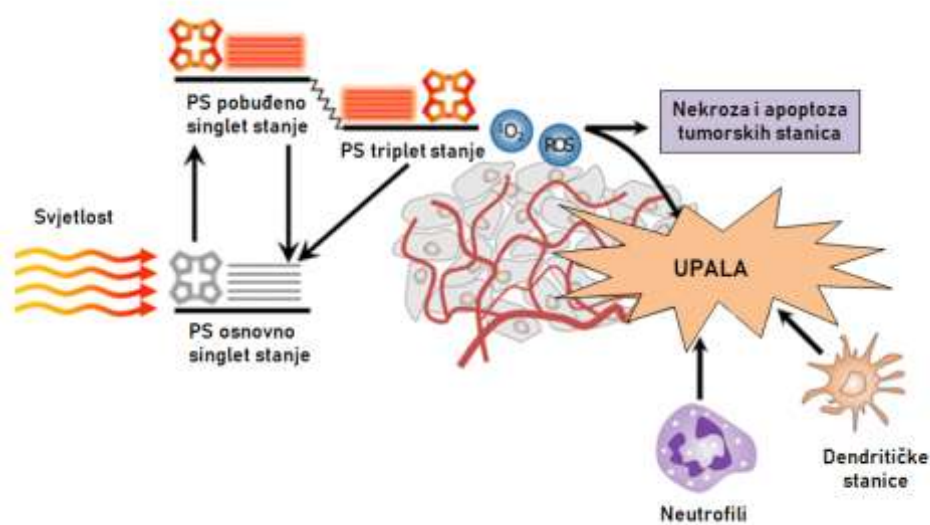
Sa sintezom porfirina započeto je 1930.-ih godina, a posljednjih desetljeća je *mezo*-tetrafenilporfirin (TPPH₂) široko istraživano u smislu njegove sinteze i primjene, kao jedan od jednostavnih i stabilnih supstituiranih tetapirolnih makrocikličkih spojeva [8]. Navedeni spoj često je polazna točka za daljnje modifikacije. Utvrđeno je da iskorištenje i brzina kondenzacije pirola i benzaldehida u TPP ovise o kiselosti, otapalu, temperaturi, dostupnosti atmosferskog kisika te o početnoj koncentraciji reagensa. Gotovo svi prirodni i sintetski porfirini mogu se sintetizirati ciklokondenzacijom supstituiranih aldehida s pirolom. Prva procedura sinteze objavljena je 1935. godine, kada je Rothemund prvi sintetizirao TPPH₂ s prinosom od 10% zagrijavanjem smjese pirola i benzaldehida pri

150°C otopljenih u piridinu na 24 h u zatvorenoj cijevi ispunjenoj dušikom. Međutim, uvjeti su bili preoštri te su iskorištenja bila jako mala, a glavni produkt te reakcije je bio *mezo*-supstituirani klorin, porfirin s jednom reduciranom perifernom dvostrukom vezom što u konačnici nije ciljani produkt. Nakon toga, Adler i Longo su 1960.-ih sintetizirali TPPH2 također iz benzaldehida i pirola, međutim ova reakcija je bila katalizirana karboksilnom kiselinom pri visokoj temperaturi te uz prisutnost zraka. Prinos navedene sinteze TPPH2 je do 20% što je bolje od prve utemeljene metode međutim i u ovom slučaju su iskorištenja mala te su ista bila zadovoljavajuća samo za sintezu simetričnih porfirina. Potonja metoda je modificirana i kao takva korištena pri sintezi piridilporfirina u ovome radu. Nadalje, 1980.-ih, Lindsey je poboljšao dosad utemeljenu sintezu porfirina i povećao prinos asimetričnog porfirina tako što se kondenzacija aldehida i pirola u ovom slučaju odvija u blažim uvjetima što omogućava veći broj aldehida koji mogu reagirati. Ova reakcija se odvija sekvencijskim procesom kondenzacije i oksidacije pri sobnoj temperaturi pod atmosferom argona. Zbog blažih uvjeta lakše se postiže ravnoteža prilikom kondenzacije te je manje nusprodukata. Jedina mana ove metode je ta što se konačni produkt teško pročišćava zbog kompeticijskih procesa polimerizacije [9]. Porfirini se mogu dalje modificirati dodatkom *mezo* premošćujućih ugljika ili heterocikličkih prstena na osnovni makrocikl što omogućuje jaču apsorpciju u željenom, crvenom dijelu spektra. Također, dodatkom raznih hidrofilnih ili hidrofobnih supstituenata moguće je mijenjati topljivost porfirina u raznim medijima te prilagoditi njegovu topljivost određenim potrebama [10].

1.4. Učinak fotodinamičke terapije na stanice

Kao što je već spomenuto u radu, jasno je da fotodinamička terapija nudi višestruke prednosti u odnosu na konvencionalnu terapiju [11]. Jedna od iznimnih prednosti je da osim neposrednog induciranja stanične smrti u tumorima, inducira i antitumorski imunski odgovor.

Naime, PDT uzrokuje akutni upalni odgovor koji se javlja kao posljedica oštećenja i/ili smrti tumorski stanica, a to uključuje infiltraciju leukocita u tumorska tkiva i proizvodnju proupalnih citokina. Dakle, protutumorski učinci fotodinamičke terapije uključuju tri glavna mehanizma uništavanja tumora (**slika 4**): direktna stanična smrt posredovana reaktivnim kisikovim vrstama, oštećenje tumorskih krvnih žila i sprječavanje daljnje angiogeneze te inicijaciju lokalnog upalnog i imunosnog odgovora.



Slika 4. *Mehanizam odgovora organizma na tumorske stanice induciran fotodinamičkom terapijom; modificirano prema slici iz literature [11].*

1.4.1. Oštećenje tumorskih krvnih žila posredovano reaktivnim kisikovim vrstama

Lasersko zračenje tumorskih područja specifičnom svjetlosnom valnom duljinom generira visoko citotoksične ROS koje oštećuju tumorske stanice i pripadajuće krvne žile [11]. ROS stvaraju nepovratna oštećenja u endotelnim stanicama i vaskularnoj bazalnoj membrani što dovodi do oslobađanja vazoaktivnih molekula, propusnosti krvnih žila i konstrikciju krvnih žila. Posljedično tome, dolazi do kolapsa vaskulature i krvarenja u tkivima što može dovesti do uništenja tumora. PDT-om posredovano

oštećenje vaskulature, između ostalog, uzrokuje pokretanje upalnog odgovora u tumorskom tkivu. Budući da je tumorski rast usko povezan s funkcijom vaskulature uslijed opskrbe kisikom i hranjivim tvarima, uništavanje tumorske vaskulature te sprječavanje daljnje angiogeneze uzrokuje smrt tumorskih stanica.

1.4.2. Lokalni upalni odgovor i prezentacija tumorskih antigena

Kao što je već spomenuto, oštećenje tumorske vaskulature djelomično je zaslužno za pokretanje upalnog odgovora u tumorskom tkivu, no fototoksično oštećenje membrane tumorskih stanica je također bitan faktor koji je uključen u pokretanje akutne upalne reakcije [11]. Naime, neutrofili i makrofagi se nakupljaju u oštećenim područjima te proizvode proinflamatorne citokine i kemokine koji privlače i aktiviraju leukocite, povećavaju propusnost kapilara, aktiviraju endotel krvnih žila i potiču stanice NK (*engl.* Natural Killer) te tako utječu na daljnji tijek lokalnih i sistemskih zbivanja. Nakon aktivacije, makrofagi i neutrofili luče i različite druge molekule (prostaglandini, NO, leukotrieni, čimbenik aktivacije trombocita). Sva ta zbivanja vode razvoju lokalne upalne reakcije. Na posljetku, stanična smrt posredovana PDT-om uzrokuje otpuštanje tumorskih antigena zajedno s povećanom akumulacijom molekularnih signala povezanih sa staničnom smrću te molekularnih signala povezanih s oštećenjem stanica (*engl.* Damage-associated molecular patterns, DAMPs) koji imaju imunostimulacijska svojstva. Tumorski antigeni procesiraju se u antigen-prezentirajućim stanicama (makrofagi, dendritične stanice, B stanice) koji ih izražavaju na MHC-II molekulama uz kostimulacijske molekule B7. Na taj način dolazi do aktivacije pomagačkih limfocita što posljedično dovodi do aktivacije stanične (limfociti T i makrofagi) i humoralne imunosti (protutijela).

1.4.3. Izravno ubijanje tumorskih stanica posredovano citotoksičnim reaktivnim kisikovim vrstama

Stanice tretirane PDT-om mogu podlijeći dvama oblicima stanične smrti: apoptozi ili nekrozi. Nekroza je neprogramirani proces koji se naziva i slučajna stanična smrt [11]. Nekrotične stanice bubre, što dovodi do uništavanja plazmatske membrane. Razaranje membrane rezultira otpuštanjem intracelularnih komponenti uključujući proupalne molekule koje dovode do upalne reakcije. S druge strane, apoptoza je kontrolirani proces stanične smrti koji zahtjeva utrošak energije. Apoptotične stanice inducirane PDT-om aktiviraju endonukleazu koja razgrađuje DNA u oligonukleosomalne fragmente što dovodi do aktivacije kaspaza koje potom razgrađuju intracelularne proteine. Za razliku od nekrotičnih stanica, apoptotičke stanice se smanjuju, dolazi do razgradnje proteina i genetskog materijala te u konačnici razgradnje mitohondrija, čime se oslobađa citokrom C. Zatim, makrofagi uklanjaju mrtve stanice i njihove fragmente te, za razliku od nekroze, ne dolazi do razvoja upale u okolnom tkivu. U kontekstu fotodinamičke terapije, postoje dva različita mehanizma apoptoze, a to su apoptoza posredovana „receptorima smrti“ (ekstrinzična apoptoza) te apoptoza posredovana mitohondrijima (intrinzična apoptoza).

1.4.3.1. Apoptoza posredovana „receptorima smrti“

Apoptoza posredovana „receptorima smrti“ odvija se kada fotosenzibilizatori preferencijalno djeluju na staničnu membranu [11]. Pokreće ju multimerizacija receptora koji pripadaju superporodici receptora faktora nekroze tumora (*engl.* Tumor Necrosis Factor, TNF). Od spomenute porodice receptora, smatra se da Fas receptor igra glavnu ulogu u poticanju apoptoze. Multimerizacija Fas receptora omogućava stvaranje "signalnog kompleksa koji potiče smrt" koji se sastoji od Fas receptora, proteinskog adaptera FADD i prokaspaze-8. U tim uvjetima, prokaspaza-8 sama sebe proteolitički aktivira što posljedično aktivira

kaskadu reakcija koje u konačnici dovode do otpuštanja citokroma C te aktivacije izvršiteljskih kaspaza (**Slika 5**).

1.4.3.2. Apoptoza posredovana mitohondrijima

Generiranje ROS-a u mitohondrijima putem PDT-a inicijalizira permeabilizaciju unutarnje membrane mitohondrija što dovodi do oslobađanja dva proteina iz intermembranskog prostora u citosol: citokroma C i faktora koji inducira apoptozu (*engl.* Apoptosis-Inducing Factor, AIF) [11]. Permeabilizaciju mitohondrijske membrane kontroliraju članovi obitelji Bcl-2 [11]. Radi se o proteinima koji se nalaze na mitohondrijskoj membrani te se mogu podijeliti u dvije skupine ovisno o utjecaju na apoptotske puteve: Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl i A1 su antiapoptotski proteini, dok Bax, Bok, Bfm, Bcl-xS i drugi promiču apoptozu. Dakle, oslobađanje citokroma c blokirano je prekomjernom ekspresijom Bcl-2 što posljedično blokira apoptozu [3]. S druge strane prekomjerna ekspresija proteina Bax uzrokuje otpuštanje citokroma C i faktora koji inducira apoptozu što djeluje kao signal za pokretanje kaskadne reakcije aktivacije kaspaze. Naime, kada je prisutan u citoplazmi, citokrom C veže Apaf-1 i prokaspazu-9 i s njima tvori proteinski kompleks nazvan apoptosom koji dovodi do auto-cijepanja i samoaktivacije kaspaze-9. Aktivna kaspaza-9 cijepa i aktivira prokaspaze-3,-6,-7. Jednom aktivirane efektorske kaspaze-3,-6,-7 dovode do cijepanja staničnih proteina te posljedično do apoptoze (**Slika 5**).

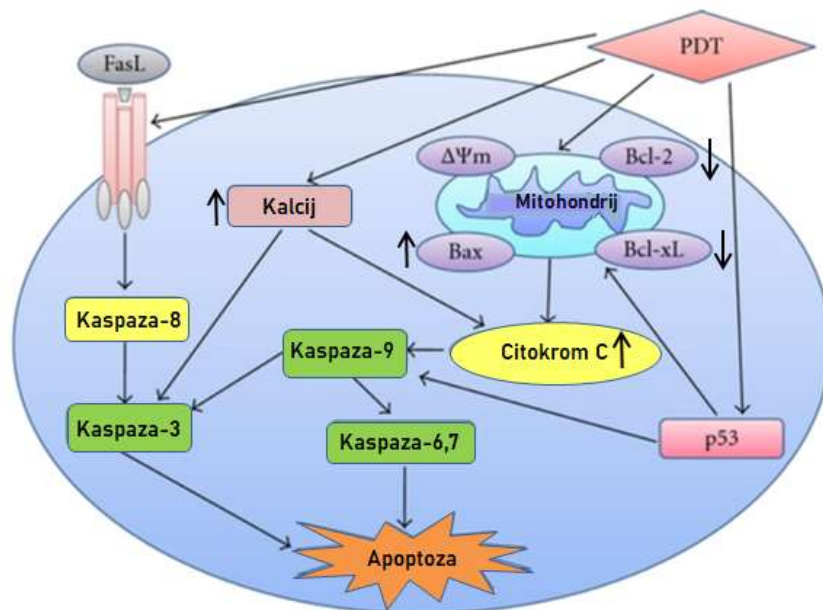
1.5. Učinak porfirina na mitohondrije

Od prvih dana eksperimentiranja s fotodinamičkom terapijom uočeno je oštećenje mitohondrija nakon fotosenzibilizacije stanica [12]. Navedeno oštećenje je dokazano pomoću enzimskih testova, elektronske mikroskopije tretiranih stanica i tumora te fluorescentne mikroskopije. Svi spomenuti testovi ukazuju na oštećenje i depolarizaciju mitohondrija. Zabilježeni su opsežni *in vitro* dokazi o oštećenjima koja uključuju oticanje

mitohondrija, strukturne promjene u mitohondriju, povećanu razinu p53 proteina, smanjenu aktivnost mitohondrijskih enzima te inhibiciju prijenosnika iona, transporta kalcija (povećana razina intracelularnog kalcija), transporta elektrona i transportera ADP/ATP. Mnogi eksperimenti provedeni su u rasponu od jedan do nekoliko sati nakon ozračivanja stanica te na taj način pružili dokaze o oštećenju mitohondrija dugo vremena nakon prvotnog pokretanja štetnih događaja. Podaci ukazuju na to da je mitohondrijska depolarizacija prvi korak koji dovodi do stanične smrti, te da otpuštanje citokroma C iz mitohondrija potiče aktivaciju kaspaza što dovodi do stanične smrti. Treba napomenuti da, iako mnogi od ovih događaja rezultiraju apoptozom, mitohondrijska depolarizacija također može biti rani događaj povezan s nekrozom [11].

Ukoliko dođe do oštećenja mitohondrija potrebno je isti ukloniti mitofagijom. Uklanjanje oštećenih mitohondrija autofagijom, proces zvan mitofagija, kritičan je za održavanje ispravnih staničnih funkcija. Autofagija je genetski programiran, evolucijski sačuvan, katabolički proces koji razgrađuje stanične proteine i oštećene ili nepotrebne organele stvaranjem dvostruke membranske strukture poznate kao autofagosom. Autofagosomi se zatim stapaju s lizosomima kako bi stvorili autolizosom gdje se omotani sadržaj razgrađuje [13]. Kako bi se ispitalo stupanj oštećenja mitohondrija, u ovome radu promatrali smo proteine Tom20, Hsp60 te mitofuzin. Tom20 je središnja komponenta receptorskog kompleksa translokaze vanjske membrane (*engl.* Translocase of Outer Membrane, TOM), a odgovoran je za prepoznavanje i translokaciju mitohondrijskih preproteina sintetiziranih u citosolu [14]. Hsp60 (*engl.* Heat Shock Protein) je šaperon uključen u uvoz mitohondrijskih proteina i skupinu makromolekula. Zajedno s Hsp10, olakšava pravilno smatanje uvezenih proteina. Također, može spriječiti pogrešno smatanje, promicati ponovno smatanje i pravilno smatanje nesmotanih polipeptida koji nastaju pod uvjetima stresa u mitohondrijskom matriksu [15]. Mitofuzin je mitohondrijska GTPaza koja se nalazi na vanjskoj membrani te posreduje u mitohondrijskom grupiranju i fuziji [16]. Dakle, Tom20 i mitofuzin se

nalaze na vanjskoj membrani mitohondrija, a Hsp60 se nalazi matriksu mitohondrija. Stoga, oštećenje vanjske mitohondrijske membrane bit će vidljivo kao odsutstvo markera vanjske mitohondrijske membrane (Tom20 i mitofuzin), dok će se mitofagija očitovati odsutvom svih mitohondrijskih markera.



Slika 5. Shematski prikaz mogućih učinaka fotodinamičke terapije na induciranje apoptoze u tumorskim stanicama; modificirano prema slici iz literature [17].

Funkcionalni mitohondriji polarizirani su preko njihovih membrana te im je unutarnja strana membrane negativno nabijena u odnosu na vanjsku stranu [15]. Različiti naboj na unutarnjoj i vanjskoj strani membrane rezultat je kombinacije membranskog potencijala i pH gradijenta nastalog protonskim pumpanjem proteina dišnog lanca. Razne molekule mogu selektivno ciljati membranu mitohondrija zbog njihovog naboja u slučaju pozitivno nabijenih molekula, ili njihove hidrofobnosti, u slučaju negativno nabijenih molekula. Primjerice, dominantni naboj na

porfirinskim bočnim lancima može utjecati na lokalizaciju spojeva u stanici. Naime, porfirini s kationskim i anionskim karakteristikama bočnih lanaca pokazuju tendenciju za mitohondrijsku odnosno lizosomalnu distribuciju.

U kontekstu fotosenzibilizatora, posebno su zanimljivi kationski fotosenzibilizatori (npr. kationski porfirini). Predloženi mehanizam djelovanja kationskih porfirina na mitohondrije je taj da kationske molekule svojom akumulacijom na membrani neutraliziraju negativni membranski potencijal. Posljedično tome, visoka razina kationskih porfirina može uzrokovati mitohondrijsku depolarizaciju te gubitak razlike potencijala koja je uzrokovala početnu akumulaciju porfirina i preraspodjelu istog na druge organele. Takva depolarizacija može djelovati kao početni ili pojačavajući faktor fotooštećenja mitohondrija ili drugih organela. Također, značajni dokazi upućuju na to da kationski fotosenzibilizatori inhibiraju enzime u proteinskim kompleksima dišnog lanca. Razlog zašto su kationske molekule vrlo interesantne u pogledu fotodinamičke terapije je taj što je dokazano veće nakupljanje pozitivno nabijenih molekula u tumorskim stanicama, u usporedbi s ne-malignim stanicama što otvara mogućnost za ciljanu terapiju tumorskih stanica. Navedeno povećano nakupljanje može biti uzrokovano većim brojem mitohondrija u tumorskim stanicama (karakteristika stanica koje se brzo dijele te zahtijevaju puno energije) ili većim transmembranskim potencijalom koji je karakterističan za maligne stanice [15].

2. CILJ RADA

Fotosenzibilizatori korišteni u fotodinamičkoj terapiji konstantno se poboljšavaju te se njihove karakteristike pokušavaju optimizirati kako bi njihov učinak u konačnici bio maksimalan. U posljednje vrijeme, mnoga se istraživanja fokusiraju na kationske fotosenzibilizatore koji su vrlo specifični u svojem djelovanju jer zbog svojeg pozitivnog naboja ciljaju negativno nabijenu membranu mitohondrija te na taj način specifično i efikasno uništavaju tumorske stanice. Iz tog razloga, u prvom djelu ovog rada, cilj je bio sinteza četiri različite vrste piridilporfirina, a to su: 5-(4-acetamidofenil)-10,15,20-tris(1-oksipiridin-3-il)porfirin, 5-(4-acetamidofenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin triklorid, 5-(4-oktanamidofenil)-10,15,20-tris(1-oksipiridin-3-il)porfirin te 5-(4-oktanamidofenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin triklorid. Spojevi se međusobno razlikuju po tome što su 5-(4-amidofenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin triklorid i 5-(4-oktanamidofenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin triklorid kationski porfirini dok su preostala dva spoja zwitter-ioni. Osim toga, dva s acetamido skupinom se razlikuju značajno od druga dva prema duljini lanca (oktanamidna skupina), a time i prema lipofilnosti.

U drugom dijelu rada cilj je bio ispitati potencijalni citotoksični učinak kationskog porfirina s hidrofobnim lancem (5-(4-oktanamidofenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin triklorid). S tom svrhom analizirana je njegova internalizacija u Neuro2A stanice, stanična smrt, utjecaj na oštećenje mitohondrijske membrane te kolokalizacija s mitohondrijima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Opće napomene

U reakcijama su korišteni komercijalno dostupni reagensi i otapala zadovoljavajuće čistoće s kojima nije bilo daljnje manipulacije.

Za pročišćavanje spojeva korištena je kromatografija na stupcu te su kolone punjene silikagelom (60Å, Macherey-Nagel 0,04 – 0,063 mm) te eluirane smjesom diklormetan/metanol (DCM/MeOH) različite polarnosti.

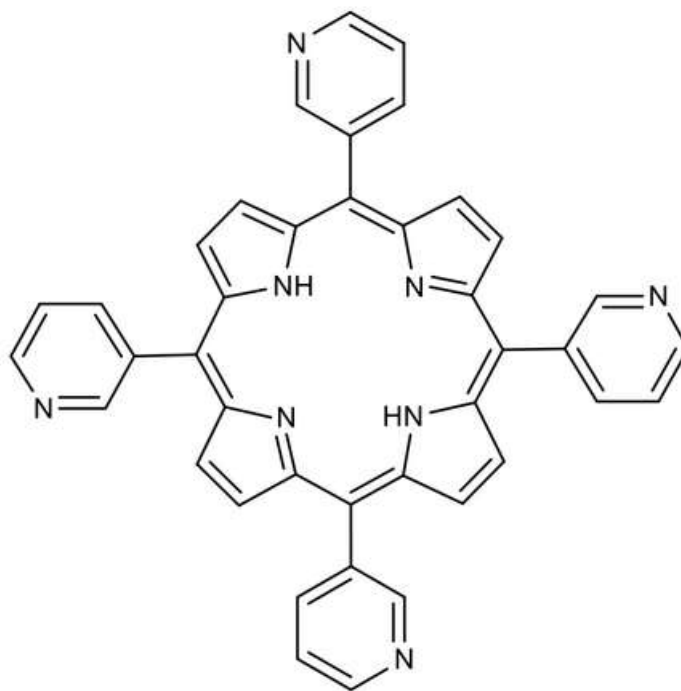
Za provjeru i praćenje tijeka reakcija korištena je tankoslojna kromatografija (TLC, pločice presvučene slojem silikagela, 60Å, Fluka F254, 0.2 mm širine) uz pomoć UV lampe kao izvora svjetlosti valnih duljina 254 i 365 nm.

Otapala su uklanjana na rotacijskom uparivaču pri sniženom tlaku (Büchi, 20-40 mmHg).

NMR spektri su snimljeni pomoću NMR spektrometra Brüker Avance u Laboratoriju za spektroskopiju NMR na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Zagreb. ¹H NMR spektri su snimani na 400 MHz. Uzorci su otapani u deuteriranim otapalima, a njihovi su kemijski pomaci (δ) u ppm (parts per million) određeni prema internom standardu tetrametilsilanu (TMS, 0 ppm). Konstante sprege su izražene u hercima (Hz). Oznake multipliciteta : s – singlet, d – dublet, t – triplet, q – kvartet, m – multiplet, br s – široki singlet.

3.2. Sinteza spojeva

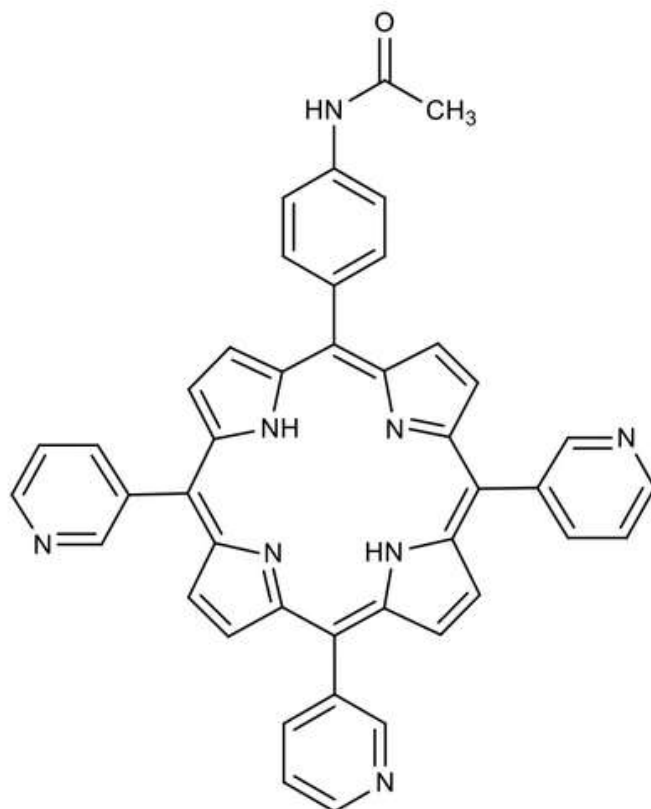
(1) 5,10,15,20-tetrakis(3-piridil)porfirin



4-Acetamidobenzaldehyd (0,90 g, 5,5 mmol) i 3-piridinkarboksaldehid (1,78 g, 16,6 mmol) otopljeni su u propanskoj kiselini (70 ml) u trogrolj tikvici. Aparatura se sastojala od trogrle tikvice, hladila, vodene kupelji te magnetne miješalice. Nakon pokretanja magnetne miješalice, preko septuma je kroz 10-15 minuta dokapavan netom destilirani pirol (1,54 ml, 22,1 mmol). Reakcijska smjesa je zagrijavana (90°C) preko vodene kupelji te se reakcija odvijala 45 minuta uz pristup zraka i svjetlosti. Nakon 45 minuta, trogrla tikvica je maknuta s grijača te je reakcijska smjesa miješana i hlađena na zraku još 20 minuta. Propanska kiselina je zatim uklonjena *in vacuo*, a dobivena kruta smjesa nastalih porfirina pročišćena je pomoću tri kolonske kromatografije na silikagelu sa smjesom diklormetana/metanola (CH₂Cl₂/CH₂OH) (40:1) kao eluensom. Omjer CH₂Cl₂ postepeno je smanjivan do 17:1 kako bi se s kolone eluirao sav asimetrični porfirin. Prva porfirinska frakcija, simetrični **1**, je izolirana

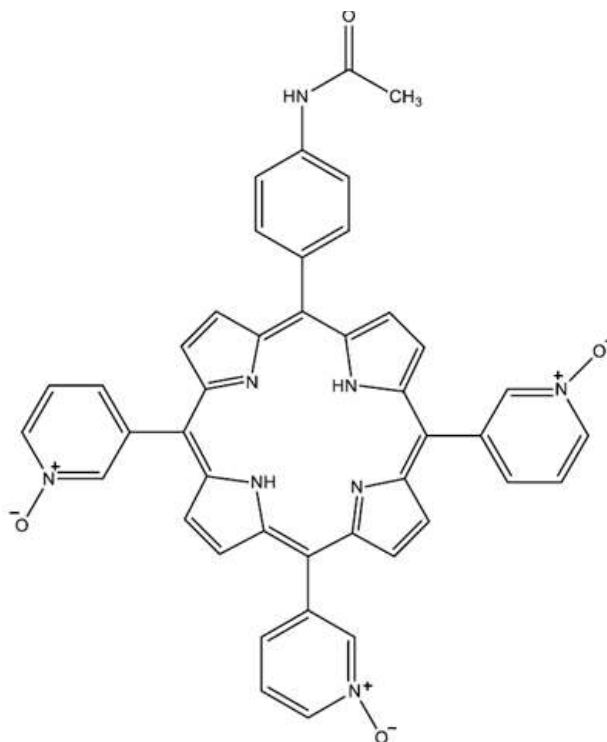
te dodatno pročišćena precipitacijom iz *n*-heksana. Spoj je otopljen u 10 ml CH₂Cl₂/CH₂OH (17:1) te je dodano 40 ml *n*-heksana kako bi se spoj pretvorio u krutinu i precipitirao. U konačnici, produkt **1** je izoliran vakuum filtracijom kao ljubičasta krutina (126,5 mg, 3,65 %). Produkt **1** uspoređen je i potvrđen pomoću tankoslojne kromatografije sa spojem koji je prethodno sintetiziran te karakteriziran i opisan u literaturi [18].

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



Iduća frakcija porfirina **2** je izolirana te dodatno pročišćena kao i u slučaju prve porfirinske frakcije, simetričnog **1**, te je u konačnici produkt izoliran kao ljubičasta krutina (110,8 mg, 2,98 %); Produkt **2** uspoređen je i potvrđen pomoću tankoslojne kromatografije sa spojem koji je prethodno sintetiziran te karakteriziran i opisan u literaturi [18].

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

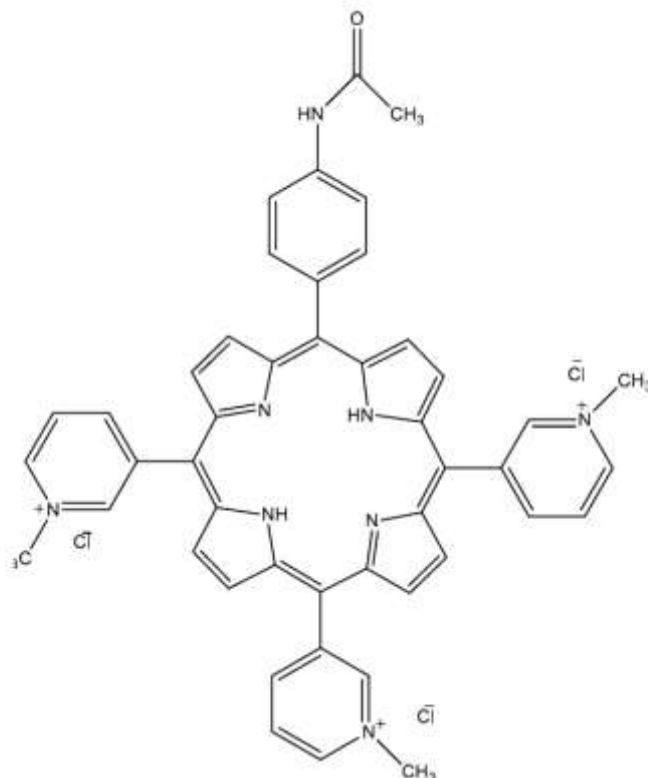


Porfirin **2** (30,1 mg, 0,045 mmol) otopljen je u suhom CH₂Cl₂ (10 ml). Reakcijska smjesa je miješana te je kroz pola sata dodavana *meta*-klorperbenzojeva kiselina (199,7 mg, 1,16 mmol). Reakcija se odvijala pri sobnoj temperaturi. Nakon dodavanja *meta*-klorperbenzojeve kiseline reakcija se odvijala još 10 minuta, a nakon toga je zaustavljena dodatkom trietilamina (Et₃N) (1 ml). Otpalo je uklonjeno *in vacuo*, a dobivena krutina je pročišćena pomoću dvije kolonjske kromatografije sa CH₂Cl₂/MeOH (15:1; poslije 10:1) kao eluensom. Produkt **3** je izoliran kao krutina ljubičaste boje (32,7 mg, 106 %).

¹H NMR (CD₃Cl): δ/ppm -2,93 (s, 2H, *pirolni NH*); 2,41 (s, 3H, -CH₃); 7,69 (s, 1H, *amidni NH*); 7,80-7,70 (m, 3H, *Py-5-H*); 8,22 – 7,92 (m, 7H, preklapanje *Py-6-H*, *Ar-3,5-H* i *Ar-2,6-H*); 8,77 – 8,69 (m, 3H, *Py-4-H*); 9,04 – 8,82 (m, 8H, *β-H*); 9,09 (s, 3H, *Py-2-H*);

NAPOMENA: Osim ovih pikova ima i ostalih pikova koji pripadaju nečistoćama (vidi **Prilog 2**).

(4) 5-(4-acetamidofenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin
triklorid

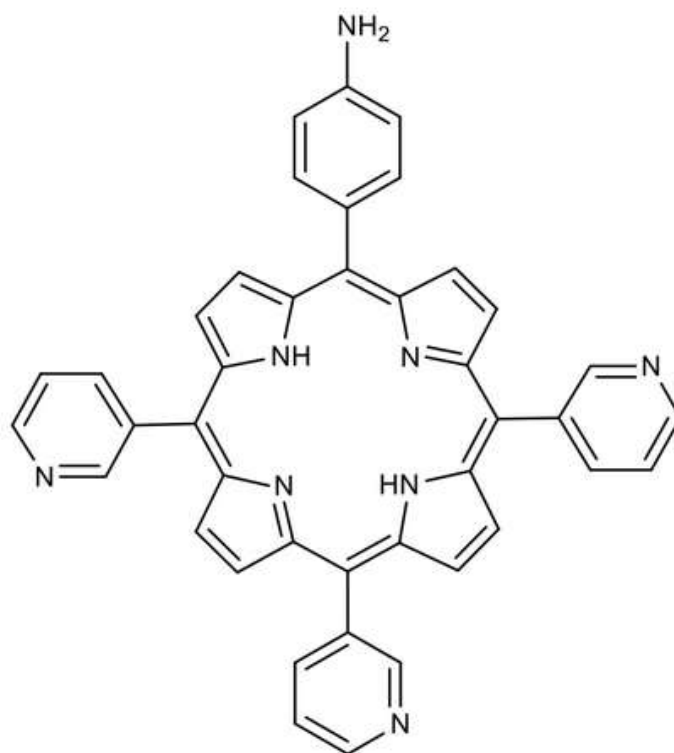


Porfirin **2** (30.6 mg, 0.045 mmol) otopljen je u *N,N*-dimetilformamidu (DMF) (15 ml) te je reakcijska smjesa prebačena u dvogrlu tikvicu. Preko septuma je dodan metil-jodid (CH₃I) (0.4 ml). Uz konstantno miješanje, reakcija se odvijala sedam sati pri sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetla. Otapalo je uklonjeno *in vacuo*. Spoj je zatim otopljen u destiliranoj vodi (5 ml) te je dodan amonijev heksafluorofosfat (NH₄PF₆) (5 kapi) kako bi željeni spoj precipitirao. Nakon toga, spoj je otopljen u acetonu (5 ml) te je u otopinu dodan tetrabutilamonijev klorid (TBAC) kako bi došlo do ionske izmjene i precipitacije željenog spoja. Produkt **4** izoliran je kao ljubičasta krutina vakuum filtracijom te ispran dietil-eterom kako bi se uklonio sav TBAC u suvišku (26.4 mg, 70.92 %).

^1H NMR (CD_3Cl): δ/ppm 2,35 (s, 3H, CH_3); 4,80 (s, 9H, N-CH_3) ; 8,09 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H, Ar-3,5-H); 8,21 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, Ar-2,6-H); 8,59 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H, Py-5-H); 9,12 (br s, 8H, $\beta\text{-H}$); 9,41 (d, $J = 7,4$ Hz, 3H, Py-6-H); 9,46 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H, Py-4-H); 9,96 (s, 3H, Py-2-H);

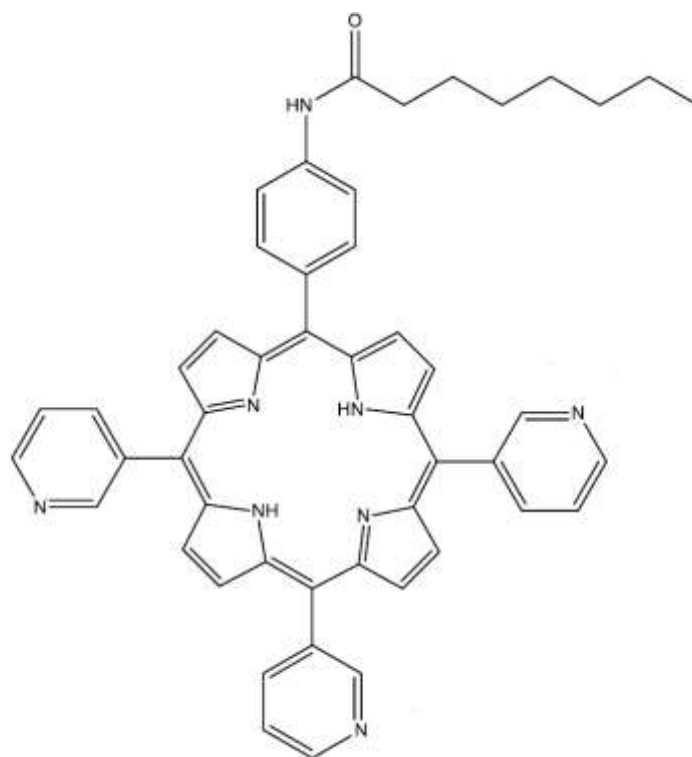
NAPOMENA: Osim ovih pikova ima i ostalih pikova koji pripadaju nečistoćama (vidi **Prilog 4**).

(5) 5-(4-aminofenil)-10,15,20-tris(3-piridil)porfirin



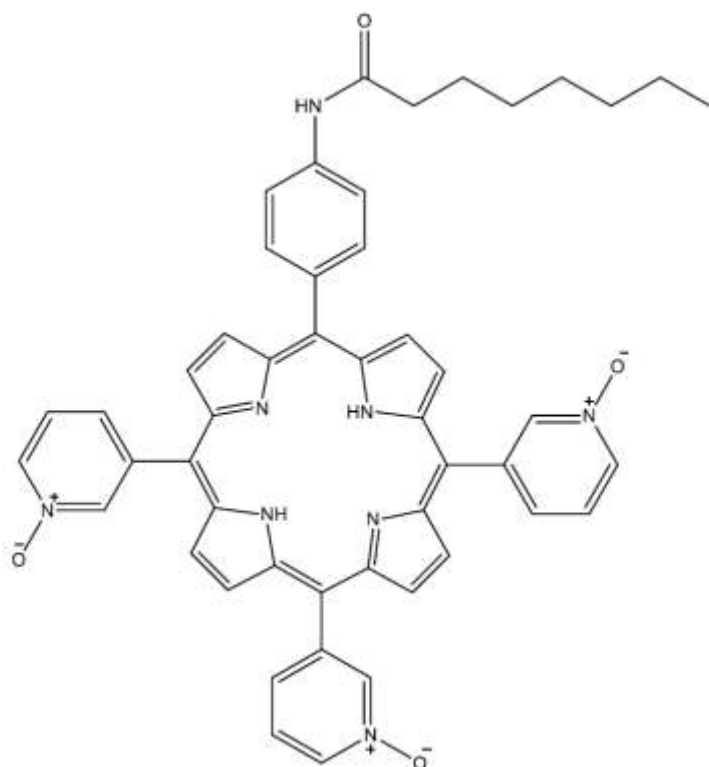
Porfirin **2** (20.8 mg, 0.03 mmol) je otopljen u vodenoj otopini klorovodične kiseline (7.07 ml, 18 %). Reakcijska smjesa je grijana u vodenoj kupelji te se odvijala pod refluksom dva sata uz konstantno miješanje, zaštićena od svjetla. Vodena otopina HCl je uklonjena *in vacuo*, a nastala zelena krutina je otopljena u CH₂Cl₂/Et₃N (9:1) (4.16 ml) i miješana 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon toga, reakcijska smjesa je prebačena u lijevak za odjeljivanje gdje je isprana destiliranom vodom (3 x 10 ml) i zasićenom otopinom NaCl (10 ml). Organski sloj je sušen pomoću Na₂SO₄ kroz pola sata, a nakon filtracije je otapalo uklonjeno *in vacuo*. Produkt je pročišćen pomoću kolonske kromatografije na silikagelu s CH₂Cl₂/MeOH (30:1) kao eluensom, a prilikom priprema kolone dodan je Et₃N (1 ml) u eluens. Produkt **5** je izoliran kao tamna ljubičasta krutina (13.4 mg, 70.43 %). Produkt **5** uspoređen je i potvrđen pomoću tankoslojne kromatografije sa spojem koji je prethodno sintetiziran te karakteriziran i opisan u literaturi [18].

(6) 5-(4-oktanamidofenil)-10,15,20-tris(3-piridil)porfirin



Porfirin **5** (77.5 mg, 0.115 mmol) je otopljen u bezvodnom CH₂Cl₂ (15 ml) uz dodatak Et₃N (750 μl). Reakcijska smjesa je ohlađena na 0 °C. Oktanoil-klorid (C₈H₁₅ClO) (0.11 g, 0.676 mmol) otopljen je u bezvodnom CH₂Cl₂ (4 ml) te je dodavan u smjesu kroz 45 minuta uz konstantno miješanje i hlađenje reakcijske smjese, zaštićeno od svijetla. Nakon toga, reakcija se odvijala još 45 minuta pri sobnoj temperaturi uz konstantno miješanje. Otopina je prebačena u lijevak za odjeljivanje te je isprana destiliranom vodom (2 x 30 ml), a organski sloj je sušen pomoću Na₂SO₄ kroz pola sata. Smjesa je profiltrirana, a otapalo je uklonjeno *in vacuo*. Produkt je pročišćen pomoću dvije kolonske kromatografije na silikagelu s eluensom CH₂Cl₂/MeOH (30:1 te 40:1). Konačni produkt **6** je izoliran kao ljubičasta krutina (74.5 mg, 85.16 %). Produkt **6** uspoređen je i potvrđen pomoću tankoslojne kromatografije sa spojem koji je prethodno sintetiziran te karakteriziran i opisan u literaturi [18].

(7) 5-(4-oktaamidofenil)-10,15,20-tris(1-oksopiridin-3-il)porfirin

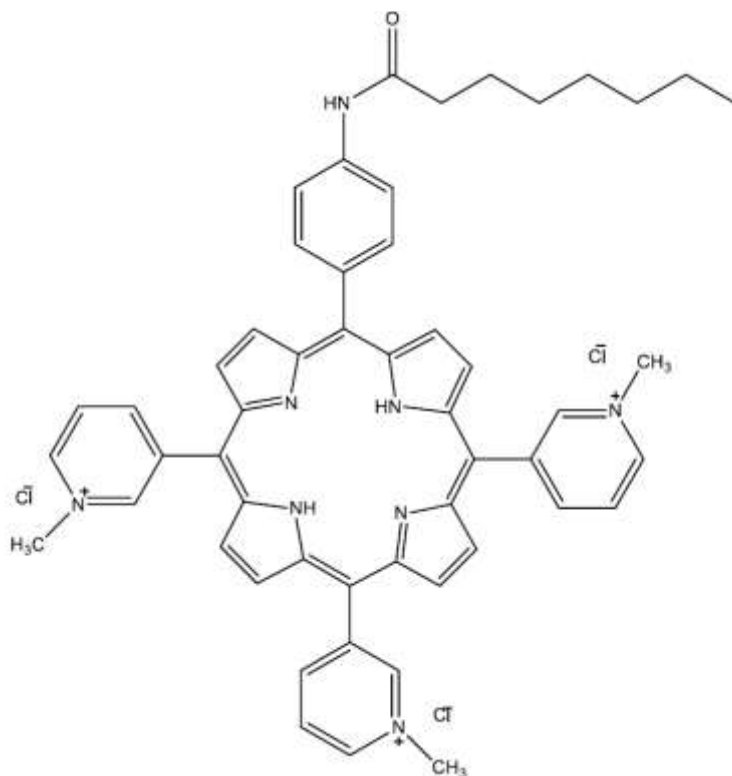


Porfirin **6** (32.4 mg, 0.0426 mmol) otopljen je u suhom CH₂Cl₂ (10 ml). Reakcijska smjesa je miješana te je kroz pola sata dodavana *meta*-klorperbenzojeva kiselina (200 mg, 1.16 mmol). Reakcija se odvijala pri sobnoj temperaturi. Nakon dodavanja potrebne količine *meta*-klorperbenzojeve kiseline, reakcija se odvijala još 10 minuta, a nakon toga je zaustavljena dodatkom Et₃N (1 ml). Otpalo je uklonjeno *in vacuo*, a dobivena krutina je pročišćena kroz dvije kolonjske kromatografije sa CH₂Cl₂/MeOH(od 15:1 do 10:1) kao eluensom. Produkt **7** je izoliran kao krutina ljubičaste boje (45 mg, 130 %).

^1H NMR ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): 0,95 (t, $J = 6,5$ Hz, 3H, CH_3); 1,47 – 1,35 (m, 8H, C^4H_2 , C^5H_2 , C^6H_2 , C^7H_2); 1,91 (p, $J = 7,5$ Hz, 2H, C^3H_2); 2,59 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H, C^2H_2); 7,80-7,67 (m, 3H, *Py-5-H*); 8,24 – 7,93 (m, 7H, preklapanje *Py-6-H*, *Ar-3,5-H* i *Ar-2,6-H*); 8,73 (d, $J=6,4$ Hz, 3H, *Py-4-H*); 9,05-8,84 (m, 8H, $\beta\text{-H}$); 9,09 (s, 3H, *Py-2-H*);

NAPOMENA: Osim ovih pikova ima i ostalih pikova koji pripadaju nečistoćama (vidi **Prilog 6**).

(8) 5-(4-oktaamidofenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin
triklorid



Porfirin **6** (42.1 mg, 0.055 mmol) otopljen je u *N,N*-dimetilformamidu (DMF) (15 ml) te je reakcijska smjesa prebačena u dvogrlu tikvicu. Preko septuma je dodan CH_3I (0.4 ml). Reakcija se odvijala sedam sati pri sobnoj temperaturi uz konstantno miješanje, zaštićena od svjetla. Otapalo je uklonjeno *in vacuo*. Spoj je zatim otopljen u destiliranoj vodi (5 ml) te je dodano 5 kapi NH_4PF_6 kako bi željeni spoj precipitirao. Nakon toga, spoj je otopljen u acetonu (5 ml) te je u otopinu dodan tetrabutilamonijev klorid kako bi došlo do ionske izmjene i precipitacije željenog spoja. Produkt **8** je izoliran kao ljubičasta krutina vakuum filtracijom te ispran dietil-eterom (17 mg, 33.95 %).

^1H NMR (CD_3Cl): δ/ppm 0,99 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H, CH_3); 1,59 – 1,37 (m, 8H, C^4H_2 , C^5H_2 , C^6H_2 , C^7H_2); 1,88 (p, $J = 7,5$ Hz, 2H, C^3H_2); 2,60 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, C^2H_2); 4,80 (s, 9H, N-CH_3); 8,10 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, Ar-3,5-H); 8,21 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, Ar-2,6-H); 8,59 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H, Py-5-H); 9,14 (br s, 8H, $\beta\text{-H}$); 9,41 (d, $J = 7,3$ Hz, 3H, Py-6-H); 9,47 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H, Py-4-H); 9,96 (s, 3H, Py-2-H)

3.3. Stanična linija Neuro2A

U ovom radu, korištena je stanična linija Neuro2A, odnosno neuronalna stanična linija mišjeg neuroblastoma koja je uzgajana u mediju koji sadrži EMEM (*engl.* Eagle's Minimum Essential Medium; Pan Biotech), 10% fetalni goveđi serum (Pan Biotech), 2 mM L-Glutamin (Pan Biotech), 0,1 mM neesencijalne aminokiseline (NEAA, Pan Biotech), 1 M natrijev piruvat (Pan Biotech), 100 U/mL Penicilin, 100 mg/mL Streptomycin i 250 ng/mL Amfotericin B (Pan Biotech); koji će se u nastavku teksta navoditi kao kompletni medij. Stanična linija je uzgajana u Petrijevim zdjelicama u inkubatoru na 37°C s 5% CO₂ te je pasažirana 3 puta tjedno. Stanice su pasažirane tako što im je maknut mediji te su isprane u 10 ml PBS-a (*engl.* Phosphate Buffered Saline, Pan Biotech). Nakon ispiranja, dodano je 2 ml 0,05% tripsina (Pan Biotech) te su stanice inkubirane na 37°C 3 minute kako bi se nakon enzimske razgradnje površinskih proteina lako odvojile od Petrijeve zdjelice. Nadalje, za neutralizaciju tripsina dodano je 8 ml kompletnog medija te su preostale stanice dizane s površine Petrijeve zdjelice uz pomoć mlaza pipete. Sadržaj Petrijeve zdjelice je zatim prebačen u Falcon epruvetu od 15 ml te centrifugiran 5 minuta na 1500 rpm. Nakon centrifugiranja, supernatant je izliven, a stanični pelet je resuspendiran u 3 ml medija. U novu Petrijevu zdjelicu stavljeno je 9 ml kompletnog medija i 1 ml resuspendiranih stanica. Stanice su raspoređene po cijeloj površini Petrijeve zdjelice laganim miješanjem u obliku broja 8.

3.3.1. Brojanje i nasađivanje stanica za biokemiju i fluorescentnu mikroskopiju

Prilikom nasađivanja u jažice, stanice su prikupljene kao što je opisano prilikom pasažiranja te su pobrojane. Stanice se broje tako što se razrijede u tripanskom modrilu u omjeru 1:5 te se žive stanice broje na Neubauerovom hemocitometru. Žive stanice se lako mogu raspoznati od

mrtvih iz tog razloga što su mrtve stanice kompletno obojene u plavo. Broj živih stanica dobiven je po formuli:

$$\text{Broj stanica/mL} = \frac{\text{ukupan broj stanica}}{\text{broj kvadrata}} \times 10^4 \text{ mL} \times \text{razrjeđenje} **$$

*volumen jednog velikog polja komorice koji se sastoji od 16 kvadrata i volumena je 1mm x 1mm x 0,1 mm= 0,1 μL (10^{-4} mL)

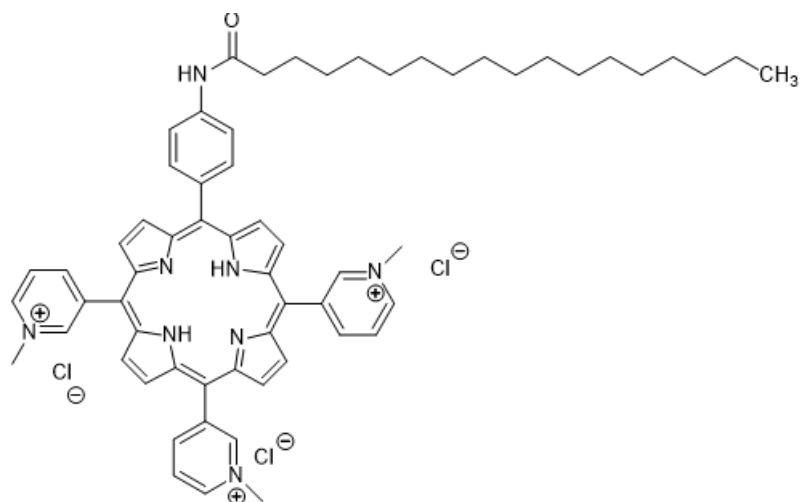
**razrjeđenje 1:10= x10

Stanice za fluorescentnu mikroskopiju nasađivane su u koncentraciji od 50 000 stanica po jažici u volumenu od 0,5 mL na pločice s 24 jažice (u koja su prethodno stavljena stakalca za mikroskopiju), dok su stanice za biokemijske analize nasađivane u koncentraciji od 200 000 stanica po jažici u volumenu od 1 mL na pločice s 12 jažica. Nakon nasađivanja, stanice su inkubirane 24 h sata kako bi im se omogućilo prianjanje za površinu jažice prije samog tretiranja.

3.4. Metode detekcije porfirina i njegovog učinka na stanice

3.4.1. Fotosenzibilizatori za fluorescentnu mikroskopiju

Za testove internalizacije porfirina i njihove kolokalizacije s mitohondrijima nisu korišteni fotosenzibilizatori sintetizirani u ovome radu zbog nezadovoljavajuće čistoće spojeva za biološke eksperimente. Naime, sintetizirani spojevi su karakterizirani NMR analizom te su zamijećene nečistoće u NMR spektru. Korišten je fotosenzibilizator 5-(4-oktadekanamidofenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin triklorid (**Slika 5**) koji je karakteriziran (^1H i ^{13}C NMR, UV/vis, MS) i prethodno ispitivan u biološkim eksperimentima [18]. Početna otopina fotosenzibilizatora koncentracije 1.6 mM, pripremljena je otapanjem 1.6 mg porfirina u 1 mL otopine PBS-a. Konačne koncentracije (1 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM i 50 μM) dobivene su razrjeđivanjem početne otopine s kompletnim medijem.



Slika 6. Struktura 5-(4-oktadekanamidofenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin triklorida

3.4.2. *In vitro* priprema stanica za fluorescentnu mikroskopiju i fluorescentna mikroskopija

3.4.2.1. Internalizacija porfirina u stanice

Neuro2A stanična linija nasađena je u koncentraciji od 50 000 stanica po jažici na pločice s 12 jažica. Stanice su inkubirane 24 h. Nakon inkubacije u jažice je dodan je fotosenzibilizator u koncentraciji od 5 μM , 10 μM , 20 μM i 50 μM . Važno je da uvijek jedna jažica nije bila tretirana porfirinom te je služila kao negativna kontrola. Stanice tretirane fotosenzibilizatorom inkubirane su na 24 h. Nakon 24 h uklonjen je medij te su stanice isprane PBS-om (3 x 1 mL) kako bi se uklonio porfirin koji nije ušao u stanice. Jedna pločica je osvijetljena crvenim svjetlom (valna duljina 643 nm, intenzitet 2 mW cm^{-2}) tijekom 30 minuta. Nadalje, u jažice je dodan 1 mL 4% paraformaldehida (PFA) te su stanice inkubirane s PFA 20 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon fiksacije, stanice su isprane s PBS-om (3 x 1 mL) te je dodan 1 mL DAPI boje po jažici razrijeđene s PBS-om u omjeru 1:1000. DAPI je fluorescentna boja koja interkalira u DNA te tako omogućava vizualizaciju jezgre. Nakon inkubacije od 5 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi, stanice su još

jednom isprane PBS-om. U sljedećem koraku stakalca su izvučena iz jažica te osušena. Stakalca su postavljena tako da su stanice okrenute prema dolje te su pomoću Aqua-Poly/Mount medija (Polysciences, Inc.) zalijepljena na predmetno stakalce. Stakalca su slikana na Olympus IX83 fluorescentnom mikroskopu s povećanjem od 60x.

3.4.2.2. Kolokalizacija porfirina s mitohondrijima

Stanice su nasađene u koncentraciji od 50 000 stanica po jažici na pločicu s 12 jažica te su inkubirane 24 h. Nakon inkubacije jažice su tretirane s 5 μ M porfirina te su inkubirane 24 h. Nakon 24 h uklonjen je mediji, stanice su isprane PBS-om (3 x 1mL) te je pločica sa stanicama u 0,5 mL PBS-a osvijetljena crvenim svjetlom (850W) na 30 minuta. Za fiksaciju u jažice je dodan 1 mL 4% PFA na 20 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon fiksacije, stanice su isprane s PBS-om (3 x 1 mL) te su permeabilizirane dodatkom 600 μ L 0,5% detergenta Triton X-100 u PBS tijekom na 7 minuta. Vrlo je važno napomenuti da se stanice ne smiju puštati dulje od 7 minuta s reagensom za permeabilizaciju jer postoji mogućnost da će se oštetiti. Nadalje, nakon 7 minuta stanice su isprane s PBS-om (1 mL) te je u jažice dodano 600 μ L 3% BSA s 0,2% Triton X-100/PBS tijekom 30 minuta kako bi se blokiralo nespecifično vezanje protutijela. Nakon blokiranja, u jažice je dodano 150 μ L primarnog protutijela anti-Hsp60 (1:400 razrijeđeno u 3%BSA/0,2% Triton X-100/PBS, Sigma) te su stanice inkubirane s primarnim protutijelom sat vremena. Nakon toga, stanice su isprane s PBS-om (3 x 1mL) te je u jažice dodano sekundarno anti-mišje protutijelo konjugirano s fluoroforom Alexa Fluor 488 (1:400 razrijeđeno u 3%BSA/0,2% Triton X-100/PBS, Invitrogen). Stanice su inkubirane sa sekundarnim protutijelom sat vremena, a nakon toga su isprane PBS-om (3 x 1 mL) te je dodan 1 mL DAPI boje po jažici (1:1000 razrijeđeno s PBS-om). Nakon inkubacije od 5 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi, stanice su još jednom isprane PBS-om. Na posljetku, stakalca su izvučena iz jažica te osušena. Stakalca su postavljena tako da su stanice okrenute prema dolje te su pomoću

Aqua-Poly/Mount medija (Polysciences, Inc.) zalijepljena na predmetno stakalce. Stakalca su slikana na Olympus IX83 fluorescentnom mikroskopu s povećanjem od 60x.

3.4.3. Western blot analiza

Kao što je spomenuto, za Western blot analizu stanice su nasadene u koncentraciji od 200 000 stanica po jažici na pločice s 12 jažica. Uvijek su se nasadivale 2 identične pločice kako bi jedna pločica bila osvijetljena nakon tretmana porfirinom, a druga ostala neosvijetljena. Stanice su inkubirane 24 h. Nakon inkubacije u jažice je dodan fotosenzibilizator u koncentraciji od 5 μ M, 10 μ M i 20 μ M. I u ovom slučaju uvijek je jedna jažica ostala netretirana te je služila kao negativna kontrola. Nakon 24 h uklonjen je mediji te su stanice isprane PBS-om (3 x 1 mL) te je jedna pločica osvijetljena crvenim svjetlom (643 nm, 2 mW cm⁻²) na 30 minuta.

3.4.3.1. Izolacija proteina

Nakon osvijetljavanja jedne pločice, stanice u obje pločice su lizirane u RIPA puferu (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5% natrijev deoksikolat, 1% Triton X-100 (Fischer Scientific), pH 8) u prisutnosti proteaznih i fosfataznih inhibitora (Roche). Liziranje stanica potpomognuto je struganjem uz pomoć nastavaka pipete te su lizirane stanice prebačene u Eppendorf tubice od 1,5 mL. Stanični lizati su zatim inkubirani 30 minuta na ledu. Nakon inkubacije, centrifugirani su 10 minuta na 14000 rpm pri 4°C. Nakon centrifugiranja željeni proteini se nalaze otopljeni u supernatantu te je 90 μ L supernatanta iz svake Eppendorf tubice prebačeno u nove označene Eppendorf tubice gdje je dodan 4X Laemmli pufer za uzorke (50 mM Tris pH 6,8, 10% glicerol, 2% SDS, 2% 2-merkaptoetanol, 0,04% bromophenol blue).

3.4.3.2. SDS-PAGE elektroforeza (natrijev dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza)

Proteini su razdvajani pomoću SDS-PAGE elektroforeze na 15% gelu za Tom20 (15% akrilamid + bisakrilamid (Rotiphorese Gel 40), 1,5 M Tris

pH 8.8, 10% SDS, 10% amonijev persulfat (APS), 0.01% tetrametiletilendiamin (TEMED)) i 12% gelu (12% akrilamid + bisakrilamid, 1,5 M Tris pH 8.8, 10% SDS, 10% APS i 0.01% TEMED) za Hsp60, mitofuzin i β -aktin. Sabijajući gel je uvijek bio 5% (5% akrilamid+bisakrilamid; 1M Tris HCl pH 6,8, 10 % SDS, 10 % APS i 0,01% TEMED). Nakon izrade i polimerizacije oba gela (razdvajajućeg i sabijajućeg), stakalca su stavljena u kadnicu za elektroforezu koja je zatim napunjena s 1X SDS-PAGE puferom (1 mM SDS, 3 mM Tris, 14.4 mM glicin). Uzorci su grijani 10 minuta na 95°C u termobloku, a nakon toga su vorteksirani i kratko centrifugirani. Nakon toga, uzorci su bili spremni za nanošenje na gel, a uz uzorke nanesen je i proteinski marker (Tricolor Proein Marker; Roth). Elektroforeza je provedena pri 100 V dok su proteini putovali kroz sabijajući gel, a kada su dospjeli do razdvajajućeg gela, struja je povećana na 130V.

3.4.3.3. Transfer proteina na membranu

Za transfer proteina korištena je nitrocelulozna membrana (veličina pore 0,45 μ m) za 12% gel jer smo pomoću nje hvatali veće proteine te PVDF membrana (veličina pore 0,2 μ m, Immobilion) za 15% gel jer je ona puno osjetljivija od nitrocelulozne membrane te smo pomoću nje hvatali manje proteine. Potonju je prethodno bilo potrebno aktivirati u metanolu 30 sekundi te isprati u 1x transfer puferu (25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS i 20% metanol). U kazetu za transfer redom je složena spužva, Whatman papir, gel, membrana, Whatman papir te spužva. Sve je dobro učvršćeno te uronjeno u kadnicu s 1X transfer puferom. Proteinski transfer proveden je u 65 minuta za Tom20, te 90 minuta za ostale proteine pod konstantnom strujom od 100 V ili 400 mA.

3.4.3.4. Imunodetekcija

Nakon transfera potrebno je blokirati membranu kako bi se minimaliziralo nespecifično vezanje. Za blokiranje membrane je korišten 5% BSA (*engl.* bovine serum albumin, Roche Kit) u 0,1% TBS-T puferu (10% TBS, 0,1% Tween 20). Membrana uronjena u pufer je inkubirana 1

h na vertikalnoj tresilici pri sobnoj temperaturi. Nadalje, membrane su inkubirane s primarnim protutijelima anti-Hsp60 (razrijeđen 1:1000 od početne koncentracije, Sigma), anti-mitofuzin (razrijeđen 1:1000 od početne koncentracije, Sigma), anti-Tom20 (razrijeđen 1:1000 od početne koncentracije, Sigma) preko noći na 4°C. Nakon inkubacije, membrane su isprane 3 puta po 10 minuta s 0,1% TBS-T. Kao sekundarna protutijela korištena su anti-zečje za mitofuzin i Tom20 te anti-mišje za Hsp60 protutijelo, oba obilježena s peroksidazom iz hrena (HRP) (1:2500 od početne koncentracije od 0,8 mg/mL; Jackson). Membrane su inkubirane s odgovarajućim sekundarnim protutijelima 1 h pri sobnoj temperaturi na vertikalnoj tresilici. Za detekciju aktina korišteno je primarno protutijelo obilježeno HRP-om (1:25000 od početne koncentracije od 2 mg/mL; Sigma) s kojim je membrana inkubirana 30 minuta. Nakon toga, membrane su ponovo isprane 3 puta po 10 minuta s 0,1% TBS-T. Na posljetku, membrane su inkubirane 1 minutu s kemiluminiscentnim supstratom (*engl.* Lumi light WB supstrate; Roche) za detekciju HRP aktivnosti te su slikane na Bio-Rad uređaju na kojemu su očitani i kolorimetrijski markeri koji služe za određivanje molekularne mase proteina.

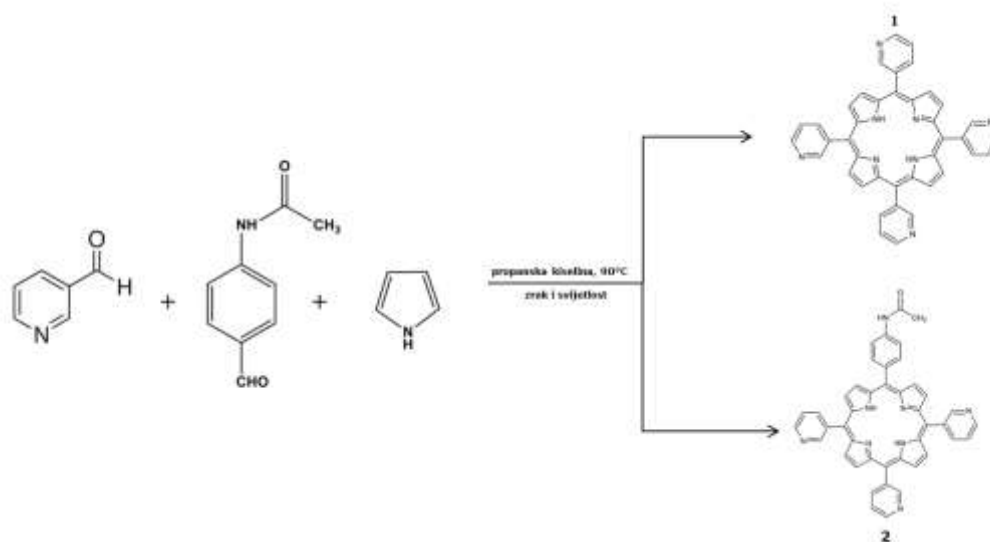
3.5. Kvantifikacija i statistička obrada podataka

Za kvantifikaciju proteina na Western Blot membranama korišten je program Image J. U programu GraphPad6 napravljena je statistička analiza podataka.

4. REZULTATI

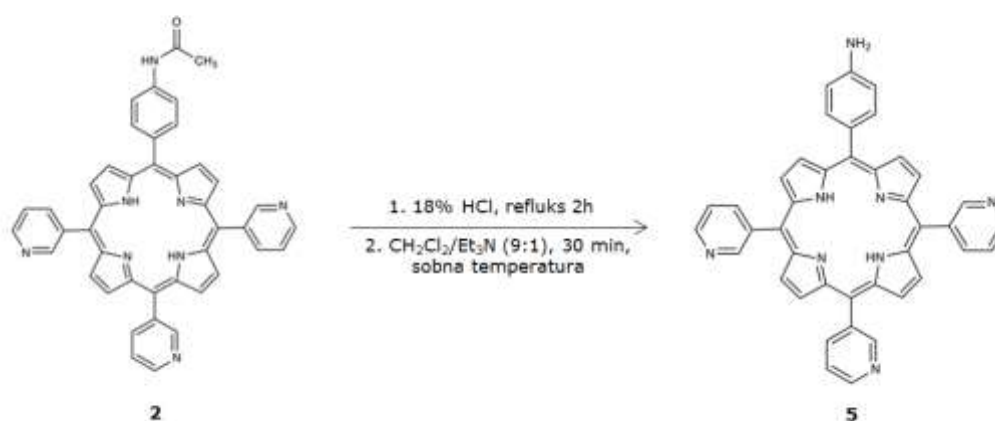
4.1. Sinteza spojeva

Sinteza spojeva prema prethodno opisanom postupku [18] započeta je modificiranom Adlerovom metodom te sintezom asimetričnog porfirina (**2**) koji je dalje korišten za sintezu konačnih produkata. Kao nusprodukt ove reakcije dobiven je i simetrični porfirin koji nije korišten za daljnje reakcije. Za pročišćavanje reakcijske smjese do konačnog produkta bile su potrebne tri kolonske kromatografije zbog toga što je, osim simetričnog porfirina koji se nije koristio dalje te ga je bilo potrebno ukloniti, bilo mnogo nečistoća i drugih nusprodukata. U ovoj reakciji vrlo je bitan pristup zraku kako bi se međuprodukt porfirinogen oksidirao u porfirin. Spojevi **1** i **2** sintetizirani su i pročišćeni s iskorištenjima 3,65 % i 2,98 % (**Slika 7**).



Slika 7. Shematski prikaz sinteze asimetričnog **2** i simetričnog piridilporfirina **1**

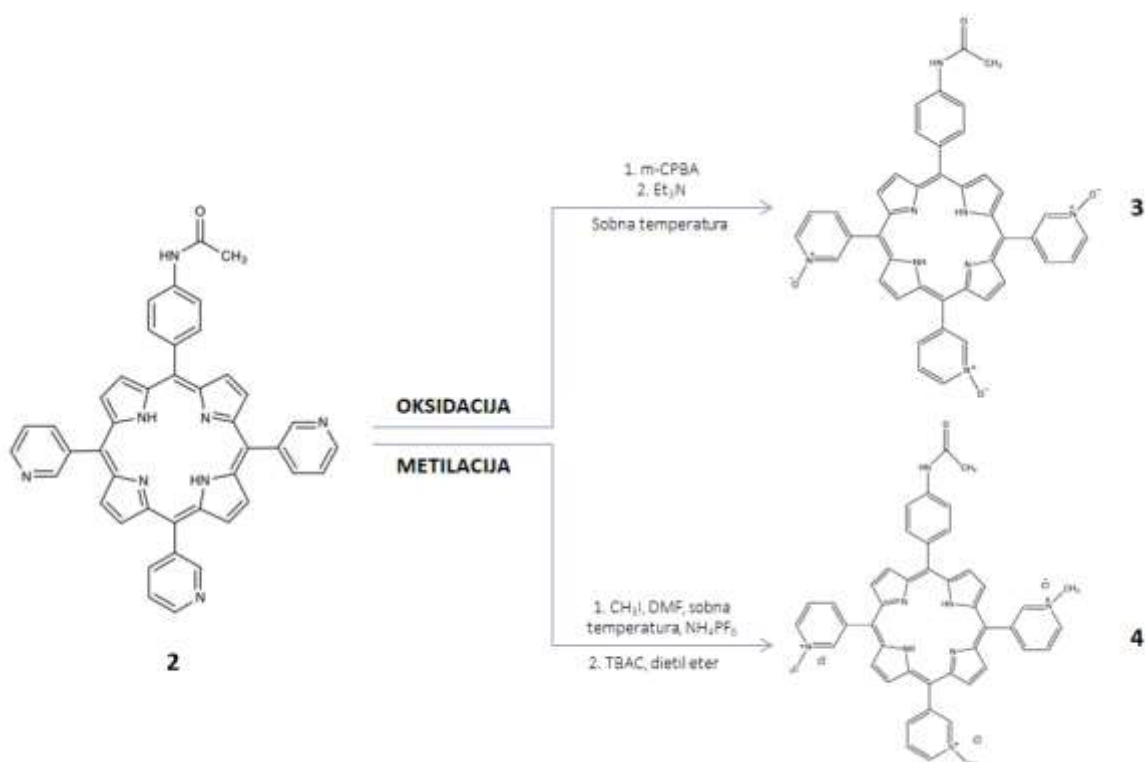
Nadalje, ukupna količina asimetričnog porfirina **2** odvojena je na tri djela za daljnje reakcije. Jedan dio se dalje koristio za reakciju hidrolize spoja **2** u amin **5** koja je izvedena u vodenoj otopini HCl s iskorištenjem od 70,43 % (**Slika 8**).



Slika 8. Shematski prikaz hidrolize spoja **2** u amin **5**

Druga dva prethodno odvojena djela modificirana su reakcijama *N*-metilacije te *N*-oksidacije prema opisanom postupku [18] uz određene modifikacije. *N*-metilacija je provedena dokapavanjem CH₃I u otopinu asimetričnog porfirina **2** koji je prethodno otopljen u DMF. Ova reakcija se odvijala 7 sati zaštićena od svjetla te je napredak reakcije praćen tankoslojnom kromatografijom. Kako bi spoj precipitirao korišten je NH₄PF₆. S obzirom na to da je produkt izoliran kao jodidna sol koja je slabo topljiva u vodi, jodidni ioni su ionskom izmjenom zamijenjeni s kloridnim ionima. Kao ionski izmjenjivač korišten je tetrabutilamonijev klorid (TBAC). Kako bi se isprao sav TBAC u suvišku, izolirani produkt je ispran dietil-eterom. Konačni produkt **4** je dobiven s iskorištenjem od 70,92 % (**Slika 9**).

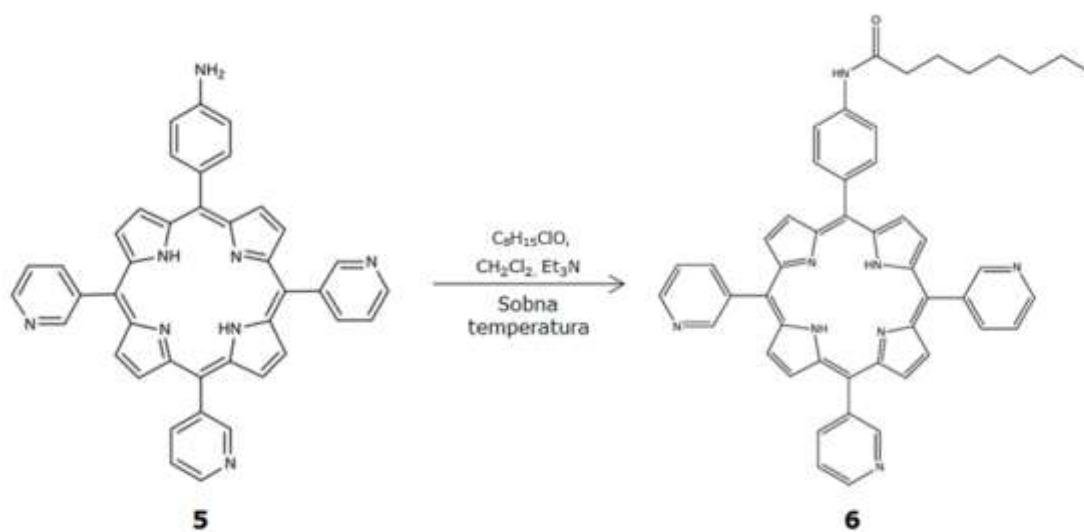
N-oksidacija je provedena uz pomoć *meta*-kloroperbenzojeve kiseline. Navedena kiselina dodavana je kroz pola sata u otopinu porfirina **2**. Porfirin **2** je prethodno otopljen u suhom diklormetanu. Reakcija oksidacije se odvijala pri sobnoj temperaturi, a zaustavljena je uz kap Et₃N nakon 40 minuta. Konačni produkt **3** dobiven je s iskorištenjem od 106 % što ukazuje na zaostalo otapalo i/li nečistoće u konačnom produktu (**Slika 9**).



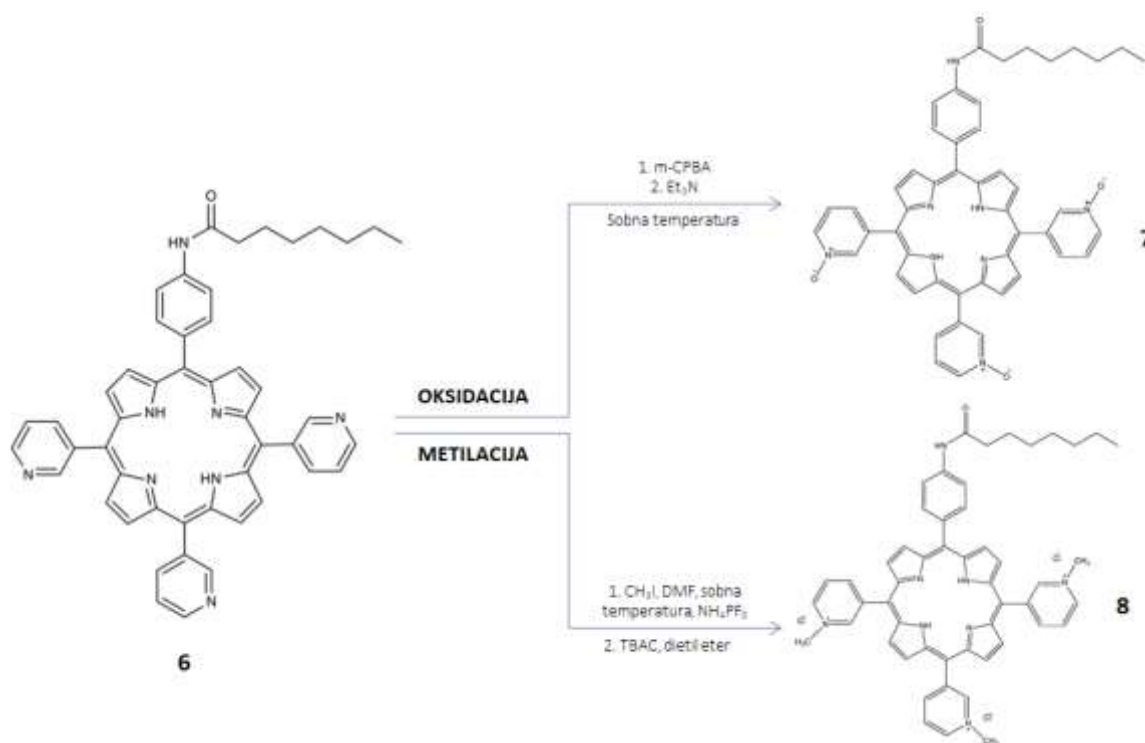
Slika 9. Shematski prikaz *N*-metilacije i *N*-oksidacije asimetričnog porfirina **2**

Prethodno sintetizirani amin **5** dalje je modificiran dodatkom alifatskog lanca. Naime, reakcijom nukleofilne acilne supstitucije je amin **5** pomoću oktanoil-klorida preveden u amidni produkt **6** s iskorištenjem od 85,16 % (**Slika 10**). Nadalje, navedeni amidni produkt **6** podvrgnut je istim reakcijama (*N*-oksidacija i *N*-metilacija) kao i asimetrični porfirin **2**. Navedene reakcije izvedene su na identičan način u istim uvjetima te s

istim reagensima kao i prethodne. Konačni produkti **7** i **8** sintetizirani su s iskorištenjima 130 % i 33,95 % (**Slika 11**).



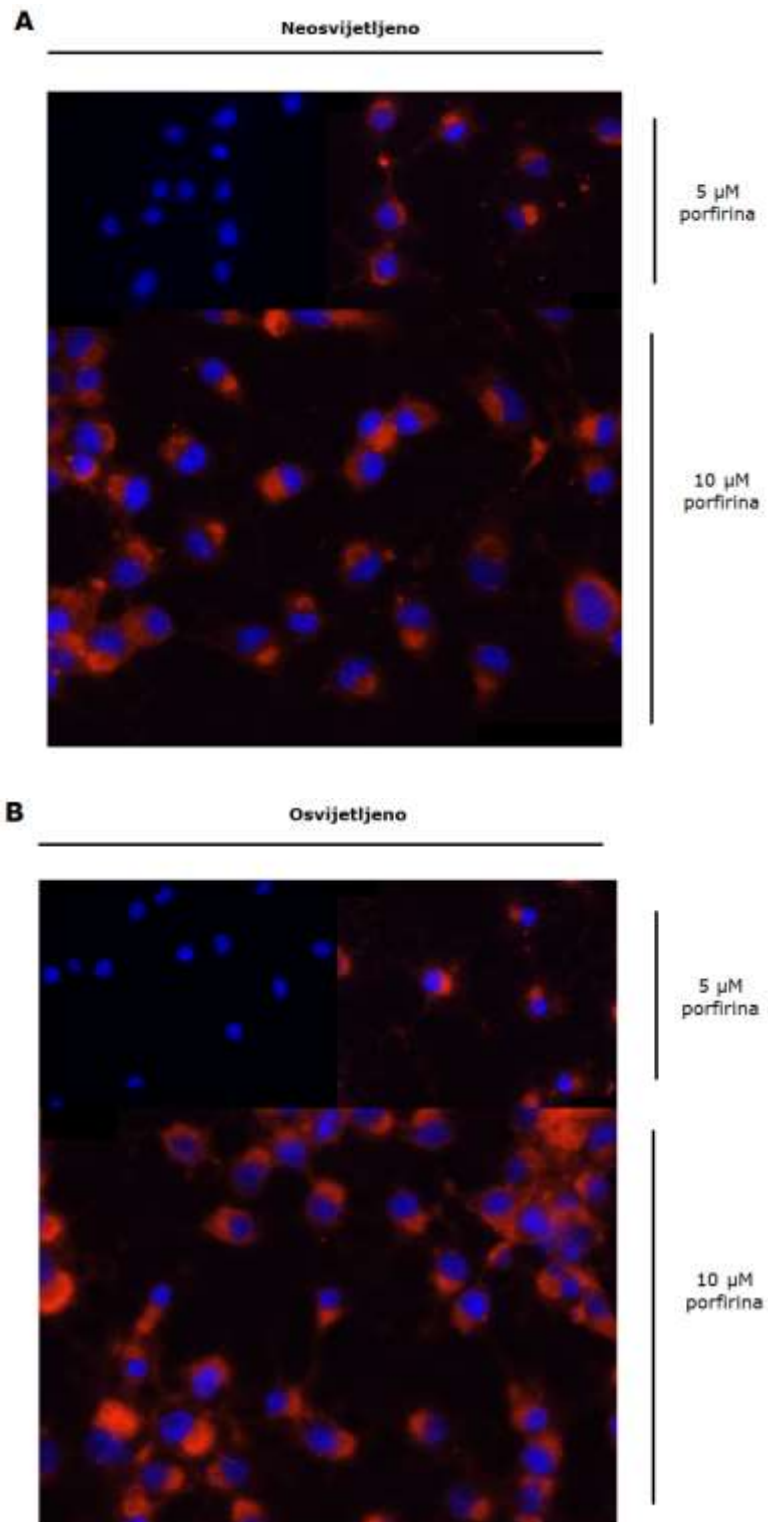
Slika 10. Shematski prikaz reakcije nukleofilne acilne supstitucije amina **5** u amidni produkt **6**



Slika 11. Shematski prikaz N-metilacije i N-oksidacije amidnog produkta **6**

4.2. Internalizacija porfirina u Neuro2A stanice

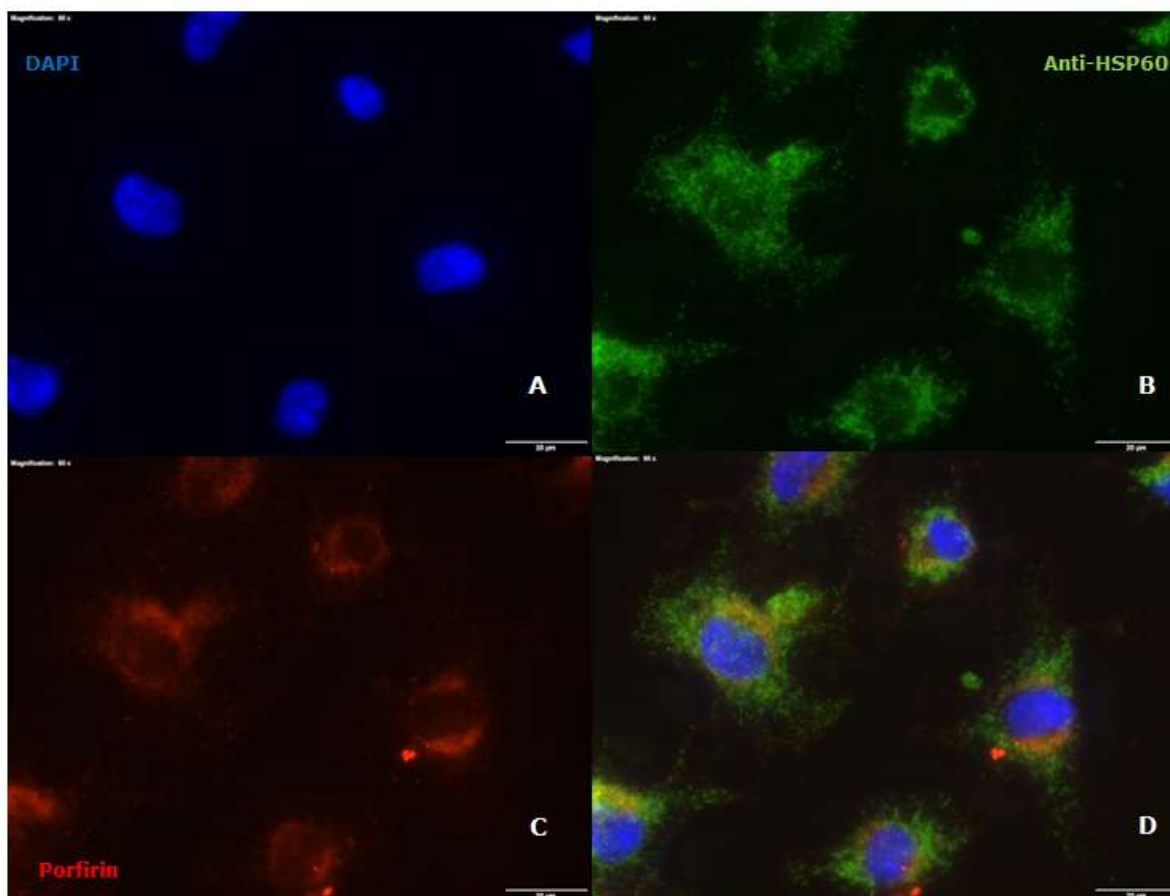
Kako bi porfirin djelovao unutar stanice, vrlo je bitna njegova internalizacija te lokalizacija u ciljnim stanicama. Kako bi se uopće mogao ispitati učinak porfirina na stanice prvo je potrebno saznati kojom se uspješnošću isti internalizira u stanice. U ovom radu se ispitala internalizacija amfifilnog spoja 5-(4-oktadekanamidofenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin triklorid, a ista je ispitana tako što su stanice inkubirane s različitim koncentracijama navedenog porfirina (5 μ M i 10 μ M) na 24 h. Nakon 24 h, ispran je medij u kojemu su stanice inkubirane kako bi na fluorescentnom mikroskopu bio vidljiv samo porfirin koji je prisutan unutar stanica. S obzirom na to da ispitivani porfirin posjeduje nativnu fluorescenciju u crvenom dijelu spektra, jasno se može vidjeti da je porfirin uspješno ušao u stanice (**Slika 12**). Također, može se zamijetiti da nema razlike u internalizaciji porfirina između osvijetljenih i neosvijetljenih stanica, a primjećuje se tek neznatna razlika u količini porfirina unutar stanica kada se uspoređuju stanice tretirane s 5 μ M u odnosu na stanice tretirane s 10 μ M (**Slika 12**). Upravo iz tog razloga, za daljnja ispitivanja odlučeno je da će se stanice tretirati s manjom koncentracijom porfirina (5 μ M) s obzirom na to da je uspješnost internalizacije jednaka, a potrošnja ispitivanog spoja manja.



Slika 12. Uspješna internalizacija porfirina u stanice. *Internalizacija porfirina u koncentraciji od 5 μ M i 10 μ M nakon 24 h: (A) neosvijetljene Neuro2A stanice; (B) osvijetljene Neuro2A stanice; snimljeno na fluorescentnom mikroskopu Olympus IX83 s povećanjem od 60X. Prikazane su reprezentativne slike od 2 pokusa.*

4.3. Ispitivanje kolokalizacije porfirina s mitohondrijima

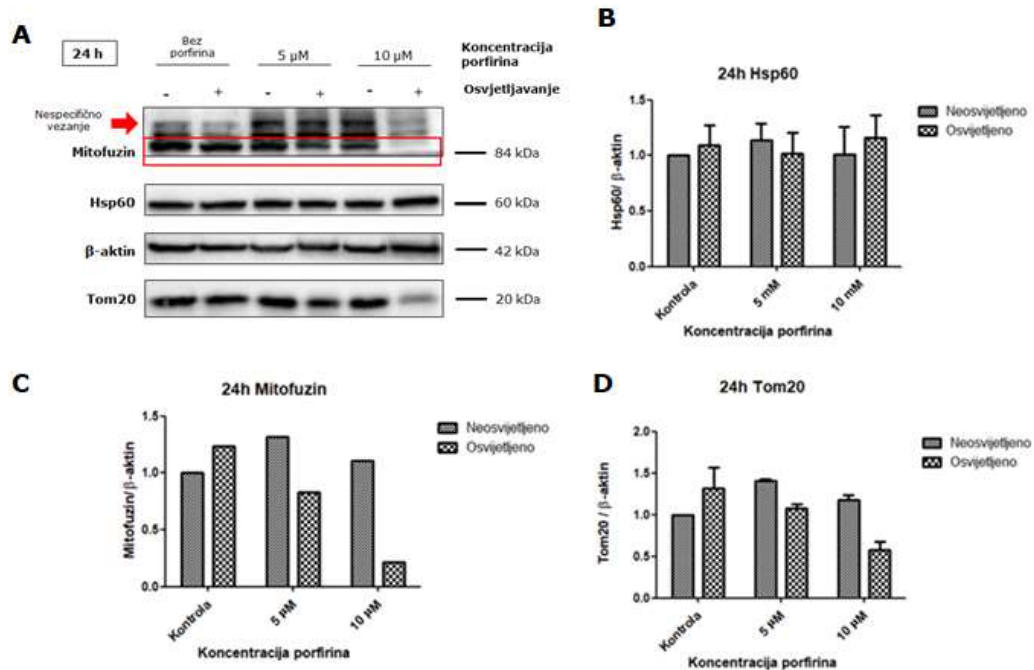
Smatra se kako određene karakteristike fotosenzibilizatora poput naboja, lipofilnosti te trodimenzionalne strukture imaju značajan utjecaj na njihovu internalizaciju u stanice, ali ponajprije na njihovu distribuciju u samim stanicama. Naime, zbog svojih karakteristika se mogu preferencijalno lokalizirati u specifičnim staničnim odjeljcima te tako ciljati više ili manje osjetljive stanične strukture [1]. Porfirin korišten za ispitivanja u ovome radu posjeduje alkilni lanac od 18 C atoma na *para* položaju fenilne skupine što povećava ukupnu lipofilnost molekule. Iz tog razloga se pretpostavlja kako bi se ispitivani spoj trebao inkorporirati u lipidni dvosloj staničnih membrana, a zbog svog dugog alkilnog lanca smještenog na *para* položaju, očekuje se njegova povećana akumulacija u mitohondrijima. Nadalje, u literaturi se može vidjeti da i ukupan naboj porfirina igra važnu ulogu u njegovoj substancičnoj lokalizaciji te da se kationski fotosenzibilizatori preferencijalno nakupljaju u mitohondriju [15]. U ovom radu ispitana je kolokalizacija kationskog amfifilnog spoja koji posjeduje tri pozitivno nabijena piridilna dušika u porfirinskom prstenu te dugačak alkilni lanac na *para* položaju. Kolokalizacija je ispitana na fluorescentnom mikroskopu tako što su mitohondriji obilježeni primarnim anti-Hsp60 protutijelom i sekundarnim anti-mišjim protutijelom konjugiranim sa zelenim fluoroforom Alexa Fluor 488, a stanice su tretirane s 5 μ M porfirina koji posjeduje nativnu crvenu fluorescenciju. U slučaju preklapanja dviju fluorescencija, odnosno kolokalizacije porfirina s mitohondrijima, vidjelo bi se žuto obojenje. Rezultati su pokazali da su mitohondriji bili smješteni širom citoplazme (**Slika 13B**). Internalizirani porfirini su također bili u citoplazmi, ali ne u mitohondrijima već prvenstveno u blizini DAPI-obojenih jezgara tj. perinuklearno (**Slika13D**). Perinuklearna distribucija porfirina možda može upućivati na kolokalizaciju s Golgijevim aparatom. Dakle, iz dobivenih rezultata se može zaključiti da porfirini u ovom slučaju ne kolokaliziraju s mitohondrijima.



Slika 13. Porphirini ne kolokaliziraju s mitohondrijima. Stanice tretirane porfirinom u koncentraciji od 5 μ M tijekom 24 sata. Nakon fiksacije, jezgre stanica obojane su s DAPI bojom, a mitohondriji obilježeni s anti-Hsp60 te sekundarnim anti-mišjim Alexa Fluor 488 protutijelima. (A) DAPI; (B) Hsp-60; (C) porfirin; (D) Slika nastala preklapanjem slika A, B i C; snimljeno na fluorescentnom mikroskopu Olympus IX83 s povećanjem od 60X.

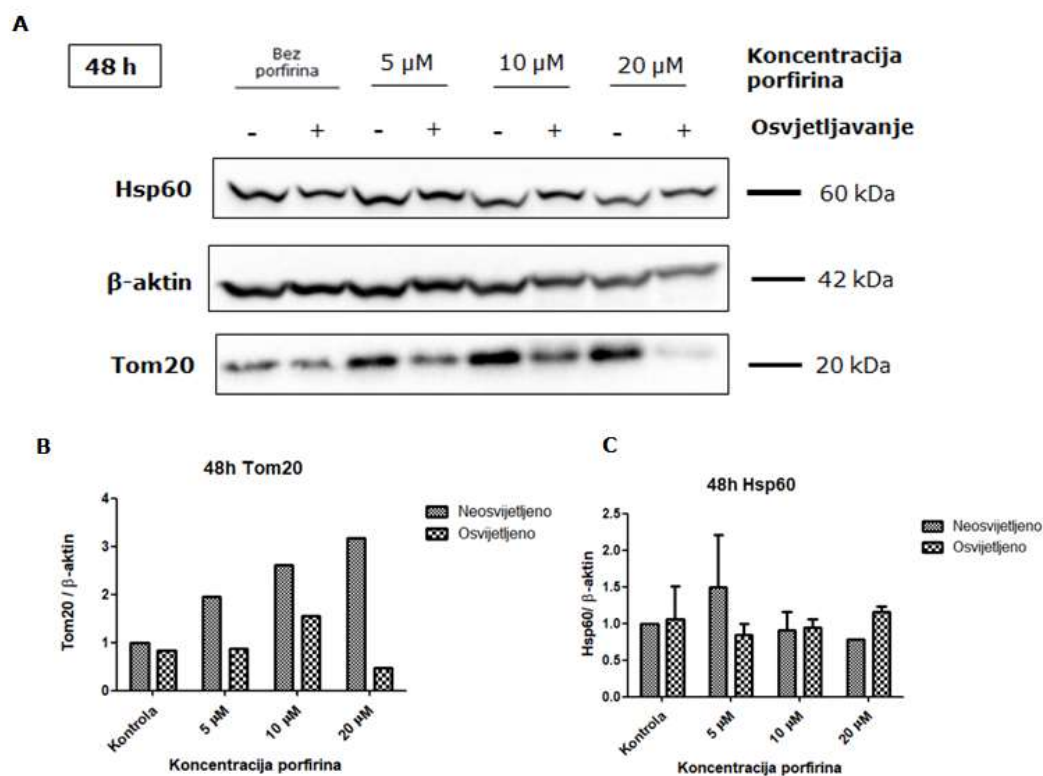
4.4. Vanjska membrana mitohondrija narušena je uslijed djelovanja aktiviranog porfirina

Iako smo pokazali da ispitivani porfirin ne kolokalizira s mitohondrijima te ne oštećuje direktno mitohondrije, ispitali smo indirektan učinak koji porfirin posjeduje na mitohondrije putem analize količine mitohondrijskih proteina u stanicama koje su tretirane s porfirinom u usporedbi s netretiranim stanicama. S obzirom da se pretpostavlja kako fotosenzibilizator bez prethodnog osvjetljavanja nema nikakvog utjecaja na stanice, samo dio stanica tretiranih porfirinom je osvjetljeno na 30 minuta crvenom svjetlošću kako bi se mogla ispitati ta tvrdnja. Za početak, stanice su inkubirane s porfirinom u dvije različite koncentracije (5 μ M i 10 μ M) na 24 sata. Nakon 24 sata tretman je prekinut, stanice su lizirane te su proteini izolirani iz stanica. Količina proteina prisutna u stanicama kvantificirana je pomoću Western blot metode. Analizirana je količina tri različita mitohondrijska proteina (mitofuzin, Hsp60, Tom20) u odnosu na β -aktin, stanični protein ubikvitarno prisutan koji omogućuje normalizaciju rezultata. Vidljivo je da uistinu neosvjetljeni porfirin nije djelovao na stanice jer je količina svih mitohondrijskih proteina ista kao i u kontroli (**Slika 14**). Nakon osvjetljavanja stanica tretiranih porfirinom količina mitofuzina i Tom20 se smanjila srazmjerno s količinom dodanog porfirina. S obzirom da se mitofuzin i Tom20 nalaze na vanjskoj membrani, može se zaključiti da porfirin narušava vanjsku membranu mitohondrija. S druge strane, pokazalo se da porfirin nema nikakav utjecaj na količinu proteina Hsp60. S obzirom na to da se Hsp60 nalazi unutar matriksa mitohondrija, može se zaključiti da oštećeni porfirini ne odlaze u mitofagiju koja bi bila vidljiva ukoliko bi se smanjivala količina svih promatranih mitohondrijskih proteina.



Slika 14. Oštećenje vanjske mitohondrijske membrane uslijed djelovanja porfirina. Stanice su tretirane 24 h s 5 μM i 10 μM porfirina. Western blot-om je analizirana količina proteina (A). Dobiveni rezultati su kvantificirani u Image J programu te prikazani kao protein/ β -aktin te normalizirani na netretirane stanice za Hsp60 (B), mitofuzin (C) i Tom20 (D). Za mitofuzin su pokazani podaci od jednog eksperimenta. Za Hsp60 i Tom20, podaci su prikazani kao prosječna vrijednost \pm SD dva eksperimenta. Koristeći sparni t-test u GraphPrism6 napravljena je statistička analiza značajnosti, međutim ni jedan rezultat nije bio značajan.

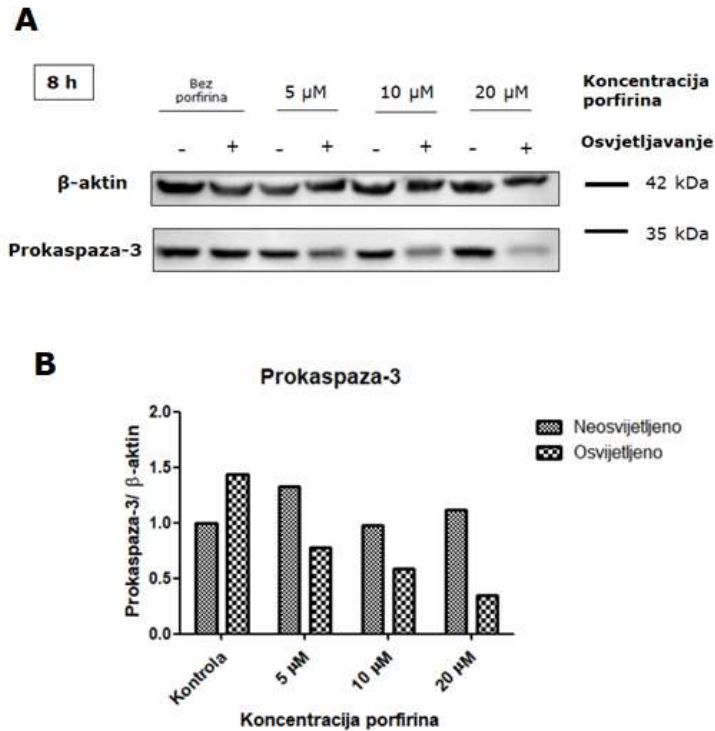
Kako bi se pokušali dostići uvjeti pri kojima djelovanje porfirina uzrokuje mitofagiju povećana je duljina trajanja tretmana na 48h te je dodana još jedna koncentracija porfirina (20 μ M). Vidjeli smo da se ni pri tim uvjetima količina proteina Hsp60 nije smanjila (**Slika 15**) što potvrđuje prethodni zaključak da porfirin uistinu nema učinak na navedeni protein te djelovanje porfirina ne uzrokuje mitofagiju. S druge strane, ispitan je i učinak na mitofuzin i Tom20 kako bi se potvrdila hipoteza da uslijed djelovanja porfirina dolazi do oštećenja vanjske mitohondrijske membrane. Rezultati nisu uspješno prikupljeni za mitofuzin jer je na gelu bilo prisutno mnogo nespecifičnog vezanja protutijela te nije bilo moguće razlikovati mitofuzin od nespecifičnog vezanja. U slučaju proteina Tom20 se jasno moglo vidjeti da je produženo trajanje tretmana te dodatna koncentracija porfirina doprinijela smanjenju količine spomenutog proteina u stanicama te da je pri koncentraciji od 20 μ M količina Tom20 gotovo nedetektabilna što ukazuje na značajno oštećenje vanjske mitohondrijske membrane (**Slika 15**). Također, vidljivo je da stanice koje nisu bile osvijetljene, nisu pretrpjele nikakva oštećenja (**Slika 15**).



Slika 15. Djelovanje porfirina ne uzrokuje nastupanje mitofagije. Stanice su tretirane 48 h s 5 μ M, 10 μ M i 20 μ M porfirina. Western blot-om je analizirana količina proteina (A). Dobiveni rezultati su kvantificirani u Image J programu te prikazani kao protein/ β -aktin te normalizirani na netretirane stanice za Tom20 (B) i Hsp60 (C). Za Tom20 su pokazani podaci od jednog eksperimenta. Za Hsp60, podaci su prikazani kao \pm SD dva eksperimenta te koristeći spareni t-test u GraphPrism6 napravljena statistička analiza značajnosti, međutim ni jedan rezultat nije bio značajan.

4.5. Stanice tretirane porfirinom umiru apoptozom

Zbog pronalaska da aktivirani fotosenzibilizator 5-(4-oktadekanamidofenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin triklorid uzrokuje oštećenje vanjske membrane mitohondrija u Neuro2a stanicama, istražili smo da li to potiče staničnu smrt. Stanice su tretirane 8 h s tri različite koncentracije porfirina (5 μ M, 10 μ M i 20 μ M) te je promatrano da li dolazi do aktivacije kaspaza. U ovome radu ispitana je prisutnost prokaspaze-3 koja, ako je prisutna u stanici, ukazuje na to da nije došlo do njezine aktivacije te stanica ne odlazi u apoptozu. S druge strane, ako u stanici nema prokaspaze-3 znači da je aktivirana cijepanjem na dvije manje podjedinice te da je pokrenuta signalna kaskada koja dovodi do apoptoze. Iz rezultata je vidljivo da u prisutnosti porfirina nakon osvjetljavanja, količina prokaspaze-3 se smanjuje s povećanjem koncentracije porfirina što ukazuje na nastupanje apoptoze (**Slika 16**). Dakle, može se zaključiti da stanice tretirane porfirinom, nakon osvjetljavanja, umiru apoptozom. Navedene rezultate potrebno je još potvrditi pomoću markera za aktiviranu kaspazu-3.



Slika 16. Oštećenje mitohondrija potiče apoptozu. Stanice su tretirane 8 h s 5 μ M, 10 μ M i 20 μ M porfirina. Western blot-om je analizirana količina proteina (A). Dobiveni rezultati su kvantificirani u Image J programu te prikazani kao protein/ β -aktin te normalizirani na netretirane stanice za prokaspazu-3 (B). Pokazani su podaci od jednog eksperimenta.

5. RASPRAVA

5.1. Sinteza piridilporfirina

Porfirini su sastavni dio prostetskih skupina mnogih ključnih bioloških produkata. U proteklih 100 godina porfirini su izazvali veliko zanimanje u znanstvenim krugovima, te je njihova struktura, funkcija i sinteza uvelike istraživana. Međutim, usprkos mnogim pokušajima optimizacije sinteze porfirina, i dalje je jedan od najvećih problema prilikom sinteze pročišćavanje i vrlo mali prinos konačnog produkta, posebice ukoliko je ciljani produkt asimetrični porfirin [8]. U ovome radu, modificiranom Adlerovom metodom, sintetiziran je asimetrični porfirin, uz simetrični porfirin kao očekivani, ali neželjeni produkt navedene reakcije. Nakon pročišćavanja, koje je bilo dosta zahtjevno zbog velike količine nečistoća u reakcijskoj smjesi, izoliran je asimetrični produkt s vrlo malim prinosom dok je, s druge strane, izoliran i simetrični produkt koji je imao puno veći prinos. Nadalje, hidroliza acetamidne skupine na fenilu asimetričnog porfirina te dodavanje alifatskog lanca na dobivenu slobodnu amino-skupinu su dvije jednostavne reakcije koje su se odvijale bez problema te su prinosi bili zadovoljavajući. Problemi su se pojavili prilikom reakcija *N*-oksidacije i *N*-metilacije piridilnih skupina. Naime, navedenim reakcijama podvrgnuti su običan asimetrični porfirin sintetiziran u prvom koraku te asimetrični porfirin koji je modificiran dodatkom alifatskog lanca od 8 C atoma na *para* poziciju fenilne skupine. U oba slučaja problemi su bili jednaki. Prilikom *N*-oksidacije oba spoja, bilo je vrlo teško u potpunosti pročistiti oksidirani konačni produkt kolonskom kromatografijom što se u konačnici može vidjeti po dobivenim iskorištenjima od 106% i 130% što ukazuje na zaostale nečistoće ili zaostalo otapalo u konačnim produktima. Nadalje, prilikom *N*-metilacije bilo je teško kompletno pročistiti spoj u vidu kompletnog odstranjivanja ionskog izmjenjivača TBAC. Bilo je potrebno u više navrata ispirati spoj s dietil-eterom kako bi se uklonio TBAC, međutim i nakon višestrukog ispiranja metiliranog produkta s dietil-eterom, TBAC je i dalje bio vidljiv na

^1H NMR spektru metiliranog spoja. U konačnici, odabran je spoj **7**, metilirani porfirin s alifatskim lancem, za daljnja biološka ispitivanja, no nakon NMR analize zaključeno je da navedeni spoj nije moguće koristiti zbog nezadovoljavajuće čistoće. Naime, prvotno je problem bio u zaostalom TBAC-u, međutim nakon dodatnog pročišćavanja s dietil-eterom, na NMR-u su zamijećene nečistoće na alifatskom lancu. Navedeno onečišćenje nije bilo moguće pročitati stoga je korišten fotosenzibilizator 5-(4-oktadekanamidofenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin triklorid koji je prethodno sintetiziran u Laboratoriju za organsku kemiju i kemiju čvrstog stanja Odjela za biotehnologiju te ispitan u biološkim eksperimentima [18].

5.2. Internalizacija porfirina u Neuro2A stanice

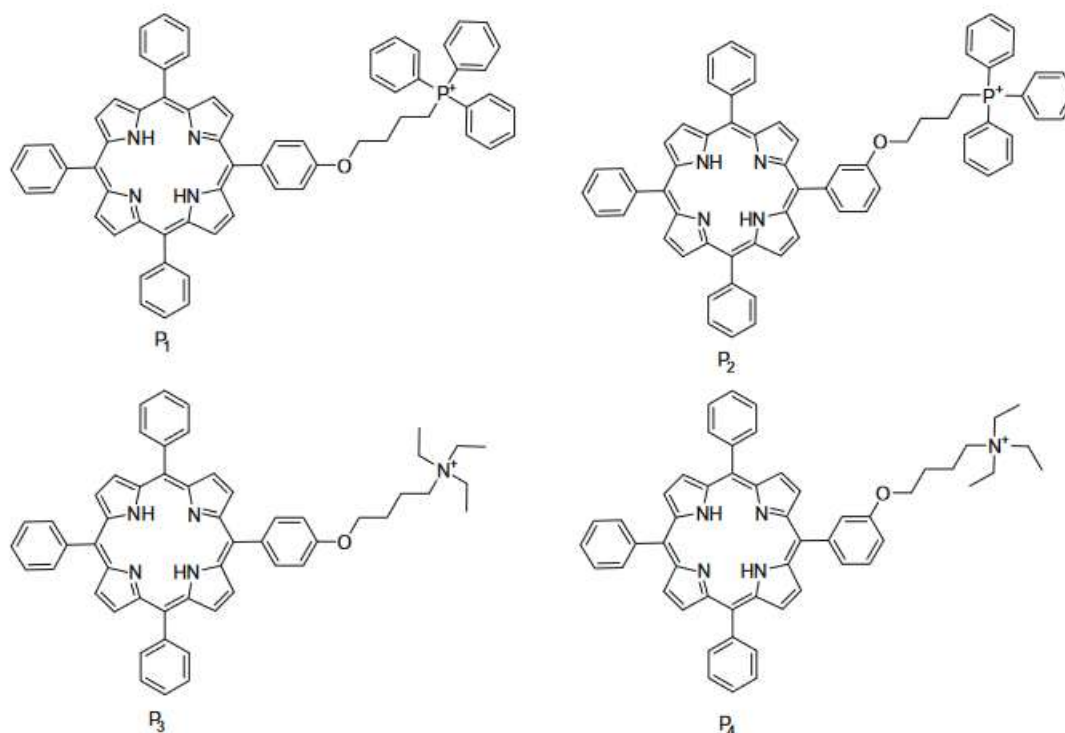
Kao što je već spomenuto u radu, ukupni naboj, raspodjela naboja i lipofilnost molekule su među najvažnijim parametrima koji kontroliraju stanični unos i unutarstaničnu lokalizaciju fotosenzibilizatora. Dodatni faktor koji utječe na unošenje i lokalizaciju fotosenzibilizatora je priroda supstituenata vezanih na periferiji porfirinskog prstena; navedeni supstituenti određuju veličinu i trodimenzionalni oblik molekule [1]. Naime, u optimalnim uvjetima molekula ne bi trebala biti prevelika kako bi mogla nesmetano ulaziti u stanicu te bi trebala imati lipofilni dio koji bi joj omogućavao inkorporaciju u lipidni dvosloj staničnih membrana. U literaturi [1] je ispitana internalizacija porfirina uspoređujući porfirine s četiri različite funkcionalne skupine (metil, etil, butil i heksil) smještene na različitim položajima (*orto*, *meta*, *para*) u odnosu na aromatski prsten na kojemu su smještene. Strukture navedenih porfirina variraju od hidrofilnijih do amfifilnih. U spomenutom radu [1] je dokazano da stanice internaliziraju amfifilne spojeve mnogo brže od njihovih hidrofilnih analoga, što posljedično rezultira većom intracelularnom koncentracijom amfifilnih spojeva, osobito nakon kraćeg vremena inkubacije. U ovom radu testirana je internalizacija amfifilnog spoja koji posjeduje dugačak lipofilni

lanac od 18 C atoma te pozitivno nabijenu hidrofилnu jezgru koja je ostvarena kvaternizacijom piridilnih dušikovih atoma. S obzirom na to da je dokazano da se navedeni spoj bez ikakvog problema internalizira u stanice pri svim testiranim koncentracijama, može se zaključiti kako su karakteristike ovog spoja optimalne za prolazak kroz staničnu membranu što potvrđuje literaturne podatke o učinkovitoj internalizaciji amfifilnih spojeva u stanice. Kako bi se testirala hipoteza da testirani spoj posjeduje idealne karakteristike za prolazak kroz staničnu membranu, u daljnjem istraživanju bi se moglo testirati više vrsta porfirina (npr. oksidirani, metilirani, s različitim dužinama alifatskog lanca, itd.). Po utvrđivanju da se navedeni spojevi internaliziraju u stanice, mogla bi se izmjeriti emisija fluorescencije te usporedbom s emisijom standarda poznate koncentracije precizno odrediti njihova koncentracija unutar stanica. Na taj način moguće je prikupiti preciznije podatke o uspješnosti internalizacije spojeva te s većom sigurnošću znati koji spoj posjeduje najbolje karakteristike za najefikasniji prolazak kroz staničnu membranu. Također, kako bi se testirala brzina unosa porfirina, moglo bi se mijenjati vrijeme inkubacije stanica s porfirinima (npr. 1 h, 8 h, 12 h) te istom metodom mjerenja emisije fluorescencije određivati koncentraciju internaliziranog porfirina. Na taj način bi bilo moguće utvrditi razlike u brzini unosa testiranih porfirina te ustanoviti nakon koliko vremena unos porfirina dosegne „plato“ (ako uopće dolazi do te pojave), odnosno nakon koliko vremena koncentracija unutarstaničnog porfirina dosegne svoju maksimalnu vrijednost.

5.3. Kolokalizacija porfirina s mitohondrijima

Dva najbitnija faktora koji određuju substaničnu lokalizaciju spoja su njegov naboj i lipofilnost. U literaturi je dokazana pozitivna korelacija između kationske prirode fotosenzibilizatora te njegove substanične lokalizacije u mitohondrijima [19]. U ovom radu ispitana je substanična lokalizacija kationskog spoja 5-(4-oktadekanamidofenil)-10,15,20-tris(*N*-

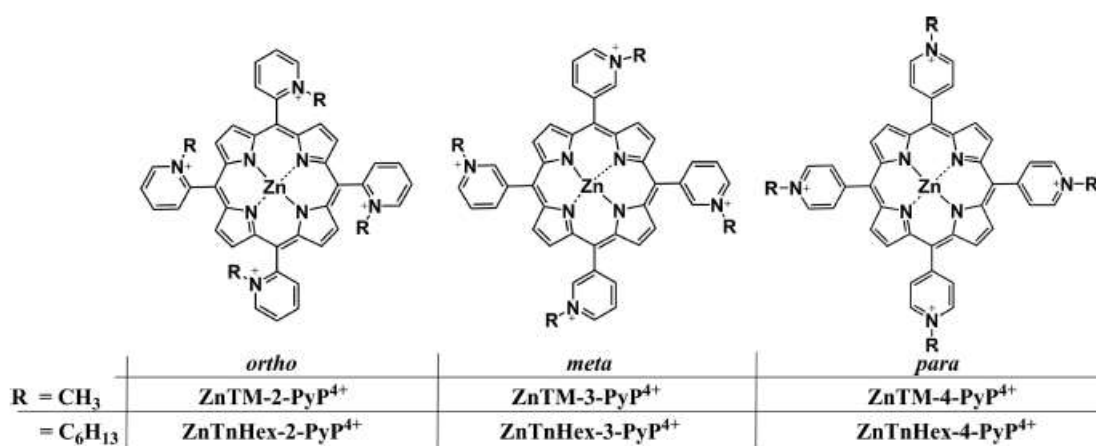
metilpiridin-3-il)porfirin triklorida. U radu koji su objavili Lei W. i suradnici korišteni su 5- (*p*-(4-trifenilfosfonij)-butoksifenil) -10,15,20-trifenilporfirin bromid (**P1**), 5-(*m*-(4-trifenilfosfonij)-butoksifenil)-10,15,20-trifenilporfirin bromid (**P2**), 5-(*p*-(4-trietilamonij)-butoksifenil)-10,15,20-trifenil porfirin bromid (**P3**) te 5-(*m*-(4-trietilamonij)-butoksifenil)-10,15,20-trifenil porfirin bromid (**P4**) [19].



Slika 17. Strukture spojeva ispitanih u radu koji su objavili Lei W. i suradnici [19]

Dakle, spojevi korišteni u radu koji su objavili Lei W. i suradnici su strukturom su slični poput porfirina korištenog u ovome radu, jedina razlika je ta što se pozitivan naboj u slučaju literaturnih spojeva nalazi na kraju alifitskog lanca, dok se u slučaju spoja korištenog u ovome radu pozitivan naboj nalazi na tri piridila vezana na porfirinski prsten. Dakle, ukupan pozitivni naboj spoja testiranog u ovome radu je veći od ukupnog pozitivnog naboja literaturnih spojeva što bi trebalo pospješiti njegovu

kolokalizaciju s mitohondrijima. Nadalje, lipofilnost spoja također igra veliku ulogu u određivanju substanične lokalizacije spoja. U slučaju kationskih porfirina koji posjeduju lipofilne alkilne lance, substanična lokalizacija porfirina uvelike ovisi o dužini alkilnog lanca te o položaju na kojem se nalazi (*orto*, *meta*, *para*) u odnosu na porfirinski prsten [1]. Naime, porfirini koji posjeduju duže alkilne lance (npr. *n*-heksil) na *para* položaju pokazuju povećanu akumulaciju u mitohondrijima. Naime, Ezzeddine R. i suradnici objavili su rad gdje su ispitali porfirine s različitim dužinama alifatskih lanca te su promatrali utjecaj dužine i pozicije alifatskog lanca na substaničnu lokalizaciju porfirina.



Slika 18. Strukture spojeva ispitanih u radu koji su objavili Ezzeddine R. i suradnici. [1]

Dakle, karakteristike koje su zajedničke spojevima korištenim u spomenutom radu te spoju testiranom u ovom radu su kationska priroda spoja te posjedovanje alkilnog lanca. S druge strane, razlika između navedenih spojeva je ta što spojevi koje su koristili Ezzeddine R. i suradnici imaju alkilni lanac na sva 4 piridila i tako su kvaternizirani, a u slučaju spoja ispitanih u ovom radu, kation je dobiven metiliranjem triju piridilnih skupina te porfirin posjeduje samo jedan dugi alkilni lanac koji je vezan preko amidne skupine na preostali fenil. Stoga, iako se literaturni spojevi svojom strukturom ne preklapaju u potpunosti sa strukturom

spoja ispitanog u ovom radu, postoje određene sličnosti koje spadaju pod ključne faktore koji određuju substaničnu lokalizaciju fotosenzibilizatora. S obzirom na to da se iz literaturnih podataka može zaključiti da kationski porfirini s alifatskim lancem na *para* položaju pokazuju preferencijalno nakupljanje u mitohondrijima, navedena pretpostavka korištena je za dizajniranje eksperimenta te je uz pomoć markera za mitohondriji testirana hipoteza kolokalizacije porfirina s mitohondrijima. Usprkos očekivanju, u ovom radu nije dokazana kolokalizacija kationskog porfirina s mitohondrijima, a razlog tomu može biti više faktora. Prvotno, moguće je da lanac od 18C atoma u kombinaciji s tri kationa u strukturi ne zadovoljava kriterije naboja/lipofilnosti koji su potrebni kako bi se afinitet spoja preusmjerio na mitohondrije te u konačnici porfirini kolokaliziraju s lizosomima, s obzirom na to da je dokazano da manje lipofilni porfirini s alkilnim lancima kolokaliziraju s lizosomima [1]. Nadalje, postoji mogućnost da korištena metoda vizualizacije mitohondrija narušava prvotnu lokalizaciju porfirina te uzrokuje njihovu relokalizaciju ili čak uzrokuje njihov izlazak iz stanice. Naime, u radovima koji su do analizirali substaničnu lokalizaciju porfirina korištene su boje za vizualizaciju mitohondrija poput MitoTracker Green FM [1] ili rhodamine 123 (R123) [20] koje se unose u stanicu slobodnom difuzijom. Stoga, moguće je da za vrijeme označavanja mitohondrija primarnim i sekundarnim protutijelima, uslijed dodavanja deterdženata za permeabilizaciju stanica ili u nekom drugom koraku, dolazi do narušavanja membranskih struktura odgovornih za zadržavanje porfirina unutar stanica te su iz tog razloga slabije vidljivi na fluorescentnom mikroskopu ili su promijenili svoju prvobitnu lokaciju. Potonja hipoteza nije dokazana te je manje vjerojatna s obzirom na to da su stanice prije bojanja fiksirane, no u budućnosti bi valjalo testirati navedenu hipotezu te pokušati vizualizirati mitohondrije na drugačiji način (npr. koristeći MitoTracker Green FM), a zatim usporediti rezultate različitih označavanja mitohondrija. Još jedna mogućnost je ta da zbog svog trostrukog pozitivnog naboja te posljedično povećane polarnosti, porfirin testiran u ovome radu ulazi u stanicu endocitozom.

Dakle, moguće je da kako bi porfirin ušao u stanicu dolazi do stvaranja vezikule na površini membrane koja zatim putuje u citosol te se tamo spaja s lizosomima [20]. Stoga, moguće je da porfirini iz tog razloga ulaze u lizosome i tamo i ostaju. Promatrajući lokalizaciju porfirina u stanicama bez označavanja organela, može se primijetiti da se nakupljaju perinuklearno što može upućivati i na kolokalizaciju s Golgijevim aparatom ili s endoplazmatskim retikulumom. U daljnjim istraživanjima trebalo bi, pomoću markera za Golgijev aparat, endoplazmatski retikulum i lizosome, ispitati i te mogućnosti.

5.4. Učinak porfirina na mitohondrije

Iako nije uspješno dokazana kolokalizacija porfirina s mitohondrijima te se ne može raspravljati o direktnoj štetnosti porfirina na mitohondrije putem internalizacije spoja u mitohondrijsku membranu, ispitan je indirektan učinak na oštećenje mitohondrija mjerenjem količine tri različita mitohondrijska proteina (Tom20, Hsp60 te mitofuzin). Zaključili smo da ispitan spoj narušava vanjsku membranu budući da se smanjuje količina proteina Tom20 i mitofuzina koji se nalaze na vanjskoj membrani mitohondrija, dok unutarnja membrana ostaje netaknuta što je pokazala nepromijenjena količina proteina Hsp60 koji se nalazi u mitohondrijskom matriksu. Dakle, može se zaključiti da nakon tretmana stanica s porfirinom i aktivacije porfirina osvjetljavanjem, dolazi do oštećenja mitohondrija, ali isti nisu eliminirani mitofagijom već samo dolazi do razgradnje proteina vanjske mitohondrijske membrane. U literaturi je dokazano je da uslijed osvjetljavanja kationskih fotosenzibilizatora dolazi do njihove aktivacije te da oni potom počinju generirati ROS koje narušavaju mitohondrijsku membranu te uništavaju mitohondrijske proteine [17]. Dakle, moguće je da ispitan porfirin generira ROS koje ulaze u reakcije s okolnim proteinima i membranom te narušavaju njihovu strukturu i pravilnu funkciju. Integritet vanjske mitohondrijske membrane narušava se uslijed uništavanja mitohondrijskih proteina i mitohondrijske membrane. Nadalje, moguće je da narušavanje

integriteta vanjske mitohondrijske membrane u kombinaciji s nakupljanjem pozitivno nabijenih porfirina na negativno nabijenu membranu mitohondrija dovodi do depolarizacije mitohondrijske membrane što u konačnici može voditi do proteasomalne degradacije proteina vanjske mitohondrijske membrane. Naime, dokazano je da uslijed depolarizacije mitohondrijske membrane dolazi do njezine fragmentacije što posljedično dovodi do parkinom-inducirane regrutacije proteasoma u depolarizirane mitohondrije te uzrokuje proteasomalnu degradaciju proteina vanjske mitohondrijske membrane [21]. Parkin je ubikvitin ligaza te igra ključnu ulogu u ubikvitinaciji -proces u kojem su molekule kovalentno označene ubikvitinom (Ub) i usmjerene prema proteasomalnoj ili lizosomalnoj razgradnji [21]. U literaturi se također navodi da je parkinom posredovana proteasomalna degradacija mitofuzina prvi, kritični korak u uklanjanju oštećenih mitohondrija mitofagijom [22]. Dakle, moguće je da porfirini svojim djelovanjem potiču regrutaciju parkina i posljedično proteasomalnu razgradnju proteina vanjske membrane što predstavlja ranu fazu mitofagije.

Na posljetku, ispitano je na koji način umiru stanice tretirane porfirinom. Naime, poznato je da postoji više oblika stanične smrti među kojima je najpoznatija apoptoza (programirana stanična smrt). U slučaju kada neki vanjski ili unutarnji signal potakne signalni put koji vodi do apoptoze aktiviraju se inicijatorske kaspaze koje zatim aktiviraju cijeli niz izvršiteljskih kaspaza koje u konačnici ubijaju stanicu razgradnjom proteina [22]. U ovom radu je ispitana količina nepocijepane kaspaze-3 poznate i pod nazivom prokaspaza-3. Naime, kaspaza-3 je izvršiteljska kaspaza koja se aktivira cijepanjem prokaspaze-3 na dva manja fragmenta. Dakle, ukoliko je u stanici prisutna prokaspaza-3 znači da kaskada koja dovodi do apoptoze nije pokrenuta. Iz rezultata je jasno vidljivo da se količina prokaspaze-3 smanjuje u onim stanicama gdje je prisutan porfirin i gdje su stanice osvijetljene. Dakle, može se zaključiti da porfirin uzrokuje apoptozu stanica, ali tek nakon njegove aktivacije

osvjetljavanjem. Navedena karakteristika ispitanog spoja vrlo je korisna u kontekstu fotodinamičke terapije jer omogućava specifično ciljanje i ubijanje tumorskih stanica osvjetljavanjem te minimalizira neželjena oštećenja zdravog tkiva. Dakle, čak i ako se porfirin internalizira u zdrave stanice, iste neće biti oštećene ukoliko ne dođe do aktivacije porfirina osvjetljavanjem.

U budućem istraživanju, valjalo bi utvrditi točnu kolokalizaciju porfirina kako bi se bolje shvatio put koji porfirin prolazi jednom kad se internalizira u stanice te način na koji isti djeluje. Također, bilo bi korisno usporediti više vrsta porfirina koji se razlikuju po ukupnom pozitivnom naboju ili lipofilnosti (različite duljine alifatskih lanaca) te promatrati razliku u unosu porfirina u stanice, pratiti da li postoji razlika u substancijskoj distribuciji u ovisnosti o naboju/lipofilnosti te ispitati da li se mijenjanjem naboja/lipofilnosti može postići nastupanje mitofagije koja nije uspješno dokazana kod spoja koji je testiran u ovome radu.

6. ZAKLJUČAK

Fotodinamička terapija se pojavila polovinom prošlog stoljeća i od tada na sebe privlači sve veći interes zbog svog potencijala liječenja raznih tumorskih bolesti, ali i virusnih, bakterijskih te gljivičnih infekcija. Specifičnost ciljanja abnormalnih stanica koju pruža ova metoda liječenja je jedna od najznačajnijih prednosti koje nudi naspram klasičnih, dosad korištenih terapija. Kako bi se optimizirala uspješnost terapije najbitnije je razviti fotosenzibilizator koji će se s maksimalnom uspješnošću (i po mogućnosti selektivno) internalizirati u abnormalne stanice te će na njih djelovati tek nakon aktivacije svjetlošću. Stoga, godinama je cilj svih istraživača razviti optimalan fotosenzibilizator koji će posjedovati sve prethodno spomenute karakteristike. Upravo iz tog razloga, u ovome radu su sintetizirana četiri porfirina (5-(4-acetamidofenil)-10,15,20-tris(1-oksidopiridin-3-il)porfirin, 5-(4-amidofenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin triklorid, 5-(4-oktanamidofenil)-10,15,20-tris(1-okso-piridin-3-il)porfirin te 5-(4-oktanamidofenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin triklorid) čiji je učinak trebao biti ispitan na stanicama. Međutim, zbog nedovoljne čistoće spojeva korišten je sličan spoj, 5-(4-oktadekanamidofenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin triklorid, koji je karakteriziran (^1H i ^{13}C NMR, UV/vis, MS) i prethodno ispitan u biološkim eksperimentima [18]. Navedeni spoj ciljano je dizajniran kao kationski fotosenzibilizator s alifatskim lancem od 18C atoma, zadovoljavajući tako sve kriterije za uspješnu internalizaciju u stanice (lipofilnost) te kolokalizaciju s mitohondrijima (kationska priroda). Nakon bioloških ispitivanja na Neuro2A stanicama, utvrđeno je da, kao što je i predviđeno, ispitani porfirin uspješno ulazi u stanice, međutim nije potvrđena njegova kolokalizacija s mitohondrijima. Iako nije potvrđena kolokalizacija s mitohondrijima, ispitan je učinak koji porfirini posjeduju na mitohondrije te je dokazano da nakon osvjetljavanja dolazi do oštećenja vanjske mitohondrijske membrane (vjerojatno uslijed djelovanja ROS-a koje generira aktivirani porfirin), ali pri ispitanim koncentracijama (5 μM ,

10 μM , 20 μM) i vremenima inkubacije stanica s porfirinom od 24h i 48h ne dolazi do mitofagije. Na posljetku, ispitano je da li navedena oštećenja dovode do stanične smrti te je potvrđeno da uslijed aktivacije porfirina njegovim osvjetljavanjem dolazi do aktivacije kaspazne kaskade koja dovodi do apoptoze te stanice koje su tretirane porfirinom i naknadno osvjetljene umiru apoptozom što je odlična karakteristika koja je vrlo tražena kod fotosenzibilizatora.

Ovaj rad je odličan pokazatelj da spoj 5-(4-oktadekanamidofenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin triklorid ima veliki potencijal u terapijskom smislu jer posjeduje najbitniju karakteristiku koju svaki fotosenzibilizator korišten u PDT treba imati, a to je da sam po sebi nije citotoksičan te uzrokuje apoptozu stanica tek nakon osvjetljavanja što omogućuje vrlo precizno i selektivno ciljanje abnormalnih stanica. Daljnjim istraživanjima na spomenutom spoju te optimizacijom istog može se postići kvalitetan proizvod koji bi jednog dana mogao biti primijenjen za liječenje raznih bolesti.

7. LITERATURA

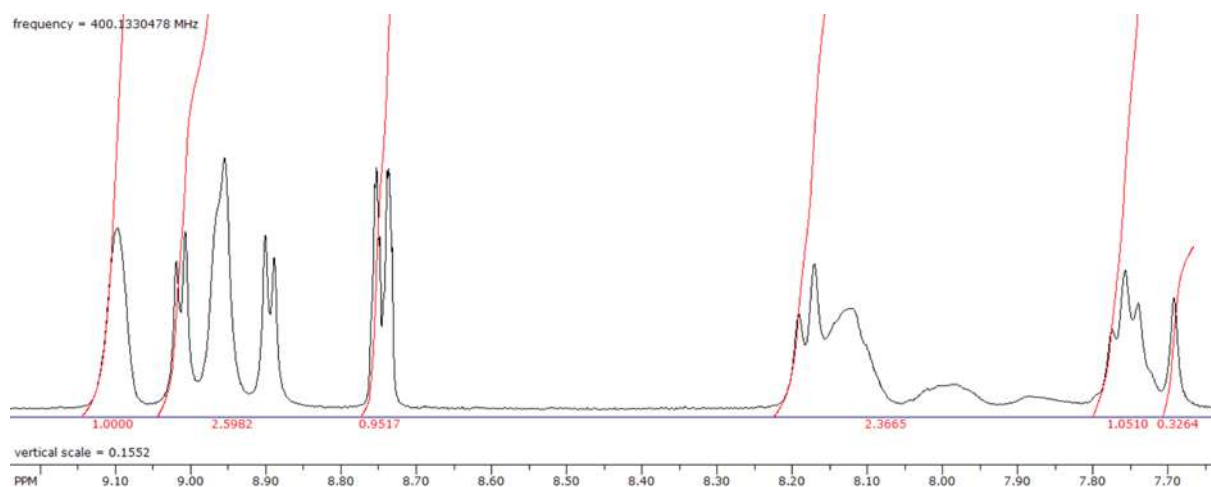
1. Ezzeddine R, Al-Banaw A, Tovmasyan A, Craik J, Batinic-Haberle I, Benov L. Effect of Molecular Characteristics on Cellular Uptake, Subcellular Localization, and Phototoxicity of Zn(II)-N-Alkylpyridylporphyrins. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(51):36579-36588.
2. van Straten D, Mashayekhi V, de Bruijn H, Oliveira S, Robinson D. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers*. 2017;9(12):19.
3. Estaquier J, Vallette F, Vayssiere J, Mignotte B. The Mitochondrial Pathways of Apoptosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2011;157-183.
4. Josefsen LB, Boyle RW. Unique Diagnostic and Therapeutic Roles of Porphyrins and Phthalocyanines in Photodynamic Therapy, Imaging and Theranostics. *Theranostics*. 2012;2(9):916-966.
5. Daniell M, Hill J. A HISTORY OF PHOTODYNAMIC THERAPY. *ANZ Journal of Surgery*. 1991;61(5):340-348.
6. Rkein A, Ozog D. Photodynamic Therapy. *Dermatologic Clinics*. 2014;32(3):415-425.
7. McKenzie L, Bryant H, Weinstein J. Transition metal complexes as photosensitisers in one- and two-photon photodynamic therapy. *Coordination Chemistry Reviews*. 2019;379:2-29.
8. Adler A, Longo F, Finarelli J, Goldmacher J, Assour J, Korsakoff L. A simplified synthesis for meso-tetraphenylporphine. *The Journal of Organic Chemistry*. 1967;32(2):476-476.
9. Sun Z, Cao M, Lu X, She Y, Zhou Q, Zhang S. Synthesis of substituted meso-tetraphenylporphyrins in mixed solvent systems. *Arkivoc*. 2013;2013(3):389.
10. Hiroto S, Miyake Y, Shinokubo H. Synthesis and Functionalization of Porphyrins through Organometallic Methodologies. *Chemical Reviews*. 2016;117(4):2910-3043.

11. Hwang H, Shin H, Han J, Na K. Combination of photodynamic therapy (PDT) and anti-tumor immunity in cancer therapy. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2018;48(2):143-151.
12. Morgan J, Oseroff A. Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001;49(1-2):71-86. 11
13. Ding W, Yin X. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biological Chemistry*. 2012;393(7).
14. TOM20 - Mitochondrial import receptor subunit TOM20 - *Saccharomyces cerevisiae* (strain ATCC 204508 / S288c) (Baker's yeast) - TOM20 gene & protein [Internet]. Uniprot.org. 2019 [citirano 23. srpnja 2019]. Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P35180> 15
15. HSPD1 - 60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor - *Homo sapiens* (Human) - HSPD1 gene & protein [Internet]. Uniprot.org. 2019 [citirano 23. srpnja 2019]. Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P10809> 16
16. MFN2 - Mitofusin-2 - *Homo sapiens* (Human) - MFN2 gene & protein [Internet]. Uniprot.org. 2019 [citirano 23. srpnja 2019]. Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/O95140> 17
17. Li W, Ma Q, Wu E. Perspectives on the Role of Photodynamic Therapy in the Treatment of Pancreatic Cancer. *International Journal of Photoenergy*. 2012.
18. Malatesti N, Harej A, Kraljević-Pavelić S, Lončarić M, Zorc H, Wittine K, Andjelkovic U, Josic Dj. Synthesis, characterisation and in vitro investigation of photodynamic activity of 5-(4-octadecaanamidophenyl)-10,15,20-tris(N-methylpyridinium-3-yl)porphyrin trichloride on HeLa using low light fluorescence rate. *Photochem. and Photobio.*, 15(2016): 1-12.
19. Lei W, Xie J, Hou Y, Jiang G, Zhang H, Wang P et al. Mitochondria-targeting properties and photodynamic activities of porphyrin derivatives bearing cationic pendant. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2010;98(2):167-171.

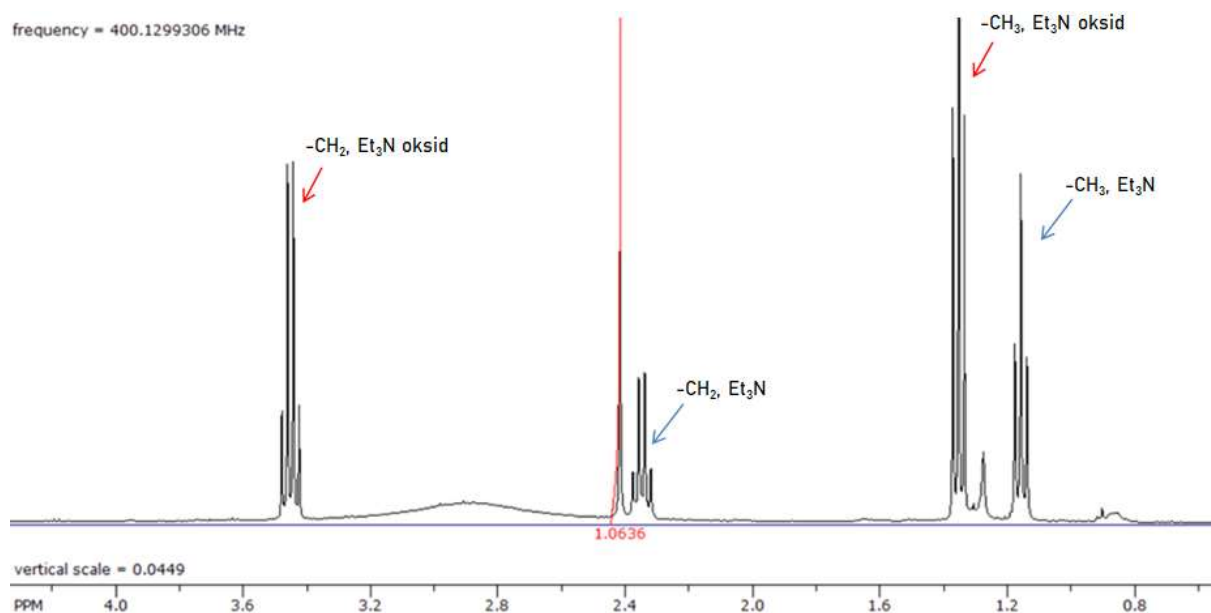
20. Ricchelli F, Franchi L, Miotto G, Borsetto L, Gobbo S, Nikolov P et al. Meso-substituted tetra-cationic porphyrins photosensitize the death of human fibrosarcoma cells via lysosomal targeting. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2005;37(2):306-319.
21. Yoshii S, Kishi C, Ishihara N, Mizushima N. Parkin Mediates Proteasome-dependent Protein Degradation and Rupture of the Outer Mitochondrial Membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(22):19630-19640.
22. Karbowski M, Youle R. Regulating mitochondrial outer membrane proteins by ubiquitination and proteasomal degradation. *Current Opinion in Cell Biology*. 2011;23(4):476-482.

8. PRILOZI

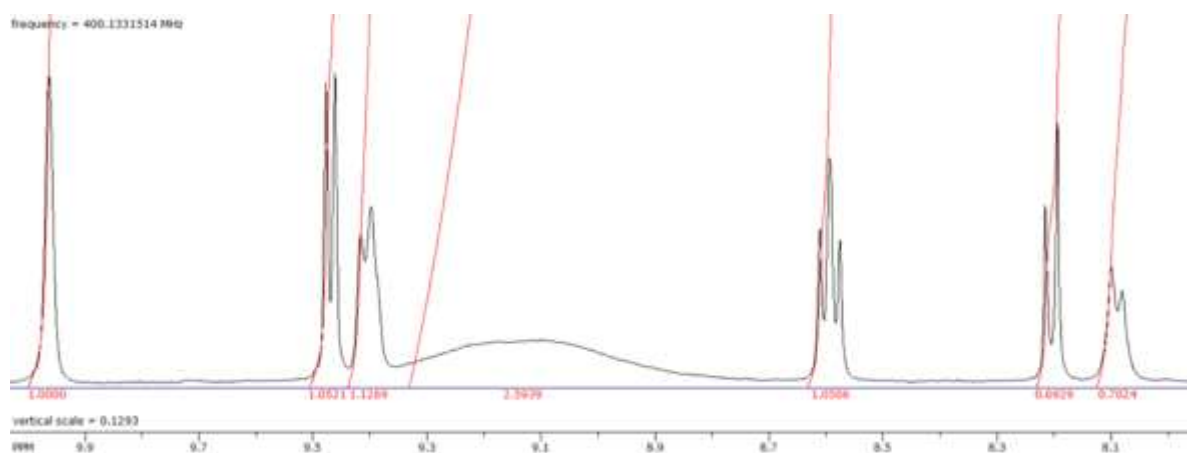
Prilog 1. NMR spektar aromatskoj dijela spoja **3**



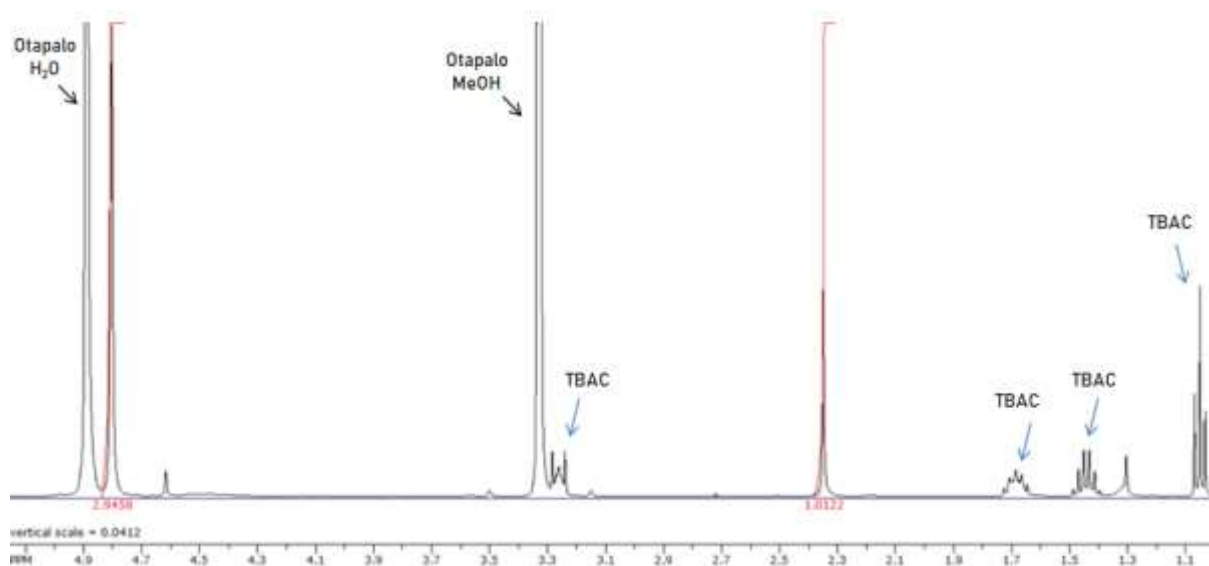
Prilog 2. NMR spektar alifatskog dijela spoja **3** s označenim nečistoćama; crvenim strelicama je označen zaostali trietilamin *N*-oksid, a plavim strelicama je označen zaostali trietilamin



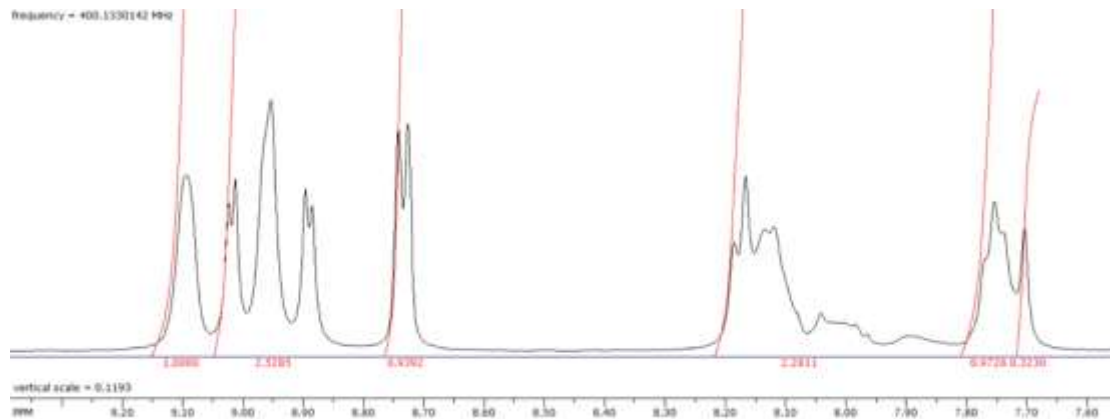
Prilog 3. NMR spektar aromatskoj dijela spoja **4**



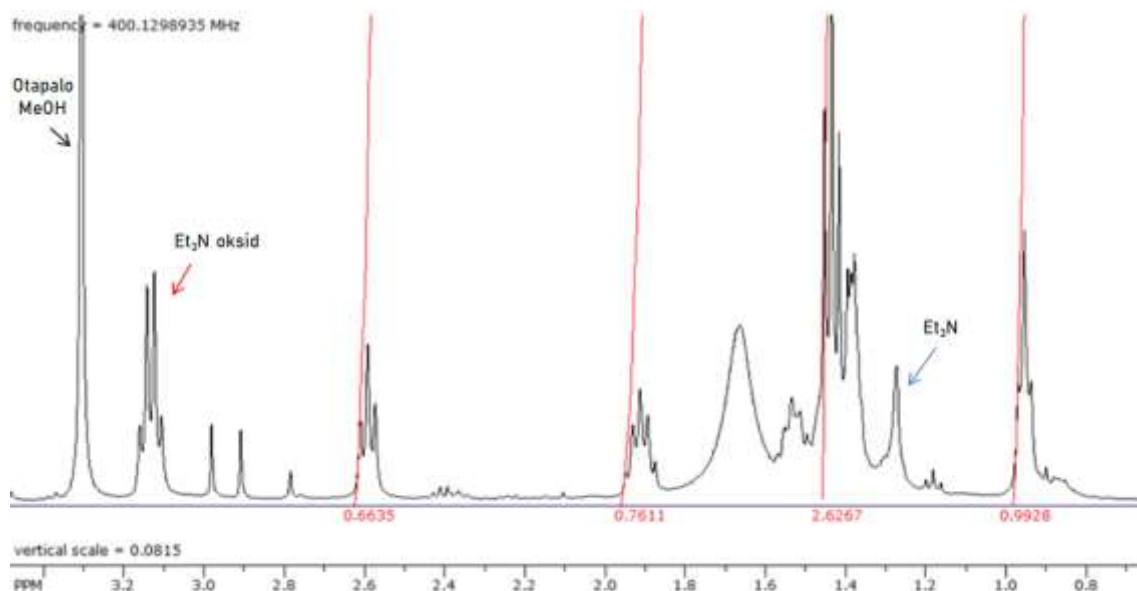
Prilog 4. NMR spektar alifatskog dijela spoja **4** s označenim nečistoćama; a plavim strelicama je označen zaostali TBAC, a crnim strelicama su označena otapala (voda i metanol)



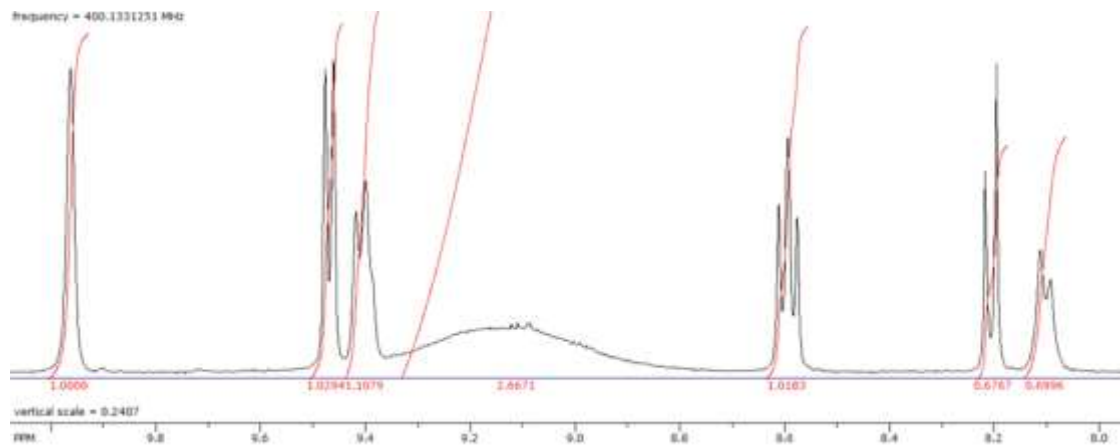
Prilog 5. NMR spektar aromatskoj dijela spoja 7



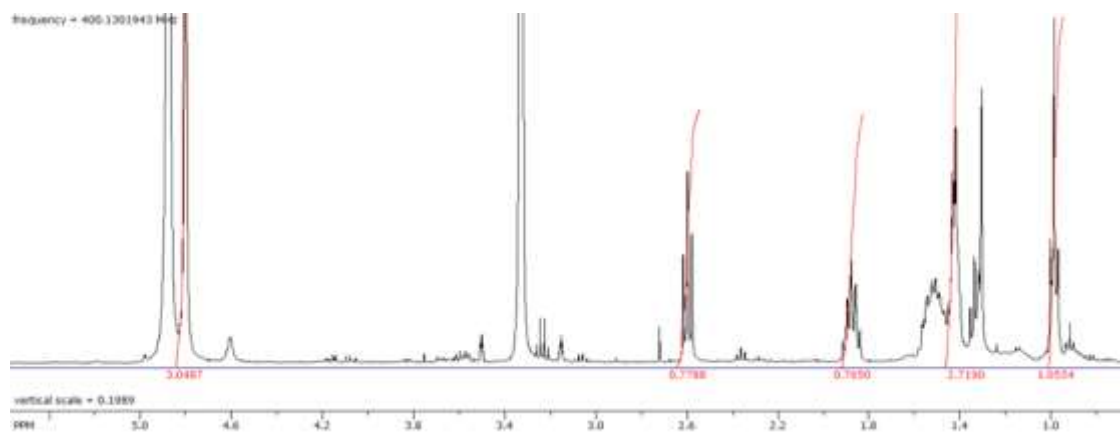
Prilog 6. NMR spektar alifatskog dijela spoja 7 s označenim poznatim nečistoćama; crvenom strelicom je označen zaostali trietilamin *N*-oksid, plavom strelicom je označen zaostali trietilamin, a crnom strelicom je označeno otapalo (metanol)



Prilog 7. NMR spektar aromatskoj dijela spoja 8



Prilog 8. NMR spektar alifatskog dijela spoja 8



9. ZAHVALA

Diplomski rad je financiran iz podrške Sveučilišta u Rijeci (uniri-prirod-18-173) izv. prof. dr. sc. N. Malatesti, te projekta Hrvatske zaklade za znanost (IP-2018-01-8563) i podrške Sveučilišta u Rijeci (18-211-1369) izv. prof. dr. sc. I. Munitić. Oprema korištena za izradu diplomskog rada financirana je iz Europskog fonda za regionalni razvoj (engl. European Regional Development Fund (ERDF)) u okviru projekta Razvoj istraživačke infrastrukture na Kampusu Sveučilišta u Rijeci.

Prvenstveno se zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Neli Malatesti i komentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Munitić na ukazanom povjerenju, trudu i vremenu te prenesenom znanju koje sam usvojila pri provedbi eksperimentalnog dijela i tijekom pisanja rada.

Posebnu zahvalu upućujem curama iz laboratorija, doktorandicama Martini Mušković i Nikolini Prtenjači te Valentini Štimac i Karli Dubaić koje su mi uvijek bile velika podrška te su bile voljne uskočiti i pomoći mi kad god je trebalo. Također, hvala im na uvijek ugodnoj i veseloj atmosferi u laboratoriju.

Zahvaljujem mom dečku Marku i svojim prijateljima, koji su uvijek bili tu uz mene.

Na kraju, zahvaljujem svojim roditeljima, sestri i Totu na mentalnoj i financijskoj podršci bez kojih ništa od ovog ne bi bilo moguće.

10. ŽIVOTOPIS

EUROPEAN CURRICULUM VITAE FORMAT



OSOBNI PODACI

Prezime / Ime	Patrizia Janković
E-mail	patrizia.jankovic18@gmail.com
Držvaljanstvo	Hrvatsko
Datum rođenja	18. prosinca 1995.

ŠKOLOVANJE

Period	2002. - 2010.
Mjesto	Rijeka, Hrvatska
Naziv ustanove	Osnovna Škola „Dolac“

Period	2010. - 2014.
Mjesto	Rijeka, Hrvatska
Naziv ustanove	Prva sušačka hrvatska gimnazija, opći smjer

Period	2014. – 2017.
Mjesto	Rijeka, Hrvatska
Naziv ustanove	Sveučilište u Rijeci, Odjel za Biotehnologiju, preddiplomski studiji „ Biotehnologija i istraživanje lijekova “

Period	2017. – sada
Mjesto	Rijeka, Hrvatska
Naziv ustanove	University of Rijeka, Odjel za Biotehnologiju, diplomski studiji „ Istraživanje i razvoj lijekova “

PROGRAM RAZMJENE (ERASMUS)

Period	Rujan 2018. – Siječanj 2019.
Mjesto	Barcelona, Španjolska
Naziv ustanove	Universidad Autonoma de Barcelona, Fakultet Bioznanosti

PRAKTIČNI RAD

Period	26.06.2017. – 07.07.2017.
Naziv i adresa poslodavca	JGL-Jadran Galenski Laboratorij d.d., Pulac, 51 000 Rijeka, Hrvatska
Vrsta zaposlenja i odjel	Odrađivanje prakse u poslovnoj jedinici Istraživanje i razvoj lijekova na odjelu „Razvoj formulacije“

Period	Akadska godina 2017./2018.
Naziv i adresa poslodavca	Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, Radmile Matejčić 2, 51 000 Rijeka
Vrsta zaposlenja i odjel	Demonstrator na laboratorijskim vježbama u sklopu kolegija „Organska kemija“

Period	21.07.2018.-19.08.2018.
Naziv i adresa poslodavca	Medicinski fakultet Łodz, Al. Kosciuszki 4, 90-419 Łodz, Poland
Vrsta zaposlenja i odjel	Odrađivanje prakse na Odjelu za kemiju i kliničku biokemiju

OSOBNJE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Materinji jezik	Hrvatski
-----------------	----------

Jezik	Engleski
Govor	Izvrstan
Pisanje	Izvrstan
Razumijevanje	Izvrstan

Jezik	Talijanski
Govor	Izvrstan
Pisanje	Izvrstan
Razumijevanje	Izvrstan

Jezik	Španjolski
Govor	Dovoljno
Pisanje	Dovoljno
Razumijevanje	Dovoljno

SOCIJALNE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

-dobre komunikacijske vještine stečene tijekom rada na mjestu promotora, IQOS informera te prodavača u dućanu
 -razvijen smisao za organizaciju te vođenje tima stečen tijekom volontiranja u ESN-u na poziciji Event koordinatora
 -spremnost za usvajanje novih znanja i vještina
 -spremnost na timski rad u dinamičnom i zahtjevnom okruženju

AKTIVNOSTI

- članica Udruge studenata biotehnologije Sveučilišta u Rijeci (**USBRI**)
- članica studentske udruge **Erasmus Student Network** gdje obavljam funkciju **Event koordinatora**
- 2016. **Volonter** na **14. Festivalu znanosti** („Šarenilo kemije“)
- 2017. **Volonter** na **15. Festivalu znanosti** („Šarenilo kemije“)
- 2017. **Volonter** u projektu „**Ljetna škola kemije**“
- 2017. **Usmeno izlaganje** na 4. Simpoziju Studenta Kemičara gdje sam prezentirala rezultate svog projekta (Naslov: *Funkcionalne skupine fluorescentnih boja za konjugaciju s proteinima*)
- 2018. **Volonter** u projektu „**Student mentor**“
- 2018. **Volonter** na **16. Festivalu znanosti** („Šarenilo kemije“)
- 2019. Sudjelovala u **Ljetnoj školi za patofiziologiju i javno zdravstvo** („*capstone course*“ održan na Odjelu za biotehnologiju u suradnji sa Sveučilištem St.Claude State of Minnesota)

TEHNIČKE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

- izvršno vladanje Microsoft office paketom (Word, Excel, Power Point)
- pretraživanje interneta i strukturnih baza podataka
- poznavanje rada u programima Chimera, PyMOL, GAMESS, Avogadro

OSTALE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

- 2013.** Osvojeno 3. mjesto na Županijskom natjecanju iz talijanskog jezika
- 2014.** Osvojeno 3. mjesto na Županijskom natjecanju iz talijanskog jezika
- 2015.- sada** Dobitnica **Stipendije za darovite studente grada Rijeke**
- 2019.** Dobitnica **Rektorove nagrade** za izvrsnost