

Sinteza 5-(4-(cis-9,10-epoksioktadekanamido)fenil)-10,15,20-tris(N-metilpiridin-3-ij)porfirin triklorida

Doričić, Karmen

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:041844>

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

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

Repository / Repozitorij:



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



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

Karmen Doričić

**Sinteza 5-(4-(*cis*-9,10-epoksioktadekanamido)fenil)-10,15,20-
tris(*N*-metilpiridin-3-ij)porfirin triklorida**

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

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

Karmen Doričić

**Sinteza 5-(4-(*cis*-9,10-epoksioktadekanamido)fenil)-10,15,20-
tris(*N*-metilpiridin-3-ij)porfirin triklorida**

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

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

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

Karmen Doričić

**Synthesis of 5-(4-(*cis*-9,10-epoxyoctadecanamido)phenyl)-
10,15,20-tris(*N*-methylpyridinium-3-yl)porphyrin trichloride**

Master thesis

Rijeka, 2023

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

Diplomski rad obranjen je dana 26. rujna 2023.

pred povjerenstvom:

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

Rad ima 56 stranica, 39 slika, 3 tablice i 38 literaturnih navoda.

Zahvala

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Neli Malatesti na stručnosti, susretljivosti i pomoći tijekom istraživačkog rada te potpori prilikom pisanja diplomskog rada.

Također se zahvaljujem asistentici mag. med. chem. Martini Mušković koja je svojim iskustvom, savjetima i entuzijazmom olakšala rad u laboratoriju te me usmjeravala u pisanju diplomskog rada.

Na kraju bih se željela zahvaliti svojim roditeljima koji su mi bili potpora tijekom cijelog obrazovanja.

Sažetak

Fotodinamička terapija (PDT) je klinički odobren, minimalno invazivan terapijski postupak kojeg karakterizira citotoksična aktivnost protiv tumorskih stanica i raznih patogena. Temelji se na dinamičkim interakcijama između fotosenzibilizatora (PS), svjetlosti određene valne duljine te molekularnog kisika koje dovode do razaranja ciljanog tkiva.

Jedna od ključnih komponenti PDT-a je odabir i dizajn PS-a. Većina PS-a koji se koriste u PDT-u temelji se na porfirinskoj strukturi zbog njihovih povoljnih fotofizikalnih svojstava. Za kliničku primjenu važni su amfifilni porfirini budući da se njima omogućava pasivno ciljanje tumora koje je prethodno dokazano učinkovitijim nego aktivno. Njihovi hidrofobni dijelovi omogućavaju im ulazak i akumulaciju u stanice, dok ih hidrofilni dijelovi čine topljivima u vodi što je važno kako bi se spriječila njihova agregacija te olakšala administracija.

Dokazano je da se hidrofobnost porfirina povećava s duljinom alkilnih lanaca te da se na isti način povećava i njihova akumulacija u tumorske stanice. Smatra se da bi prisutnost epoksidne jedinice na dugom alkilnom lancu porfirina mogla povećati njegovu protutumorsku aktivnost budući da je prethodno pokazano kako epoksidirane masne kiseline te neki njihovi metaboliti posjeduju protutumorsku aktivnost.

U ovom radu provedena je optimizacija sinteze *N*-metiliranog tripiridilporfirina konjugiranog s dugim alkilnim lancem (18C) koji sadrži polarnu skupinu. Uspoređena je učinkovitost novosintetiziranog porfirina te prethodno sintetiziranog *N*-metiliranog tripiridilporfirina konjugiranog s dugim alkilnim lancem (18C) za primjenu u PDT-u na ljudskim epitelijalnim stanicama adenokarcinoma dojke (MDA-MB-231). Novosintetizirani spoj, iako je djelotvoran, manje je učinkovit od prethodno sintetiziranog. Međutim, on ne posjeduje tamnu toksičnost na MDA-MB-231 stanice, za razliku od spoja koji ne posjeduje polarnu skupinu na alkilnom lancu.

Ključne riječi: fotodinamička terapija, amfifilni porfirini, *N*-hidroksisukcinimid, epoksidacija, MTT test

Summary

Photodynamic therapy (PDT) is clinically approved, minimally invasive therapeutic procedure characterized by cytotoxic activity against tumor cells and various pathogens. It is based on dynamic interactions between the photosensitizer (PS), light of a certain wavelength and molecular oxygen, which lead to the destruction of the target tissue.

One of the key components of PDT is PS selection and design. Most of the PSs used in PDT are based on porphyrin structure due to their favorable photophysical properties. Amphiphilic porphyrins are important for clinical application since they enable passive tumor targeting, which has previously been proven to be more effective than active targeting. Their hydrophobic parts enable them to enter and accumulate in cells, while hydrophilic parts make them soluble in water, which is important to prevent their aggregation and facilitate administration.

It has been proven that hydrophobicity of porphyrins increases with the length of the alkyl chains and as a consequence their accumulation in tumor cells also increases. It is thought that the presence of an epoxy unit on the long alkyl chain of porphyrin could increase its antitumor activity since it has previously been shown that epoxidized fatty acids and some of their metabolites possess antitumor activity.

In this thesis, the optimization of synthesis of *N*-methylated tripyridylporphyrin conjugated with long alkyl chain (18C) containing a polar group was performed. The effectiveness of newly synthesized porphyrin and previously synthesized *N*-methylated tripyridylporphyrin conjugated with a long alkyl chain (18C) for use in PDT on human epithelial breast adenocarcinoma cells (MDA-MB-231) was compared. The newly synthesized compound, although effective, is less effective than previously synthesized one. However, it does not possess dark toxicity on MDA-MB-231 cells, unlike the compound that does not possess a polar group on the alkyl chain.

Key words: photodynamic therapy, amphiphilic porphyrins, *N*-hydroxysuccinimide, epoxidation, MTT test

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Fotodinamička terapija	1
1.2. Princip djelovanja PDT-a	2
1.3. Fotosenzibilizatori	6
1.4. Porfirini kao fotosenzibilizatori	7
1.5. UV-Vis i fluorescencijski spektar porfirina	8
1.6. Sinteza porfirina	9
1.7. Amfifilni porfirini	10
1.7.1. <i>N</i> -metilirani tripiridilporfirin konjugiran s dugim alkilnim lancem (18C) koji sadrži epoksidnu jedinicu	11
2. Cilj rada	13
3. Materijali i metode	14
3.1. Opće napomene	14
3.2. Sinteze spojeva	16
3.2.1. Adler-Longo sinteza	16
3.2.2. Hidroliza produkta 2	18
3.2.3. Kloriranje oleinske kiseline	19
3.2.4. Epoksidacija oleoil-klorida	20
3.2.5. Aktivacija oleinske kiseline <i>N</i> -hidroksisukcinimidom	21
3.2.6. Epoksidacija sukcinimidil-oleata	22
3.2.7. Konjugacija produkta 7 na 5-(4-aminofenil)-10,15,20-tris(3-piridil)porfirin	23
3.2.8. Metilacija produkta 8	24
3.3. Stanična kultura	26
3.3.1. Održavanje stanica	26

3.3.2. Test citotoksičnosti (MTT test)	26
4. Rezultati i rasprava	29
4.1. Sinteza početnih porfirina	29
4.2. Priprema derivata epoksidirane oleinske kiseline	31
4.3. Konjugacija produkta 7 na 5-(4-aminofenil)-10,15,20-tris(3-piridil)porfirin	37
4.4. Metilacija produkta 8	40
4.5. Spektrofotometrijska analiza sintetiziranih porfirina	43
4.6. Test citotoksičnosti (MTT test).....	50
4.6.1. Stanice tretirane svjetlom (<i>light</i>)	51
4.6.2. Stanice netretirane svjetlom (<i>dark</i>).....	52
4.6.3. Usporedba stanica tretiranih i netretiranih svjetlom.....	53
5. Zaključak	55
6. Literatura	57
7. Životopis.....	62

1. Uvod

1.1. Fotodinamička terapija

Fotodinamička terapija (PDT) je klinički odobren, minimalno invazivan terapijski postupak kojeg karakterizira citotoksična aktivnost protiv tumorskih stanica i raznih patogena (1,2). Postupak uključuje administraciju fotosenzibilizatora (PS), njegovu selektivnu akumulaciju u tumorsko tkivo te osvjetljavanje tumora svjetlošću određene valne duljine. U prisustvu kisika, prethodno navedeno dovodi do direktne smrti tumora, oštećenja mikrovaskulature te indukcije lokalne upalne reakcije (2). Može se koristiti samostalno ili u kombinaciji s drugim protutumorskim terapijama kao što su kemoterapija, radioterapija ili kirurški zahvati kako bi se povećala vjerojatnost pozitivnog ishoda (1).

Svjetlost se još od antičkog doba koristila za liječenje određenih bolesti. Drevne civilizacije poput Egipta, Indije i Kine pomoću nje liječile su kožne bolesti kao što su psorijaza, vitiligo i rak kože. U 18. i 19. stoljeću u Francuskoj, svjetlost se koristila za liječenje tuberkuloze, rahitisa, skorbuta, reumatizma, paralize, edema i mišićne slabosti (3).

Začetnikom moderne fototerapije smatra se Niels Finzen. On je otkrio da se sunčeva svjetlost ili osvjetljavanje ugljičnom lampom može koristiti za liječenje *lupus vulgaris-a*, najčešćeg oblika tuberkuloze kože. Fototerapija obuhvaća uporabu svjetlosti za liječenje bolesti, dok fotokemoterapija uključuje administraciju molekule poput primjerice psoralena kako bi se povećala osjetljivost kože na svjetlost te omogućila njena dublja penetracija (3).

Oskar Raab smatra se zaslužnim za otkriće PDT-a. On je 1900. godine uočio da je svjetlost određene valne duljine smrtonosna za papučicu (lat. *Paramecium*) u prisustvu akridinske boje (4). Tvrdio je da je *in vitro* toksičnost nastala kao posljedica fluorescencije uzrokovane prijenosom energije sa svjetlosti na kemikaliju (5). Godine 1903. Hermann Von Tappeiner, profesor Oskar Raab-a, i Albert Jesionek liječili su kožne tumore

kombinacijom topikalne administracije eozina i osvjetljavanjem bijelom svjetlošću (4). Hermann Von Tappeiner i Albert Jodlbauer, 1904. godine, otkrili su da je kisik ključna komponenta fotosenzibilizacijskih reakcija te su 1907. osmislili termin „fotodinamička aktivnost“ kako bi opisali ovaj fenomen (5).

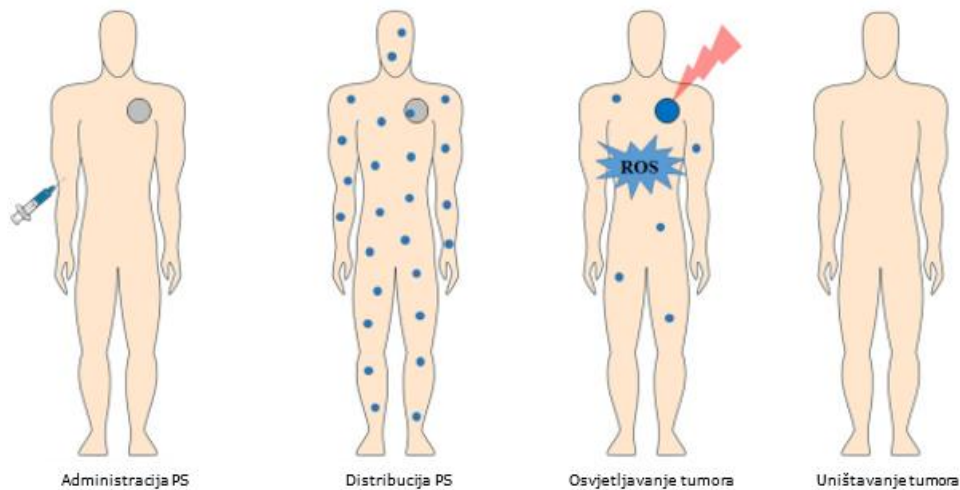
Do danas najistraženiji fotosenzibilizatori su porfirini koji su identificirani sredinom 19. stoljeća (4). W. Hausmann je 1911. godine administrirao hematoporfirin mišu te uočio reakcije na njegovoj koži nakon izlaganja svjetlosti (3). Godine 1913., njemački znanstvenik Friedrich Meyer-Betz ispitivao je učinak porfirina na ljude. Sam sebi administrirao je 200 mg hematoporfirina te uočio produženo znojenje i bol na dijelovima tijela koji su bili izloženi svjetlosti (3,4).

Značajan napredak PDT-a zabilježen je 1975. godine kada je Thomas Dougherty sa svojim istraživanjem pokazao da administracija hematoporfirinskog derivata (HpD) te njegova aktivacija crvenim svjetlom uništava tumor dojke u miševa (6). On je zajedno sa svojim suradnicima pročistio HpD te proizveo Photofrin, prvi fotosenzibilizator, koji je Američka agencija za hranu i lijekove 1995. godine odobrila za uporabu u PDT-u (7). Do današnjeg dana PDT nastavlja se značajno razvijati te se ne koristi samo za liječenje tumora već je poznata njegova uporaba u liječenju bakterijskih, virusnih i parazitskih bolesti (3).

1.2. Princip djelovanja PDT-a

Princip djelovanja PDT-a temelji se na dinamičkim interakcijama između PS, svjetlosti određene valne duljine te molekularnog kisika koje dovode do razaranja ciljanog tkiva. PDT započinje topikalnom ili intravenskom administracijom PS. Zatim slijedi njegova distribucija te selektivna akumulacija u tumorsko tkivo. Kako bi se PS aktivirao nužno je osvjetljavanje ciljanog tkiva svjetlošću određene valne duljine, što je još jedan od načina osiguravanja selektivnosti. Osvjetljavanje se najčešće provodi pomoću crvene svjetlosti budući da ona najdublje prodire u

organizam te PS poput porfirina dobro apsorbiraju svjetlost u tom dijelu spektra. Aktivacija PS-a dovodi do stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) koje uzrokuju nepovratnu štetu ciljanom tkivu budući da uzrokuju staničnu smrt (Slika 1.) (2,3,8).



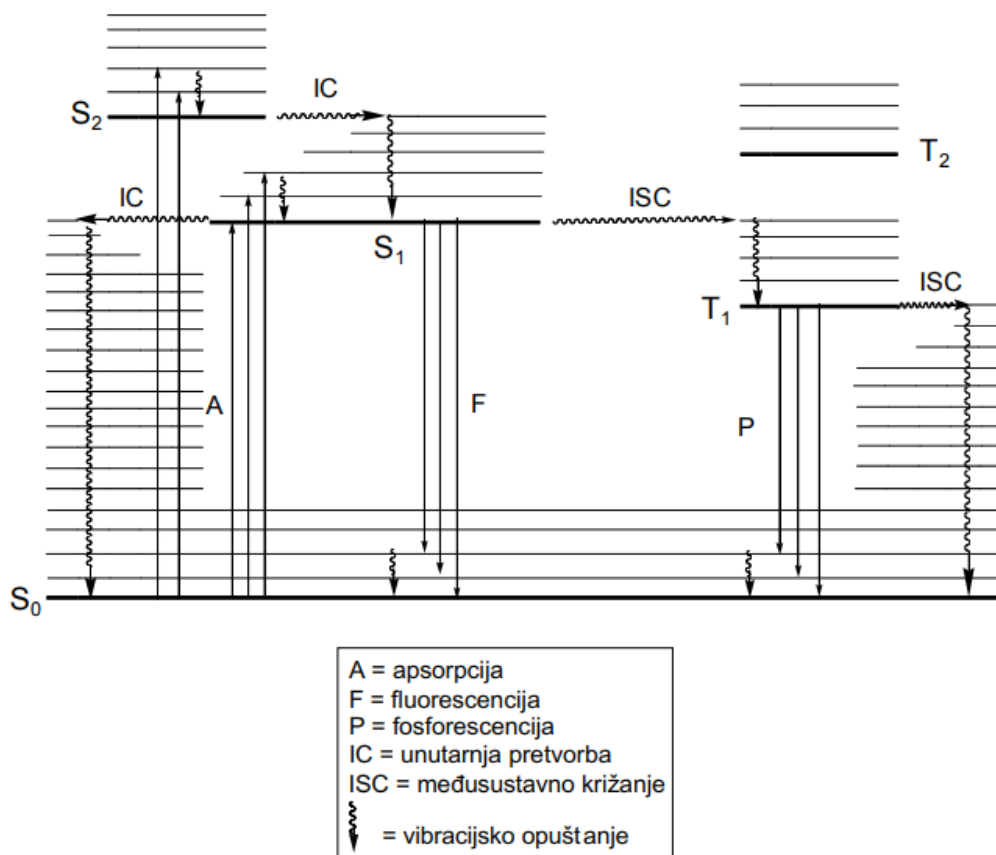
Slika 1. Princip djelovanja PDT-a. Modificirano prema slici iz literature (3).

Fotodinamička reakcija započinje osvjetljavanjem PS. Apsorpcija svjetlosti uzrokuje pobuđivanje PS iz osnovnog singletnog stanja (S^0) u kratkoživuće, pobuđeno singletno stanje ($^1S^*$). Ovo pobuđeno stanje je vrlo nestabilno te se PS može ponovno vratiti u osnovno stanje gubeći višak energije svjetlosnom emisijom, odnosno fluorescencijom ili proizvodnjom topline (proces unutarnje pretvorbe). Također može doći do međusustavnog križanja, odnosno do prelaska PS u stabilnije, dugoživuće pobuđeno tripletno stanje ($^1T^*$). Prilikom ovog prelaska dolazi do promjene spina elektrona. Ovakav proces je spinski zabranjen te je zbog toga manje učestao. PS se iz pobuđenog tripletnog stanja može vratiti u osnovno stanje emisijom svjetlosti (fosforescencija) ili može sudjelovati u tip I i tip II kemijskim reakcijama koje predstavljaju dva glavna mehanizma djelovanja PDT-a (3,9). Dijagram Jablonskog koristi se kako bi se opisali prethodno navedeni fotodinamički procesi (Slika 2.).

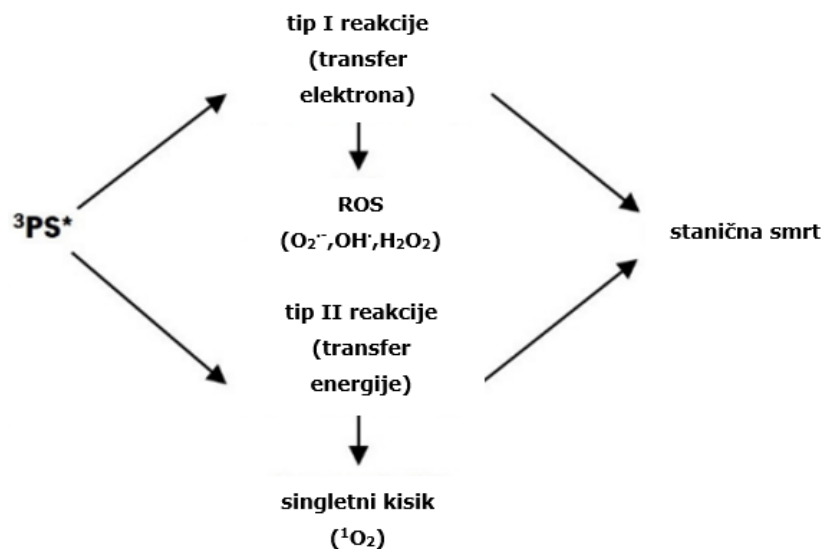
U tip I reakcijama dolazi do prijenosa atoma vodika ili elektrona između PS u pobuđenom tripletnom stanju i supstrata (stanična membrana ili druge

biološke molekule) što dovodi do stvaranja slobodnih radikala i radikal-aniona PS-a te supstrata. Ovi radikali stupaju u interakcije s molekulama kisika što uzrokuje stvaranja ROS-ova kao što su superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilni radikal (HO^{\cdot}) i vodikov peroksid (H_2O_2). Ovaj niz reakcija dovodi do oksidativnog stresa koji je odgovoran za uništavanje tumorskih stanica (3,9).

U tip II reakcijama dolazi do prijenosa energije s PS-a u pobuđenom tripletnom stanju na molekule kisika (O_2) koje se nalaze u osnovnom tripletnom stanju. Direktni prijenos energije između ovih molekula je moguć budući da imaju iste spinove. Ovom reakcijom dolazi do pobuđivanja molekula kisika u osnovnom tripletnom stanju te one prelaze u pobuđeno singletno stanje (1O_2). Singletni kisik iznimno je reaktivan te uzrokuje oštećenje proteina, masti i drugih molekula što posljedično dovodi do stanične smrti. Tip II reakcije dominantne su tijekom PDT-a te je singletni kisik glavni citotoksični agens odgovoran za biološke učinke (Slika 3.) (3,9).



Slika 2. Dijagram Jablonskog (10).



Slika 3. Tip I i Tip II reakcije. Modificirano prema slici iz literature (3).

Postoje tri glavna mehanizma koja PDT koristi za uništavanje tumora. Reaktivni kisikovi spojevi koji nastaju kao posljedica fotokemijskih reakcija mogu direktno uništiti tumore inducirajući apoptozu ili nekrozu (3). Također može doći do uništavanja tumorske vaskulature što dovodi do nedostatka kisika i hranjivih tvari u tumorskom tkivu te posljedično stanične smrti (11). Budući da ROS-ovi imaju kratak životni vijek pod najvećim utjecajem PDT-a su stanice koje se nalaze u blizini njihove proizvodnje (3). Nadalje, PDT utječe i na imunološki sustav. Može inducirati upalu, regrutirati leukocite na ciljano mjesto te aktivirati T-limfocite što posljedično dovodi do uništavanja tumorskog tkiva. Smatra se da su citotoksične T stanice glavne imunološke efektorske stanice odgovorne za uništavanje tumorskog tkiva (11). Učinkovitost PDT-a ovisi o nekoliko čimbenika kao što su primjerice lokalizacija tumora, koncentracija kisika, period osvjetljavanja te doza svjetlosti. Lokalizacija tumora je od velikog značaja budući da je stupanj oksigenacije tumora koji se nalaze duboko u organizmu niži što kao posljedicu ima smanjenu proizvodnju ROS-ova. Također takve tumore teže je osvjetliti. Važan čimbenik koji utječe na učinkovitost PDT-a je i odabir PS-a koji se koristi o čemu će više biti rečeno u idućem poglavlju (3).

1.3. Fotosenzibilizatori

Odabir i dizajn fotosenzibilizatora jedne su od ključnih komponentni PDT-a. Kako bi bili što učinkovitiji trebaju imati visoku selektivnost za tumorsko tkivo te visok prinos singletnog kisika budući da se smatra glavnim citotoksičnim agensom odgovornim za biološke učinke. Poželjno je da su amfifilni kako bi se mogli akumulirati u tumorskome tkivu, ali i istovremeno što lakše administrirati. Maksimum apsorpcije svjetlosti trebali bi imati na valnim duljinama od 680 do 800 nm budući da ta svjetlost prodire dovoljno duboko u organizam, a istovremeno ima dovoljno energije kako bi pobudila PS. Idealan PS ne smije biti toksičan u mraku te se mora brzo eliminirati iz zdravog tkiva kako bi se smanjila vjerojatnost nuspojava. Također mora biti stabilan na sobnoj temperaturi te imati visok stupanj kemijske čistoće (2,9,12).

Prvi PS koji je dobio odobrenje FDA bio je Photofrin. On spada u prvu generaciju PS-a. Iako su se pomoću njega uspješno liječile neke vrste tumora, ima brojne nedostatke. Neki od njih su otežana sinteza, maksimum apsorpcije pri nižim valnim duljinama te dugačak poluživot zbog čega je prisutna neželjena fototoksičnost (13).

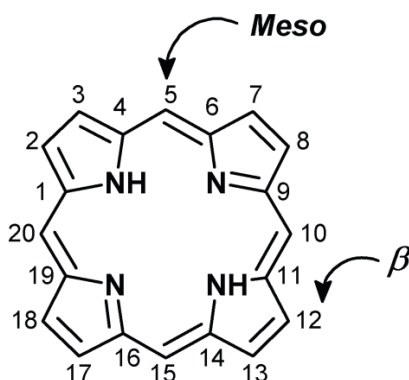
Većina PS-a druge generacije temelji se na strukturi porfirina. Ovoj skupini pripadaju benzoporfirini, bakterioklorini i klorini. Pripadnici ove generacije imaju mnoge prednosti u odnosu na PS prve generacije. Mogu se aktivirati svjetlošću većih valnih duljina što znači da prodiru dublje u tkiva. Imaju veće kvantne prinose singletnog kisika, selektivniji su za tkiva te se mogu brzo metabolizirati što smanjuje nuspojave. Njihov glavni nedostatak je slaba topljivost u vodi što je limitirajući faktor prilikom intravenske administracije te su zbog toga nužne nove metode dostave lijeka (9,13,14). Razvoj PS-a treće generacije temelji se na sintezi molekula koje imaju veći afinitet za tumorsko tkivo što smanjuje oštećenje okolnog, zdravog tkiva (9). Kako bi se povećala akumulacija PS-a na ciljanim mjestima, PS-i druge generacije konjugiraju se sa specifičnim molekulama kao što su protutijela, ugljikohidrati, aminokiseline i peptidi ili se inkapsuliraju u nosače kao što su

liposomi, micelle i nanočestice. Ovime se postiže aktivno ciljanje tumora koje je jedna od glavnih karakteristika PS-a treće generacije (13).

1.4. Porfirini kao fotosenzibilizatori

Većina fotosenzibilizatora koji se koriste u PDT-u temelji se na porfirinskoj strukturi (2). Porfirini su makrociklički spojevi koji su nužni za biološku aktivnost svih živih organizama (12). Imaju važnu ulogu u procesima prijenosa kisika, fotosintezi, staničnom disanju, oksidaciji masnih kiselina, staničnoj smrti i mnogim drugima (15,16).

Porfirinska struktura sastoji se od 4 pirolna prstena povezana s metinskim mostovima. Upravo zbog toga porfirini su visoko konjugirane molekule koje sadrže 22 π -elektrona, od čega ih je 18 delokalizirano po Hückel-ovom pravilu aromatičnosti ($4n+2$). Njihova aromatska struktura omogućava elektrofilne supstitucijske reakcije kao što su primjerice halogenacija, nitracija, sulfonacija i acilacija. U porfirinima se ove reakcije odvijaju na dvije različite pozicije, a to su *meso*-pozicije na metinskim mostovima te β -pirolne pozicije (Slika 4.). Kemijske karakteristike supstituenata određuju njihovu topljivost u vodi ili drugim otapalima. Također, manipulacija različitim supstituentima omogućava široku raznolikost biokemijskih funkcija porfirina (15,16). Kada su supstituenti na *meso*-pozicijama i β -pirolnim pozicijama isključivo vodikovi atomi, a dva od četiri makrociklička dušika protonirana, tetrapirrolna struktura naziva se porfin (16).

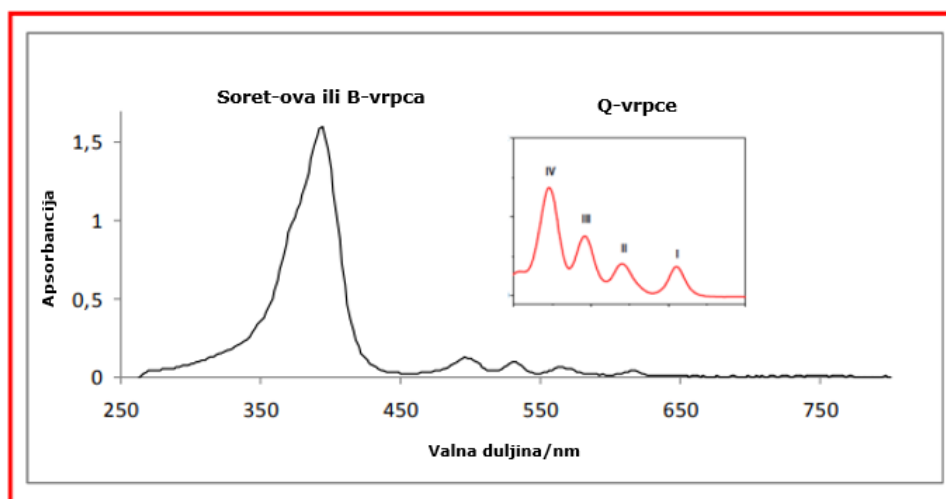


Slika 4. Struktura porfirina (16).

1.5. UV-Vis i fluorescencijski spektar porfirina

Jedna od glavnih karakteristika porfirina je visoko konjugirani π -elektronski sustav. On je odgovoran za njihovu dobru apsorpciju svjetla te karakterističnu ljubičastu boju. Upravo su zbog svoje boje dobili ime prema grčkoj riječi *purpura* što znači ljubičasta (15)(17).

Elektronski apsorpcijski spektar tipičnih porfirina sastoji se od dvije različite regije. Prva uključuje prijelaz iz osnovnog u drugo pobuđeno stanje (S^0 u $^2S^*$) koji je prikazan Soret-ovom ili B-vrpcom. Ovaj pik nalazi se u rasponu od 380 do 500 nm ovisno o tome ima li porfirin supstituente na *meso*- ili β -pozicijama te koji su to supstituenti. Druga regija uključuje slabe prijelaze iz osnovnog u prvo pobuđeno stanje (S^0 u $^1S^*$) koji su prikazani Q-vrpcom. Ovi pikovi najčešće se nalaze u rasponu od 500 do 750 nm te se označavaju rimskim brojevima I, II, III, IV (Slika 5.) (15). Porfirini slobodne baze imaju četiri Q-vrpce (18). Na apsorpcijski spektar porfirina utječu ligandi te centralni metalni atom porfirina (16).

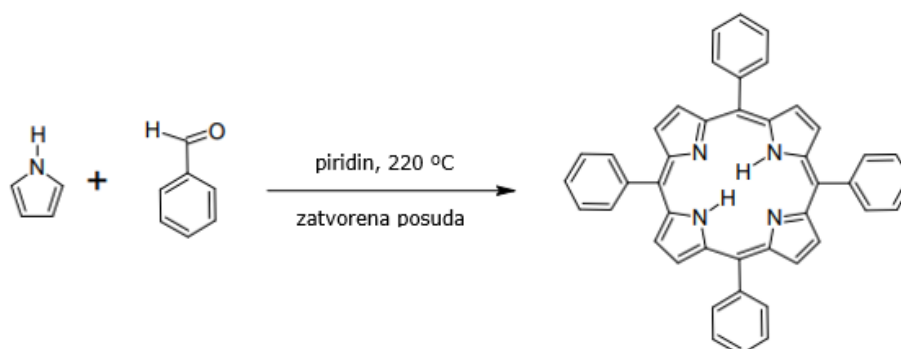


Slika 5. UV-Vis spektar porfirina. Modificirano prema slici iz literature (15).

Za fluorescencijski spektar porfirina karakteristična su dva pika koja se javljaju u rasponu od 600 do 730 nm, prilikom pobuđivanja porfirina elektromagnetnim zračenjem valne duljine na kojoj se nalazi Soret-ova vrpca (19).

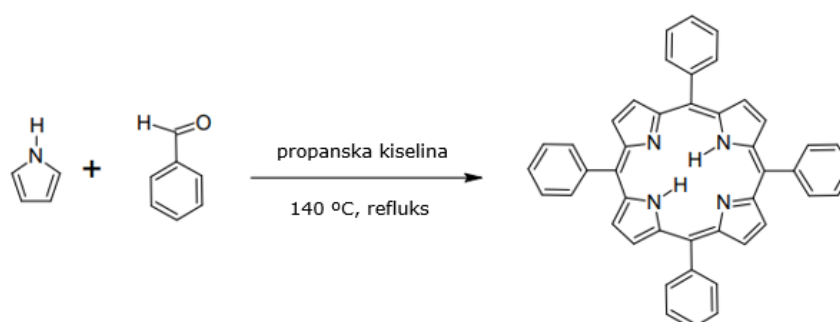
1.6. Sinteza porfirina

Rothemund je 1935. godine uspješno proveo sintezu porfirina u jednom koraku. U reakciji su sudjelovali benzaldehid i pirol u piridinu. Odvijala se u zatvorenoj posudi 24 sata na 220 °C. Glavni produkt reakcije bio je *meso*-supstituirani klorin te je zbog toga iskorištenje reakcije bilo nisko, oko 5% (Slika 6.) (15,20,21).



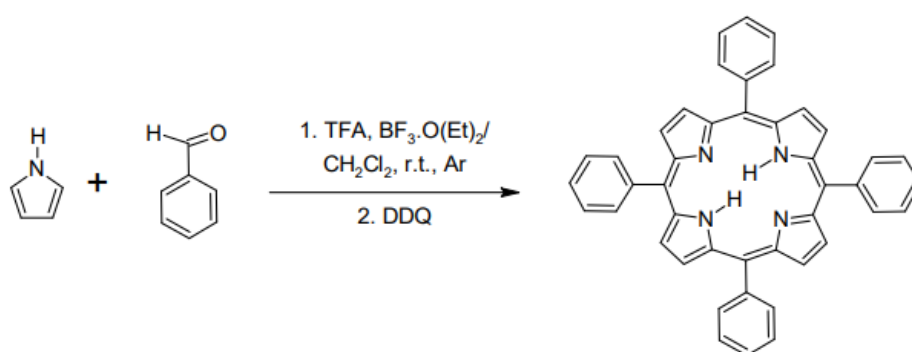
Slika 6. Sinteza tetrafenilporfirina (TPP-a) Rothemund-ovom metodom. Modificirano prema slici iz literature (21).

Adler, Longo i suradnici, 1960.-ih godina ponovno su istraživali sintezu *meso*-supstituiranih porfirina te razvili alternativnu metodu. Ovaj pristup uključivao je kondenzaciju pirola i aldehida uz prisustvo kiseline kao katalizatora te atmosferskog kiska. Reakcija se odvijala na visokoj temperaturi. Nastajanje klorina bilo je značajno manje u usporedbi s Rothemund-ovom sintezom te je posljedično i iskorištenje reakcije bilo veće, oko 20% (Slika 7.) (15,21,22).



Slika 7. Sinteza TPP-a Adler-Longo metodom. Modificirano prema slici iz literature (21).

Budući da se pomoću Adler-Longo metode nisu mogli kondenzirati mnogi aldehidi te posljedično dobiti raznovrsni porfirini, tijekom 1980.-ih, Lindsey je razvio novu metodu. Ona se sastojala od dva koraka, kondenzacije te oksidacije, koji su se odvijali na sobnoj temperaturi. Reakcije su se odvijale pod blagim uvjetima kako bi se postigla ravnoteža tijekom kondenzacije te kako bi se smanjila proizvodnja nusprodukata u svim koracima sinteze porfirina. Prednost ove reakcije je veće iskorištenje, 30-40%, te jednostavnije pročišćavanje produkata (Slika 8.) (15,21,23).



Slika 8. Sinteza TPP-a Lindsey metodom (21).

1.7. Amfifilni porfirini

Hidrofobni porfirini uspješno prolaze kroz stanične membrane te se akumuliraju u tumorska tkiva, međutim nemaju kliničku primjenu budući da se agregiraju u vodi. Agregacija porfirina sprječava njihovu cirkulaciju kroz krvotok te posljedično akumulaciju u tumorska tkiva. Također, agregati imaju smanjenu sposobnost stvaranja singletnog kisika te su posljedično i slabije učinkoviti u PDT-u. Upravo zbog toga istražuju se amfifilni porfirini (24,25).

Amfifilni porfirini imaju hidrofilne i hidrofobne dijelove. Tetrapirolna jezgra porfirina je hidrofobni dio molekule. Hidrofobni dio često uključuje i alkilne lance koji su konjugirani na porfirine. Hidrofobnost se može povećati povećanjem brojem ugljika u alkilnim lancima. Hidrofilni dijelovi potječu od nabijenih ili nenabijenih glava polarnih skupina. Jedan od načina povećavanja hidrofilnosti molekule je kvaternizacija dušika. Primjerice

piridilni dušici na *meso*-pozicijama porfirina često se koriste za kvaternizaciju pomoću *N*-alkilacije (25).

Amfifilni porfirini imaju važnu ulogu u PDT-u zato što ih hidrofilni dijelovi čine topljivima u vodi, sprječavaju agregaciju te olakšavaju njihovu administraciju, dok hidrofobni dijelovi olakšavaju ulazak i akumulaciju u stanice (25). Jedan su od načina pasivnog ciljanja tumora koji je prethodno dokazan učinkovitijim u PDT-u nego aktivni. Njihov hidrofobni dio odgovoran je za vezanje na lipoproteine niske gustoće (LDL). Budući da LDL receptori imaju povećanu aktivnost u tumorskim stanicama posljedično dolazi do selektivne akumulacije porfirina u tumorskom tkivu. Tumorska tkiva imaju niži pH nego normalna tkiva kao posljedicu bržeg metabolizma. Normalna tkiva imaju pH oko 7,00-8,00, dok tumorska tkiva imaju pH 5,85-7,68. Ova razlika u pH također potiče selektivnu akumulaciju porfirina u tumorska tkiva. Hidrofilni dijelovi porfirina mogu stvarati stabilne komplekse s albuminom, međutim pH tumorskog tkiva može smanjiti vjerojatnost vezanja za albumin i povećati za LDL što kao posljedicu ima povećano zadržavanje porfirina u tumorskom tkivu (25,26).

1.7.1. *N*-metilirani tripiridilporfirin konjugiran s dugim alkilnim lancem (18C) koji sadrži epoksidnu jedinicu

Prethodno istraživanje pokazalo je da se lipofilnost *ortho* Zn(II) *N*-alkilpiridilporfirina povećava s promjenom duljine alkilnih lanaca od 1C do 6C atoma te se na isti način povećava i njihova akumulacija u tumorske stanice. Kod porfirina s dužim alkilnim lancima uočena je i veća fotodinamička aktivnost (27). Nadalje, uočeno je da *N*-metilirani tripiridilporfirin s konjugiranim alkilnim lancem od 18C atoma posjeduje značajno veću fototoksičnost na HeLa staničnu liniju, nego gotovo identičan porfirin koji nema konjugiran dugi alkilni lanac. Ovime se dokazalo da lipofilnost molekule, koja se u ovim slučajevima mijenjala duljinom konjugiranih alkilnih lanaca, značajno utječe na bioraspoloživost lijeka (28).

N-metilirani tripiridilporfirini pokazali su se učinkovitiji u PDT-u od *N*-oksidiranih tripiridilporfirina. Međutim, dva metilirana amfifilna tripiridilporfirina, s alkilnim lancem od 18C atoma, pokazala su značajnu tamnu toksičnost dok ju niti jedan ispitivani oksidopiridilporfirin nije (1). Smatra se da bi daljnje modifikacije alkilnog lanca (18C) *N*-metiliranog tripiridilporfirina mogle poboljšati njegov fotodinamički učinak te potencijalno smanjiti tamnu toksičnost. Jedan način je epoksidacija alkilnog lanca budući da su prethodna istraživanja pokazala da epoksidirane masne kiseline te neki njihovi metaboliti posjeduju protutumorsku aktivnost (29). Primjerice uočeno je da ω -3 epoksi-masne kiseline utječu na vijabilnost MDA-MB-231 stanica raka dojke. Narušavaju staničnu proliferaciju te aktiviraju apoptozu tako što smanjuju proizvodnju ATP-a te povećavaju aktivnost kaspaze 3 (30). Također, u jednom istraživanju pokazano je kako administracija *cis*-9,10-epoksi stearinske kiseline HepG2 stanicama uzrokuje oštećenje DNA, oksidativni stres te apoptozu. Smatra se da u ovom slučaju ROS-ovi imaju važnu ulogu u indukciji DNA oštećenja i oksidativnog stresa *in vitro* (31).

2. Cilj rada

Cilj ovog diplomskog rada je optimizacija protokola za sintezu *N*-metiliranog tripiridilporfirina konjugiranog s dugim alkilnim lancem (18C) koji sadrži epoksidnu jedinicu na poziciji 9,10 te analizirati njegova (foto)fizikalna svojstva (apsorpcijski i fluorescencijski spektri te kvantni prinos fluorescencije).

Testom citotoksičnosti (MTT test, 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolijev bromid test) usporedit će se učinkovitost novosintetiziranog porfirina i prethodno sintetiziranog *N*-metiliranog tripiridilporfirina s konjugiranim dugim alkilnim lancem (18C) za primjenu u PDT-u na ljudskim epitelijalnim stanicama adenokarcinoma dojke.

3. Materijali i metode

3.1. Opće napomene

Kemikalije i reagensi: U reakcijama su korišteni komercijalno dostupni reagensi, bez prethodnih manipulacija, proizvođača VWR chemicals (SAD), Sigma-Aldrich (SAD), Thermo Fisher Scientific (SAD), GRAM-MOL d.o.o. (Hrvatska), Acros Organics (Belgium), Alfa Aesar GmbH&Co (SAD), CARLO ERBA Reagents (Italija).

Tankoslojna kromatografija (TLC): Tijekom reakcija pratio se pomoću tankoslojne kromatografije na TLC pločicama presvučenim slojem silika-gela (Macherey-Nagel (Njemačka), 0,20 mm silika-gel 60 Å s fluorescentnim indikatorom UV₂₅₄) uz UV lampu ($\lambda = 254$ nm i $\lambda = 365$ nm).

Kromatografija na stupcu: Dobiveni produkti pročišćavali su se pomoću kromatografije na stupcu prilikom čega se koristio silika-gel (Macherey-Nagel (Njemačka) silika-gel 60 Å, 0,04-0,063 mm) te za eluciju otopine diklometan (DCM)/metanol (MeOH) i *n*-heksan (Hex)/etil-acetat (EtOAc) u različitim omjerima.

UV-Vis spektroskopija: UV-Vis spektri snimljeni su pomoću Agilent Cary 60 UV-Vis (SAD) spektrofotometra prilikom čega su korištene kvarcne kivete (Hellma Analytics, Njemačka) ($\lambda = 350 - 700$ nm).

Fluorescentna spektroskopija: Fluorescentni spektri snimljeni su pomoću Agilent Cary Eclipse (SAD) spektrofotometra prilikom čega su korištene kvarcne kivete (Hellma Analytics, Njemačka) ($\lambda = 550 - 800$ nm).

Kvantni prinos fluorescencije izračunat je formulom: $\phi_{FL} = \phi_{ref} * \frac{n^2}{n_{ref}^2} * \frac{I}{A} * \frac{A_{ref}}{I_{ref}}$,

- ϕ_{ref} - kvantni prinos fluorescencije referentnog spoja koji se može pronaći u literaturi; referentni spoj korišten u radu je TPP otopljen u toluenu $\phi_{FL} = 0,11$ (32)

- η - indeks loma korištenog otapala
- η_{ref} – indeks loma otapala korištenog za referentni spoj (toluen)
- I – integracija intenziteta fluorescencije
- I_{ref} – integracija intenziteta fluorescencije za referentni spoj
- A – apsorpcija spoja pri valnoj duljini ekscitacije*
- A_{ref} - apsorpcija referentnog spoja pri valnoj duljini ekscitacije*

* Intenzitet apsorpcije ispitivanih te referentnog spoja bio je između 0,20 i 0,25 pri $\lambda_{ex} = 420$ nm.

FTIR spektroskopija: Infracrveni spektri snimljeni su pomoću Agilent Cary 630 (SAD) FT-IR spektrofotometra.

NMR spektroskopija: NMR spektri snimljeni su pomoću Bruker Avance III HD 600 MHz/54 mm NMR spektrofotometra u Laboratoriju za NMR spektroskopiju na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Korištena su otapala deuterirani kloroform i metanol.

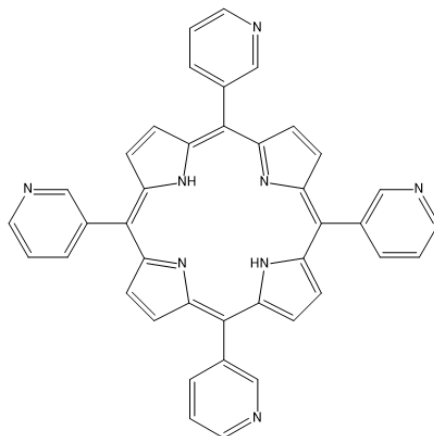
Računalne metode: Molekulske strukture te reakcijski mehanizmi nacrtani su pomoću ChemDraw Professional 17,0 (PerkinElmer Informatics, SAD). Za prikaz UV-Vis i fluorescentnih spektara koristio se program Origin 2022 (OriginLab corporation, SAD). Programom SpinWorks 4 analizirani su NMR spektri. MS Excel (Microsoft Corporation, SAD) korišten je za analizu rezultata testa citotoksičnosti.

Stanična kultura: Za uzgajanje staničnih kultura i biološke eksperimente korišteni su medij i dodaci mediju proizvođača PAN Biotech (Njemačka) te Lonza (Švicarska).

3.2. Sinteze spojeva

3.2.1. Adler-Longo sinteza

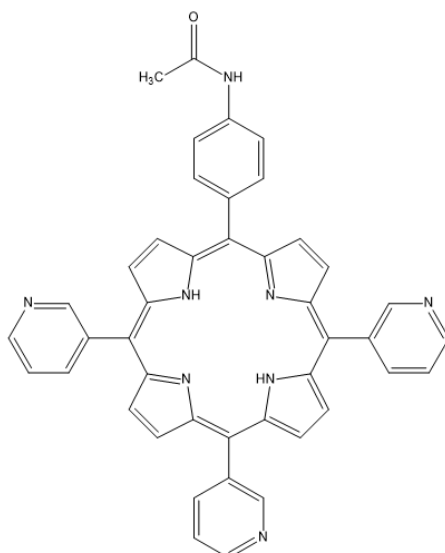
1) 5,10,15,20-tetrakis(3-piridil)porfirin



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

Molekulska masa: 618,69 g/mol

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



Molekulska formula: $C_{43}H_{30}N_8O$

Molekulska masa: 674,75 g/mol

3-piridinkarboksialdehid (1,79 g, 0,02 mol, 3 ekv.) i 4-acetamidobenzaldehid (0,92 g, 5,64 mmol, 1 ekv.) otopljeni su u propanskoj kiselini (70 mL). Otopina se postepeno zagrijavala te miješala. Tijekom 10 minuta u nju je dodavan prethodno destilirani pirol (1,55 mL, 0,02 mol, 4 ekv.) Nakon što je dodan sav pirol, reakcijska smjesa se zagrijavala (90 °C) 45 minuta uz prisustvo zraka i svjetlosti. Dobiveni produkti potvrđeni su TLC-om, a otapalo je uklonjeno *in vacuo*. Reakcijska smjesa pročišćena je dvjema kolonskim kromatografijama. Kao mobilna faza korištena je smjesa otapala DCM/MeOH 30:1.

Prva porfirinska frakcija, produkt **1**, potvrđena je TLC-om. Dobiveni produkt otopljen je u DCM-u te je zatim dodan *n*-heksan u suvišku kako bi se potaknula njegova precipitacija. Dobiveni precipitat skupljen je filtracijom i izoliran kao ljubičasta krutina (210,8 mg, 6%).

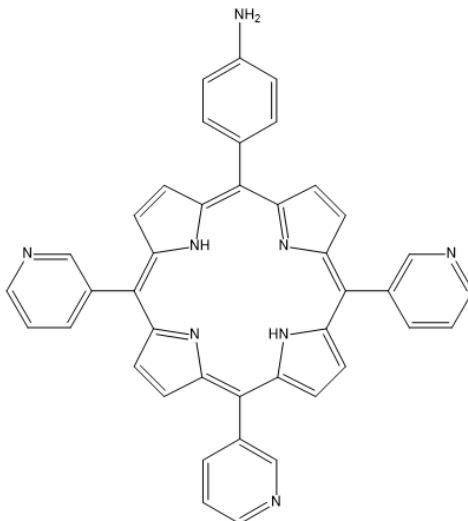
Druga porfirinska frakcija, produkt **2**, također je potvrđen TLC-om. Otopljen je u DCM-u te je zatim dodan *n*-heksan u suvišku kako bi se potaknula njegova precipitacija. Dobiveni precipitat izolirao se filtracijom kao ljubičasta krutina (84,5 mg, 2%).

UV-Vis (CH₂Cl₂): λ_{\max}/nm ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 10^3$) = 419 (310,0), 515 (15,0), 551 (6,8), 590 (4,6), 647 (3,0).

Fluorescencija (CH₂Cl₂, $\lambda_{\text{ex}} = 419 \text{ nm}$): $\lambda_{\text{em}}/\text{nm} = 651, 717$; $\phi_{\text{FL}} = 0,1$.

3.2.2. Hidroliza produkta **2**

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



Molekulska formula: $C_{41}H_{28}N_8$

Molekulska masa: 632,71 g/mol

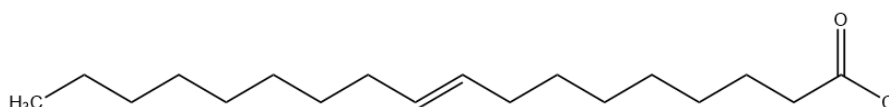
Produkt **2** (84,5 mg, 0,12 mmol) otopljen je u 18% vodenoj otopini klorovodične kiseline (HCl-a) (30 mL). Reakcijska smjesa zagrijavala se 2 sata (uz refluks) zaštićena od svjetla. Nakon što se reakcijska smjesa ohladila, otapalo je uklonjeno *in vacuo*. Dobivena krutina otopljena je u smjesi otapala DCM/trietilamin (TEA) (9:1) te je miješana 30 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetla. Zatim se reakcijska smjesa isprala destiliranom vodom (3x50 mL) te zasićenom otopinom natrijeva klorida (NaCl) (50 mL). Organski sloj sušio se pomoću natrijeva sulfata (Na_2SO_4) 30 minuta, nakon čega je otopina filtrirana, a otapalo uklonjeno *in vacuo*. Dobiveni produkt **3** dokazan je TLC-om te pročišćen kolonskom kromatografijom uz mobilnu fazu DCM/MeOH (30:1). Otopljen je u DCM-u nakon čega je dodan *n*-heksan u suvišku kako bi se potaknula njegova precipitacija. Dobiveni precipitat skupljen je filtracijom i izoliran kao ljubičasta krutina (69,7 mg, 88%).

UV-Vis (CH₂Cl₂): λ_{\max}/nm ($\epsilon/M^{-1}\text{cm}^{-1} \times 10^3$) = 420 (200,0), 518 (9,9), 555 (5,2), 593 (2,8), 650 (1,8).

Fluorescencija (CH₂Cl₂, $\lambda_{\text{ex}} = 420 \text{ nm}$): $\lambda_{\text{em}}/\text{nm} = 656, 721$; $\phi_{\text{FL}} = 0,1$.

3.2.3. Kloriranje oleinske kiseline

4) (Z)-oktadec-9-enoil klorid (oleoil-klorid)



Molekulska formula: C₁₈H₃₃ClO

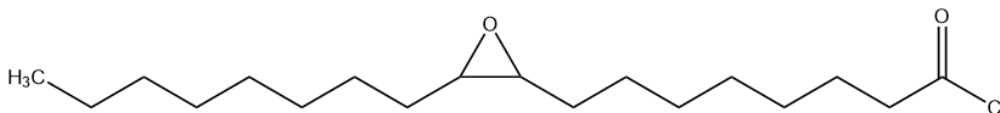
Molekulska masa: 300,91 g/mol

Oleinska kiselina (164,3 mg, 0,58 mmol, 1 ekv.) otopljena je u suhom DCM-u (15 mL). Reakcijska smjesa zaštićena je od svjetla te stavljena pod dušikovu atmosferu (N₂ atm). Zatim je u nju dodano nekoliko kapi piridina te tionil-klorid (SOCl₂) (210 μ L, 2,90 mmol, 5 ekv.). Reakcija je ostavljena preko noći te je idući dan zaustavljena. Otapalo je uklonjeno *in vacuo*, a dobivena krutina otopljena je u DCM-u (20 mL). Zatim je provedeno ispiranje pomoću destilirane vode (4x20 mL). Organski sloj sušio se 30 minuta pomoću Na₂SO₄, nakon čega je otopina filtrirana, a otapalo uklonjeno *in vacuo*. Produkt **4** izoliran je kao žuta uljasta tekućina (144,1 mg, 82%).

¹H NMR (600 MHz, CD₃Cl): δ/ppm 0,88 (t, $J = 7,2 \text{ Hz}$, 3H, CH₃), 1,39 - 1,21 (m, 20H, preklapanje C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂, C⁷H₂, C¹²H₂, C¹³H₂, C¹⁴H₂, C¹⁵H₂, C¹⁶H₂, C¹⁷H₂), 1,76 - 1,60 (m, 2H, C³H₂), 2,05 - 1,97 (m, 4H, C⁸H₂, C¹¹H₂), 2,88 (t, $J = 7,2 \text{ Hz}$, 2H, C²H₂), 5,39 - 5,29 (m, 2H, C⁹H=C¹⁰H).

3.2.4. Epoksidacija oleoil-klorida

5) *Cis*-9,10-epoksisistearol klorid



Molekulska formula: $C_{18}H_{33}O_2Cl$

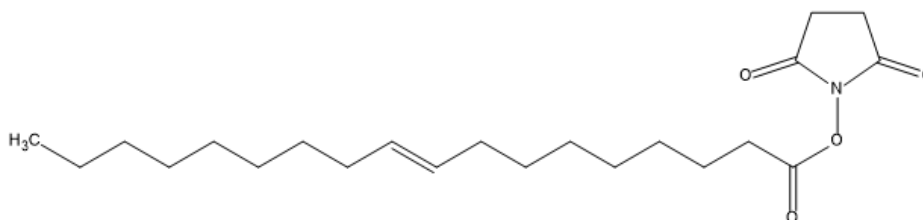
Molekulska masa: 316,90 g/mol

Produkt **4** (30 mg, 0,10 mmol, 1 ekv.) otopljen je u suhom DCM-u (15 mL). Reakcijska smjesa miješala se na sobnoj temperaturi te je stavljena pod N_2 atm. U nju je postepeno dodavana *meta*-kloroperoksibenzojeva kiselina (*m*-CPBA) (35,6 mg, 0,20 mmol, 2 ekv.). Napredak reakcije provjeravan je TLC-om uz Hex/Et₂O/HAc 80:20:1,5 kao smjesu otapala. 26 sati od početka reakcije dodan je TEA u suvišku (0,5 mL, 3,60 mmol, 24 ekv.) te je reakcija miješana još 1 sat na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa se potom isprala s destiliranom vodom (5x20 mL). Organski sloj sušio se preko Na_2SO_4 , otopina je zatim filtrirana, a otapalo uklonjeno *in vacuo*. Reakcijska smjesa pročišćena je trima kolonskim kromatografijama s mobilnim fazama Hex/EtOAc (8:2 i 9:1). Produkt **5** izoliran je kao bijela krutina (8,2 mg).

Napomena: ATR-FTIR spektroskopijom pokazano je da produkt **5** nije produkt od interesa.

3.2.5. Aktivacija oleinske kiseline *N*-hidroksisukcinimidom

6) Sukcinimidil-oleat



Molekulska formula: $C_{22}H_{37}NO_4$

Molekulska masa: 379,50 g/mol

Oleinska kiselina (2,5 g, 8,85 mmol, 1 ekv.) i *N*-hidroksisukcinimid (NHS) (1,53 g, 0,01 mol, 1,5 ekv.) otopljeni su u suhom DCM-u (140 mL). Reakcijska smjesa ohlađena je na 0 °C te je dodan piridin (0,3 mL, 3,71 mmol, 0,42 ekv.). Potom je tijekom 40 minuta dodavan *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid (DCC) (2,68 g, 0,01 mol, 1,5 ekv.). Nakon što je sav DCC dodan, reakcijska smjesa nastavila se miješati na sobnoj temperaturi. Napredak reakcije pratio se TLC-om (Hex/Et₂O/HAc 80:20:1,5). Budući da sav reaktant nije izreagirao, reakcija je ostavljena preko noći. Idući dan završetak reakcije potvrđen je TLC-om te je otapalo uklonjeno *in vacuo*. Reakcijska smjesa pročišćena je dvjema kolonskim kromatografijama s mobilnim fazama Hex/EtOAc (9:1 i 85:15). Produkt **6** izoliran je kao bijela krutina (2,59 g, 77%).

Napomena: Dobiveni produkt nije se mogao u potpunosti pročistiti, sadrži i oleinsku kiselinu.

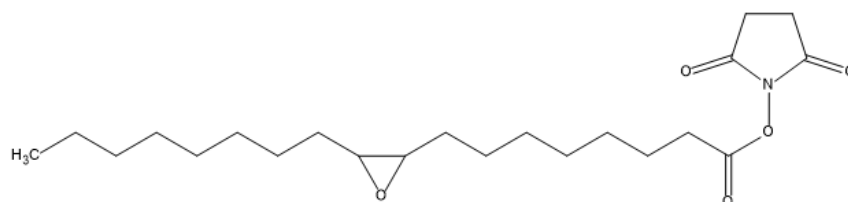
¹H NMR (600 MHz, CD₃Cl): δ/ppm 0,88 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H, CH₃), 1,47 - 1,09 (m, 22H, preklapanje C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂, C⁷H₂, C¹²H₂, C¹³H₂, C¹⁴H₂, C¹⁵H₂, C¹⁶H₂, C¹⁷H₂), 1,74 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H, C³H₂), 2,08 - 1,96 (m, 4H, C⁸H₂,

$C^{11}H_2$), 2,60 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, C^2H_2), 3,02 – 2,69 (m, 4H, sukcinimid-2,3-H), 5,40 – 5,30 (m, 2H, $C^9H=C^{10}H$).

Napomena: Na 1H NMR spektru uočena je prisutnost viška atoma vodika na multiplitetu 1,47 – 1,09 koji bi mogao odgovarati zaostalom NHS-u ili oleinskoj kiselinu.

3.2.6. Epoksidacija sukcinimidil-oleata

7) Ester 9,10 epoksisistearinske kiseline i *N*-hidroksisukcinimida



Molekulska formula: $C_{22}H_{37}NO_5$

Molekulska masa: 395,30 g/mol

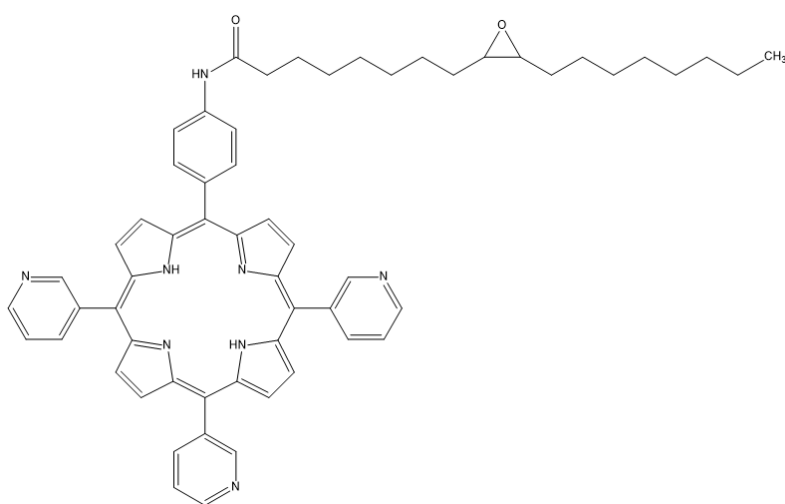
Produkt **6** (1,33 g, 3,50 mmol, 1 ekv.) otopljen je u suhom DCM-u (20 mL). Reakcijska smjesa nalazila se pod N_2 atm te konstantno miješala. *m*-CPBA (0,91 g, 5,25 mmol, 1,5 ekv.) također je otopljen u suhom DCM-u (10 mL) te dodavan u reakcijsku smjesu tijekom 15 minuta. Tijek reakcije provjeren je TLC-om (Hex/EtOAc 8:2). Nakon 2 sata dodan je TEA (1 mL, 7,17 mmol, 2 ekv.) te se reakcijska smjesa miješala još sat vremena na sobnoj temperaturi. Otapalo je uklonjeno *in vacuo*, a dobiveni produkt sušio se preko noći u eksikatoru. Potom je pročišćen kolonskom kromatografijom s mobilnom fazom Hex/EtOAc 85:15. Produkt **7** izoliran je kao prozirna uljasta tekućina (979,5 mg, 71%).

1H NMR (600 MHz, CD_3Cl): δ /ppm 0,88 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H, CH_3), 1,57 - 1,09 (m, 24H, preklapanje C^4H_2 , C^5H_2 , C^6H_2 , C^7H_2 , C^8H_2 , $C^{11}H_2$, $C^{12}H_2$, $C^{13}H_2$,

$C^{14}H_2$, $C^{15}H_2$, $C^{16}H_2$, $C^{17}H_2$), 1,75 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H, C^3H_2), 2,61 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, C^2H_2), 2,96 – 2,69 (m, 6H, preklapanje epoksid $C^{9,10}H$, sukcinimid-2,3- H).

3.2.7. Konjugacija produkta **7** na 5-(4-aminofenil)-10,15,20-tris(3-piridil)porfirin

8) Epoksi-9,10 steartiltripiridilporfirin



Molekulska formula: $C_{59}H_{60}N_8O_2$

Molekulska masa: 913,18 g/mol

Produkt **3** (30 mg, 0,05 mmol, 1 ekv.) otopljen je u suhom DCM-u (9 mL) te je potom dodan TEA (0,12 mL, 0,85 mmol, 18 ekv.). Reakcijska smjesa propuhivana je s N_2 15 minuta. Produkt **7** (827,6 mg, 2,09 mmol, 44 ekv.) otopljen je u suhom DCM-u (5 mL) te dodavan u reakcijsku smjesu tijekom 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Napredak reakcije pratio se TLC-om (DCM/MeOH 9:1). Tri dana od početka reakcije dodano je još produkta **7** (145,7 mg, 0,37 mmol, 7 ekv.) otopljenog u suhom DCM-u (4 mL). Reakcija je zaustavljena 5 dana od početka te je otapalo uklonjeno *in vacuo*. Reakcijska smjesa pročišćena je dvjema kolonskim kromatografijama za

koje je korištena mobilna faza DCM/MeOH (40:1 i 35:1). Produkt **8** izoliran je kao ljubičasta krutina (7,1 mg).

UV-Vis (CH₂Cl₂): $\lambda_{\max}/\text{nm} = 419, 516, 551, 591, 647$.

Fluorescencija (CH₂Cl₂, $\lambda_{\text{ex}} = 419 \text{ nm}$): $\lambda_{\text{em}}/\text{nm} = 651, 717$; $\phi_{\text{FL}} = 0,09$.

¹H NMR (600 MHz, CD₃Cl): $\delta/\text{ppm} -2,78 - (-87)$ (m, 2H, pirol NH), 0,92 - 0,81 (m, 3H, CH₃), 1,62 - 1,09 (m, 24H, preklapanje C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂, C⁷H₂, C⁸H₂, C¹¹H₂, C¹²H₂, C¹³H₂, C¹⁴H₂, C¹⁵H₂, C¹⁶H₂, C¹⁷H₂), 1,88 (q, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 2H, C³H₂), 2,55 (t, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 2H, C²H₂), 2,98 - 2,91 (m, 2H, epoksid C^{9,10}H), 7,59 (s, 1H, amid NH), 7,82 - 7,75 (m, 3H, Py-5-H), 8,21 - 8,15 (m, 2H, Ar-2,6-H), 8,58 - 8,46 (m, 3H, Py-6-H), 8,87 - 8,66 (m, 8H, β -H), 9,11 - 9,06 (m, 3H, Py-4-H), 9,50 - 9,41 (m, 3H, Py-2-H).

Napomena: ¹H NMR spektroskopijom pokazano je da produkt **8** nije čist, odnosno da je prisutan još jedan porfirin.

3.2.8. Metilacija produkta **8**

Produkt **8** (4,4 mg) otopljen je u suhom *N,N*-dimetilformamid-u (DMF-u) (8 mL) te je reakcijska smjesa propuhivana s N₂ 15 minuta. Zatim je dodan metil-jodid (CH₃I) (0,06 mL, 0,96 mmol) te je reakcija puštena preko noći, zaštićena od svjetla i na sobnoj temperaturi. Idući dan reakcija je provjerena TLC-om uz sljedeće smjese otapala: acetonitril (ACN)/H₂O/kalijev nitrat (KNO₃) 8:1:1 te DCM/MeOH 9:1. Kako bi se reakcija zaustavila otapalo je uklonjeno *in vacuo*. Zatim je uslijedila zamjena protuiona (I⁻ u Cl⁻) koja je napravljena dvjema različitim metodama.

Metoda 1: Produkt konjugacije otopljen je u vodi te je zatim dodana zasićena otopina amonijeva heksafluorofosfata (NH₄PF₆) kako bi se potaknula precipitacija. Dobiveni talog ispran je vodom tri puta te sakupljen

filtracijom. Nakon što se preko noći osušio u eksikatoru, otopljen je u acetonu te je dodana zasićena otopina tetrabutilamonijevog klorida (TBAC) kako bi se potaknula precipitacija. Talog je tri puta ispran acetonom te sakupljen filtracijom. U zadnjem koraku, talog je otopljen u metanolu, a njegova precipitacija potaknuta je dodatkom dietil-etera (Et₂O). Nakon što je talog ispran tri puta pomoću Et₂O, sakupljen je filtracijom. Produkt **9** izoliran je kao ljubičasta krutina (1,4 mg).

Metoda 2: Produkt konjugacije otopljen je u MeOH (10 mL) te je potom u reakcijsku smjesu dodan Amberlite IRA-402(Cl) (1 g). Reakcijska smjesa miješala se 2 sata na sobnoj temperaturi nakon čega je provedena filtracija, a otapalo uklonjeno *in vacuo*. Dobiveni produkt otopljen je u nekoliko kapljica MeOH te je njegova precipitacija potaknuta pomoću Et₂O. Produkt **10** sakupljen je filtracijom te izoliran kao ljubičasta krutina (4,4 mg).

UV-Vis (MeOH): $\lambda_{\max}/\text{nm} = 422, 515, 550, 588, 645$.

Fluorescencija (MeOH, $\lambda_{\text{ex}} = 422 \text{ nm}$): $\lambda_{\text{em}}/\text{nm} = 650, 714$; $\phi_{\text{FL}} = 0,06$.

¹H NMR (600 MHz, MeOD): δ/ppm 0,87 – 0,79 (m, 3H, CH₃), 1,66 – 1,14 (m, 24H, preklapanje C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂, C⁷H₂, C⁸H₂, C¹¹H₂, C¹²H₂, C¹³H₂, C¹⁴H₂, C¹⁵H₂, C¹⁶H₂, C¹⁷H₂), 1,85 (q, $J = 7,5 \text{ Hz}$, 2H, C³H₂), 2,52 – 2,43 (m, 3H, neodređeni pik, moguće protoni koji su dio tercijarnog amina), 2,57 (t, $J = 7,5 \text{ Hz}$, 2H, C²H₂), 4,77 (s, 9H, piridin N-CH₃), 8,12 – 8,04 (m, 2H, Ar-2,6-H), 8,22 – 8,15 (m, 2H, Ar-3,5-H), 8,60 – 8,54 (m, 3H, Py-5-H), 9,34 – 8,78 (m, 8H, β -H), 9,41 – 9,34 (m, 3H, Py-6-H), 9,48 – 9,41 (d, $J = 7 \text{ Hz}$, 3H, Py-4-H), 9,98 – 9,88 (s, 3H, Py-2-H).

Napomena: ¹H NMR spektroskopijom pokazano je da produkt **9** nije produkt od interesa budući da ne sadrži epoksidnu jedinicu.

3.3. Stanična kultura

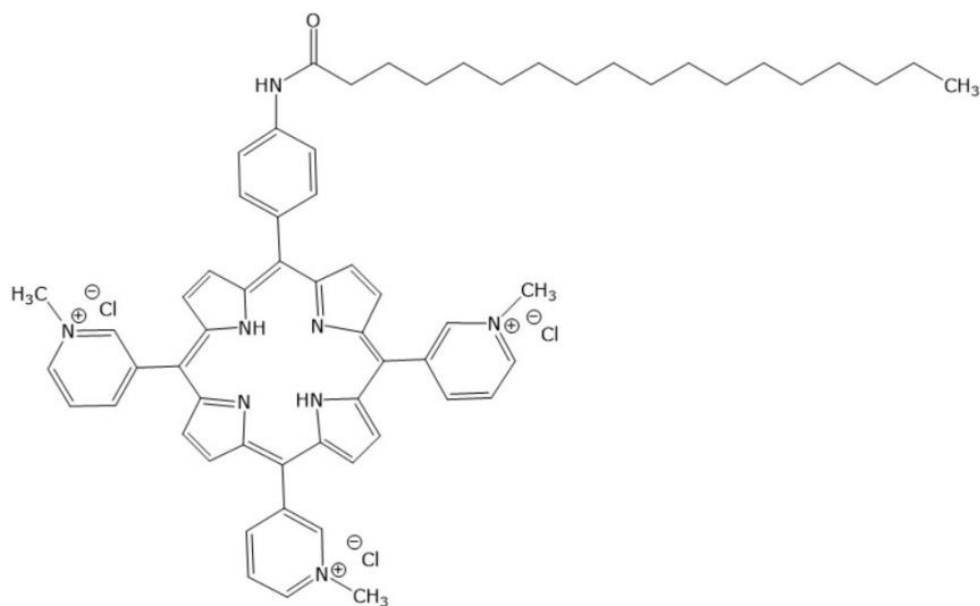
3.3.1. Održavanje stanica

Za potrebe ovoga rada korištena je stanična linija MDA-MB-231. To su ljudske epitelijalne stanice adenokarcinoma dojke. Uzgajane su u bocama (T75) s ventiliranim čepom za stanične kulture u Dulbecco modificiranom Eagle mediju (DMEM) obogaćenom s 10%-tnim fetalnim goveđim serumom (FBS), 1%-tnim L-glutaminom i 1%-tnom otopinom antibiotika penicilin/streptomycin (Pen/Strep). Stanice su se inkubirale na 37 °C te 5% CO₂. Kako bi se omogućio njihov daljni rast, pasažirale su se pri konfluentnosti od najmanje 80%. Prvo se uklonio medij te su se zatim stanice isprale s fosfatnim puferom (PBS) za uklanjanje zaostalog medija. Potom se dodaje tripisin uz inkubaciju od 1 do 2 minute na 37 °C. Dodaje se svježeg medija te potom vadi dio kako bi se smanjio broj stanica u boci. Na samom kraju ponovno se dodaje svježeg medija za daljni rast stanica.

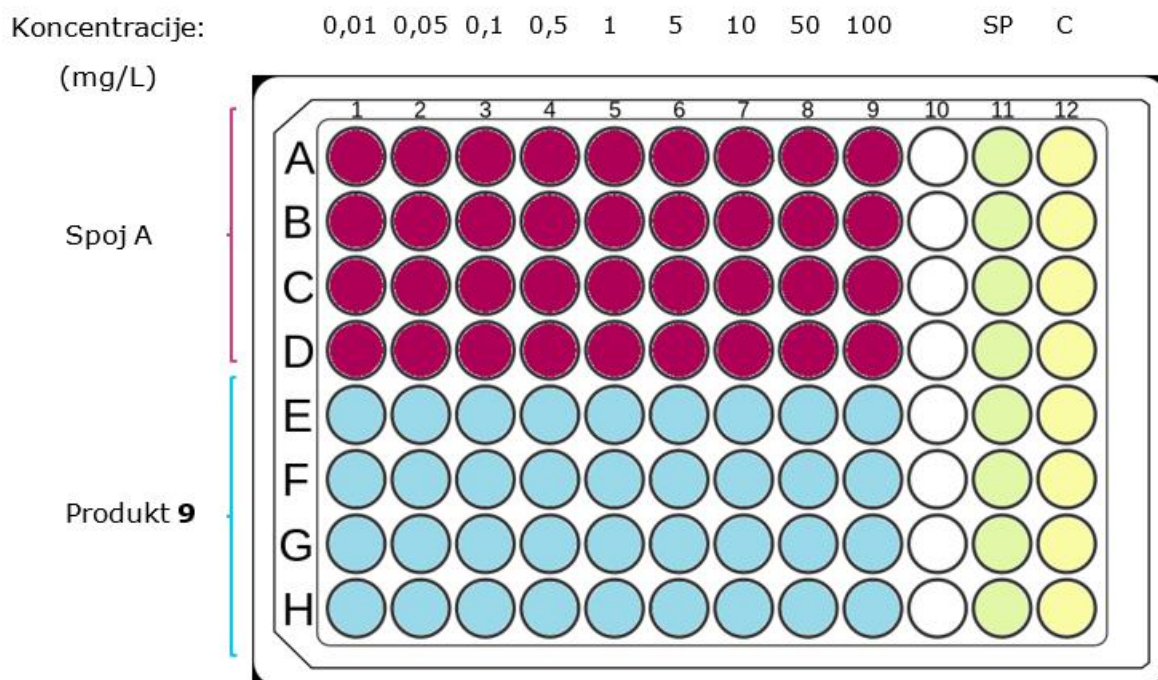
3.3.2. Test citotoksičnosti (MTT test)

Kako bi se mogao provesti MTT test stanice su prvo prebrojane koristeći Neubauer komoricu uz tripansko modriilo kako bi se razlikovale mrtve od živih stanica. Napravljen je izračun volumena medija i stanica koji su potrebni da u svakoj jažici bude po 5000 stanica te su stanice nasadene na dvije 96-well pločice. Stanice su se dva dana inkubirale na 37 °C i 5% CO₂. Napravljen je izračun potrebnih koncentracija porfirina kojima će se tretirati stanice. Testirane koncentracije bile su u rasponu od 0,01 mg/L do 100 mg/L. Jedan dio stanica tretiran je metiliranim stearoil-konjugiranim tripiridilporfirinom (spoj A) čija je struktura prikazana na Slici 9., a drugi dio stanica produktom **9**. Sva mjerenja provedena su u kvadriplikatu. U jažice koje su korištene kao slijepa proba (SP) samo su dodani MTT i DMSO, a u jažice koje su korištene kao kontrola (C) nasadene su stanice koje se nisu tretirale porfirinima. Na Slici 10. prikazan je izgled 96-well pločica. Nakon

24 sata inkubacije stanica ovim spojevima, izvađen je medij te zamijenjen sa svježim medijem.



Slika 9. Struktura spoja A.



Slika 10. Shematski prikaz 96-well pločica.

Jedna pločica (*light*) osvjetljavana je 30 minuta lampom crvenog osvjetljenja ($\lambda = 645 \text{ nm}$, 2 mW/cm^2 , ukupna doza svjetlosti = $3,6 \text{ J/cm}^2$),

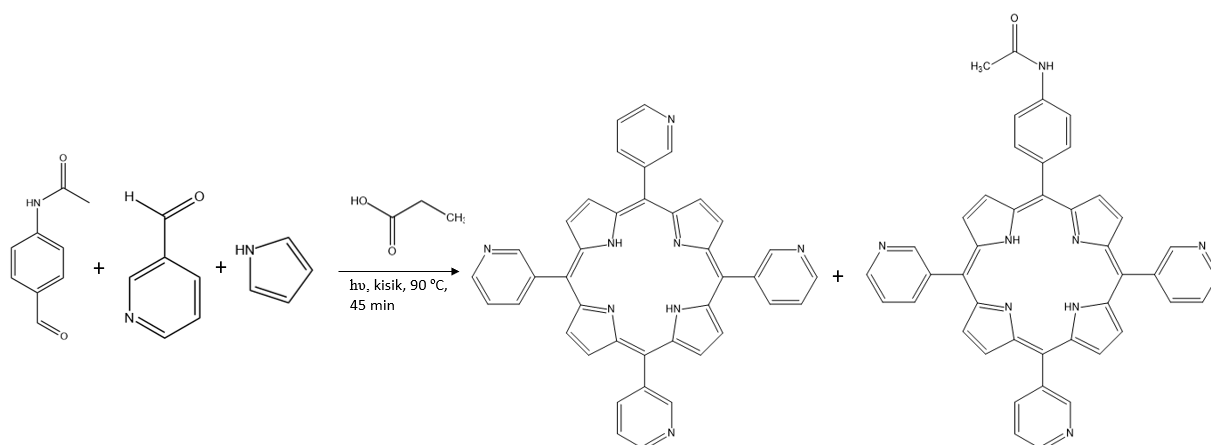
dok je druga (*dark*) bila u mraku cijelo vrijeme. 36 sati nakon osvjetljavanja uklonjen je medij te je dodano 40 μL MTT-a. Nakon dodatka MTT-a pločice su inkubirane 3 sata zamotane u alu-foliju. Nakon inkubacije dodano je po 160 μL DMSO-a u sve jažice. Kako bi se pločice analizirale mjerena je njihova apsorbancija na valnoj duljini formazana ($\lambda = 570 \text{ nm}$) pomoću monokromatora Tecan Sunrise. Dobiveni podaci analizirani su u programu MS Excel.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Sinteza početnih porfirina

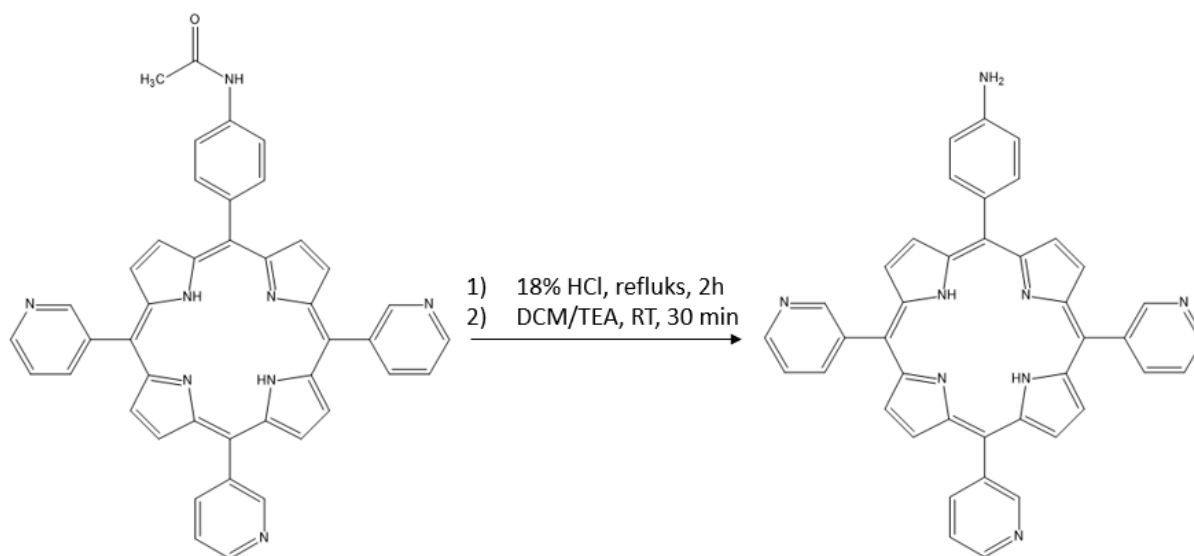
Početni porfirini sintetizirali su se pomoću modificirane Adler-Longo metode prikazane na Slici 11. (22). Reakcija se odvijala uz propansku kiselinu kao katalizator na 90 °C. Prisustvo zraka i svjetlosti bilo je nužno kako bi se porfirinogen mogao oksidirati u porfirin. Kako bi se dobili *meso* supstituirani porfirini u reakcijsku smjesu su uz pirol dodani i 3-piridinkarboksialdehid te 4-acetamidobenzaldehid. 3-piridinkarboksialdehid važan je zato što ima dušik na *meta* poziciji koji se može alkilirati kako bi se povećala hidrofилnost dobivenog porfirina. 4-acetamidobenzaldehid važan je zato što sadrži amidnu skupinu pogodnu za hidrolizu u amino skupinu koja je dalje dobar nukleofil za reakcije nukleofilne acilne supstitucije (28).

Nedostatak Adler-Longo metode je otežano pročišćavanje posebice kada je više aldehida uključeno u reakciju. Reakcijska smjesa pročišćena je dvjema kolonskim kromatografijama. Kao prva frakcija izoliran je simetrični porfirin, odnosno 5,10,15,20-tetrakis(3-piridil)porfirin (produkt **1**) s iskorištenjem od 6%. Kao druga frakcija izoliran je asimetrični porfirin, odnosno 5-(4-acetamidofenil)-10,15,20-tris(3-piridil)porfirin (produkt **2**) uz iskorištenje od 2%. 4-acetamidobenzaldehid manje je reaktivan te je zbog toga manje iskorištenje asimetričnog porfirina. Produkt **2** bio je produkt od interesa budući da sadrži amidnu skupinu koja je modificirana u idućim koracima (28).



Slika 11. Shematski prikaz sinteze produkta **1** i produkta **2**.

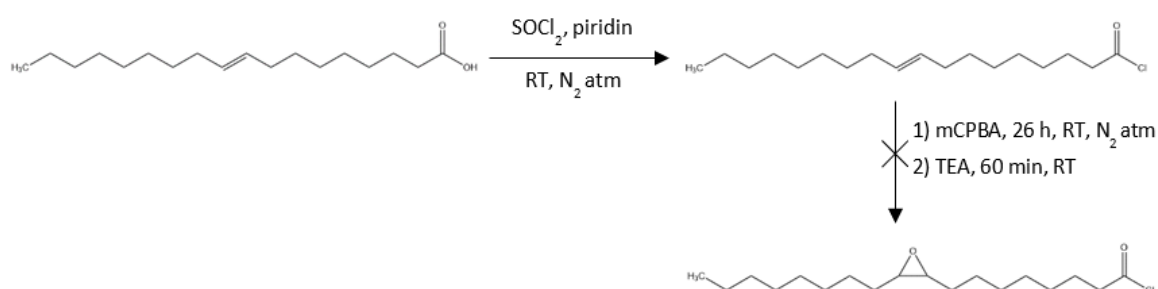
Amido skupina produkta **2** hidrolizirala se pomoću 18%-tne vodene otopine HCl-a. Dobivena je amino skupina koja je pogodna za reakcije nukleofilne acilne supstitucije što je važno kako bi se na porfirin u idućim koracima mogli konjugirati derivati masnih kiselina dugih lanaca (33). Dobiveni produkt **3** dokazan je TLC-om te je iskorištenje reakcije bilo 88%. Dodatak HCl-a uzrokovao je i protonaciju pirolnih jedinica u porfirinu. Kako bi se one deprotonirale dodan je DCM/TEA (9:1) što je dovelo do nastanka trietilamonijevog klorida ($C_6H_{15}NH^+Cl^-$), soli koja je topljiva u vodi te se ekstrakcijom može odvojiti od organske frakcije u kojoj se nalazi porfirin. Na Slici 12. shematski je prikazana hidroliza produkta **2** čime nastaje produkt **3**.



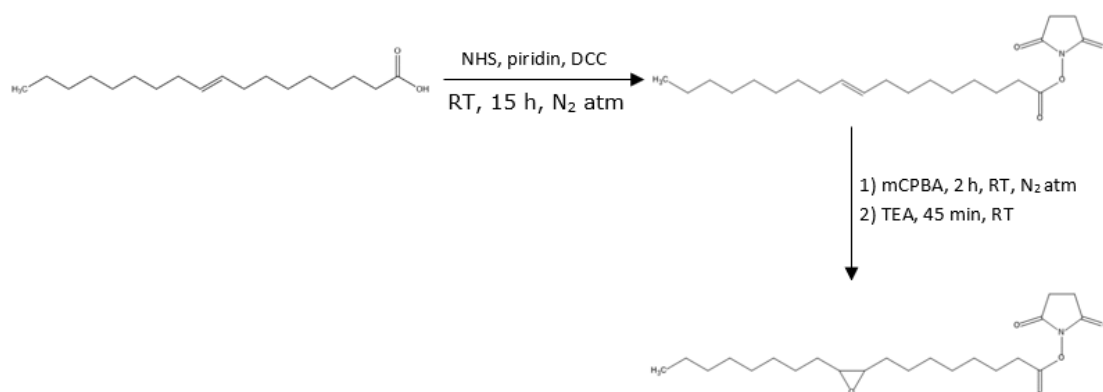
Slika 12. Shematski prikaz sinteze produkta **3**.

4.2. Priprema derivata epoksidirane oleinske kiseline

Nakon sinteze produkta **3** uslijedila je sinteza derivata epoksidirane oleinske kiseline kako bi se mogli konjugirati na prethodno sintetizirani porfirin. Cilj je bio konjugirati dugački alkilni lanac od 18C atoma koji na sredini sadrži epoksidnu skupinu kako bi se istovremeno povećala akumulacija porfirina u tumorsko tkivo te njegova protutumorska aktivnost. Za pripremu alkilnog lanca od 18C atoma koji sadrži epoksidnu skupinu korištena je oleinska kiselina (18C atoma) s dvostrukom vezom između 9C i 10C atoma budući da su dvostruke veze podložne epoksidaciji. Kako bi se alkilni lanci uspješno konjugirali na amino skupinu porfirina bilo je nužno aktivirati karboksilnu skupinu oleinske kiseline. Derivati epoksidirane oleinske kiseline pokušali su se sintetizirati pomoću dvije metode opisane u nastavku (Slika 13. i Slika 14.).

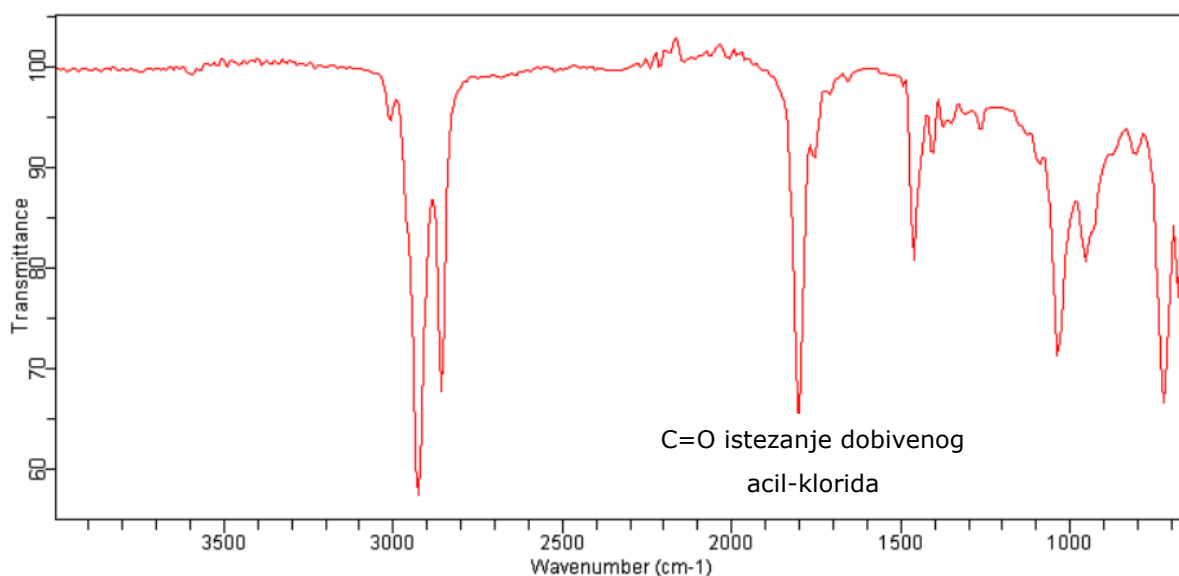


Slika 13. Shematski prikaz sinteze derivata epoksidirane oleinske kiseline pomoću metode 1.



Slika 14. Shematski prikaz sinteze derivata epoksidirane oleinske kiseline pomoću metode 2.

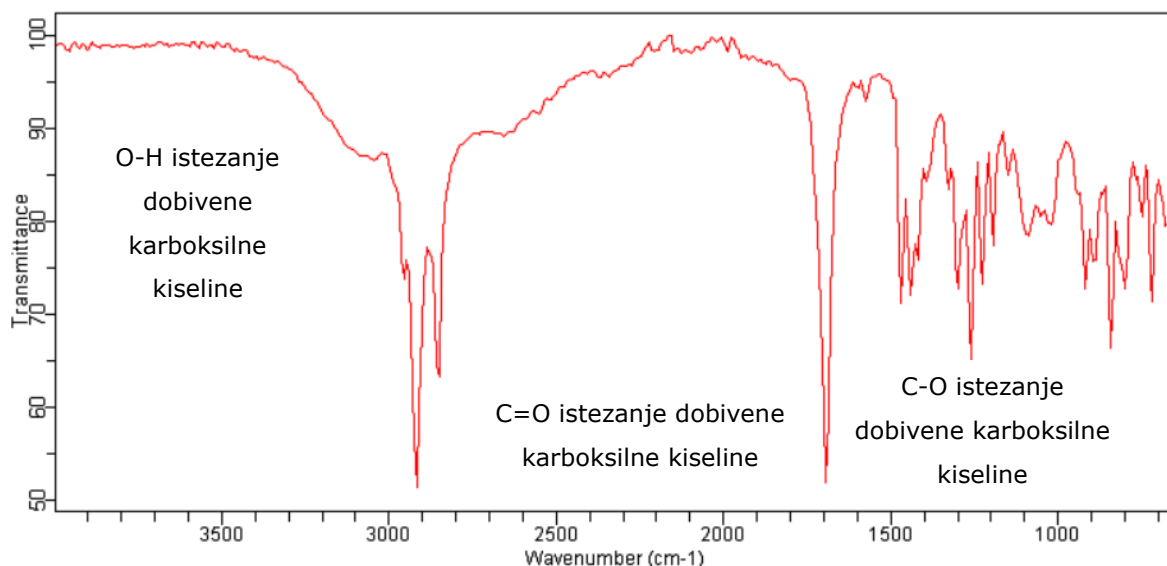
Koristeći metodu 1 oleinska kiselina aktivirala se pomoću SOCl_2 prilikom čega je nastao produkt **4**, odnosno oleoil-klorid. Aktivacija oleinske kiseline prvo je provedena na ovaj način budući da su acil-kloridi najreaktivniji derivati karboksilnih kiselina te su podložni reakcijama nukleofilne acilne supstitucije. Budući da SOCl_2 reagira s vodom prilikom čega nastaje plinoviti HCl te sumporov dioksid (SO_2) reakcija se odvijala pod N_2 atm te je korišten suhi DCM. U reakcijsku smjesu dodaje se piridin kako bi reagirao sa suviškom SOCl_2 prilikom čega nastaje piridinijev klorid koji se može ukloniti ekstrakcijom s vodom (34). Iskorištenje reakcije bilo je 82% te je dobiveni produkt dokazan ^1H NMR i ATR-FTIR spektroskopijom. Na ATR-FTIR spektru vidljivo je C=O istežanje oko 1800 cm^{-1} koje je karakteristično za acil-kloride (Slika 15.) (35).



Slika 15. ATR-FTIR spektar produkta **4**.

U idućem koraku provedena je epoksidacija dvostruke veze oleoil-klorida pomoću *m*-CPBA. To je peroksi kiselina koja se često koristi za epoksidaciju alkena budući da je jak oksidans (36). Higroskopna je te se zbog toga reakcija provodila pod N_2 atm. Tijek reakcije pratio se TLC-om. Kako bi se zaustavila daljnja oksidacija dodan je TEA. On reagira s *m*-CPBA prilikom čega nastaje trietilamonijev oksid koji se može odvojiti od reakcijske smjese ekstrakcijom s vodom. Kako bi se provjerilo je li dobiven produkt od

interesa, napravljena je ATR-FTIR spektroskopija (Slika 16.). Uočeni su pikovi na oko 1300 cm^{-1} koji su karakteristični za epoksid što znači da je epoksidacija dvostruke veze uspješno provedena. Međutim, nestao je pik na 1800 cm^{-1} koji je karakterističan za C=O istežanje u acil-kloridima te se pojavio pik na 1700 cm^{-1} koji je karakterističan za C=O istežanje u karboksilnim kiselinama. Također, prisutan je pik koji se proteže od 2400 cm^{-1} do 3400 cm^{-1} karakterističan za O-H istežanje u karboksilnim kiselinama (35). Iz ovoga se može zaključiti da nije dobiven produkt od interesa budući da je došlo do hidrolize acil-klorida te je ponovno nastala karboksilna kiselina koja je u ovom slučaju imala epoksid za razliku od oleinske kiseline koja je korištena kao ishodišni materijal za sintezu.



Slika 16. ATR-FTIR spektar produkta **5**.

Budući da se pomoću ove metode nije uspio dobiti željeni derivat epoksidirane oleinske kiseline, isprobala se druga metoda.

Koristeći metodu 2 oleinska kiselina aktivirala se pomoću NHS-a budući da NHS esteri mogu reagirati s nukleofilima poput amino skupina prilikom čega nastaju alkilirani produkti. NHS esteri nastaju kemijskom reakcijom karboksilne skupine i NHS-a u prisustvu DCC-a. Budući da je esterska veza podložna hidrolizi u vodenom okruženju, kako bi nastali stabilni derivati NHS estera, reakcija se odvijala u odsustvu vode te pod N_2 atm. Reakcijska

smjesa ohlađena je na 0 °C te je u nju dodan piridin kako bi se postignuli optimalni uvjeti za NHS aktivaciju (37). Na ovaj način dobiven je produkt **6**, odnosno sukcinimidil-oleat. Reakcija se pratila TLC-om te je zaustavljena nakon što u reakcijskoj smjesi više nije bio prisutan reaktant (Slika 17.). Reakcijska smjesa pročišćena je dvjema kolonskim kromatografijama Hex/EtOAc (9:1 i 85:15) te je uočeno da se dio NHS-estera hidrolizirao. Razlog tome može biti pročišćavanje na koloni koja sadrži lagano kiseli silika-gel. Produkt **6** dokazan je ¹H NMR spektroskopijom. Iskorištenje reakcije bilo je 77%, međutim zbog hidrolize produkt se nije mogao u potpunosti pročistiti te je sadržavao i oleinsku kiselinu.



Slika 17. TLC kromatogram aktivacije oleinske kiseline NHS-om.

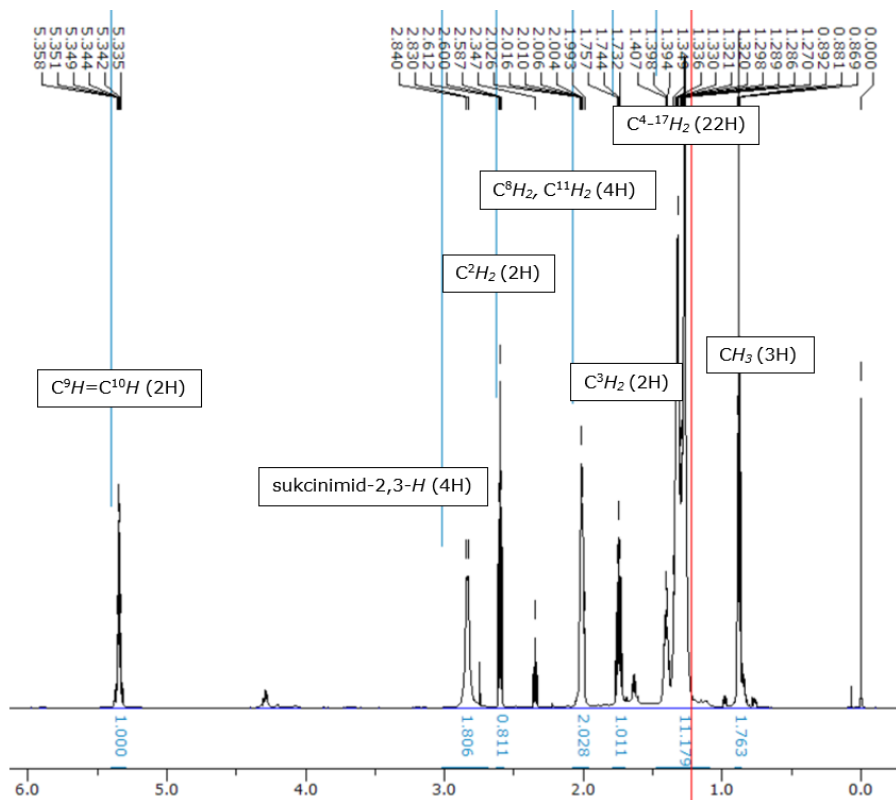
U idućem koraku provedena je epoksidacija sukcinimidil-oleata pomoću *m*-CPBA. Reakcija se provodila pod N₂ atm budući da je *m*-CPBA higroskopian te kako bi se minimizirala hidroliza NHS estera. Reakcija se pratila TLC-om te nakon što je sav sukcinimidil-oleat izreagirao reakcija je zaustavljena dodatkom TEA (Slika 18.). Reakcijska smjesa pročišćena je kolonskom kromatografijom Hex/EtOAc (85:15) kako bi se pročistile nečistoće vidljive na TLC-u. Dobiven je produkt **7**, odnosno ester 9,10 epoksistearinske kiseline i *N*-hidroksisukcinimida. Iako se dobiveni produkt čuvao u eksikatoru uočena je njegova hidroliza što potvrđuje podložnost esterske

veze hidrolizi. Iskorištenje reakcije bilo je 71% te je produkt dokazan ^1H NMR spektroskopijom.

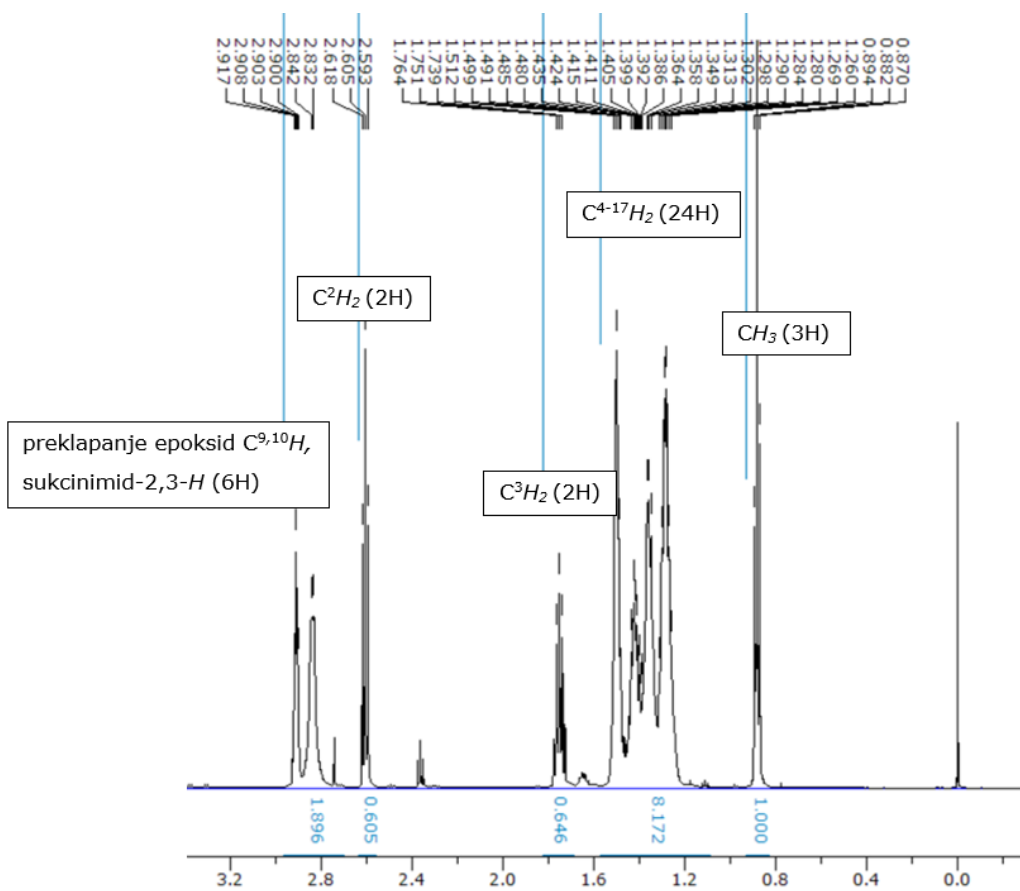


Slika 18. TLC kromatogram epoksidacije sukcinimidil oleata.

^1H NMR spektrima produkata **6** i **7** (Slika 19. i Slika 20.) pokazano je kako su dobiveni produkti od interesa. ^1H NMR spektrom produkta **7** dokazana je prisutnost epoksida čime se potvrđuje da je epoksidacija sukcinimidil-oleata uspješno provedena. Na ^1H NMR spektru produkta **6** uočen je višak H atoma na multiplitetu 1,47 – 1,09. Ovaj višak H atoma može biti posljedica zaostalog NHS-a budući da je dodan u suvišku prilikom aktivacije oleinske kiseline ili posljedica zaostale oleinske kiseline budući da dobiveni produkt nije u potpunosti čist.



Slika 19. ^1H NMR spektar produkta 6.

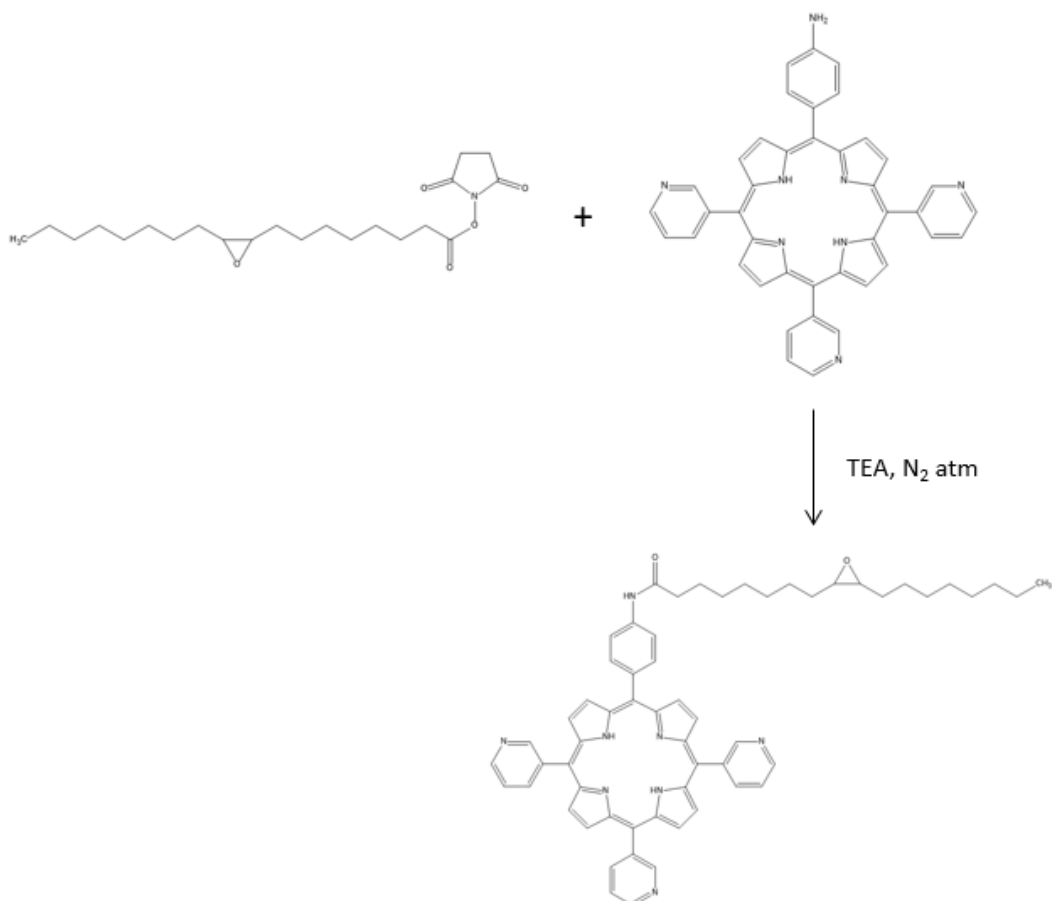


Slika 20. ^1H NMR spektar produkta 7.

4.3. Konjugacija produkta **7** na 5-(4-aminofenil)-10,15,20-tris(3-piridil)porfirin

NHS esteri poput estera 9,10 epoksistearinske kiseline i *N*-hidroksisukcinimida mogu reagirati s nukleofilima kao što je amino skupina prisutna na 5-(4-aminofenil)-10,15,20-tris(3-piridil)porfirinu prilikom čega dolazi do nastanka amidne veze (Slika 21.). Ona je stabilnija te manje podložna hidrolizi nego esterska veza te su zbog toga i dobiveni konjugati stabilniji (37).

Budući da je za ovu reakciju konjugacije optimalni pH između 7 i 9 (37), u reakcijsku smjesu dodan je TEA. Reakcija se odvijala pod N₂ atm kako bi se minimizirala hidroliza produkta **7**. Ukoliko dođe do hidrolize, reakcija konjugacije neće se moći odviti budući da karboksilna kiselina mora biti aktivirana kako bi došlo do nukleofilne acilne supstitucije. Napredak reakcije pratio se TLC-om. Tri dana od početka reakcije u reakcijsku smjesu dodano je još produkta **7**, budući da sav produkt **3** nije izreagirao. Reakcija je zaustavljena pet dana od početka. Konjugacija se odvijala značajno sporije, nego da je korišten acil-klorid, budući da su esteri slabije reaktivni u usporedbi s acil-halogenidima. TLC-om je pokazan nastanak produkta koji je nepolarniji od početnoga spoja što je bilo očekivano budući da se na porfirin konjugirao dugi alkilni lanac. Također je pokazana i prisutnost produkta **3** u reakcijskoj smjesi, iako je produkt **7** dodan u suvišku (51 ekv.), te je zbog toga pročišćena dvjema kolonskim kromatografijama DCM/MeOH (40:1 i 35:1) (Slika 22.). Nakon prvog pročišćavanja, na TLC-u su bile vidljive nečistoće značajno polarnije od produkta od interesa, ali su se uspješno uklonile prilikom drugog pročišćavanja.

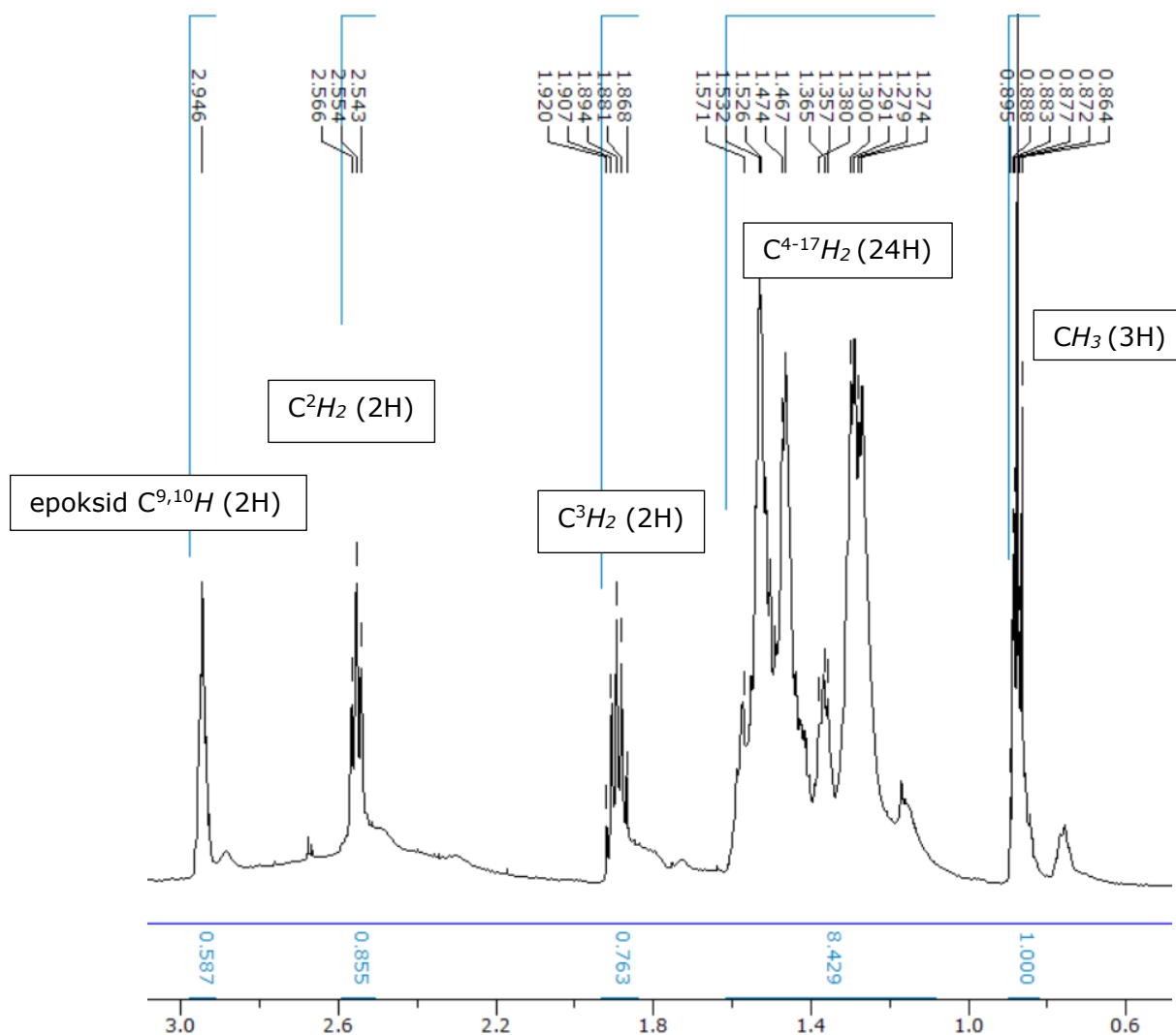


Slika 21. Shematski prikaz konjugacije estera 9,10 epoksistearinske kiseline i *N*-hidroksisukcinimida na 5-(4-aminofenil)-10,15,20-tris(3-piridil)porfirin.

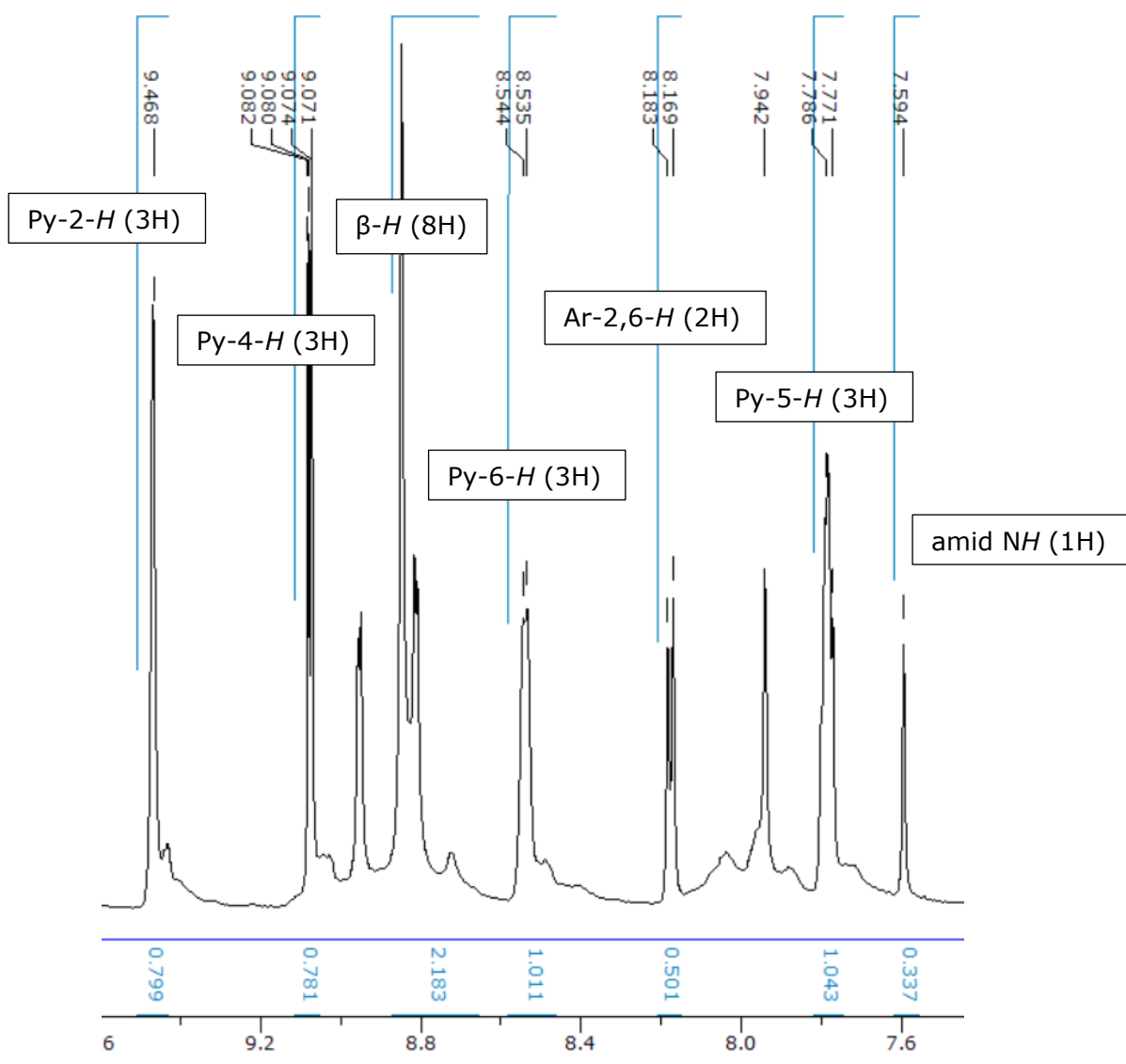


Slika 22. TLC kromatogram nukleofilne acilne supstitucije.

^1H NMR spektroskopijom (Slika 23. i Slika 24.) pokazano je kako je nastao željeni produkt nukleofilne acilne supstitucije, međutim on nije u potpunosti čist. Prisutan je još jedan porfirin što se može uočiti iz ^1H NMR spektra budući da su prisutna „ramena“ uz pikove. Reakcija konjugacije dugo je trajala te postoji mogućnost da je prilikom same reakcije došlo do djelomične degradacije produkta.



Slika 23. ^1H NMR spektar alifatskog dijela produkta **8**.



Slika 24. ¹H NMR spektar aromatskog dijela produkta **8**.

4.4. Metilacija produkta **8**

Kako bi se poboljšala hidrofilna svojstva dobivenog konjugata provedena je *N*-metilacija porfirina pomoću CH₃I. CH₃I dodan je u suvišku (200 ekv.) kako bi došlo do metilacije svih piridilnih dušika. Reakcija se odvijala u suhom DMF-u pod N₂ atm. Ostavljena je preko noći te je idući dan TLC-om (ACN/H₂O/KNO₃ 8:1:1) dokazan produkt (Slika 25.).



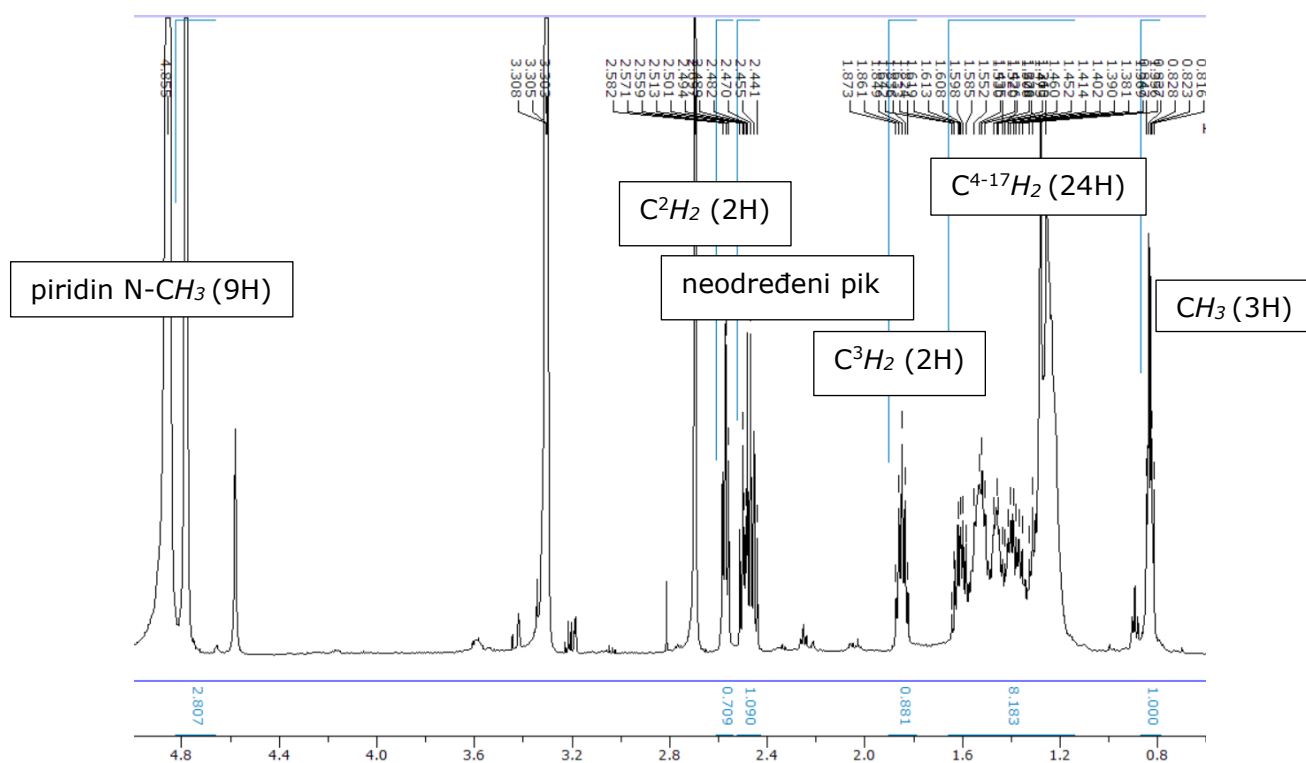
Slika 25. TLC kromatogram metilacije produkta **8**.

Budući da se ranije pokazalo kako trijodidni produkti nisu jako topljivi u vodi, jodidni ioni (I^-) zamijenili su se kloridnima (Cl^-) pomoću dvije metode (28).

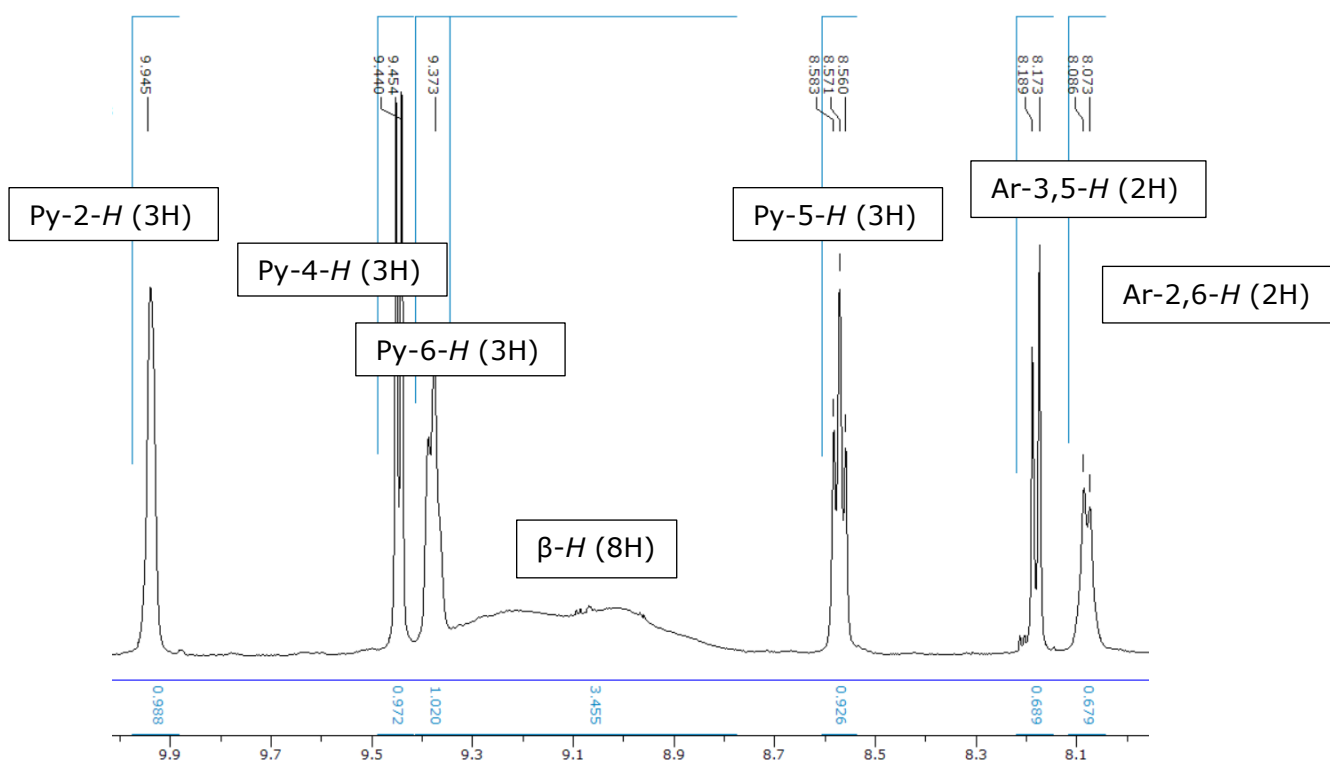
Metodom 1 ioni su zamijenjeni dodatkom zasićene otopine NH_4PF_6 te zasićene otopine TBAC-a. Izoliran je produkt **9** te je iskorištenje reakcije bilo 27%. Metodom 2 ioni su zamijenjeni korištenjem Amberlite IRA-402(Cl). Izoliran je produkt **10** te je iskorištenje reakcije bilo je 86%.

Ovim dvjema metodama dobiveni su isti produkti. Metoda 2 pokazala se puno boljom zbog značajno većeg iskorištenja. Velik dio produkta se metodom 1 izgubio prilikom više ponovljenih koraka ispiranja i filtriranja.

1H NMR spektroskopijom (Slika 26. i Slika 27.) pokazano je kako nije dobiven produkt od interesa. Metilacija produkta **8** uspješno je provedena, međutim novonastali produkt **9** ne sadrži epoksidnu jedinicu. Nestao je pik na 2,95 ppm-a koji je bio prisutan na 1H NMR spektru produkta **8**. Pojavio se pik na oko 2,50 ppm-a koji bi mogao odgovarati protonima koji su dio tercijarnog amina (35). Iz ovoga se može pretpostaviti da je prilikom metilacije došlo do reakcije između produkta **8** i TEA koji je potencijalno zaostao prilikom pročišćavanja produkta **8**.



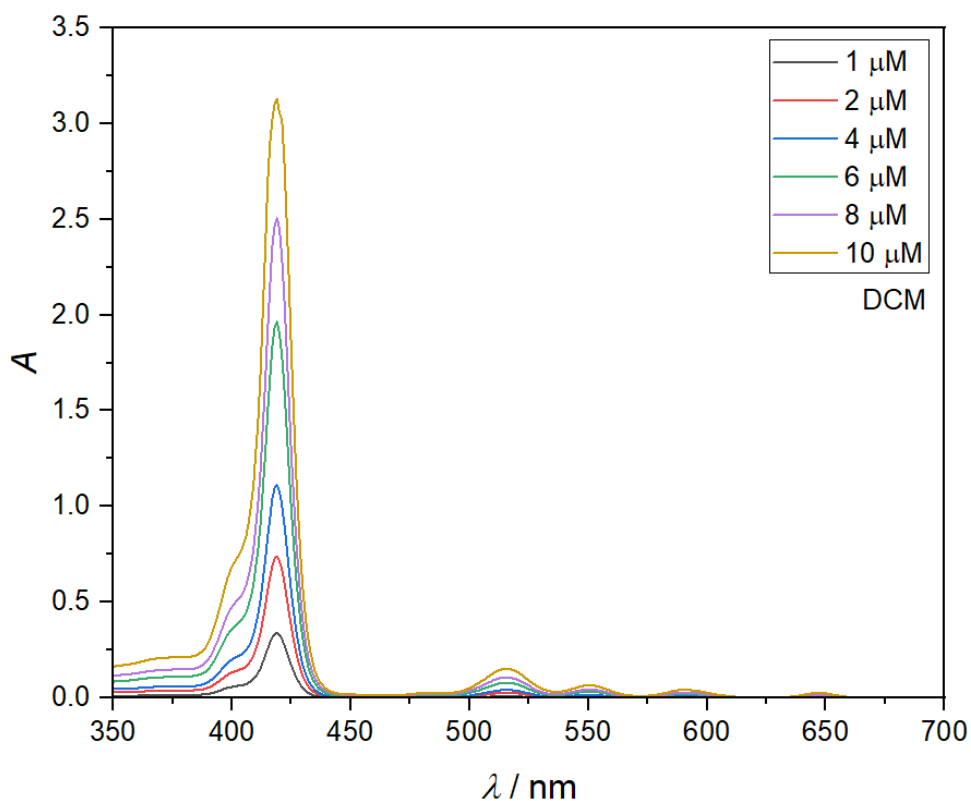
Slika 26. 1H NMR spektar alifatskog dijela produkta **9**.



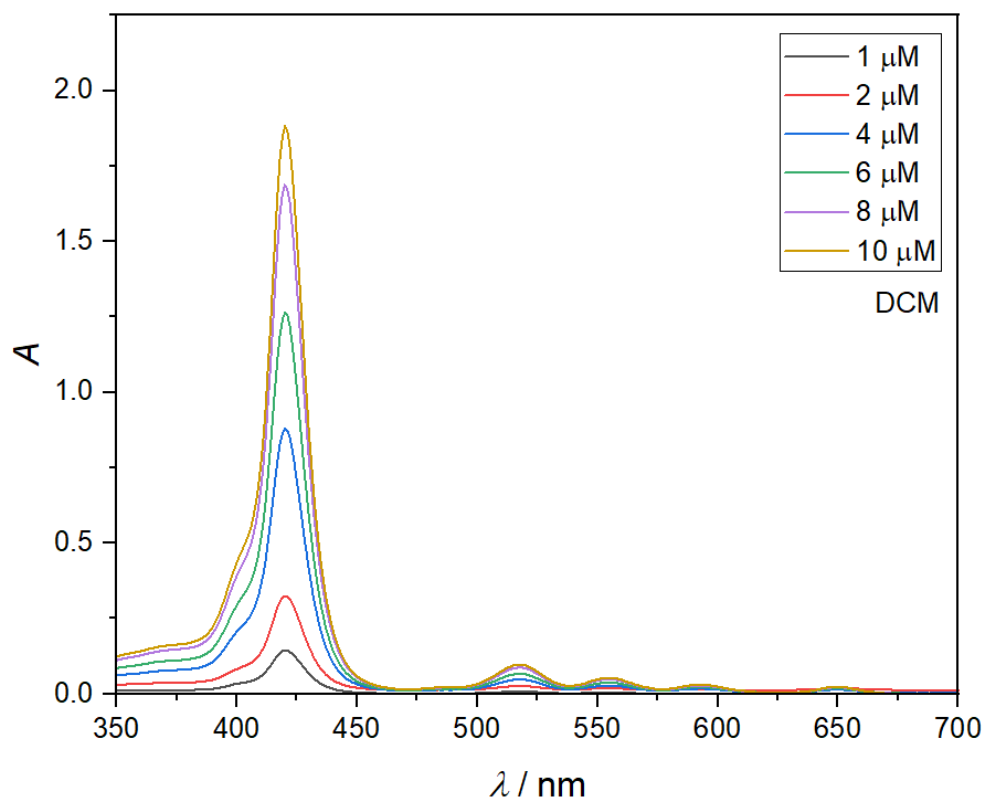
Slika 27. 1H NMR spektar aromatskog dijela produkta **9**.

4.5. Spektrofotometrijska analiza sintetiziranih porfirina

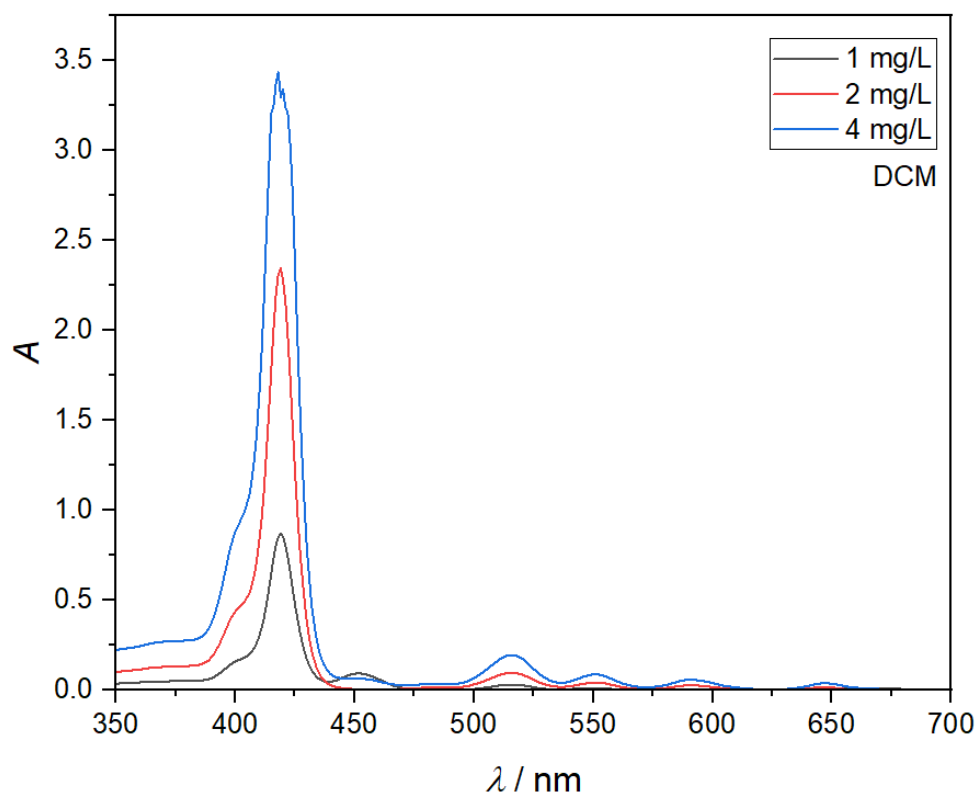
Kako bi se napravila karakterizacija svih sintetiziranih porfirina snimljeni su njihovi UV-Vis i fluorescencijski spektri. Za produkte **2**, **3** i **8** snimljeni su u DCM-u, a za produkt **9** u MeOH. UV-Vis spektri prikazani su na Slikama 28., 29., 30. i 31., a fluorescencijski spektri na Slikama 32., 33., 34. i 35.



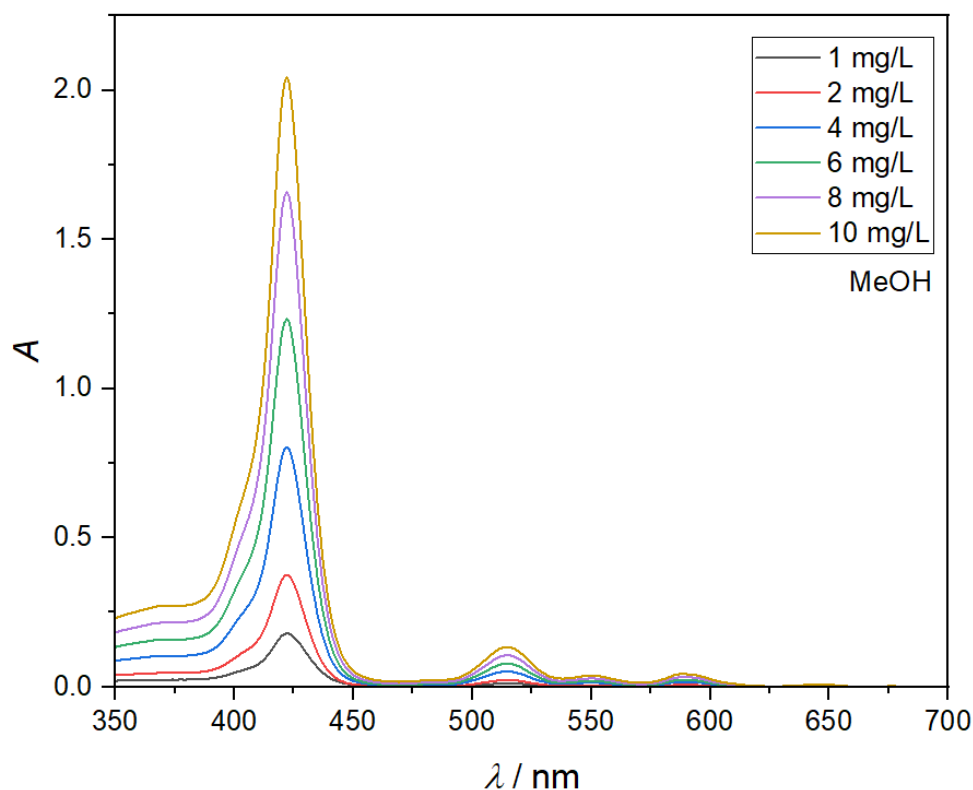
Slika 28. UV-Vis apsorpcijski spektar produkta **2** u rasponu koncentracija od 1 μ M do 10 μ M.



Slika 29. UV-Vis apsorpcijski spektar produkta **3** u rasponu koncentracija od 1 μM do 10 μM .



Slika 30. UV-Vis apsorpcijski spektar produkta **8** u rasponu koncentracija od 1 mg/L do 4 mg/L.



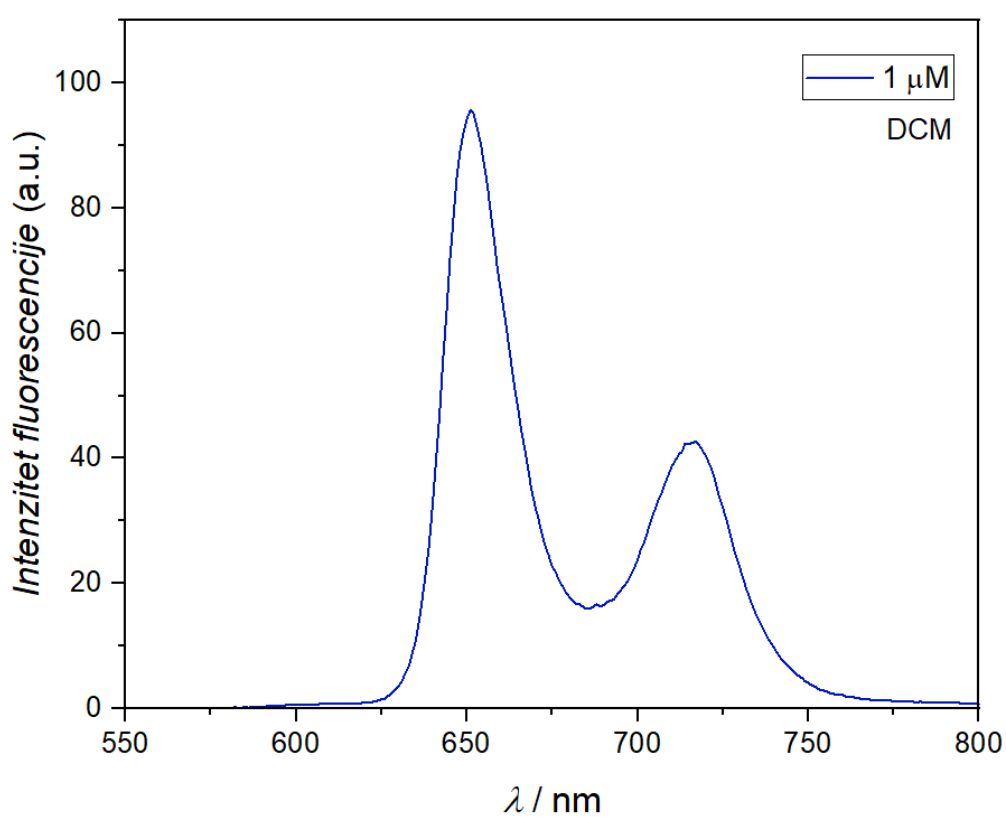
Slika 31. UV-Vis apsorpcijski spektar produkta **9** u rasponu koncentracija od 1 mg/L do 10 mg/L.

Kod sva četiri porfirina prisutan je karakteristični apsorpcijski spektar. Vidljiva je Soretova vrpca na približno 420 nm (produkt **2**: 419 nm, produkt **3**: 420 nm, produkt **8**: 419 nm, produkt **9**: 422 nm) te četiri Q-vrpce u rasponu od 500 do 650 nm.

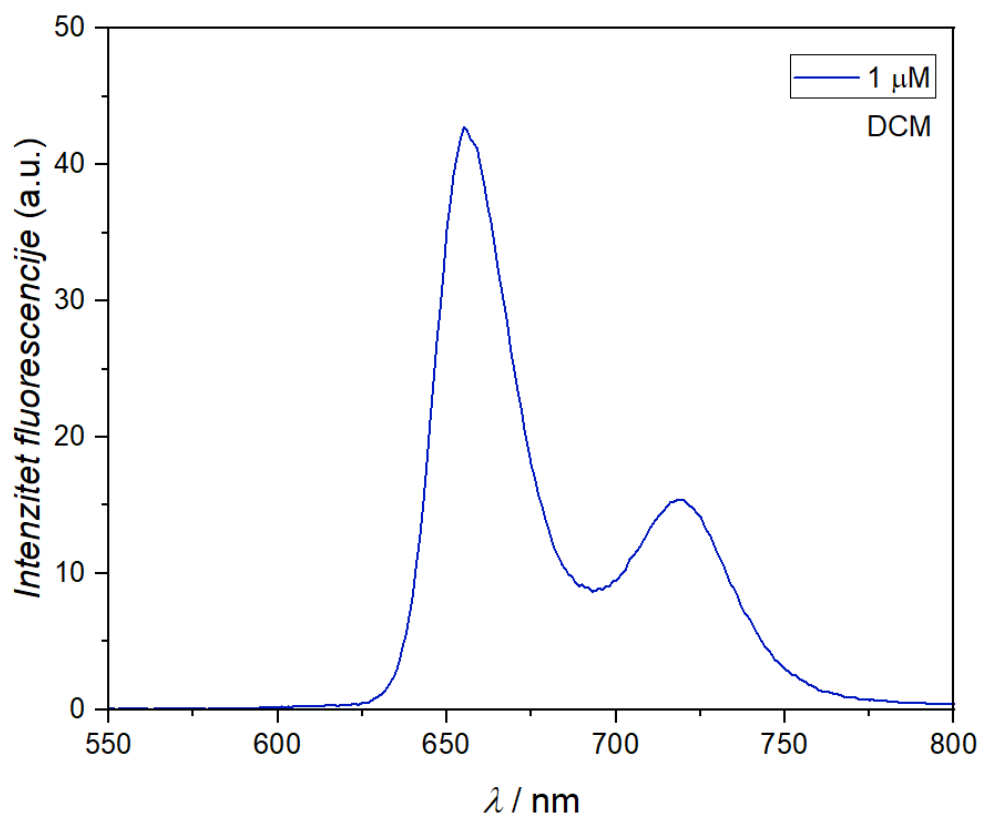
Za produkte **2** i **3** izračunati su molarni apsorpcijski koeficijenti (ϵ). Oni opisuju koliko jako neki spoj apsorbira svjetlost pri određenoj valnoj duljini. Budući da za produkte **8** i **9** nisu poznate molarne mase, a time i molarne koncentracije, ϵ nije se mogao izračunati. U Tablici 1. prikazani su ϵ za produkte **2** i **3** pri valnim duljinama Soretove i Q-vrpce.

Tablica 1. Molarni apsorpcijski koeficijenti izračunati za produkte **2** i **3** pri valnim duljinama Soretove i Q-vrpce.

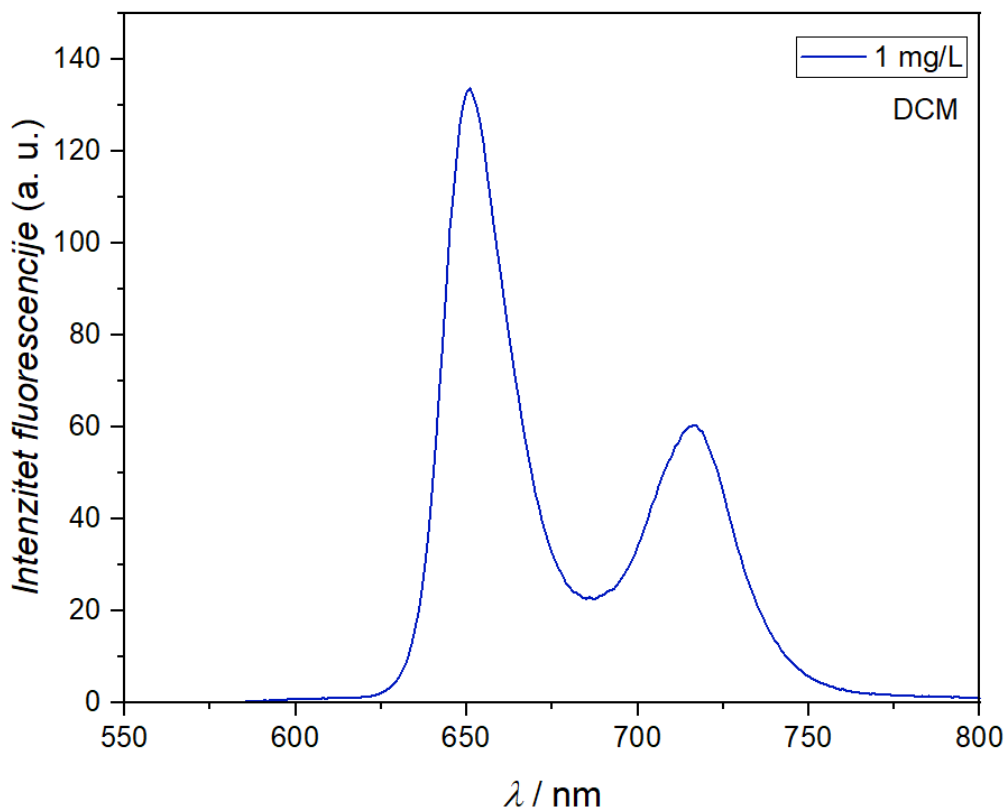
Produkt	λ/nm	$\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 10^3$	λ/nm	$\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 10^3$	λ/nm	$\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 10^3$	λ/nm	$\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 10^3$	λ/nm	$\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 10^3$
2	419	310,0	515	15,0	551	6,8	590	4,6	647	3,0
3	420	200,0	518	9,9	555	5,2	593	2,8	650	1,8



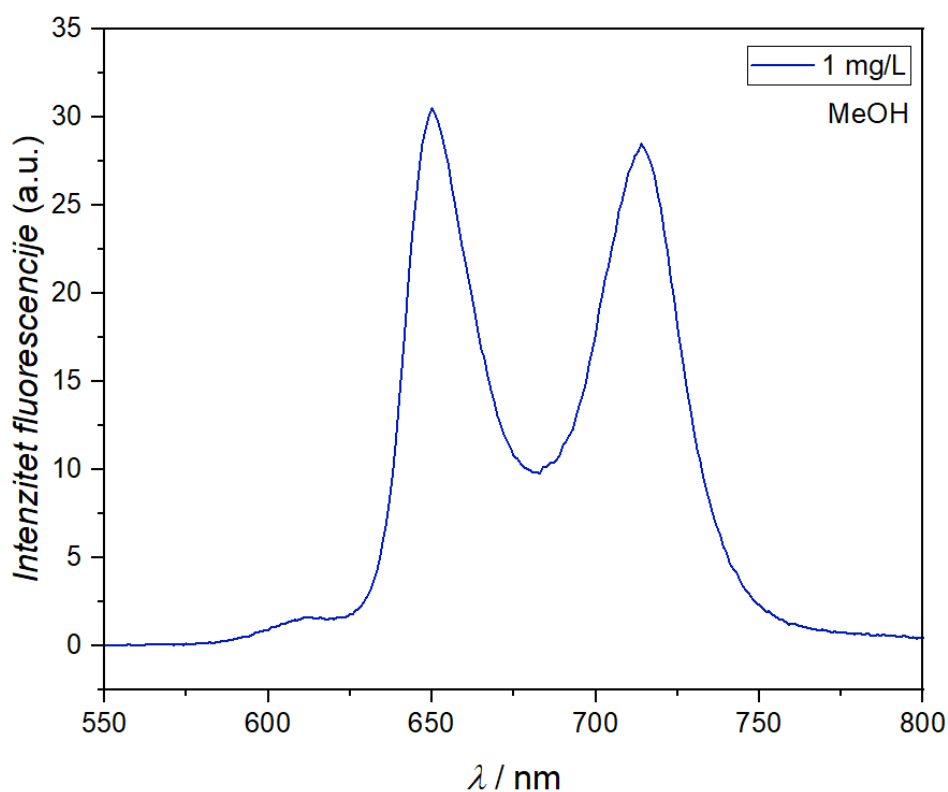
Slika 32. Fluorencijski spektar produkta **2** pri koncentraciji 1 μM , DCM, $\lambda_{\text{ex}} = 419 \text{ nm}$.



Slika 33. Fluorescencijski spektar produkta **3** pri koncentraciji 1 μM , DCM, $\lambda_{\text{ex}} = 420$ nm.



Slika 34. Fluorescencijski spektar produkta **8** pri koncentraciji 1 mg/L, DCM, $\lambda_{\text{ex}} = 419$ nm.



Slika 35. Fluorescencijski spektar produkta **9** pri koncentraciji 1 mg/L, MeOH, $\lambda_{\text{ex}} = 422$ nm.

Na fluorescencijskim spektrima vidljiva su dva emisijska pika karakteristična za porfirine na oko 650 nm (produkt **2**: 651 nm, produkt **3**: 656 nm, produkt **8**: 651 nm, produkt **9**: 650 nm) te na oko 715 nm (produkt **2**: 717 nm, produkt **3**: 721 nm, produkt **8**: 717 nm, produkt **9**: 714 nm). Pik na oko 650 nm je značajno intenzivniji od pika na oko 715 nm, osim kod produkta **9**, gdje su oba pika sličnog intenziteta.

Uspoređujući apsorpcijske spektre produkta **8** (Slika 30.) i njegovog metiliranog para, produkta **9** (Slika 31.), može se uočiti da je kod produkta **9** prisutan slabiji intenzitet apsorpcije pri svim koncentracijama. Usporedbom fluorescencijskih spektara ovih porfirina (Slika 34. i Slika 35.) uočen je značajan pad intenziteta pika pri 650 nm te posljedično smanjenje razlike intenziteta pikova pri 650 nm i 720 nm.

Za sve sintetizirane porfirine izračunat je i kvantni prinos fluorescencije (ϕ_{FL}). To je omjer broja molekula koje fluoresciraju i ukupnog broja

molekula koje su apsorbirale fotone. Govori koliki se dio pobuđenih molekula vraća iz $^1S^*$ u osnovno stanje S^0 emisijom fotona. Maksimalna vrijednost je 1 kada se sve molekule koje se nalaze u pobuđenom $^1S^*$ stanju vrate u osnovno S^0 stanje emisijom fotona. U Tablici 2. prikazani su ϕ_{FL} sintetiziranih porfirina.

Tablica 2. Izračunati kvantni prinosi fluorescencije za sintetizirane porfirine.

Produkt	ϕ_{FL}
2	0,10
3	0,10
8	0,09
9	0,06

Produkti **2**, **3** i **8** imaju slične ϕ_{FL} , dok novosintetizirani porfirin, produkt **9**, ima nešto manji. Iz ovoga se može zaključiti da kod njega postoji veća vjerojatnost nastanka tripletnog stanja budući da se manje molekula iz pobuđenog stanja vraća u osnovno stanje putem fluorescencije.

4.6. Test citotoksičnosti (MTT test)

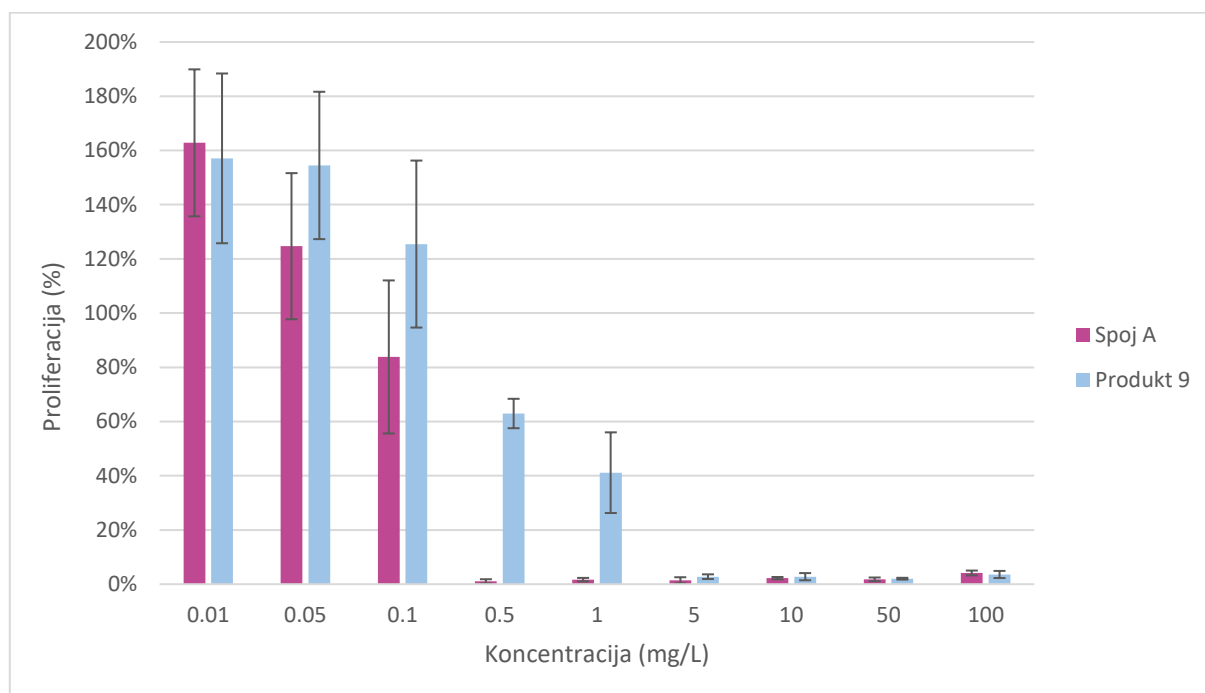
MTT test koristi se za ispitivanje vijabilnosti stanica te zbog toga ima važnu ulogu prilikom ispitivanja citotoksičnosti lijekova pri različitim koncentracijama. Temeljni princip ovoga testa je taj što je mitohondrijska aktivnost većine živih stanica konstantna te je smanjenje broja živih stanica linearno povezano sa smanjenom mitohondrijskom aktivnošću. Mitohondrijska aktivnost stanica očituje se u pretvorbi tetrazolijeve soli MTT-a u kristale formazana. Zbog toga se bilo kakav porast ili smanjenje broja stanica može detektirati mjerenjem apsorpcije formazana. Pomoću MTT testa može se izračunati koncentracija 50%-tne inhibicije (IC_{50}), odnosno koncentracija lijeka pri kojoj dolazi do 50%-tne inhibicije rasta u odnosu na netretiranu kontrolu (38).

U ovome radu MTT testom uspoređivala se učinkovitost spoja A (metilirani stearoil-konjugirani tripiridilporfirin) te produkta **9** za primjenu u PDT-u. Proučavana je njihova učinkovitost pri različitim koncentracijama te su određene IC_{50} vrijednosti.

Budući da se proučavala njihova učinkovitost u PDT-u jedna pločica tretirana je 30 minuta lampom crvenog osvjetljenja ($\lambda = 645 \text{ nm}$, 2 mW/cm^2 , ukupna doza svjetlosti = $3,6 \text{ J/cm}^2$) te je 36 sati nakon, napravljen MTT test. Druga pločica nije se tretirala svjetlošću kako bi se vidjelo ukoliko su ovi spojevi aktivni u mraku, odnosno ukoliko posjeduju tamnu toksičnost. Tamna toksičnost opisuje se kao smanjenje vijabilnosti stanica u prisustvu PS-a koji nije tretiran svjetlom te je nepoželjna u PDT-u.

4.6.1. Stanice tretirane svjetlom (*light*)

Učinkovitost porfirina ispitivana je pri rasponu koncentracija od 0,01 mg/L, do 100 mg/L. Spoj A pokazao se učinkovitijim od produkta **9** (Slika 36.). Spoj A pri koncentraciji od 0,1 mg/L smanjuje proliferaciju MDA-MB-231 stanica za oko 20%, dok produkt **9** pri toj koncentraciji nije toksičan za stanice. Pri koncentraciji od 0,5 mg/L spoj A je gotovo u potpunosti toksičan za stanice, dok produkt **9** pri istoj koncentraciji smanjuje proliferaciju stanica za oko 40%. On je gotovo u potpunosti toksičan za stanice pri koncentraciji od 5 mg/L. IC_{50} vrijednost za spoj A iznosi 0,26 mg/L, a za produkt **9** 0,80 mg/L.

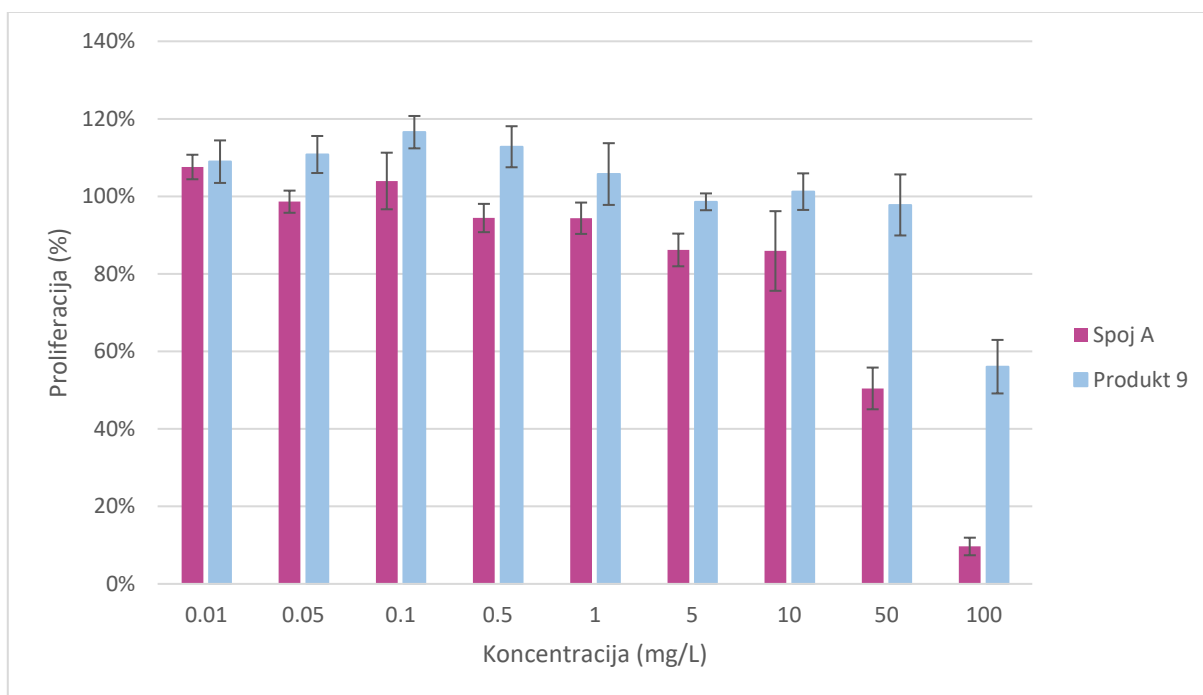


Slika 36. Ovisnost proliferacije MDA-MB-231 stanica (%) o koncentracijama spoja A i produkta **9** nakon tretiranja svjetlom.

MTT test pokazao je da su oba spoja učinkovita za primjenu u PDT-u, međutim prethodno sintetizirani spoj čiji konjugirani alkilni lanac ne sadrži polarnu skupinu (spoj A) ima nižu IC_{50} vrijednost, odnosno potrebna je manja koncentracija spoja kako bi se proliferacija stanica smanjila za 50%.

4.6.2. Stanice netretirane svjetlom (*dark*)

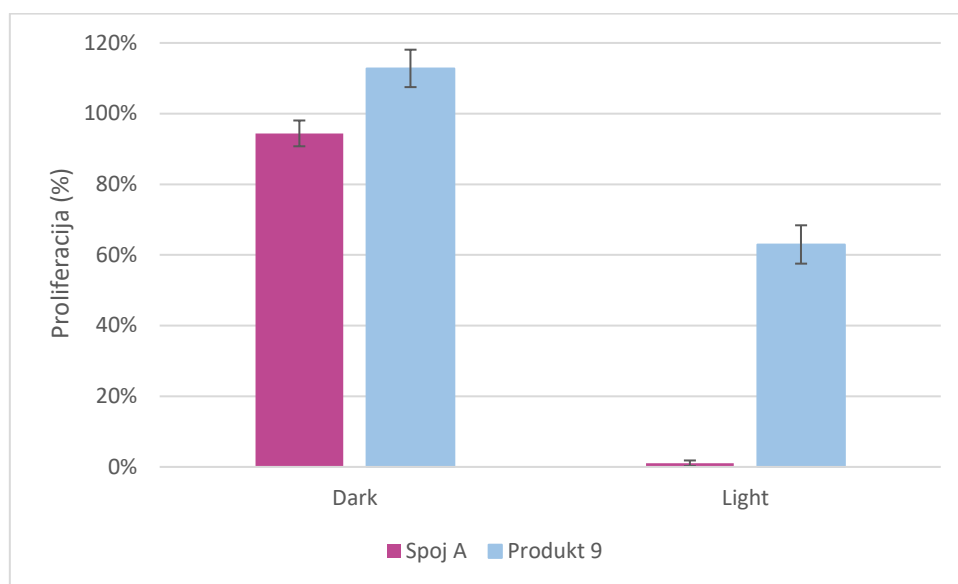
Rezultati MTT testa upućuju na potencijalnu tamnu toksičnost spoja A. Pri koncentracijama od 50 mg/L te 100 mg/L uočeno je značajno smanjenje proliferacije MDA-MB-231 stanica. Pri koncentraciji od 50 mg/L proliferacija stanica smanjena je za gotovo 50%, dok je pri 100 mg/L smanjena za čak 90%. Kod produkta **9** nije uočena tamna toksičnost. Preživljenje MDA-MB-231 stanica koje su tretirane produktom **9** je visoko, 90%-100%. Veće smanjenje proliferacije (oko 40%) uočeno je jedino kod stanica koje su tretirane s produktom **9** koncentracije 100 mg/L (Slika 37.).



Slika 37. Ovisnost proliferacije MDA-MB-231 stanica (%) o koncentracijama spoja A i produkta **9** u mraku.

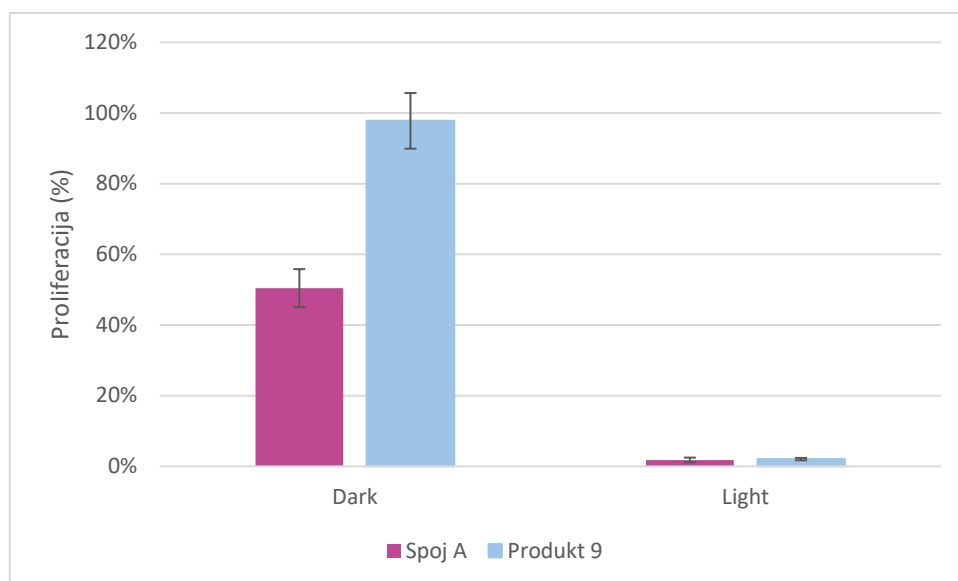
4.6.3. Usporedba stanica tretiranih i netretiranih svjetlom

Iz usporedbe tretiranih i netretiranih stanica može se uočiti da je spoj A učinkovitiji od produkta **9** pri koncentraciji od 0,5 mg/L te da oba spoja ne posjeduju tamnu toksičnost. Pri ovoj koncentraciji vrlo malo stanica tretiranih spojem A (uz osvjetljavanje) je preživjelo. Međutim, više od 50% stanica tretiranih produktom **9** iste koncentracije (uz osvjetljavanje) je preživjelo. Pri ovoj koncentraciji većina stanica tretiranih spojem A i produktom **9** u mraku je preživjela (Slika 38.).



Slika 38. Usporedba proliferacije MDA-MB-231 stanica (%) tretiranih spojem A i produktom **9** koncentracije 0,5 mg/L u mraku (*dark*) i nakon tretiranja svjetlom (*light*).

Usporedbom stanica tretiranih i netretiranih svjetlom pokazano je da su spoj A i produkt **9** jednako učinkoviti pri koncentraciji od 50 mg/L, ali spoj A posjeduje tamnu toksičnost, za razliku od produkta **9**. Pri ovoj koncentraciji vrlo malo stanica tretiranih spojem A i produktom **9** je preživjelo nakon tretiranja svjetlom. Oko 50% stanica tretiranih spojem A iste koncentracije nije preživjelo u mraku, dok je većina stanica tretiranih produktom **9** preživjela u mraku (Slika 39.). U Tablici 3. prikazane su IC_{50} vrijednosti spoja A i produkta **9** koje su jedan od pokazatelja učinkovitosti ovih spojeva.



Slika 39. Usporedba proliferacije MDA-MB-231 stanica (%) tretiranih spojem A i produktom **9** koncentracije 50 mg/L u mraku (*dark*) i nakon tretiranja svjetlom (*light*).

Tablica 3. IC_{50} vrijednosti spoja A i produkta **9** nakon tretiranja stanica svjetlom i bez tretiranja svjetlom.

	IC_{50} (mg/L)	
	Nakon tretiranja svjetlom	Bez tretiranja svjetlom
Spoj A	0,26	50,53
Produkt 9	0,80	> 100

Rezultati MTT testa pokazuju da novosintetizirani produkt koji sadrži polarnu skupinu na konjugiranom dugom alkilnom lancu nije učinkovitiji od prethodno sintetiziranog porfirina bez polarne skupine na konjugiranom dugom alkilnom lancu. Međutim, on ne posjeduje tamnu toksičnost (osim pri koncentraciji od 100 mg/L) na MDA-MB-231 stanice, za razliku od prethodno sintetiziranog porfirina koji je pokazao tamnu toksičnost pri koncentraciji od 50 mg/L.

5. Zaključak

Cilj ovog diplomskog rada bio je optimizacija protokola za sintezu *N*-metiliranog tripiridilporfirina konjugiranog s dugim alkilnim lancem (18C) koji sadrži epoksidnu jedinicu na poziciji 9,10.

Provedena je optimizacija protokola za sintezu derivata masnih kiselina dugog lanca koji sadrže epoksidnu jedinicu kako bi se reakcijom nukleofilne acilne supstitucije mogli konjugirati na produkt **3**. Korištene su dvije metode. Prva je uključivala aktivaciju oleinske kiseline pomoću SOCl_2 , a druga NHS-om. Budući da su acil-halogenidi reaktivniji nego esteri u reakcijama nukleofilne acilne supstitucije, prvo je provedena aktivacija pomoću SOCl_2 . Oleoil-klorid uspješno je sintetiziran što je i pokazano ^1H NMR spektroskopijom. Međutim, epoksidacija oleoil-klorida bila je neuspješna. Došlo je do njegove hidrolize te je nastala epoksidirana oleinska kiselina. Aktivacija oleinske kiseline NHS-om te zatim i epoksidacija sukcinimidil-oleata uspješno su provedene što je pokazano ^1H NMR spektroskopijom. Budući da su esteri podložni hidrolizi, produkt **7** nije se u potpunosti uspio pročistiti te je sadržavao tragove oleinske kiseline.

Nukleofilnom acilnom supstitucijom sintetiziran je produkt **8** te potvrđen ^1H NMR spektroskopijom. Kako bi se poboljšala njegova hidrofilna svojstva provedena je metilacija, međutim dobiveni produkt **9** nije bio produkt od interesa. Bio je metiliran, ali nije sadržavao epoksidnu jedinicu na dugom alkilnom lancu. Njegova točna struktura nije određena, ali se pretpostavlja da je na dugom alkilnom lancu prisutna polarna skupina.

Analizirani su ϕ_{FL} produkata **8** i **9** te je uočeno da produkt **9** ima niži ϕ_{FL} . Iz ovoga se može zaključiti da kod njega postoji veća vjerojatnost nastanka tripletnog stanja budući da se manje molekula iz pobuđenog stanja vraća u osnovno stanje putem fluorescencije što je važno za primjenu u PDT-u.

Testom citotoksičnosti usporedila se učinkovitost spoja A i produkta **9** za primjenu u PDT-u na MDA-MB-231 stanicama. Novosintetizirani spoj, iako je djelotvoran, manje je učinkovit od prethodno sintetiziranog. Međutim, on

ne posjeduje tamnu toksičnost na MDA-MB-231 stanice, za razliku od spoja A.

Budući da nije dobiven produkt od interesa daljnje istraživanje trebalo bi se usredotočiti na optimizaciju protokola za sintezu *N*-metiliranog tripiridilporfirina konjugiranog s dugim alkilnim lancem (18C) koji sadrži epoksidnu jedinicu na poziciji 9,10. Sinteza ovoga spoja omogućila bi daljnje ispitivanje njegove učinkovitosti za primjenu u PDT-u.

6. Literatura

1. Jelovica M, Grbčić P, Mušković M, Sedić M, Pavelić SK, Lončarić M, Malatesti N. In Vitro Photodynamic Activity of N-Methylated and N-Oxidised Tripyridyl Porphyrins with Long Alkyl Chains and Their Inhibitory Activity in Sphingolipid Metabolism. *ChemMedChem*. 2018; 13: 360–372, doi: 10.1002/cmdc.201700748.
2. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J. Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61: 250–281, doi: 10.3322/caac.20114.
3. Correia JH, Rodrigues JA, Pimenta S, Dong T, Yang Z. Photodynamic therapy review: Principles, photosensitizers, applications, and future directions. *Pharmaceutics*. 2021; 13: 1332-1348, doi: 10.3390/pharmaceutics13091332.
4. Dolmans DEJGJ, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nature*. 2003; 3: 375–380, doi: 10.1038/nrc1071.
5. Mitton D, Ackroyd R. A brief overview of photodynamic therapy in Europe. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2008; 5: 103–111, doi: 10.1016/j.pdpdt.2008.04.004.
6. Dougherty TJ, Grindey GB, Fiel R, Weishaupt KR, Boyle DG. Photoradiation Therapy. II. Cure of Animal Tumors With Hematoporphyrin and Light. *Journal of the National Cancer Institute*. 1975; 55: 115-121, doi: 10.1093/jnci/55.1.115.
7. Lee CN, Hsu R, Chen H, Wong TW. Daylight Photodynamic Therapy: An Update. *Molecules*. 2020; 25: 5195-5211, doi: 10.3390/molecules25215195.
8. Niculescu AG, Grumezescu AM. Photodynamic Therapy—An Up-to-Date Review. *Applied Sciences*. 2021; 11: 3626-3644, doi: 10.3390/app11083626.

9. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, Kotlinska J, Michel O, Kotowski K, Kulbacka J. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2018; 106: 1098–1107, doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.049.
10. Odak I, Škorić I. *ORGANSKA FOTOKEMIJA: Principi i primjena*. Zagreb: Impresum; 2017.
11. Gunaydin G, Gedik ME, Ayan S. Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches. *Frontiers in Chemistry*. 2021; 9, doi: 10.3389/fchem.2021.691697.
12. O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical advances in Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*. 2009; 85: 1053–1074, doi: 10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x.
13. Aires-Fernandes M, Botelho Costa R, Rochetti do Amaral S, Mussagy CU, Santos-Ebinuma VC, Primo FL. Development of Biotechnological Photosensitizers for Photodynamic Therapy: Cancer Research and Treatment—From Benchtop to Clinical Practice. *Molecules*. 2022; 27: 6848–6867, doi: 10.3390/molecules27206848.
14. Kou J, Dou D, Yang L. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget*. 2017; 8: 81591–81603, doi: 10.18632/oncotarget.20189.
15. Giovannetti R. The Use of Spectrophotometry UV-Vis for the Study of Porphyrins. *Macro To Nano Spectroscopy*. 2012: 87–108, doi: 10.5772/38797.
16. Chaves JCA, dos Santos CG, de Miranda ÉGA de, Junior JTA, Nantes IL. Free-Base and Metal Complexes of 5,10,15,20-Tetrakis(N-Methyl Pyridinium L)Porphyrin: Catalytic and Therapeutic Properties. *Phthalocyanines and Some Current Applications*. 2017, doi: 10.5772/intechopen.68225.
17. Teixeira R, Serra VV, Botequim D, Paulo PMR, Andrade SM, Costa SMB. Fluorescence Spectroscopy of Porphyrins and Phthalocyanines: Some

- Insights into Supramolecular Self-Assembly, Microencapsulation, and Imaging Microscopy. *Molecules*. 2021; 26: 4264-4289, doi: 10.3390/molecules26144264.
18. Kim BF, Bohandy J. SPECTROSCOPY OF PORPHYRINS. *John Hopkins APL Tehnical Digest*. 1981; 2: 153-163, <https://secwww.jhuapl.edu/techdigest/Content/techdigest/pdf/V02-N03/02-03-Kim.pdf>.
 19. Quiroz-Segoviano RIY, Serratos IN, Rojas-González F, Tello-Solís SR, Sosa-Fonseca R, Medina-Juárez O, Menchaca-Campos C, Garcia-Sanchez AG. On Tuning the Fluorescence Emission of Porphyrin Free Bases Bonded to the Pore Walls of Organo-Modified Silica. *Molecules*. 2014; 19: 2261–2285, doi: 10.3390/molecules19022261.
 20. Rothemund P. Formation of porphyrins from pyrrole and aldehydes. *Journal of the American Chemical Society*. 1935; 57: 2010-2011, doi: 10.1021/ja01313a510.
 21. Amos-Tautua BM, Songca SP, Oluwafemi OS. Application of Porphyrins in Antibacterial Photodynamic Therapy. *Molecules*. 2019; 24: 2456-2484, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules24132456>.
 22. Adler AD, Longo FR, Finarelli JD, Goldmacher J, Assour J, Korsakoff L. A simplified synthesis for meso-tetraphenylporphine. *The Journal of Organic Chemistry*. 1967; 32: 476, doi: 10.1021/jo01288a053.
 23. Lindsey JS, Hsu HC, Schreiman IC. Synthesis of tetraphenylporphyrins under very mild conditions. *Tetrahedron Letters*. 1986; 27: 4969-4970, doi: 10.1016/S0040-4039(00)85109-6.
 24. Jiang M, Wu J, Liu W, Ren H, Zhang W, Lee CS, Wang P. Self-assembly of Amphiphilic Porphyrins To Construct Nanoparticles for Highly Efficient Photodynamic Therapy. *Chemistry - A European Journal*. 2021; 27: 11195–11204, doi: 10.1002/chem.202101199.
 25. Malatesti N, Munitic I, Jurak I. Porphyrin-based cationic amphiphilic photosensitisers as potential anticancer, antimicrobial and immunosuppressive agents. *Biophysical Reviews*. 2017; 9: 149–168, doi: 10.1007/s12551-017-0257-7.

26. Zhang Q, He J, Yu W, Li Y, Liu Z, Zhou B, Liu Y. A promising anticancer drug: a photosensitizer based on the porphyrin skeleton. *Medicinal Chemistry*. 2020; 11: 427–437, doi: 10.1039/c9md00558g.
27. Benov L, Craik J, Batinic-Haberle I. Protein damage by photo-activated Zn(II) N-alkylpyridylporphyrins. *Amino Acids*. 2012; 42: 117–128, doi: 10.1007/s00726-010-0640-1.
28. Malatesti N, Harej A, Kraljević Pavelić S, Lončarić M, Zorc H, Wittine K, et al. Synthesis, characterisation and in vitro investigation of photodynamic activity of 5-(4-octadecanamidophenyl)-10,15,20-tris(N-methylpyridinium-3-yl)porphyrin trichloride on HeLa cells using low light fluence rate. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2016; 15: 115–126, doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.07.003.
29. Xia R, Sun L, Liao J, Li H, You X, Xu D, Yang J, Hwang SH, Jones RD, Hammock B, Yang GY. Inhibition of Pancreatic Carcinoma Growth Through Enhancing ω -3 epoxy Polyunsaturated Fatty Acid Profile by Inhibition of Soluble Epoxide Hydrolase. *Anticancer Research*. 2019; 39: 3651–3660, doi: 10.21873/anticancer.13513.
30. Dyari HRE, Rawling T, Bourget K, Murray M. Synthetic ω -3 Epoxyfatty Acids As Antiproliferative and Pro-apoptotic Agents in Human Breast Cancer Cells. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2014; 57: 7459–64, doi: 10.1021/jm501083y.
31. Liu Y, Liu Y, Cheng Y, Li J, Wang Y. Epoxy Stearic Acid, an Oxidative Product Derived from Oleic Acid, Induces Cytotoxicity, Oxidative Stress, and Apoptosis in HepG2 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018; 66: 5237–5246, doi: 10.1021/acs.jafc.8b01954.
32. Taniguchi M, Lindsey JS, Bocian DF, Holten D. Comprehensive review of photophysical parameters (ϵ , Φ_f , τ_s) of tetraphenylporphyrin (H₂TPP) and zinc tetraphenylporphyrin (ZnTPP) – Critical benchmark molecules in photochemistry and photosynthesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2021; 46: 100401-100462, doi: 10.1016/j.jphotochemrev.2020.100401.

33. Roos G, Roos C. Functional Classes II, Reactions. In: Organic Chemistry Concepts. Elsevier. 2015: 103–149, doi: 10.1016/b978-0-12-801699-2.00007-9.
34. Leggio A, Belsito EL, De Luca G, Di Gioia ML, Leotta V, Romio E, Siciliano C, Liguori A. One-pot synthesis of amides from carboxylic acids activated using thionyl chloride. RSC Adv. 2016; 6: 34468–34475, doi: 10.1039/c5ra24527c.
35. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS. Introduction to SPECTROSCOPY. 3rd ed. Boston: Thomson Brooks/Cole; 2001.
36. Kim C, Traylor TG, Perrin CL. MCPBA Epoxidation of Alkenes: Reinvestigation of Correlation between Rate and Ionization Potential. Journal of the American Chemical Society. 1998; 120: 9513-9516, doi: 10.1021/ja981531e.
37. Hermanson GT. The Reactions of Bioconjugation. In: Bioconjugate Techniques. Elsevier; 2013: 229–258, doi: 10.1016/B978-0-12-382239-0.00003-0.
38. van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. Methods in molecular biology. 2011; 731: 237–245, doi: 10.1007/978-1-61779-080-5_20.

7. Životopis

OSOBNNE INFORMACIJE

Karmen Doričić

📍 Ratka Petrovića 44, 51 000 Rijeka, Hrvatska

☎ 091 956 1585

✉ karmendoricic@gmail.com

Datum rođenja: 04.05.1999.

Državljanstvo: hrvatsko

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

listopad 2021. - **Diplomski studij „Istraživanje i razvoj lijekova“**

Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, Radmile Matejčić 2, 51 000 Rijeka

listopad 2018. - rujan 2021. **Prvostupnica Biotehnologije i istraživanja lijekova**

Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, Radmile Matejčić 2, 51 000 Rijeka

- završila studij s pohvalom: SUMMA CUM LAUDE

rujan 2014. - svibanj 2018. **Gimnazija Andrije Mohorovičića Rijeka**

Frana Kurelca 1, 51 000 Rijeka

rujan 2009. - lipanj 2015. **Osnovna glazbena škola Ivana Matetića Ronjgova**

Laginjina ulica 1, 51 000 Rijeka

- temeljni predmet - klavir

rujan 2007. - lipanj 2013. **„Linguae“ - škola stranih jezika**

Radićeva 4, 51 000 Rijeka

- čitanje, pisanje i govorenje engleskog jezika

STRUČNA PRAKSA

srpanj 2023.- **Jadran-galenski laboratorij (JGL d.d.)**

- Pilot pogon (Razvoj procesa)

lipanj 2021. **Jadran-galenski laboratorij (JGL d.d.)**

- GMP laboratorij na Odjelu za biotehnologiju

lipanj 2021. **Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije (NZZJZ PGŽ)**

- Laboratorij za unaprijeđenje prehrane
- Laboratorij za mikrobiologiju hrane
- Laboratorij za kontrolu hrane i predmeta opće uporabe
- Odjel za analitiku

RADNO ISKUSTVO

- prosinac 2022. Demonstrator na kolegiju *Organska kemija*
- srpanj 2022. - rujan 2022. **Jadran-galenski laboratorij d.d. (JGL d.d.)**
Jadran-galenski laboratorij, Svilno 20, 51 000 Rijeka
- rad u odjelu za finalizaciju proizvodnje
- srpanj 2021. - travanj 2022. **Rad u trgovini „Baby Center“**
Baby Center, Ulica Janka Polić Kamova 81a, 51 000 Rijeka
- usluživanje kupaca
- siječanj 2021. - siječanj 2023. **Suvoditeljica projekta „Putujući znanstvenici“, Udruga studenata biotehnologije Rijeka (USBRI)**
- popularizacija znanosti među djecom
- listopad 2019. - srpanj 2023. **Volontiranje u „Udrugi studenata biotehnologije Rijeka“**
Udruga studenata biotehnologije Rijeka, Radmile Matejčić 2, 51 000 Rijeka
- Sudjelovanje u projektima:
- Kuglice dobrih želja
 - NatuRIs
 - Putujući znanstvenici
 - Otvoreni dan Odjela za biotehnologiju

OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik

hrvatski

Strani jezici	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	C2	C2	C2	C2	C2
talijanski	B1	B1	B1	B1	B1
Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik Zajednički europski referentni okvir za jezike – Ljestvica za samoprocjenu					

Komunikacijske vještine

- izvrsne komunikacijske vještine stečene prilikom rada u trgovini
- sklonost prema timskom radu

Organizacijske/rukovoditeljske vještine

- izvrsne organizacijske vještine stečene tijekom obrazovanja i suvođenja projekta „Putujući znanstvenici“

Računalne vještine

- vladanje Microsoft Office™ alatima
- poznavanje rada u programima za statističku obradu podataka (Statistica, MedCalc)
- poznavanje rada u programima za vizualizaciju i modeliranje molekula (ChemDraw, PyMol, VMD, Chimera, Avogadro)
- poznavanje rada u programu za obradu NMR spektara (SpinWorks 4)
- poznavanje rada u programu za analizu podataka (Origin)

DODATNE INFORMACIJE

Stipendije

- | | |
|-------------|--|
| 2022./2023. | • Stipendija za izvrsnost Sveučilišta u Rijeci |
| 2021./2022. | • Stipendija za izvrsnost Sveučilišta u Rijeci |
| 2020./2021. | • STEM stipendija |
| 2019./2020. | • STEM stipendija |
| 2018./2019. | • STEM stipendija |
| 2017./2018. | • Stipendija grada Rijeke za darovite učenike |

Nagrade

- | | |
|-------------|----------------------------------|
| 2022./2023. | • Nagrada rektorice za izvrsnost |
|-------------|----------------------------------|

Konferencije

- | | |
|-------|---|
| 2019. | • Konferencija „Budućnost i perspektiva“ (pasivni slušač) |
|-------|---|

Ljetna škola

- | | |
|--------------|--|
| lipanj 2022. | • LJETNA ŠKOLA: Patofiziologija aktualnih javnozdravstvenih problema i bolesti |
|--------------|--|