

Sinteza BODIPY spojeva koji ciljaju unutarstanične organele

Vidoša, Lorena

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:193:408694>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**

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

Lorena Vidoša

Sinteza BODIPY spojeva koji ciljaju unutarstanične organele

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Istraživanje i razvoj lijekova

Lorena Vidoša

Sinteza BODIPY spojeva koji ciljaju unutarstanične organele

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

Mentor rada : dr. sc. Nikola Basarić

Ko-mentor: izv. prof. dr. sc. Nela Malatesti

Neposredni voditelj: dr. sc. Mladena Glavaš

Diplomski rad je obranjen dana 12.09.2023.

pred povjerenstvom :

1. izv. prof. dr. sc. Petra Karanikić
2. doc. dr. sc. Jurica Novak
3. izv. prof. dr. sc. Nela Malatesti

Rad sadrži 112 stranica, 69 slika, 1 tablicu i 63 literaturna navoda.

Zahvala

Prvenstveno se zahvaljujem svom mentoru dr. sc. Nikoli Basariću što mi je omogućio rad u Laboratoriju za sintetsku organsku kemiju. Zahvaljujem Vam se na mnogobrojnim korisnim savjetima i na velikoj količini prenesenog znanja kao i na iznimnom strpljenju i podršci.

Zahvaljujem se komentorici izv. prof. dr. sc. Neli Malatesti što mi je omogućila rad u Laboratoriju za organsku kemiju i kemiju čvrstog stanja te na svim korisnim savjetima .

Zahvaljujem dr. sc. Ivani Ratkaj na staničnim kulturama i provedenim eksperimentima te ugodnoj suradnji.

Zahvaljujem se Martini na savjetima i pomoći u svakom trenutku te uvijek dobrom raspoloženju koje je učinio rad u laboratoriju još ugodnijim.

Zahvaljujem svim "podrumskim ljudima" na ugodnoj radnoj atmosferi. Hvala Margareti, Josipu i Igoru na strpljenju, odličnim savjetima, iznimnoj susretljivosti te ugodnim razgovorima i vicevima uz kolonu. Posebno se zahvaljujem Mladeni na pomoći, trudu i uloženom vremenu u objašnjavanje i odgovaranje na moja razna pitanja.

Najveće hvala mojim roditeljima, baki, sestri i prijateljima koji su bili neizmijerna podrška kroz sve dijelove mog života i školovanja, pa tako i ovog poglavlja. Vaša ljubav i podrška uvijek su mi davali motivaciju i snagu.

Sažetak

Fluorescentna mikroskopija je moćna tehnika slikovnog prikazivanja koja se koristi u različitim znanstvenim područjima, posebno u biologiji i medicini, kako bi se vizualiziralo i proučavalo raspodjelu i ponašanje molekula unutar stanica i tkiva. Koristi se fenomenom fluorescencije, koji omogućuju različiti fluorofori ili fluorescentne boje. Kao dio ovog rada, sintetizirane su dvije nove fluorescentne BODIPY boje koje sadrže supstituente na *meso*-položaju, koji su posebno dizajnirani da ciljaju lizosome ili endoplazmatski retikulum (ER). Sama sintetetska strategija temeljila se na pripremi BODIPY karboksilne kiseline, koja je metodom peptidne sinteze u izvrsnim prinosima vezana za derivate morfolina ili tosilsulfonamida. Pokušaji sinteze BODIPY derivata s trifenilfosfonijevom soli koja bi ciljala mitohondrije nisu uspjeli zbog neuspješne Williamsove sinteze etera BODIPY fenola s bromoalkinom. Spektralna i fotofizička svojstva istražena su u nepolarnim (CH_2Cl_2), polarnim otapalima - aprotičnim (CH_3CN) i protičnim (H_2O). Spojevi imaju usku i snažnu apsorpcijsku ($\approx 498 \text{ nm}$) i emisijsku vrpцу ($510\text{-}515 \text{ nm}$) u vidljivom području te male Stokesove pomake. Spojevi ne pokazuju fluoro-solvatokromna svojstva, ali kvantni prinosi fluorescencije ($\Phi_f = 0,50\text{-}0,75$) opadaju s povećanjem polarnosti otapala. Vremena života singletnih pobuđenih stanja izmjerena su metodom vremenski koreliranog brojanja pojedinačnih fotona i nalaze se u rasponu nekoliko nanosekundi ($\tau = 2,6\text{-}3,0 \text{ ns}$). Eksperimenti fluorescentne mikroskopije izvedeni su na staničnoj liniji HFF, a pokazuju laku internalizaciju spojeva i specifično bojenje lizosoma ili ER-a pri koncentracijama od $5 \mu\text{M}$, odnosno $1 \mu\text{M}$. Dobiveni rezultati sugeriraju moguću primjenu novosintetiziranih BODIPY spojeva u medicini i biologiji kao fluorescentnih indikatora za ciljanje lizosoma i ER-a.

Ključne riječi: BODIPY, endoplazmatski retikulum, fluorescencijska mikroskopija, fotofizika, lizosomi, mitohondrij, organska sinteza

Summary

Fluorescence microscopy is a powerful imaging technique used in various scientific fields, particularly in biology and medicine, to visualize and study the distribution and behavior of molecules within cells and tissues. It exploits the phenomenon of fluorescence, which is attributed to various fluorophores or fluorescent dyes. As a part of this thesis, two new fluorescent BODIPY dyes were synthesized, containing substituents at the *meso*-position, specifically designed to target lysosomes or endoplasmic reticulum (ER). The synthetic strategy was based on the preparation of a BODIPY carboxylic acid, which was in the peptide coupling protocol in excellent yields attached to a morpholine residue or tosylsulphonamide derivative, respectively. Attempted synthesis of a BODIPY derivative with triphenylphosphonium salt to target mitochondria failed due to unsuccessful Williams ether synthesis of a BODIPY phenol with a bromoalkyne derivative. Spectral and photophysical properties were investigated in nonpolar (CH_2Cl_2), polar solvents – aprotic (CH_3CN) and protic (H_2O). The compounds have narrow and strong absorption (≈ 498 nm) and emission bands (510-515 nm) in the visible region and have small Stokes shifts. The compounds do not exhibit fluoro-solvatochromic properties, but the quantum yields of fluorescence ($\Phi_f = 0.50$ - 0.75) decrease with increasing solvent polarity. Singlet excited state lifetimes were measured by time-correlated single photon counting and they are in the nanosecond time-scale ($\tau = 2.6$ - 3.0 ns). The fluorescence microscopy experiments were performed on the HFF cell line, demonstrating the easy internalization of the compounds and specific staining of lysosomes or ER at concentrations $5 \mu\text{M}$ and $1 \mu\text{M}$, respectively. The obtained results suggest a potential application of the newly synthesized BODIPY compounds in medicine and biology as fluorescent indicators for targeting lysosomes and ER.

Key words: BODIPY, fluorescence microscopy, endoplasmic reticulum, lysosomes, mitochondria, organic synthesis, photophysics

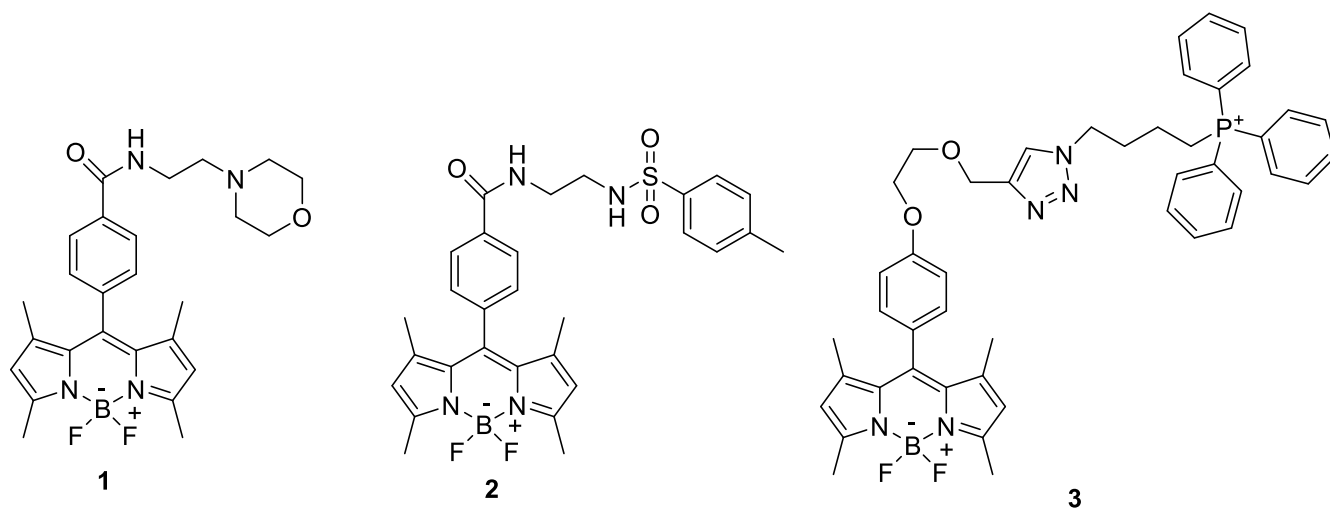
Sadržaj

1. Uvod	1
2. Ciljevi i hipoteze istraživanja	3
3. Literaturni pregled	4
3.1. Sinteza BODIPY spojeva, fotofizička svojstva i primjena	4
3.2. BODIPY fluorofori za selektivno oslikavanje organela	9
3.2.1. Lizosomi	10
3.2.2. Mitohondrij	14
3.2.3. Endoplazmatski retikulum	19
3.2.4. Golgijev aparat	23
3.2.5. Stanična jezgra	25
4. Materijali i metode	26
4.1. Opće napomene	26
4.2. Sinteza spojeva	28
4.2.1. Priprava benzil-(4-formil)benzoata (4)	28
4.2.2. Priprava benzil 4-[bis(3,5-dimetil-1H-pirol-2-il)metil] benzoata (5)	29
4.2.3. Priprava benzil-4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametil-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipirolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-il) benzoata (6)	29
4.2.4. Priprava 4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametil-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipirolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-il)benzojeve kiseline (7) ...	31
4.2.5. Priprava 4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametil-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipirolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-il)-N-(2-morfolinoetil)benzamida (1)	32
4.2.6. Priprava N-(2-aminoetil)-4-metilbenzensulfonamida (8)	33
4.2.7. Priprava 4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametil-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipirolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-il)-N-(2-((4-metilfenil)sulfonamido)etil)benzamida (2)	34
4.2.8. Priprava 4-[bis(3,5-dimetil-1H-pirol-2-il)metil]fenola (9)	35
4.2.9. Priprava 4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametil-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipirolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-il)fenola (10)	36
4.2.10. Priprava (4-bromobutil)trifenilfosfonijeve soli (11)	37

4.2.11. Priprava (4-azidobutil)trifenilfosfonijeve soli (12)	38
4.2.12. Priprava 2-(prop-2-in-1-iloksi)etan-1-ola (13).....	39
4.2.13. Priprava 3-(2-bromoetoksi)prop-1-ina (14).....	40
4.3. Analiza fotofizičkih svojstva	42
4.4. Eksperimenti u staničnoj kulturi	44
4.4.1. Kultura stanica	44
4.4.2. Bojenje stanica	44
4.4.3. Fluorescencijska mikroskopija	45
5. Rezultati i rasprava	46
5.1. Sinteza spojeva.....	46
5.2. Fotofizička svojstva	58
5.3. Eksperimenti u staničnoj kulturi	62
6. Zaključak.....	66
7. Literatura	68
8. Prilozi	74
8.1. NMR spektri	74
8.2. UV-Vis spektri	97
8.3. Fluorescencijski spektri	98
8.4. IR-spektri	108
8.5. LC-MS spektri masa.....	109
9. Životopis	111

1. Uvod

Fluorescencijska mikroskopija je moćna i nezamjenjiva metoda za neinvazivno proučavanje materije i živih sustava u raznim znanstvenim područjima, posebno u biologiji i medicini te (bio)tehnologiji (1). Navedena fluorescentna tehnika omogućuje vrlo specifičnu i osjetljivu vizualizaciju te proučavanje distribucije i ponašanja molekula unutar stanica i tkiva pri vrlo visokoj rezoluciji (1,2). Fluorescencijska mikroskopija zahtijeva da objekti od interesa fluoresciraju, što se postiže specifičnim vezanjem fluorofora (2). Fluorofori igraju središnju ulogu u fluorescencijskoj mikroskopiji te su obično organske boje ili poluvodički nanokristali, ili mogu biti biološke prirode (npr. fluorescentni proteini). Popularni sintetski fluorofori naširoko korišteni u biokemiji i staničnoj biologiji su kumarini, fluorescini, rodamini, fenoksazini, cijanini te derivati 4,4-difluor-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacena (poznatiji kao BODIPY) (3). Među navedenim spojevima, BODIPY derivati su od posebnog interesa, zbog svojih izrazito pogodnih spektroskopskih i fotofizičkih svojstava (3). Mnogi BODIPY derivati korišteni su kao indikatori za specifično ciljanje i vizualiziranje unutarstaničnih organela, od kojih su neki i komercijalno dostupni (4). Međutim, većina komercijalno dostupnih indikatora ima kompliciranu molekularnu strukturu, obično zahtijevaju višestupanjsku sintezu, pa su stoga i vrlo skupi. Nema sumnje da je razvoj jednostavnih i vrlo učinkovitih metoda za dobivanje novih BODIPY boja s jednostavnim strukturama još uvijek prijeko potreban. Stoga je svrha ovog diplomskog rada provesti organsku sintezu BODIPY spojeva **1**, **2** i **3** (Slika 1) koji su supstituirani u *meso*-položaju sa skupinama za koje je poznato da ciljaju određene unutarstanične organele.



Slika 1. Kemijske strukture ciljnih BODIPY spojeva **1**, **2** i **3** za specifično ciljanje unutarstaničnih organela.

2. Ciljevi i hipoteze istraživanja

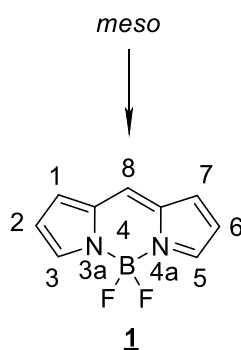
Cilj ovog istraživanja je sinteza BODIPY spojeva koji sadrže supstituente za specifično ciljanje lizosoma, endoplazmatskog retikuluma ili mitohondrija te ispitivanje primjene pripremljenih spojeva kao fluorescentnih indikatora.

Hipoteza istraživanja je da će se kombinacijom BODIPY jezgre i supstituenta na bazi morfolina, tosilsulfonamida te trifenilfosfonijeve soli pripremiti spojevi dobrih fotofizičkih svojstava. Nadalje, hipoteza je da će se dobiveni spojevi nakon tretiranja stanica lako internalizirati te da će se spoj **1** selektivno nakupljati u lizosomima, **2** u endoplazmatskom retikulumu, dok će **3** ciljati mitohondrije.

3. Literaturni pregled

3.1. Sinteza BODIPY spojeva, fotofizička svojstva i primjena

Među brojnim klasama visoko fluorescentnih organskih molekula, spojevi na bazi 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (poznatiji pod trgovačkim imenom BODIPY, Slika 2) pokazuju iznimno veliki potencijal te je njihova popularnost značajno porasla tijekom protekla dva desetljeća (4). Prve derivate ove klase spojeva otkrili su Treibs i Kreuzer 1968. (5), iako se relativno malo pozornosti pridavalo otkriću do kraja 1980-ih. Tada je prepoznata potencijalna upotreba ove boje za biološko označavanje (6) što je rezultiralo dizajniranjem nekoliko novih komercijalnih boja na bazi BODIPY-a (7). Međutim, tek su relativno nedavno moguće upotrebe i primjene boja na bazi BODIPY-a u potpunosti prepoznate. Opisane su različite primjene poput fluorescentnih indikatora (4), bioloških oznaka (8), proba za biooslikavanje (9), podesivih laserskih boja (10), potencijalnih fotodinamičkih terapijskih agensa (11), antena za skupljanje sunčeve svjetlosti ili solarnih ćelija (12,13).



Slika 2. Struktura osnovnog BODIPY spoja **1** s položajima numeriranim prema IUPAC-u (4).

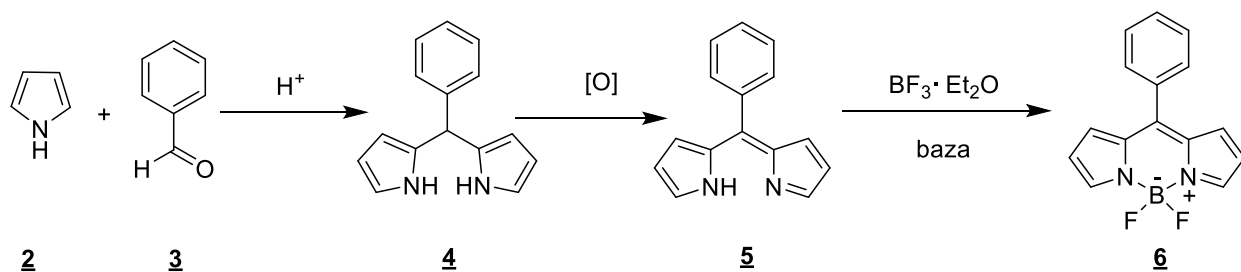
Popularnost i korisnost BODIPY-a proizlazi iz kombinacije dobrih fotofizičkih svojstava kao što su visoki molarni apsorpcijski koeficijenti $\epsilon(\lambda)$ (obično u području od 40000 do 110000 M⁻¹ cm⁻¹) i kvantni prinosi fluorescencije ϕ_F (između 60 i 90 %) te u većini slučajeva zanemarivo međusustavno križanje i populacija tripletnog pobuđenog stanja (4,7). Karakteriziraju ih intenzivne i uske apsorpcijske i emisijske vrpce u vidljivom spektralnom području (≥ 500 nm) s malim Stokesovim pomacima, vremena života fluorescencije τ u rasponu od 1 - 10 ns te dobra topljivost u većini organskih otapala i mala sklonost samoagregiranju u otopini (4,7). Sama struktura BODIPY jezgre je električki neutralna, što pridonosi relativno nepolarnoj prirodi molekule. BODIPY spojevi posjeduju nisku citotoksičnost (iako određeni halogenirani BODIPY spojevi mogu pokazivati fototoksičnost (14)) i izvrsnu otpornost na toplinsku oksidativnu degradaciju, na fotoizbjeljivanje, te na kiseline i baze (15). Štoviše, njihova spektroskopska i fotofizička svojstva mogu biti lako podešena uvođenjem odgovarajućih skupina na pravim položajima BODIPY jezgre (15).

Sa stajališta sinteze, drugi glavni razlog atraktivnosti BODIPY boja je njihov široki opseg mogućnosti funkcionalizacije (na ugljicima pirolnih prstenova (na položajima 1, 2, 3, 5, 6, 7), središnjem 8- ili *meso*-položaju i atomu bora (položaj 4)). Različiti sintetski putevi do BODIPY obitelji fluorofora omogućavaju stvaranje velikog broja struktura boja sa željenim spektroskopskim, (foto)fizičkim i kemijskim karakteristikama (4,15,16).

Sinteza BODIPY jezgre uglavnom se temelji na dobro poznatoj kemiji pripreve porfirina, čime se sintetizira osnovni kromofor BODIPY-a. Postoje tri glavna pristupa sintezi BODIPY jezgre (4).

Prvi pristup temelji se na kiselo kataliziranoj kondenzaciji aldehida **3** s pirolom (**2**) pri čemu nastaje dipirometan **4** (Shema 1) (17). Za nesupstituirani pirol, ova reakcija se obično provodi u pirolu kao otapalu kako bi se spriječila

polimerizacija, iako modifikacije dopuštaju upotrebu manjeg broja ekvivalenata pirola. Dipirometani **4** su prilično nestabilni spojevi i kako su osjetljivi na svjetlo, zrak i kiseline, najbolje ih je koristiti odmah nakon pripreme. Oksidacija dipirometana **4** daje dipirometen ili dipirin **5**. Oksidacija se može provoditi s 2,3-dikloro-5,6-dicijano-*p*-benzokinonom (DDQ) ili 2,3,5,6-tetrakloro-*p*-benzokinonom (*p*-kloranil), koji osigurava blage reakcijske uvjete. Postoji samo nekoliko primjera gdje aldehid nije aromatski (**18**), jer oksidacija obično ne uspijeva u takvim slučajevima. Dipirometen **5** podvrgnut bazi i bortrifluorid-dietil eteratu ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$) daje borondifluoridni kompleks **6** u visokom prinosu (4,15).



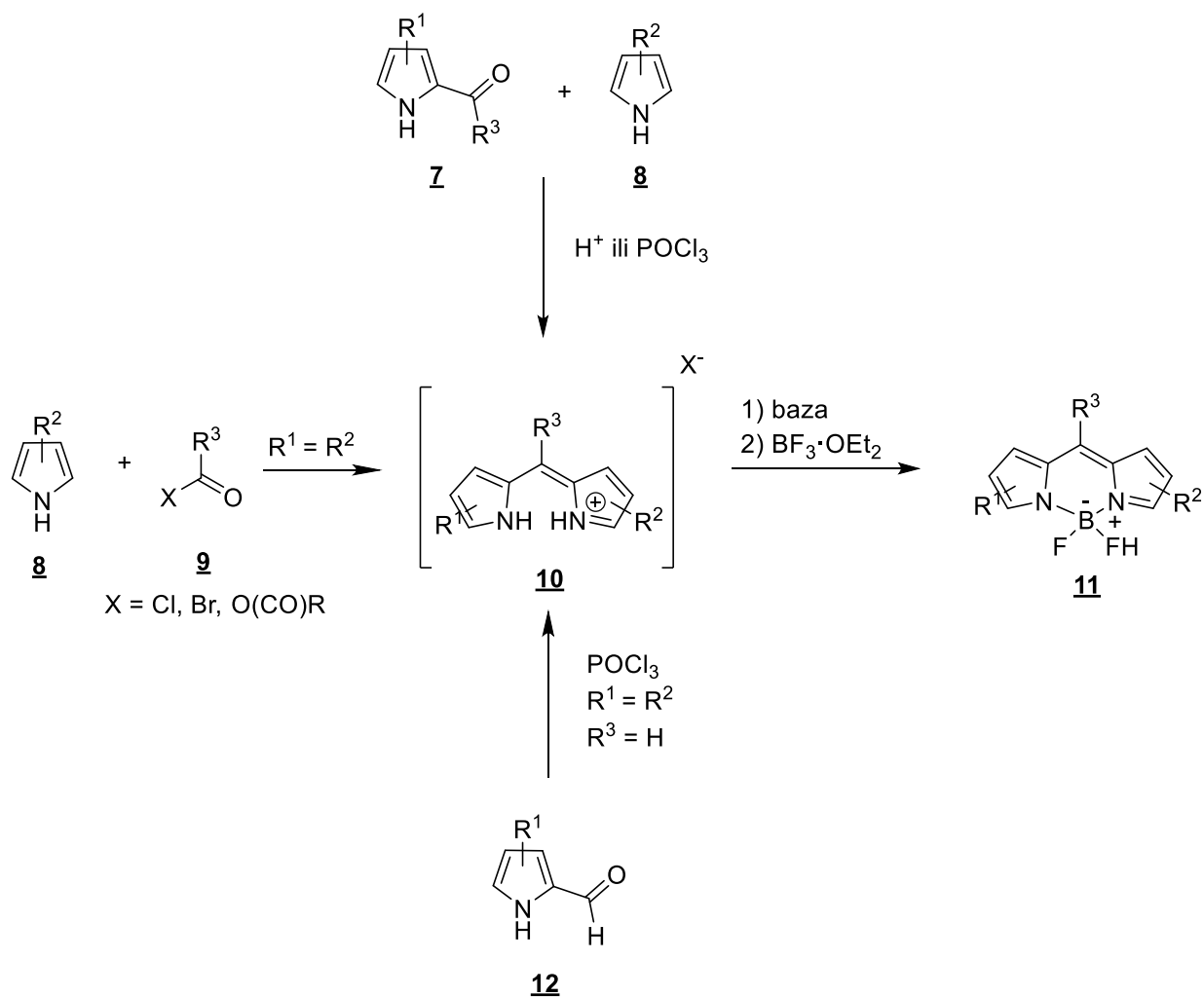
Shema 1. Kondenzacija pirola s aromatskim aldehidom, dajući dipirometan **4** koji se zatim oksidira i kompleksira u BODIPY boju **6** (4).

Drugi pristup temelji se na kiselo kataliziranoj kondenzaciji 2-acilpirola **7** s pirolom **8** koji je nesupstituiran na položaju 2. Pod kiselim uvjetima nastaje dipirinijeva sol **10**. Deprotonacija soli **10** s bazom i kompleksiranje s $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ daje BODIPY boju **11** (Shema 2). Za razliku od prethodnog postupka, supstituent koji završava u *meso*-položaju nije ograničen na arilnu skupinu, stoga se ovim pristupom može proizvesti veći raspon različitih derivata. Nadalje, dvije različite pirolne skupine mogu se koristiti u ovoj reakciji kondenzacije, čineći sintezu nesimetričnih BODIPY spojeva **11** ($\text{R}^1 \neq \text{R}^2$) mogućom (19).

Sinteza simetričnih dipirinijevih soli **10** u jednom koraku ($\text{R}^1 = \text{R}^2$, shema 2) također je moguće korištenjem sličnog postupka. U ovom slučaju,

acilacija i kondenzacija 2-nesupstituiranog pirola **8** odvijaju se u istoj reakciji, stvarajući *in situ* 2-acilpirol **7** koji odmah dalje reagira u simetričnu dipirinijevu sol **10** (Shema 2). Sredstvo za aciliranje **9** u ovoj reakciji može biti kiselinski klorid, kiselinski bromid, anhidrid ili ortoester. Na kraju, primjenom baze i $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ u suvišku, dobije se BODIPY boja **11** (19).

Treći pristup koji predstavlja zanimljivu alternativu stvaranju simetričnih dipirinijevih soli **10** ($\text{R}^1 = \text{R}^2$) opisali su Burgess i Wu (20). Oni su otkrili da derivati pirol-2-karbaldehida **12** podliježu samokondenzaciji u prisutnosti fosfornog oksitriklorida (POCl_3). Ponovo, primjena baze i bortrifluorid-dietil eterata u suvišku daje BODIPY boju **11** (19).



Shema 2. Kondenzacija 2-acilpirola **7** i 2-nesupstituiranih pirola **8** kako bi se dobile dipirinijeve soli **10** i BODIPY boje **11** (19).

3.2. BODIPY fluorofori za selektivno oslikavanje organela

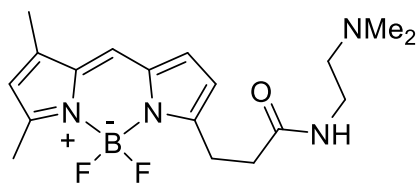
Organele su specijalizirane podjedinice unutar stanica koje su obično obavijene vlastitim lipidnim dvoslojem (21). Glavne eukariotske organele uključuju jezgru, mitohondrije, lizosome, endoplazmatski retikulum i Golgijev aparat, s tipičnim veličinama od 20 do 1000 nm. Svaka od ovih organela ima specifičnu i nezamjenjivu ulogu u staničnim procesima (22). Tijekom proteklih desetljeća porastao je interes za dizajn i sintezu organskih kromofora s jakom apsorpcijom i fluorescencijom radi karakterizacije i detekcije staničnih procesa te općenito organela. Optičko oslikavanje, koje uključuje oslikavanje temeljeno na fluorescenciji, može pružiti vrlo osjetljivu i selektivnu detekciju signala emitiranog iz fluorofora na različitim valnim duljinama, omogućujući simultano oslikavanje više organela. Stoga su fluorescentne probe omogućile karakterizaciju dinamičkih staničnih mehanizama kao i praćenje varijacija fiziološke okoline koje mogu biti uzroci ili simptomi zdravstvenih poremećaja (23).

Među različitim tipovima organskih fluorescentnih proba, derivati BODIPY boja pokazuju sve veći uspjeh u području biooslikavanja zbog fotofizičkih svojstava i velike fotostabilnosti u biološkim uvjetima. To omogućuje učinkovito otkrivanje fluorescentnog signala tijekom snimanja. Osim toga, njihova laka sinteza i funkcionalizacija omogućuje modulaciju njihovih apsorpcijskih/emisijskih profila i uvođenje funkcionalnih skupina za specifično ciljanje biološki relevantnih vrsta kao što su biomolekule, anorganski bioanaliti i stanične organele (22).

3.2.1. Lizosomi

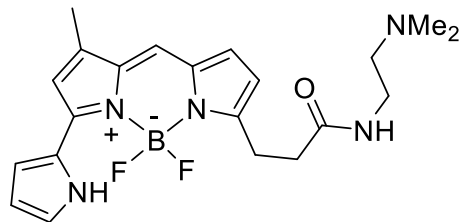
Lizosomi su organele obavijene membranom promjera od oko 500 nm te su razgradne organele stanica sisavaca (21). Lizosomi su uključeni u procese povezane s razgradnjom biomolekula (npr. proteina, lipida, ugljikohidrata) i obranom od patogenih virusa i bakterija (21). Oba procesa su posredovana hidrolitičkim enzimima, čija je funkcija najučinkovitija u okruženjima s niskim pH. Razlika u pH lizosoma u odnosu na staničnu citoplazmu (pH 4,5–6,0 naspram pH ~7,2) u stanicama raka može postati i veća jer lizosomski pH može postati kiseli (pH 3,8–4,7). To se događa zbog veće ekspresije specifičnih podjedinica koje potiču aktivnost protonske pumpe ATP-aze vakuolarnog tipa (V-ATP-aza) (24). Imajući ovo na umu, pH-uvjetovana fluorescencija bila je glavni faktor u razvoju indikatora dizajniranih za istraživanje morfologije i funkcija lizosoma (24).

Postoje komercijalno dostupni BODIPY derivati za određivanje intracelularne lokalizacije lizosoma: LysoTracker Green DND-26 (**13**) i LysoTracker Red DND-99 (**14**) (Slika 3)(25). Derivat **14** je fluorofor u obliku konjugirane višepirolne strukture koja sadrži bazični amin koji se protonira i dovodi do selektivnog nakupljanja u kiselim odjeljcima te pokazuje crvenu fluorescenciju. Strukturno je sličan derivatu **13**, ali ima dodatni pirolni prsten u konjugaciji s primarnom strukturom, što proizvodi emisiju duže valne duljine (26).



13

**LysoTracker
Green DND-26**

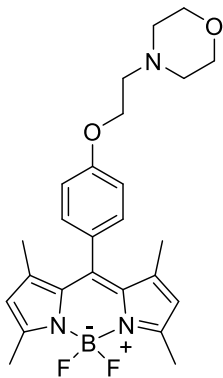


14

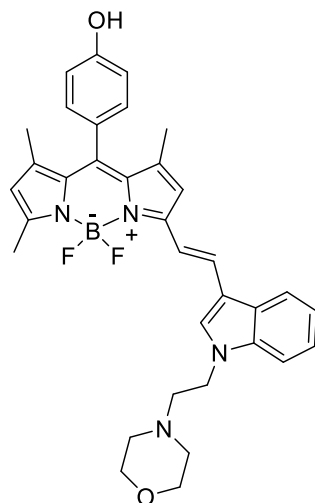
**LysoTracker
Red DND-99**

Slika 3. Kemijske strukture komercijalno dostupnih BODIPY derivata za vizualizaciju lizosoma (25,26).

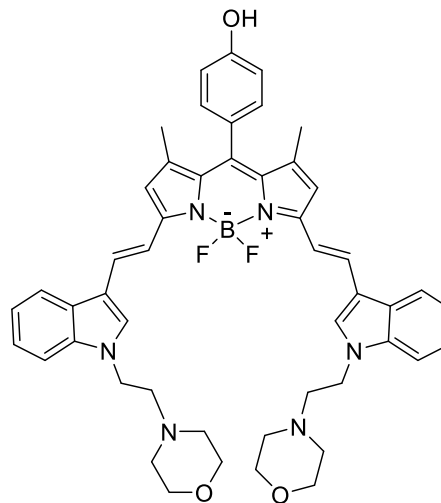
Sintetizirani su mnogobrojni BODIPY derivati koji su usmjereni na vizualiziranje lizosoma (3). U većini derivata prisutan je morfolinski supstituent (27) Kako morfolin ima pK_a 5-6 i može se protonirati samo u lizosomima, obično se odabire kao prikladna jedinica za ciljanje lizosoma (27). Prva serija visoko fotostabilnih BODIPY indikatora usmjerenih na lizosome, **15**, **16** i **17** (Slika 4) pokazuje podesive fluorescentne emisije od zelene do bliske infracrvene. Pokusi bojenja stanica pokazali su da ti indikatori imaju izvrsnu biokompatibilnost, nisku citotoksičnost i izvrsnu otpornost na fotoizbjeljivanje u živim stanicama (28). Druga serija BODIPY derivata **18**, **19a** i **20a** (Slika 4) pokazuje snažnu fluorescenciju i dobro ciljanje lizosoma. Derivati **19b** i **20b** (Slika 4) pokazali su dobru sposobnost ciljanja lizosoma u stanicama, pružajući specifičnost za oslikavanje lizosoma u hipoksičnim stanicama raka (27).



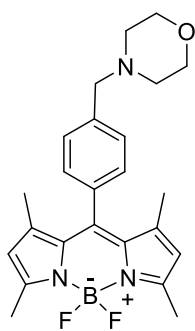
15



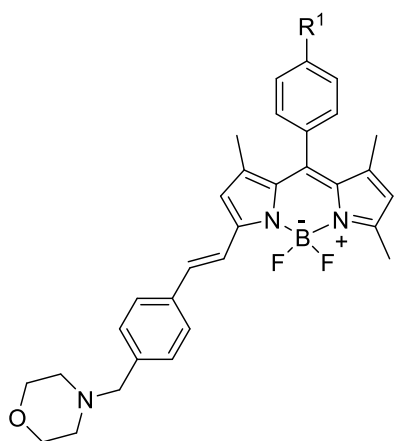
16



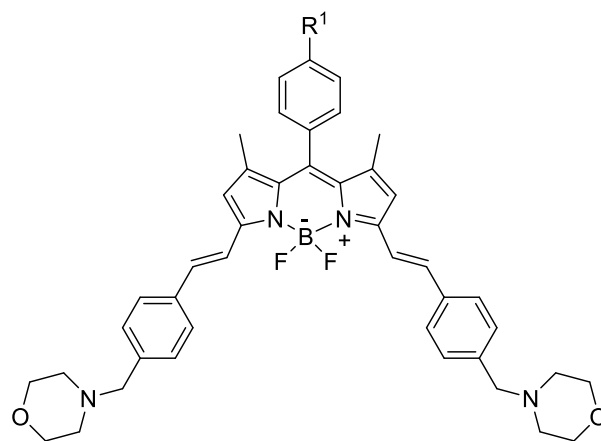
17



18



19a, R¹ = H
19b, R¹ = NO₂

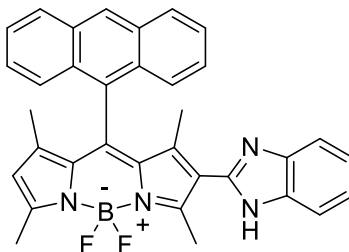


20a, R¹ = H
20b, R¹ = NO₂

Slika 4. Kemijske strukture BODIPY derivata koji ciljaju lizosome (27,28).

Molekule na bazi benzimidazola opisane su kao fluorescentne probe za praćenje promjene pH (29) Zbog svojih svojstva, benzimidazolni dio često je ugrađen u jezgre fluorofora kako bi konačnom aduktu omogućio emisiju ovisnu o pH. Navedena fluorescencija ovisi o protonaciji i deprotonaciji dušika na benzimidazolnom dijelu. Fotofizička ispitivanja na spoju **21** (Slika 5) dokazala su značajno pojačanje fluorescencije u kiselim uvjetima. Nadalje, *in vitro* studije su pokazale da je derivat BODIPY neškodljiv za stanice te da se

njegova fluorescencija povećava u kiselom lizosomskom okolišu unutar stanica, pokazujući tako njegov potencijal kao fluorescentne probe za označavanje lizosoma (29).



21

Slika 5. Kemijska struktura BODIPY derivata **21** koji cilja lizosome (29).

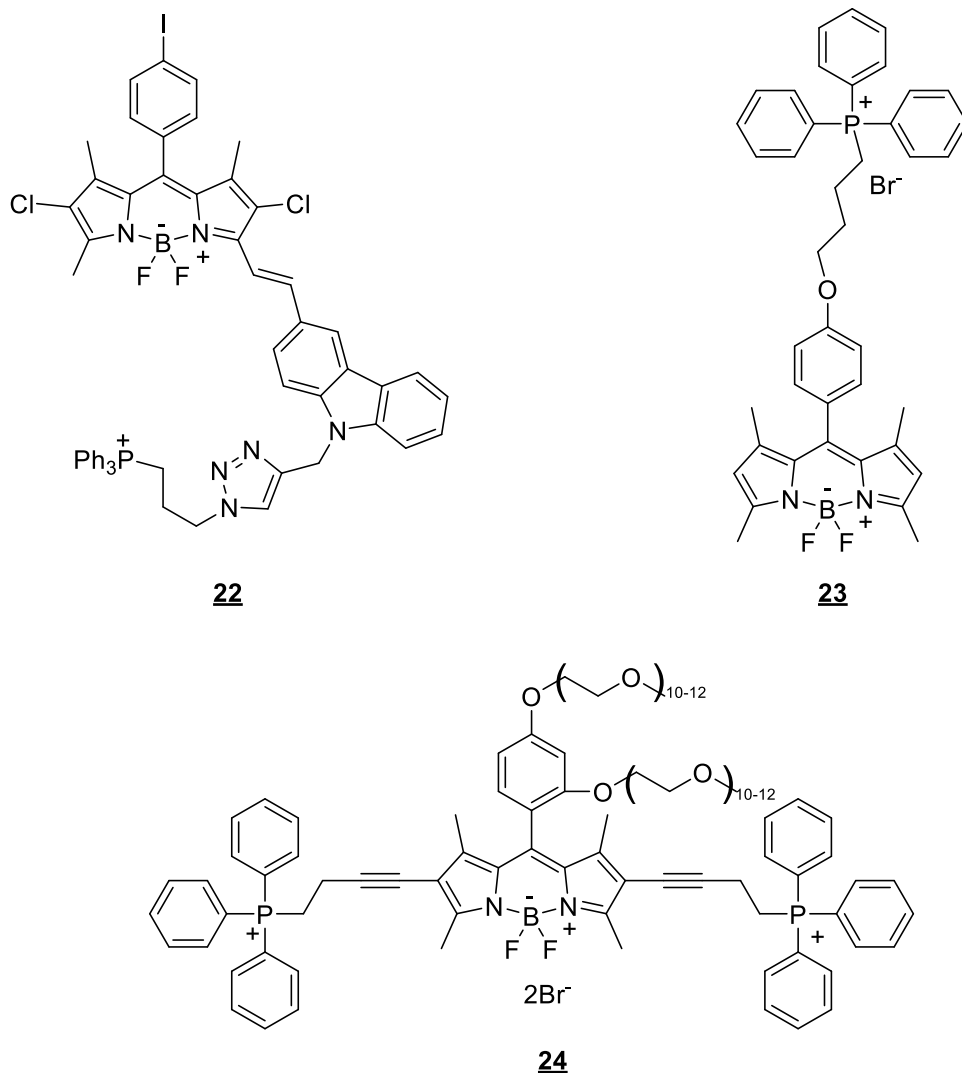
3.2.2. Mitochondrij

Mitochondriji su organele s dvostrukom membranom koje postoje u gotovo svim vrstama eukariotskih stanica (21). Mitochondriji ne samo da daju energiju stanicama stvaranjem adenozin trifosfata (ATP), već su također odgovorni za proizvodnju staničnih reaktivnih vrsta kisika (*eng. Reactive Oxygen Species, ROS*), pokretanje stanične apoptoze, regulaciju stanične proliferacije i staničnog ciklusa (21). Oštećenje stanica može izazvati promjene u veličini i strukturi mitohondrija. Nadalje, mitochondriji igraju ključnu ulogu u regulaciji metabolizma stanica, koncentracije kalcija te apoptoze (21). Svako oštećenje ili poremećaj u mitohondrijima može rezultirati ozbiljnim ljudskim bolestima kao što su rak, neurodegeneracija, kardiovaskularna disfunkcija ili Alzheimerova bolest (30). Danas su znatni naponi uloženi u proučavanje abnormalnih funkcija mitohondrija u biomedicinskim istraživanjima. Stoga su razvijene i uspješno korištene različite vrste fluorescentnih probi selektivnih za mitohondrije za promatranje njihove morfologije putem tehnika oslikavanja stanica (31).

U svrhu dobivanja fluorescentnih indikatora za mitohondrije rađene su modifikacije neutralnih fluorescentnih proba sa skupinom koja ima univerzalni lipofilni kationski ostatak (32). Trifenilfosfonijeva sol (TPP), organska kationska sol velikih dimenzija koja se isprva primjenjivala za isporuku lijekova u mitohondrije, kasnije je ugrađena u fluorofore i nakon toga postala najčešće korištena skupina za ciljanje mitohondrija (32). S uključenim pozitivnim nabojem, fosfonijev ion okružen s tri lipofilne fenilne skupine, može brzo proći kroz mitohondrijske membrane (32). Međutim, pozitivni naboj na TPP može utjecati na membranski potencijal. Poznato je da učinak protonske pumpe induciran mitohondrijskom oksidativnom fosforilacijom rezultira jakim negativnim membranskim potencijalom unutar matriksa. Stoga, kationi s

jakom lipofilnošću nastoje se kretati preko fosfolipidnog dvosloja unutarnje membrane i akumulirati unutar mitohondrijskog matriksa (32).

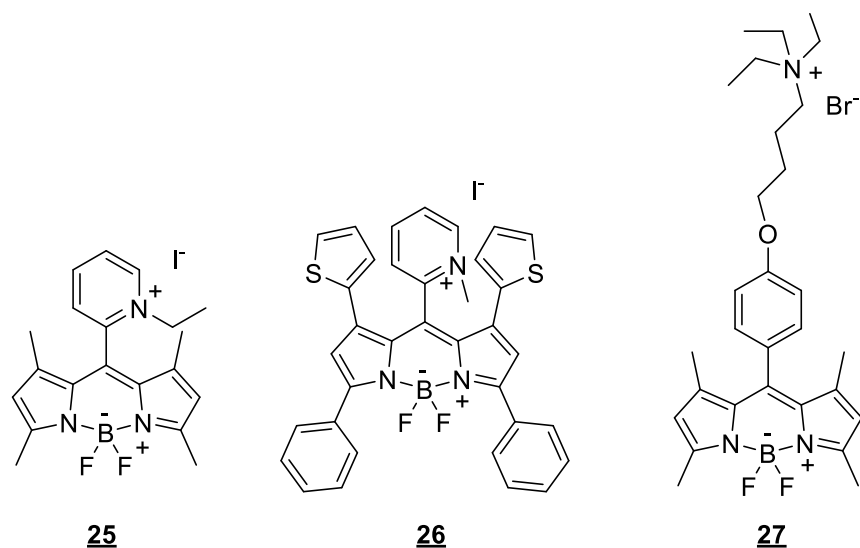
Brojni reagensi za bojenje mitohondrija razvijeni su dodatkom TPP-a uobičajenom fluoroforu (Slika 6). Fosfonijski dio pridonosi specifičnom ciljanju i zadržavanju derivata **22**, **23** i **24** u mitohondriju (33–35). Spoj **22** pokazuje visoku specifičnu lokalizaciju u mitohondrijima unutar živih stanica. S obzirom na emisiju pri ≈ 650 nm, može se učinkovito izbjeći preklapanje s drugim probama koje emitiraju u području vidljive svjetlosti (34). BODIPY derivat **23** prikazuje mnogo dobrih karakteristika, uključujući visoki kvantni prinos fluorescencije, visoku fotostabilnost, nisku citotoksičnost i brzu internalizaciju (33). Derivat **24** sastoji se od tri dijela: BODIPY dijela koja funkcionira kao fluorofor, dvije TPP skupine koje služe za ciljanje mitohondrija i dvije polietilen-glikol (PEG) skupine za povećanje topljivosti u vodi, osiguranje biokompatibilnosti i smanjenje rotacijske slobode (35). Dobiveni rezultati prikazuju da spoj posjeduje mnoga željena svojstva fluorescentne probe. To uključuje visoku topljivost u vodi, visok kvantni prinos fluorescencije, fotofizička svojstva neovisna o otapalu, pH neosjetljivost, dobru fotostabilnost, nisku citotoksičnost i izvrsna svojstva ciljanja mitohondrija (35). Shodno tome, spojevi **22**, **23**, **24** su prilično obećavajući kao kandidati za specifično vizualiziranje mitohondrija.



Slika 6. Kemijske strukture BODIPY derivata s TPP za vizualizaciju mitohondrija (33–35).

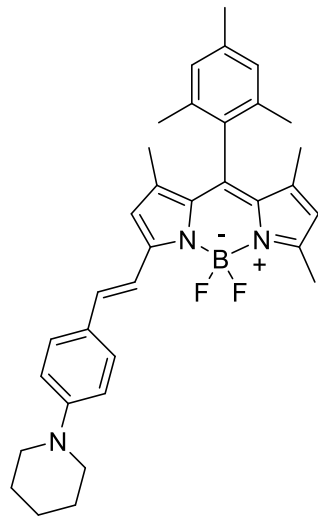
U usporedbi s uobičajeno korištenom fosfonijevom soli za ciljanje mitohondrija, koriste se i piridinijeve ili amonijeve soli (Slika 7). Derivati **25** i **26** sadrže piridinijevu skupinu te **27** trietilamonijevu (TEA), koji su u odnosu na TPP manje, bolje topljive u vodi i imaju bolju biokompatibilnost (33,36,37). Prethodno navedeni derivati pokazuju veću fotostabilnost od komercijalno dostupnih mitohondrijskih boja te imaju odlična fotofizička svojstva što može

pružiti uvid u nove strategije za budući dizajn i pripravu visoko učinkovitih fluorescentnih boja za mitohondrije (9,33,36,37).

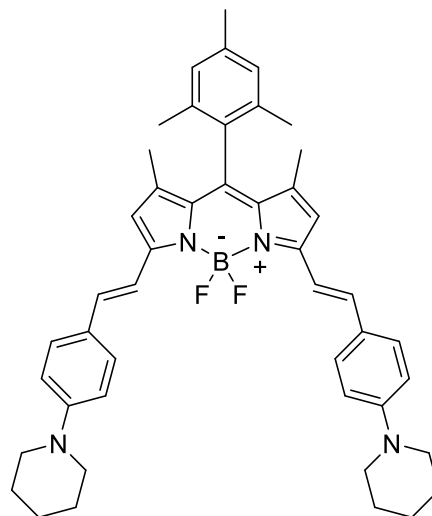


Slika 7. Kemijske strukture BODIPY derivata s piridinijevom ili amonijevom skupinom za vizualizaciju mitohondrija (9,33,36,37).

Kationske probe su kemijski nestabilne i mogu inducirati citotoksičnost; npr. namećući depolarizaciju mitohondrijske membrane, što dodatno ograničava njihovu primjenu u studijama na živim stanicama (38). Neutralni BODIPY derivati **28** i **29** pokazali su se kao dobre zamjene kationskih probi za ciljanje mitohondrija (Slika 8) (31). Derivati su dobiveni kombiniranjem jedne ili dvije piperidinilne jedinice s BODIPY fluoroforom preko C = C dvostrukih veza. Na taj se način piperidinilne skupine koriste za usmjeravanje BODIPY boje u mitohondrije, dok BODIPY održava svoja atraktivna fluorescentna svojstva (31).



28



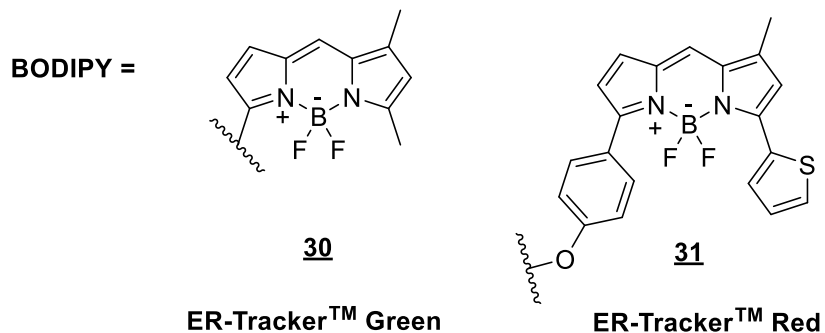
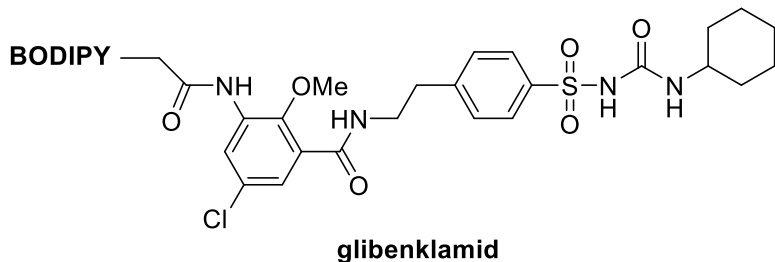
29

Slika 8. Kemijske strukture neutralnih BODIPY derivati za vizualizaciju mitohondrija (31).

3.2.3. Endoplazmatski retikulum

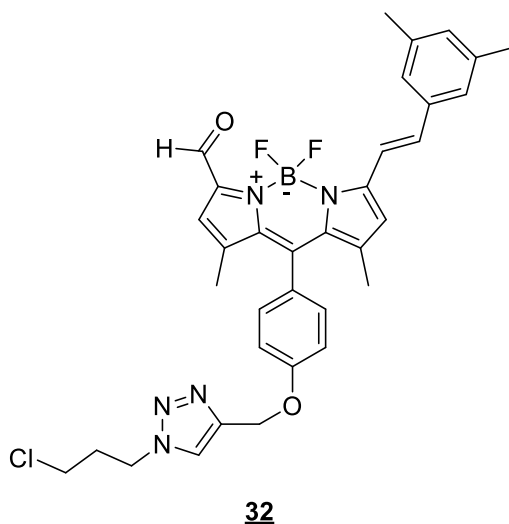
Endoplazmatski retikulum (ER) ključna je organela uključena u homeostazu, održavanje i preživljavanje stanica sisavaca (21). To je mjesto gdje se odvijaju bitni koraci u sintezi proteina, kao npr. sklapanje, savijanje, post-translacijske modifikacije proteina (glikozilacija i stvaranje disulfidne veze) te izlučivanje proteina (21). ER stres je povezan s disregulacijom u funkciji ER-a, a karakterizira ga nepoželjna akumulacija ne smotanih/pogrešno savijenih proteina, što rezultira stimulacijom ne smotanog proteinskog odgovora (*eng. Unsaturated Protein Response, UPR*), koji bi mogao inducirati apoptozu. ER stres može biti potaknut višestrukim podražajima uključujući nedostatak hranjivih tvari, hipoksiju, oksidativni stres, zračenje, *itd.* (39). Zbog uloge ER stresa u različitim patološkim stanjima kao što su moždani udari, srčane i neurodegenerativne bolesti, ishemijska, dijabetes i rak, razvili su se novi alati za otkrivanje i vizualizaciju učinka različitih podražaja na strukturu ER-a (39–41).

Nekoliko BODIPY varijanti za specifičnu vizualizaciju ER-a komercijalno je dostupno pod nazivima ER-Tracker™ Green i ER-Tracker™ Red (Slika 9) (42). Navedeni komercijalno dostupni spojevi **30** i **31** baziraju se na glibenklamidu te njegovim derivatima koji su klasični sulfonilureidni ligandi. Sulfonilureidni ligandi imaju visoku selektivnost prema ER-u zbog specifične interakcije između njegova cikloheksilsulfonilureidnog supstituenta i ATP-osjetljivog K⁺ kanala (sulfonilurea receptora) koji su istaknuti na ER membrani (41).



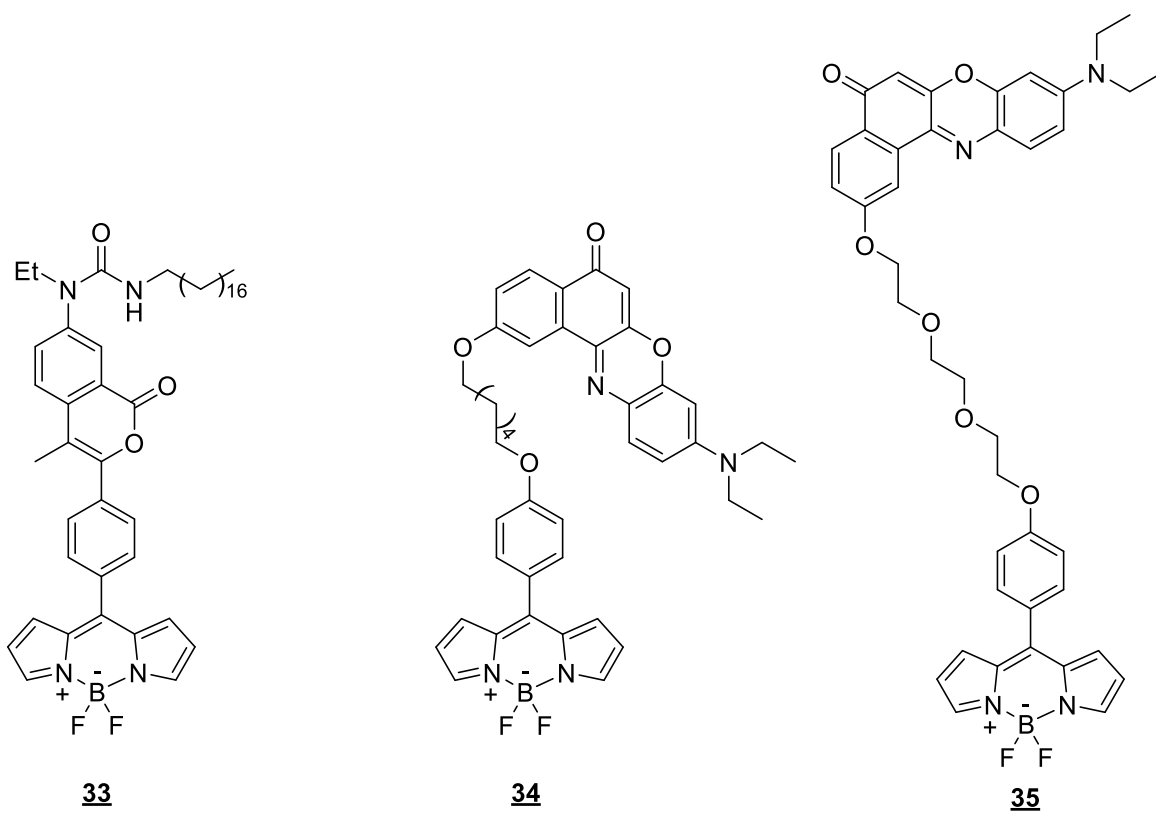
Slika 9. Kemijske strukture komercijalno dostupnih BODIPY derivata za vizualizaciju ER (42).

Kloridni ligandi se također mogu koristiti u strategijama usmjeravanja fluorescentnih boja do ER-a jer se mogu specifično vezati na kloridnu pumpu u ER-u. Sintetiziran je BODIPY derivat **32** koji sadrži klor što olakšava specifičnu lokalizaciju u ER-u (Slika 10) (41).



Slika 10. Kemijska strukture BODIPY derivata **32** za vizualizaciju ER (41).

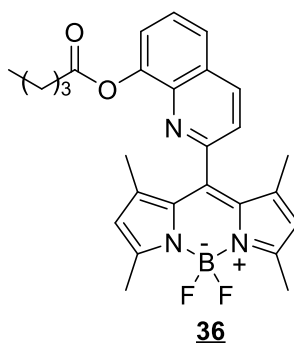
Kim i suradnici sintetizirali su BODIPY derivat **33** s kumarinskim supstituentom koji nosi dugi ugljikovodični lanac (C18) kao vektor koji cilja ER (Slika 11). Rezultirajući spoj se selektivno ugrađuje u ER membranu i može se koristiti kao ratiometrijski senzor za viskoznost lipidne membrane. Spoj **33** korišten je za proučavanje promjena u fluidnosti ER membrane u HeLa stanicama pod uvjetima stresa (3,43). Slično tome, dizajnirane su još dvije fluorescentne ratiometrijske probe **34** i **35** koje ciljaju ER slijedeći istu strategiju lipofilnog lanca (Slika 11). Obje probe vežu se na ER membranu te odgovaraju na promjene u viskoznosti prilikom stresa (44–46).



Slika 11. Kemijske strukture BODIPY derivata koji ciljaju ER membranu (43,45,46).

Dizajnirana je i mala biblioteka od 11 spojeva koji su proučavani kao potencijalne molekule za fluorescentno bojenje ER-a. Svi dobiveni spojevi su

prikazivali specifično ciljanje ER-a, ali samo spoj **36** je odabran kao kandidat za daljnja istraživanja zbog visokog kvantnog prinosa fluorescencije u vodi i niske citotoksičnosti (Slika 12). Rezultati su potvrdili da se spoj **36** visoko kolokalizira s komercijalnim ER-Trackerom, što ga čini potencijalnom fluorescentnom bojom za ER (40).

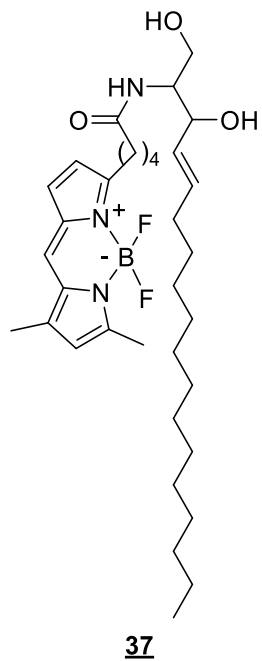


Slika 12. Kemijska struktura BODIPY derivata **36** koji cilja ER (40).

3.2.4. Golgijev aparat

Golgijev aparat je membranska struktura eukariotskih stanica, koja općenito obavlja sekretornu funkciju transportom proteina sintetiziranih u ER-u. U Golgijevom aparatu odvijaju se posttranslacijske modifikacije novosintetiziranih proteina koje kataliziraju različiti Golgijevi enzimi. Ove modifikacije mogu dodati signalne sekvence u sintetizirane proteine koji ih usmjeravaju u druge stanične odjeljke (21).

Sintetiziran je niz analoga ceramida koji su konjugirani na BODIPY te su procijenjeni kao vitalna boja za Golgijev aparat i kao alat za proučavanje prijenosa lipida između Golgijevog aparata i plazma membrane živih stanica (47). Studije su pokazale da maksimumi emisije fluorescencije nekoliko BODIPY-obilježenih ceramida snažno ovise o koncentraciji probe. To je bilo posebno vidljivo korištenjem analoga **37** (Slika 13), koji je pokazao pomak u svom maksimumu emisije od zelene do crvene s povećanjem koncentracija probe. Kada je **37** upotrijebljen za označavanje živih stanica, prethodno navedeno svojstvo je omogućilo razlikovanje membrana koje sadrže visoke koncentracije fluorescentnog lipida od drugih dijelova stanice gdje se nalaze manje koncentracije. Koristeći ovaj pristup, istaknuto crveno fluorescentno označavanje Golgijevog aparata i transportnih vezikula Golgijevog aparata uočeno je u živim stanicama (47).

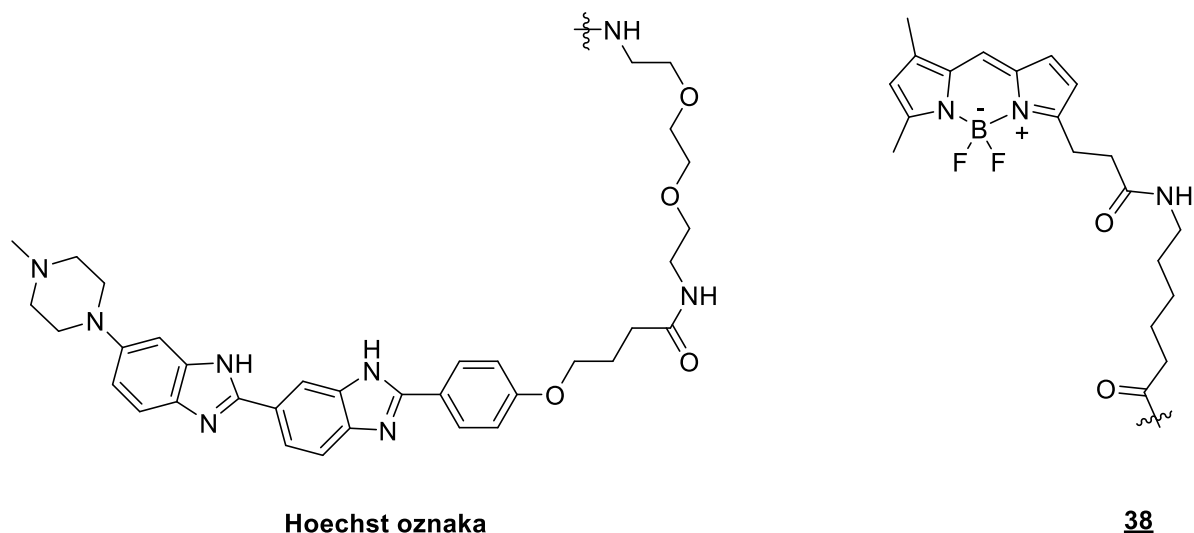


Slika 13. Kemijska struktura BODIPY derivata **37** koji cilja Golgijev aparat (47).

3.2.5. Stanična jezgra

Jezgra je kontrolni centar stanice, a njezine glavne funkcije su održavanje integriteta gena i kontrola aktivnosti stanice reguliranjem ekspresije gena. Molekularna osnova gena je deoksiribonukleinska kiselina (DNK), a transkripcija ribonukleinske kiseline (RNK) je prvi korak ekspresije gena (21).

DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindol) i Hoechst trenutno se koriste za DNA specifično bojenje stanične jezgre; međutim, oni zahtijevaju pobuđivanje u UV području, što može dovesti do oštećenja stanica pod dugotrajnim zračenjem (48). Dokazano je da jednostavne fluorescentne boje poput BODIPY-a mogu biti korisne za selektivno vizualiziranje jezgre njihovim konjugiranjem s Hoechstovim spojem koji veže DNA. Hoechst-označeni fluorofor **38** (Slika 14) ima valne duljine pobuđivanja i emisije u vidljivom dijelu spektra, detektira DNA s fluorescentnim signalima i omogućuje brzo bojenje jezgre u raznim živim stanicama i tkivima (48).



Slika 14. Kemijska struktura Hoechst-označene BODIPY boje za vizualiziranje stanične jezgre (48).

4. Materijali i metode

4.1. Opće napomene

Za identifikaciju sintetiziranih spojeva i određivanje njihove čistoće korištena je nuklearna magnetska rezonancija (NMR), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*), tekućinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom (eng. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS*), te tankoslojna kromatografija (eng. *thin layer chromatography, TLC*).

Spektri NMR (^1H , ^{13}C) snimljeni su na Bruker Avance III HD 600/54 mm Ascend, pri frekvencijama 300 i 600 MHz (^1H) te 75 i 151 MHz (^{13}C) u otapalu CDCl_3 i CD_3OD pri sobnoj temperaturi. Instrument je opremljen 5 mm trokanalskom inverzijom TCI krio-probom Prodigy sa Z-gradijentnom zavojnicom (model CPP1.1 TCI600S3 H&F-C/N-D-05 Z XT) te pripadajućom opremom za hlađenje elektronike probe tekućim dušikom.

Tijek reakcije kao i čistoća produkata određeni su na HPLC uređaju Agilent 1260 Infinity II s DAD detektorom korištenje analitičke kolone Phenomenex LC Column 150 x 4.6 mm, LUNA 3 μm C18(2) 100Å uz protok od 0.8 mL/min i gradientnu metodu: 0 → 20 min sustav B, 20 → 30 min sustav A (A = 100% MeOH, B = MeOH/H₂O = 1/1 + 0.1% trifluoroctena kiselina (TFA)).

LC-MS analize provedene su na Shimadzu LCMS-2020 uređaju koji je opremljen binarnom pumpom, degazerom, autosamplerom, peći za kolonu, te kvadrupolom opremljen ES ionizacijskim izvorom. Kao mobilna faza korišteni su: A: 50% MiliQ + 0,1 % TFA , B: 50 % Metanol (HPLC grade, proizvođač J. T. Baker) uz protok od 0,2 mL/min, volumen injektiranja od 5 μL te TIC metodu (raspon 100-1000 amu, pozitivna i negativna ionizacija, event time 1 s, trajanje snimanja 2 min, scan speed 938 u/sec).

Infracrveni spektri (FTIR-ATR) snimljeni su na Fourier Transform Infrared Attenuated Total Reflection PerkinElmer UATR Two spektrometru u rasponu od 400 do 4000 cm^{-1} .

Tališta novih spojeva određena su na Köflerovu aparatu i nisu korigirana.

Kemikalije dobivene iz komercijalnih izvora korištene su bez daljnjeg pročišćavanja. Korištena su komercijalno dostupna otapala ili ona pročišćena destilacijom. Bezvodni diklormetan (DCM) dobiven je sušenjem iznad MgSO_4 te destilacijom s KOH. Bezvodni *N,N*-dimetilformamid (DMF) dobiven je vakuumskom destilacijom iznad CaH_2 . Bezvodni etanol je kupljen i dodatno sušen po metodi Lund i Bjerrmna s Mg, a tako je sušen i metanol (49). Sva navedena suha otapala dodatno su sušena iznad molekulskih sita (4 Å, osim metanola i etanola, 3 Å). Bezvodni toluen dobiven je stajanjem iznad strugotina natrija, a bezvodni tetrahidrofuran (THF) destilacijom uz natrij te je korišten odmah u sintezi.

Reakcije su praćene korištenjem tankoslojne kromatografije (TLC) te su spojevi vizualizirani pomoću UV svjetla valne duljine 254 i 365 nm.

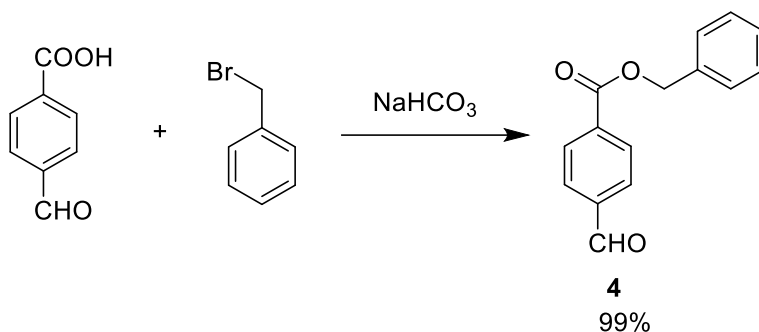
Kromatografija na stupcu provedena je sa silikagelom (Merck 63 – 200 μm) korištenjem odgovarajućih sustava otapala.

Reakcijska iskorištenja odnose se na izolirane, čiste spojeve.

Kemijska nomenklatura generirana je korištenjem ChemDraw Professional 17.0.

4.2. Sinteza spojeva

4.2.1. Priprava benzil-(4-formil)benzoata (4)

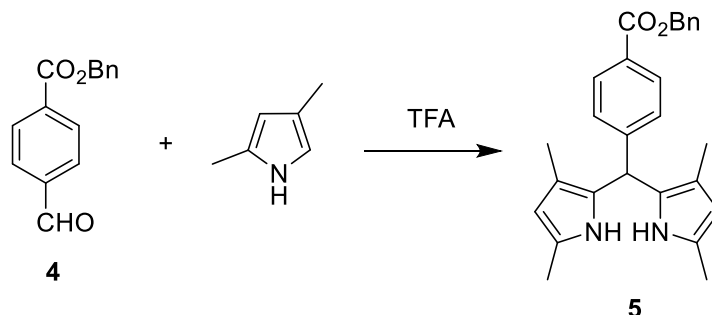


Shema 3. Priprava benzil-(4-formil)benzoata (4).

4-Karboksibenzaldehid (1,0 g, 6,66 mmol) otopljen je u *N,N*-dimetilformamidu (DMF, 50mL) te je dodan benzil-bromid (1,708 g, 9,99 mmol) i natrijev hidrogenkarbonat (0,727 g, 8,658 mmol). Reakcijska smjesa miješana je pri sobnoj temperaturi preko noći. DMF je uklonjen na rotacijskom uparivaču te je u tikvicu dodan etil-acetat (EtOAc, 30 mL) i voda (30 mL). Ekstrakcija je provedena s EtOAc (3 × 30 mL). Sakupljeni organski slojevi oprani su vodenom otopinom NH₄Cl (1 × 20 mL) i zasićenom vodenom otopinom NaCl (1 × 20 mL). Organski ekstrakti su sušeni dodatkom bezvodnog MgSO₄ te je otapalo uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Smjesa je pročišćena na kromatografskoj koloni silikagela uz heksan: EtOAc (2:1) kao eluens. Izolirano je 1,591 g spoja (99 %) u obliku bezbojnog ulja.

¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) / ppm: 10,09 (s, 1H), 8,23 (d, 2H, *J*=8,4 Hz), 7,95 (d, 2H, *J*=8,4 Hz), 7,46 (d, 2H, *J*=7,1 Hz), 7,40 (dd (t), 2H, *J*=7,1 Hz), 7,37 (t, 1H, *J*=7,1 Hz), 5,40 (s, 2H).

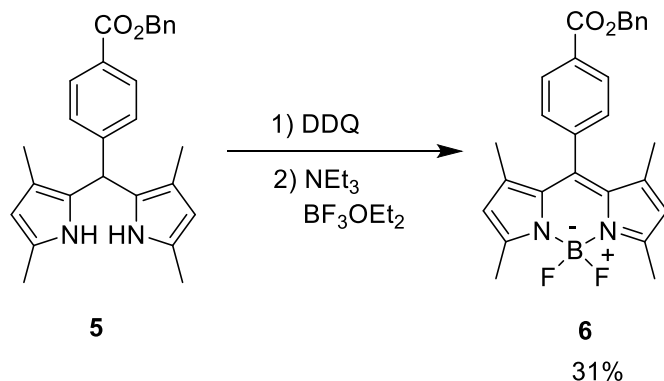
4.2.2. Priprava benzil-4-[bis(3,5-dimetil-1H-pirol-2-il)metil]benzoata (5)



Shema 4. Priprava benzil-4-(bis(3,5-dimetil-1H-pirol-2-il)metil)benzoata (5).

Benzil-(4-formil)benzoat **4** (1,59 g, 6,62 mmol) otopljen je u suhom diklormetanu (DCM, 30 mL) u inertnoj atmosferi pod N_2 . U otopinu je dodan 2,4-dimetilpirol (1,67 g, 0,01 mol) te potom trifluoroctena kiselina (TFA, 125 μL , 1,63 mmol). Reakcijska smjesa miješana je pri sobnoj temperaturi 4 sata. U reakcijsku smjesu dodana je vodena otopina NaOH (1 M, 30 mL) čime je reakcija zaustavljena. Vodeni sloj ekstrahiran je s DCM (3 \times 30 mL) i s EtOAc (1 \times 30 mL). Organski ekstrakti sušeni su dodatkom bezvodnog MgSO_4 nakon čega je otapalo uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Smjesa je pročišćena na kromatografskoj koloni silikagela uz DCM te 20% EtOAc-DCM kao eluens. Izolirano je 2,34 g smjese u obliku narančaste krutine s kojom se išlo dalje u reakciju bez dodatnog pročišćavanja.

4.2.3. Priprava benzil-4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametil-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipirolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-il) benzoata (6)



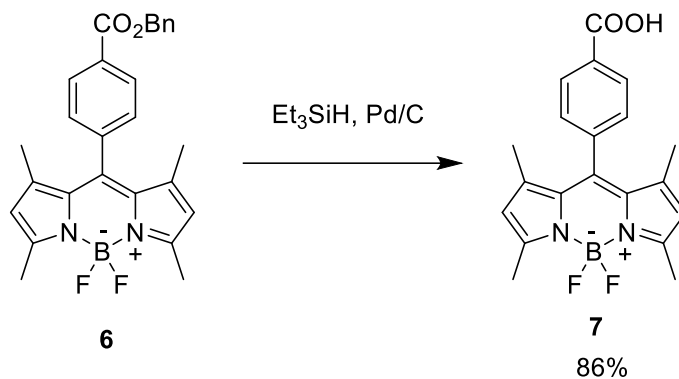
Shema 5. Priprava benzil-4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametil-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipirolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-il)benzoata (**6**).

Spoj **5** (500 mg, 1,21 mmol) i 2,3-diklor-5,6-dicijano-1,4-benzokinon (DDQ, 311 mg, 1,38 mmol) suspendirani su u suhom DCM-u (20 mL). Suspenzija je miješana pri sobnoj temperaturi 4 sata, u inertnoj atmosferi pod N₂. U reakcijsku smjesu dodan je borov trifluorid dietil-eterat (BF₃·OEt₂, 0,7 mL, 6,05 mmol), a zatim trietilamin (TEA, 0,8 mL, 6,05 mmol) te je reakcijska smjesa miješana preko noći. U reakcijsku smjesu dodana je vodena otopina NaOH (1 M, 30 mL) čime je reakcija zaustavljena. Vodeni sloj ekstrahiran je s DCM (3 × 30 mL) i s EtOAc (1 × 30 mL). Organski ekstrakti su sušeni dodatkom bezvodnog MgSO₄ te je otapalo uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Smjesa je pročišćena na kromatografskoj koloni silikagela uz DCM kao eluens. Izolirano je 170 mg spoja (31 %) u obliku narančaste krutine.

¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) / ppm: 8,21 (d, 2H, *J*=8,4 Hz), 7,49 (d, 2H, *J*=7,3 Hz), 7,36-7,46 (m, 5H), 5,99 (s, 2H), 5,41 (s, 2H), 2,56 (s, 6H), 1,36 (s, 6H).

¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) / ppm: 165,9 (s), 156,1 (s), 143,0 (s), 140,3 (s), 140,0 (s), 135,8 (s), 131,0 (s), 130,9 (s), 130,6 (d), 129,8 (d), 128,8 (d), 128,6 (d), 128,5 (d), 121,6 (d), 67,3 (t), 14,7 (q), 14,6 (q).

4.2.4. Priprava 4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametil-5H-4λ4,5λ4-dipirolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-il)benzojeve kiseline (7)



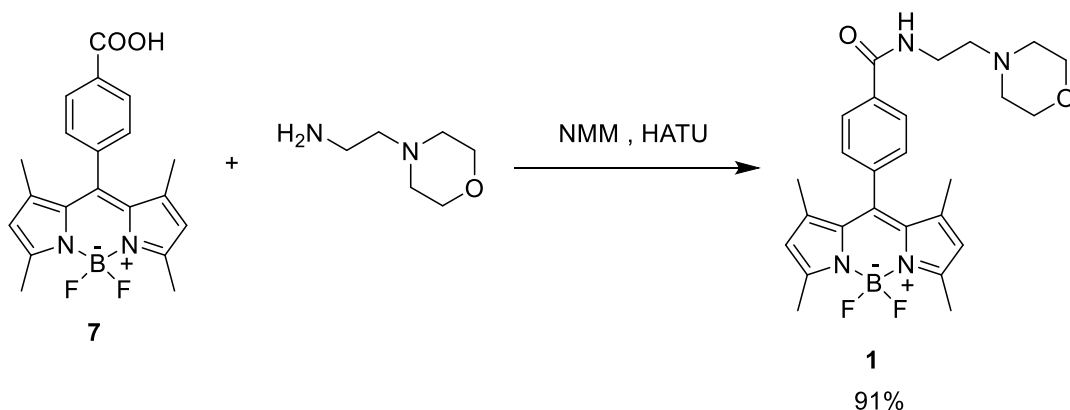
Shema 6. Priprava 4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametil-5H-4λ4,5λ4-dipirolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-il)benzojeve kiseline (**7**).

Spoj **6** (626 mg, 1,36 mmol) otopljen je u suhom etanolu (EtOH, 70mL), u inertnoj atmosferi pod N₂. U otopinu je dodan Pd/C (5%, 604 mg, 0,27 mmol Pd) i trietilsilan (Et₃SiH, 1,58 g, 13,6 mmol) te je reakcijska smjesa miješana pri sobnoj temperaturi preko noći. Reakcijska smjesa je zatim profiltrirana preko sinter lijevka i celita te je talog ispran s EtOH (3 × 30 mL) i EtOAc (3 × 30 mL). Otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču te je ostatak pročišćen na kromatografskoj koloni silikagela uz 10% MeOH:EtOAc kao eluens. Izolirano je 430 mg spoja (86 %) u obliku tamno roze krutine.

¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) / ppm: 8,24 (d, 2H, *J*=8,2 Hz), 7,51 (d, 2H, *J*=8,2 Hz), 6,11 (s, 2H), 2,52 (s, 6H), 1,44 (s, 6H).

¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz) / ppm: 169,1 (s), 157,1 (s), 145,4 (s), 142,3(s), 140,9 (s), 133,0 (s), 131,7 (d), 129,8 (d), 122,5 (d), 14,7 (q), 14,6 (q).

4.2.5. Priprava 4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametil-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipirolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-il)-N-(2-morfolinoetil)benzamida (**1**)



Shema 7. Priprava 4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametil-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipirolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-il)-N-(2-morfolinoetil)benzamida (**1**).

Spoj **7** (50 mg, 0,135 mmol) otopljen je u DMF-u (1 mL), zatim je dodan 4-metilmorfolin (NMM, 14 mg, 0,148 mmol) i 1-[Bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridin-3-oksidi heksafluorofosfat (HATU, 56 mg, 0,148 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 15 minuta te je dodan 4-(2-aminoetil) morfolin (20 mg, 0,148 mmol). Reakcijska smjesa miješana je pri sobnoj temperaturi preko noći. DMF je uklonjen na rotacijskom uparivaču te je u tikvicu dodan EtOAc (30 mL) i voda (30 mL). Provedena je ekstrakcija s EtOAc (3 \times 30 mL), organski ekstrakti su sušeni dodatkom bezvodnog NaSO₄ te je nakon filtracije otapalo uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Smjesa je pročišćena na kromatografskoj koloni silikagela uz DCM:MeOH:TEA (30:2:1) kao eluens. Izolirano je 61 mg spoja **1** (91 %) u obliku narančaste krutine.

$T_t = 175-180$ °C.

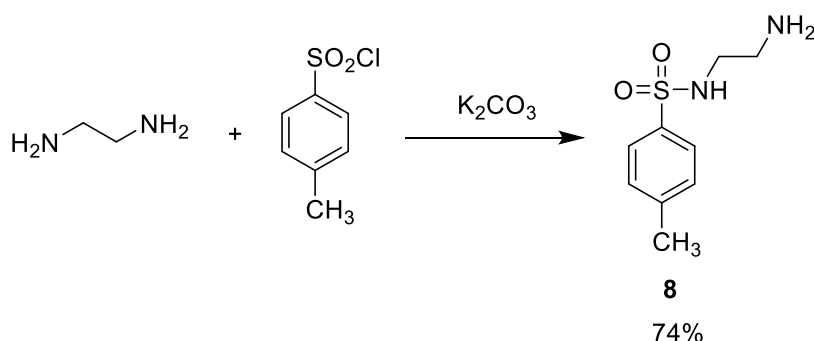
¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) / ppm: 7,93 (d, 2H, $J=8,2$ Hz), 7,39 (d, 2H, $J=8,2$ Hz), 6,90 (t, 1H, $J=4,8$ Hz, NH), 5,98 (s, 2H), 3,75 (dd (t), 4H, $J=4,5$

Hz), 3,60 (dd, 2H, $J=5,7$ Hz, $J=11,1$ Hz), 2,65 (t, 2H, $J=6,0$ Hz), 2,55 (s, 6H), 2,55-2,51 (m, 4H), 1,36 (s, 6H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) / ppm: 166,4 (s), 156,1 (s), 143,0 (s), 140,4 (s), 138,5 (s), 135,0 (s), 131,2 (s), 128,7 (d), 127,9 (d), 121,6 (d), 67,2 (t), 56,9 (t), 53,5 (t), 36,3 (t), 14,7 (q), 9,0 (q).

LC-MS : $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) nađeno: 481,2500; izračunato: 481,2588 i ($[\text{M}-\text{H}]^+$) nađeno: 479,0500; izračunato: 479,2428.

4.2.6. Priprava *N*-(2-aminoetil)-4-metilbenzensulfonamida (**8**)



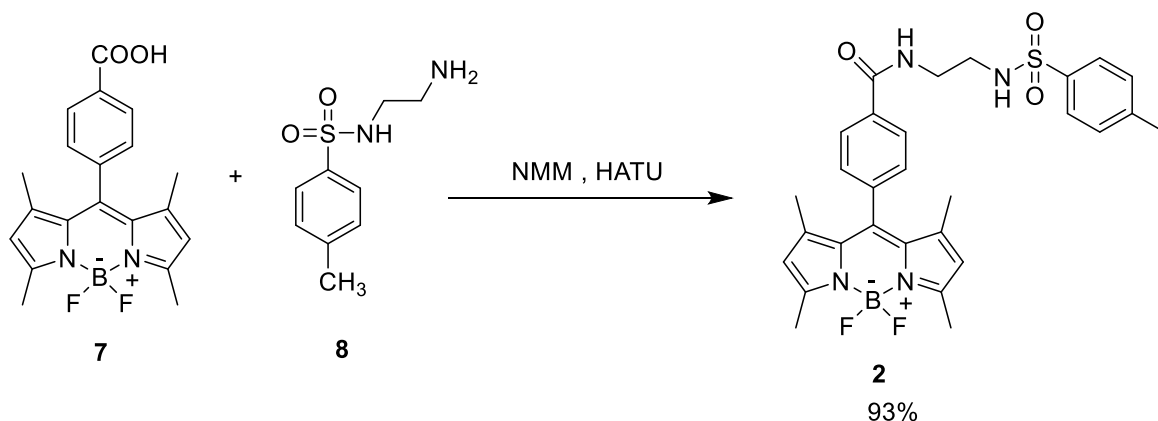
Shema 8. Priprava *N*-(2-aminoetil)-4-metilbenzensulfonamida (**8**).

Etilendiamin (1,00 g, 0,01 mol) i kalijev karbonat (1,38 g, 0,01 mol) suspendirani su u suhom DCM-u (30 mL), u inertnoj atmosferi pod N_2 . U reakcijsku smjesu zatim je lijevkom za dokapavanje polako dodan 4-metilbenzensulfonil klorid (1,91 g, 0,01 mol) otopljen u suhom DCM-u (20 mL). Reakcijska smjesa miješana je pri sobnoj temperaturi preko noći. Reakcijska smjesa je zatim profiltrirana preko sinter lijevka i celita te je talog ispran s DCM-om (3×30 mL). Otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču te je dobiveno 1,595 g spoja **8** (74 %) u obliku bijele krutine.

¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) / ppm: 7,73 (d, 2H, *J*= 8,2 Hz), 7,38 (d, 2H, *J*= 8,2 Hz), 2,88 (t, 2H, *J*= 6,1 Hz), 2,65 (t, 2H, *J*= 6,1 Hz), 2,42 (s, 3H).

¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz) / ppm: 144,7 (s), 138,8 (s), 130,8 (d), 128,0 (d), 46,4 (t), 42,2 (t), 21,4 (q).

4.2.7. Priprava 4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametil-5H-4λ⁴,5λ⁴-dipirolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-il)-*N*-(2-((4-metilfenil)sulfonamido)etil)benzamida (**2**)



Shema 9. Priprava 4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametil-5H-4λ⁴,5λ⁴-dipirolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-il)-*N*-(2-((4-metilfenil)sulfonamido)etil)benzamida (**2**).

Spoj **7** (91 mg, 0,25 mmol) otopljen je u DMF-u (1,5 mL), zatim je dodan NMM (27 mg, 0,27 mmol) i HATU (107 mg, 0,27 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 15 minuta te je nakon toga postepeno kroz 20 minuta dodavan *N*-(2-aminoetil)-4-metilbenzensulfonamid **8** (60 mg, 0,27 mmol). Reakcijska smjesa miješana je pri sobnoj temperaturi dva dana. DMF je uklonjen na rotacijskom uparivaču te je u tikvicu dodan EtOAc (20 mL) i voda (20 mL). Ekstrakcija je provedena s EtOAc (3 × 30 mL), organski ekstrakti su sušeni dodatkom bezvodnog MgSO₄ te je nakon filtracije otapalo uklonjeno na

rotacijskom uparivaču. Smjesa je pročišćena na kromatografskoj koloni silikagela uz EtOAc kao eluens. Izolirano je 129 mg spoja **2** (93 %) u obliku narančaste krutine.

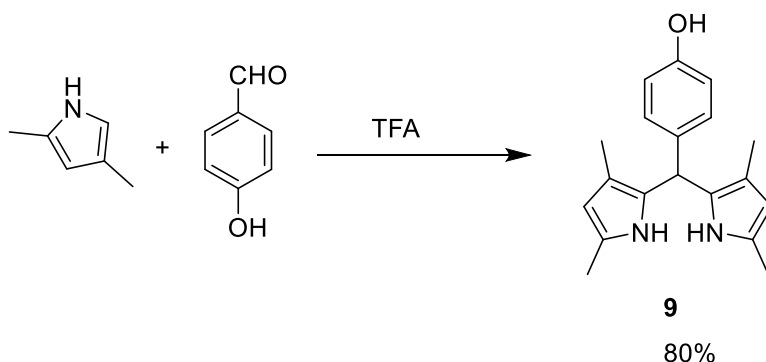
$T_t = 228-232$ °C.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) / ppm: 7,96 (d, 2H, $J=8,2$ Hz), 7,76 (d, 2H, $J=8,2$ Hz), 7,36 (d, 2H, $J=8,1$ Hz), 7,30 (d, 2H, $J=8,1$ Hz), 7,12 (t, 1H, $J=4,7$ Hz), 5,98 (s, 2H), 5,37 (s, 1H), 3,62 (dd, 2H, $J=5,2$ Hz, $J=11,0$ Hz), 3,22 (dd, 2H, $J=6,1$ Hz, $J=11,0$ Hz), 2,55 (s, 6H), 2,42 (s, 3H), 1,34 (s, 6H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) / ppm: 167,4 (s), 156,1 (s), 144,1 (s), 143,1 (s), 140,4 (s), 138,7 (s), 136,6 (s), 134,5 (s), 131,2 (s), 130,1 (d), 128,6 (d), 128,1 (d), 127,2 (d), 121,6 (d), 43,0 (t), 40,4 (t), 21,7 (q), 14,7 (q).

LC-MS : $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) nađeno: 565,2500; izračunato: 565,2228 i ($[\text{M}-\text{H}]^+$) nađeno: 563,0000; izračunato: 563,2068.

4.2.8. Priprava 4-[bis(3,5-dimetil-1H-pirol-2-il)metil]fenola (**9**)



Shema 10. Priprava 4-(bis(3,5-dimetil-1H-pirol-2-il)metil)fenola (**9**).

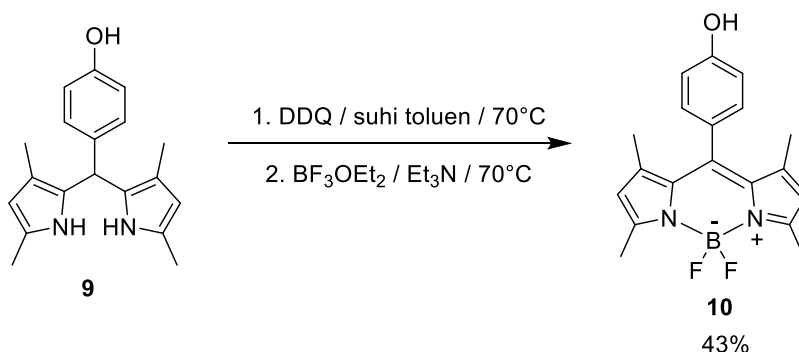
4-Hidroksibenzaldehid (1,02 g, 8,5 mmol) otopljen je u suhom DCM-u (40 mL), u inertnoj atmosferi pod N_2 . U otopinu je dodan 2,4-dimetilpirol (1,84 g, 17,00 mmol), te potom TFA (85 μL , 1,11 mmol). Reakcijska smjesa miješana je pri sobnoj temperaturi 2 sata. U reakcijsku smjesu dodana je vodena

otopina NaOH (1 M, 30 mL) čime je reakcija zaustavljena. Smjesa je ekstrahirana s EtOAc (3 × 30 mL). Vodeni sloj je neutraliziran dodatkom 1M HCl i ekstrahiran ponovo pomoću EtOAc (3 × 30 mL). Organski ekstrakti sušeni su dodatkom bezvodnog NaSO₄, profiltrirani te je otapalo uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Ostatak je pročišćen na kromatografskoj koloni silikagela uz DCM te 20%EtOAc/DCM. Izolirano je 2 g spoja **9** (80 %) u obliku narančaste krutine.

¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) / ppm: 6,86 (d, 2H, *J*=8,5 Hz), 6,67 (d, 2H, *J*=8,5 Hz), 5,53 (s, 2H), 5,32 (s, 1H), 2,11 (s, 6H), 1,84 (s, 6H).

¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz) / ppm: 156,6 (s), 135,6 (s), 130,3 (d), 128,4 (s), 126,4 (s), 115,8 (d), 115,1 (s), 108,1 (d), 39,9 (d), 12,8 (q), 11,2 (q).

4.2.9. Priprava 4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametil-5H-4λ⁴,5λ⁴-dipirolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-il)fenola (**10**)



Shema 11. Priprava 4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametil-5H-4λ⁴,5λ⁴-dipirolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-il)fenola (**10**).

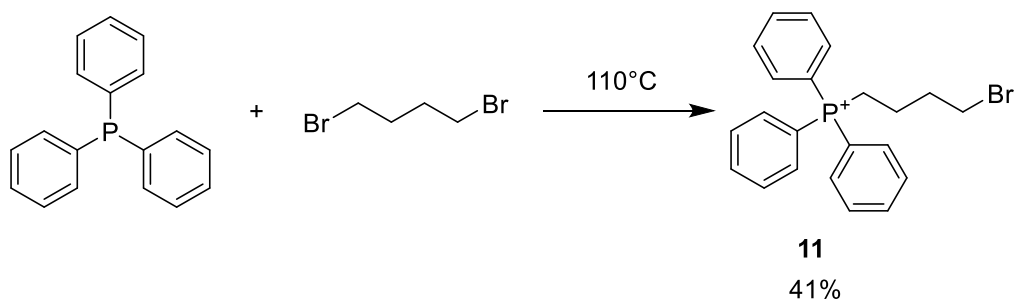
Spoj **9** (2,0 g, 6,79 mmol) i DDQ (1,69 g, 7,47 mmol) suspendirani su u suhom toluenu (135 mL). Suspenzija je zagrijavana na 70 °C 3 sata, u inertnoj atmosferi pod N₂. U ohlađenu reakcijsku smjesu dodan je TEA (7 mL, 0,068 mol) i BF₃·OEt₂ (8,6 mL, 0,034 mol). Reakcijska smjesa zagrijavana je na

70°C preko noći. Reakcijska smjesa je ohlađena te je dodana vodena otopina NaOH (1M, 30mL) i slojevi su odvojeni. Vodeni sloj ekstrahiran je s EtOAc (3 × 30 mL) te je nakon toga zakiseljen do pH 5-6 dodatkom HCl (1M) i ekstrahiran ponovo s EtOAc (3 × 30 mL). Organski ekstrakti sušeni su dodatkom bezvodnog MgSO₄ i profiltrirani nakon čega je otapalo uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Smjesa je pročišćena na kromatografskoj koloni silikagela uz DCM te 20% EtOAc/DCM kao eluens. Izolirano je 978 mg spoja **10** (43 %) u obliku narančaste krutine.

¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) / ppm: 7,13 (d, 2H, *J*=8,5 Hz), 6,94 (d, 2H, *J*=8,5 Hz), 5,98 (s, 2H), 2,55 (s, 6H), 1,44 (s, 6H).

¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) / ppm: 156,4 (s), 155,5 (s), 143,3 (s), 141,8 (s), 132,0 (s), 129,6 (d), 127,4 (s), 121,3 (d), 116,3 (d), 14,7 (q).

4.2.10. Priprava (4-bromobutil)trifenilfosfonijeve soli (**11**)



Shema 12. Priprava (4-bromobutil)trifenilfosfonijeve soli (**11**).

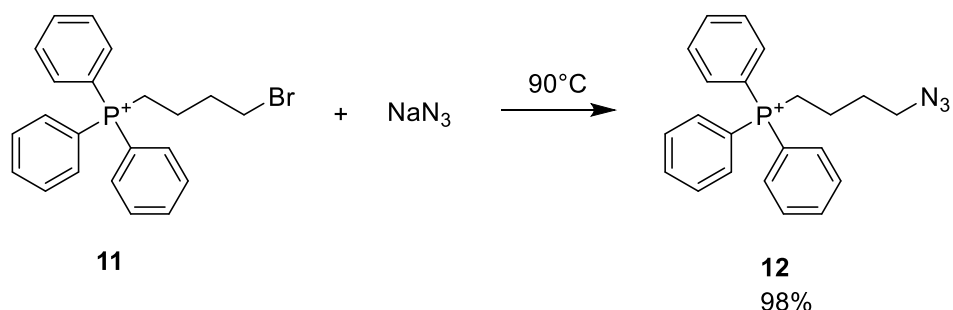
Triphenilfosfin (6,3 g, 0,024 mol) otopljen je u toluenu (160 mL) te je dodan 1,4-dibrombutan (5,0 g, 0,023 mol). Reakcijska smjesa zagrijava se uz miješanje na 110 °C preko noći. Nakon toga reakcijska smjesa je ohlađena do sobne temperature. Precipitat je profiltriran pomoću sinter lijevka i ispiran s

heksanom (2 ×10 mL). Produkt je prebačen u tikvicu i sušen u vakuumskom eksikatoru. Dobiveno je 3,76 g željenog spoja **11** (41 %) u obliku bijele krutine.

¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) / ppm: 7,93 (dt, 3H, *J*=1,8 Hz, *J*=7,4 Hz), 7,80-7,85 (m, 6H), 7,72-7,79 (m, 6H), 3,52 (t, 2H, *J*=6,3 Hz), 3,44-3,50 (m, 2H), 2,09 (dd, 2H, *J*=6,7 Hz, *J*=13,2 Hz), 1,81-1,88 (m, 2H).

¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz) / ppm: 136,3 (dd, ⁴*J*_{PC}=3,1 Hz), 134,8 (dd, ³*J*_{PC}=9,9 Hz), 131,6 (dd, ²*J*_{PC}=12,8 Hz), 119,7 (d, ¹*J*_{PC}=86,2 Hz), 34,1 (dt, ²*J*_{PC}=16,9 Hz), 33,0 (t), 22,0 (dt, ³*J*_{PC}=3,5 Hz), 21,9 (dt, ¹*J*_{PC}=52,1 Hz).

4.2.11. Priprava (4-azidobutil)trifenilfosfonijeve soli (**12**)



Shema 13. Priprava (4-azidobutil)trifenilfosfonijeve soli (**12**).

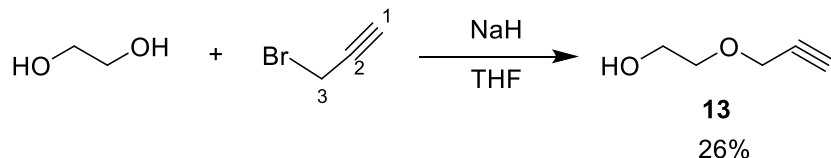
(4-Brombutil)trifenilfosfonijeva sol **11** (2,00 g, 5,02 mmol) i natrijev azid (NaN₃, 0,65 g, 0,01 mol) otopljeni su u suhom DMF-u (10 mL), u inertnoj atmosferi pod N₂. Reakcijska smjesa miješana je pri 90°C preko noći. DMF je uklonjen na rotacijskom uparivaču te je u tikvicu dodan DCM (30 mL) i voda (30 mL). Vodeni sloj ekstrahiran je s DCM (3 × 30 mL). Organski ekstrakti su sušeni dodatkom bezvodnog MgSO₄, profiltrirani, te je otapalo uklonjeno na rotacijskom uparivaču. U ostatak dodan je DCM (2 mL) kako bi se potpuno

otopio, a zatim je dodan EtOAc (10 mL) te je otopina ostavljena na hladnom kako bi kristalizirao produkt. Dekantiranjem je odvojena otopina od kristaliziranog produkta te je on osušen na rotacijskom uparivaču. Dobiveno je 1,77 g spoja **12** (98 %) u obliku bijele krutine.

¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) / ppm: 7,90 (dt, 3H, *J* = 1,3 Hz, *J* = 8,5 Hz), 7,79-7,84 (m, 6H), 7,74-7,78 (m, 6H), 3,43-4,49 (m, 2H), 3,30 (t, 2H, *J* = 6,2 Hz), 1,82 (dd, 2H, *J* = 6,6 Hz, *J* = 13,3 Hz), 1,71-1,79 (m, 2H).

¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz) / ppm: 136,4 (dd, ⁴*J*_{PC} = 2,7 Hz), 134,8 (dd, ³*J*_{PC} = 10,0 Hz), 131,5 (dd, ²*J*_{PC} = 12,3 Hz), 119,8 (ds, ¹*J*_{PC} = 86,6 Hz), 51,3 (t), 30,5 (dt, ²*J*_{PC} = 16,5 Hz), 22,2 (dt, ¹*J*_{PC} = 51,2 Hz), 20,8 (dt, ³*J*_{PC} = 3,6 Hz).

4.2.12. Priprava 2-(prop-2-in-1-iloksi)etan-1-ola (**13**)



Shema 14. Priprava 2-(prop-2-in-1-iloksi)etan-1-ola (**13**).

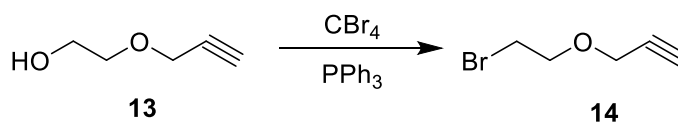
Natrijev hidrid (1,7 g, 0,035 mol, 50%) suspendiran je u suhom tetrahidrofuranu (THF, 100 mL) u inertnoj atmosferi pod N₂. Prvo je dodan etan-1,2-diol (2 g, 0,032 mol), a zatim 3-bromoprop-1-in (3,8 g, 0,032 mol) koji je polako dokapavan kroz 1 sat uz hlađenje pomoću ledene kupelji. Reakcijska smjesa miješana je i zagrijavana potom na temperaturi refluksa preko noći. U reakcijsku smjesu dodana je voda (50 mL) i slojevi su odvojeni. Vodeni sloj ekstrahiran je s dietil-eterom (3 × 30 mL). Organski ekstrakti sušeni su dodatkom bezvodnog NaSO₄ i profiltrirani nakon čega je otapalo

uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Smjesa je pročišćena na kromatografskoj koloni silikagela uz heksan:dietil-eter (1:1) te dietil-eter kao eluens. Dobiveno je 840 mg spoja **13** (26 %) u obliku bezbojnog ulja.

¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) / ppm: 4,21 (d, 2H, *J*=2,4 Hz), 3,78 (t, 2H, *J*=4,5 Hz), 3,66 (t, 2H, *J*=4,5 Hz), 2,46 (t, 1H, *J*=2,4 Hz), 1,94 (s, 1H).

¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) / ppm: 79,6 (s), 74,9 (d), 71,3 (t), 61,9 (t), 58,6 (t).

4.2.13. Priprava 3-(2-bromoetoksi)prop-1-ina (**14**)



Shema 15. Priprava 3-(2-bromoetoksi)prop-1-ina (**14**).

Spoj **13** (50 mg, 0,49 mmol) otopljen je u acetonitrilu (ACN, 2mL) te je dodan CBr₄ (428 mg, 1,29 mmol). Reakcijska smjesa miješana je u ledenoj kupelji 15 minuta, zatim je postepeno dokapavan trifenilfosfin (346 mg, 1,32 mmol) otopljen u DCM-u (1 mL). Reakcijska smjesa miješana je uz hlađenje pomoću ledene kupelji 2 sata. U reakcijsku smjesu dodan je NaHCO₃ (20 mL) te je smjesa ekstrahirana dietil-eterom (3 × 20 mL). Organski ekstrakti sušeni su dodatkom bezvodnog NaSO₄, profiltrirani te je otapalo uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Dobivena smjesa ispirana je heksanom (3 × 20 mL) nakon čega je dobivena otopina profiltrirana preko filter papira te je otapalo uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Dobiveno je 180 mg smjese u obliku

bezbojnog ulja u kojoj se nalazi željeni spoj. Smjesa nije dodatno pročišćavana.

^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) / ppm: 4,23 (d, 2H, $J=2,4$ Hz), 3,87 (t, 2H, $J=6,2$ Hz), 3,49 (t, 2H, $J=6,2$ Hz), 2,46 (t, 1H, $J=2,4$ Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) / ppm: 79,3 (s), 75,2 (d), 69,8 (t), 58,4 (t), 30,1 (t).

4.3. Analiza fotofizičkih svojstva

UV-Vis mjerenja provedena su na instrumentu PG T80/T80+ za otopine dobivenih BODIPY spojeva u acetonitrilu (CH_3CN) pri 25 °C. Spektri su snimani za otopine spojeva različitih koncentracija u CH_3CN te su izračunati molarni apsorpcijski koeficijenti pomoću formule **(F1)**. Za spojeve **1** i **2** snimljeni su spektri u rasponu 200 – 600 nm.

$$A = \varepsilon c l \quad \text{(F1)}$$

A – apsorbancija,

ε – molarni apsorpcijski koeficijent,

c – koncentracija

l – duljina puta

Fluorescencijski spektri izmjereni su spektrofluorometrom Edinburgh FS5 u različitim otapalima na sobnoj temperaturi (25 °C) u kvarcnim kivetama dimenzija 30 × 10 mm. Za mjerenja fluorescencije, apsorbancija otopina na valnoj duljini pobuđivanja bila je <0,1, a prije mjerenja otopine su propuhivane s Ar 20 minuta. Snimljeni su emisijski i ekscitacijski spektri otopina spojeva te su određeni kvantni prinosi fluorescencije pomoću formule **(F2)**. Mjerenja su provedena korištenjem pukotine na monokromatoru koja odgovara propusnosti vrpce od 1 nm za ekscitaciju i emisiju. Fluorescencijska mjerenja spojeva **1** i **2** provedena su u CH_3CN , $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:10) te DCM-u. Emisijski fluorescencijski spektri snimljeni su u rasponu od 485 - 700 nm u intervalima od 0,5 nm uz pobuđivanje na 460, 470 i 480 nm. Ekscitacijski fluorescencijski spektri snimani su uz detekciju emisije na 520 i 540 nm, a ekscitacijski spektar sniman je u rasponu 260 - 530 nm. Kvantni prinosi fluorescencije određeni su uz korištenje Rodamina B u metanolu ($\Phi_R = 0,66$)(50) kao referentnog spoja. Određena su tri kvantna prinosa uz pobuđivanje na tri valne duljine te je izračunata srednja vrijednost.

$$\Phi_f = \Phi_R \cdot \frac{I}{I_R} \cdot \frac{A}{A_R} \cdot \left(\frac{n_D}{n_D^R} \right)^2 \quad (\mathbf{F2})$$

Φ_f – kvantni prinos fluorescencije

Φ_R – kvantni prinos fluorescencije referentnog spoja

I – intenzitet fluorescencije otopine analiziranog spoja (integral emisijskog spektra)

I_R – intenzitet fluorescencije otopine referentnog spoja (integral emisijskog spectra)

A_R – apsorbancija otopine referentnog spoja na valnoj duljini pobude

A – apsorbancija otopine analiziranog spoja pri valnoj duljini pobude

n_D – indeks loma otapala (CH₃CN, H₂O, DCM)

n_D^R – indeks loma otapala u kojem je otopljen standard (CH₃OH)

Mjerenje opadanja intenziteta fluorescencije provedeno je tehnikom vremenski koreliranog brojanja pojedinačnih fotona (*engl. time-correlated single photon counting, TC-SPC*) pomoću spektrofluorometra Edinburgh FS5. Za pobuđivanje je korišten pulsni laser $\lambda = 445$ nm, a trajanje pulsa bilo je 20 ps. Mjerenje je provedeno na 1023 kanala s vremenskim rasponom od ≈ 20 ps po kanalu. Mjerenja su provođena do detekcije 3000 fotona u maksimumu pri valnoj duljini 520 nm. Funkcija odgovora instrumenta (*engl. instrument response function, IRF*) dobivena je uporabom suspenzije silikagela u H₂O. Parametri utočnjavanja (vrijeme života, τ i pred-eksponencijalni faktori, a) određeni su minimiziranjem reducirane vrijednosti χ^2 te grafičkom metodom. Opadanja intenziteta fluorescencije opisana su prema izrazu sume eksponenata **(F3)**.

$$F(t) = A + \alpha_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + \alpha_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}} + \alpha_3 e^{-\frac{t}{\tau_3}} + \dots \quad (\mathbf{F3})$$

t – vrijeme nakon laserskog pulsa

τ – vrijeme života pobuđenog stanja

4.4. Eksperimenti u staničnoj kulturi

4.4.1. Kultura stanica

Stanice ljudskih fibroblasta (HFF) uzgajane su u Dulbeccovom modificiranom Eagleovom mediju (DMEM) (Pan Biotech, Njemačka) s visokim udjelom glukoze (4.5 g/L), obogaćen s 10 % fetalnog goveđeg seruma (Pan Biotech, Njemačka), 1 % L-glutamina (Pan Biotech, Njemačka) i 1 % otopine antibiotika Penicilin/Streptomycin (Pan Biotech, Njemačka). Stanice su održavane u vlažnoj atmosferi na 37 °C i 5 % CO₂ te su pasažirane po postizanju 80 % konfluentnosti.

4.4.2. Bojenje stanica

Za eksperimente vizualizacije sintetiziranih BODIPY spojeva u stanicama putem fluorescencijskog mikroskopa, HFF stanice su nasađene u koncentraciji 50 000 stanica/jažici (gustoća stanica je 50 000 stanica/mL) na pločici s 12 jažica u koje je prethodno stavljeno pokrovno stakalce. Nakon nasađivanja, stanice su inkubirane preko noći kako bi se adherirale na pokrovno stakalce. Drugi dan, stanice se tretiraju sintetiziranim BODIPY-derivatima u različitim koncentracijama (Er-BODIPY u koncentracijama 1 μM i 5 μM, te Lyso-BODIPY u koncentracijama 5 μM i 10 μM). Nakon dodatka BODIPY derivata, stanice su inkubirane 30 min na 37 °C. Nakon inkubacije, stanicama su dodani komercijalni markeri organela u koncentracijama 0,5 μM (ER-tracker) za endoplazmatski retikulum u stanicama tretiranima s ER-BODIPY, i 0,1 μM (Lysotracker) za lizosome u stanicama tretiranima sa Lyso-BODIPY. Stanice su nakon dodatka markera inkubirane dodatnih 30 min na 37 °C. Kontrola predstavlja stanice koje su tretirane samo komercijalnim markerom, bez prethodnog tretmana BODIPY derivatima. Nakon bojenja, stanice su isprane

tri puta s 1X PBS i fiksirane sa 4% otopinom paraformaldehida 8 minuta na 4 °C. Fiksativ za stanice je uklonjen, stanice su isprane tri puta sa 1X PBS te je dodano 300 µL otopine DAPI u svaku jažicu uz inkubaciju od 3 min na sobnoj temperaturi. Boja je uklonjena, stanice su ponovo ispirane tri puta s 1X PBS i dva puta s mili-Q vodom. Pokrovno stakalce na kojem su stanice fiksirano je na predmetnom stakalcu koristeći sredstvo za fiksaciju (*engl. Fluoroshield®*, *histology mounting media*, Sigma Aldrich, USA).

4.4.3. Fluorescencijska mikroskopija

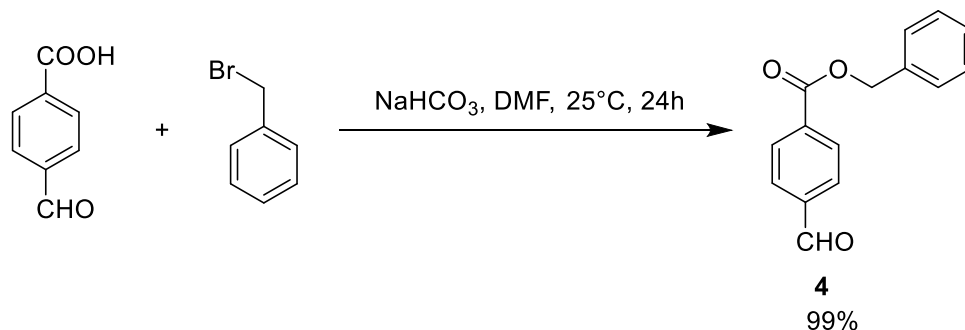
Slike pripremljenih stakalaca su snimljene Olympus IX83 fluorescentnim mikroskopom opremljenim Hamamatsu Orca R2 kamerom. Valne duljine fluorescencija za plavi kanal je $\lambda_{\text{ex}} = 360\text{-}370$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 420\text{-}460$ nm, zeleni $\lambda_{\text{ex}} = 460\text{-}495$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 510$ nm i crveni $\lambda_{\text{ex}} = 530\text{-}550$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 575$ nm. Sve su slike snimljene pri 20x ili 60x povećanju, uz korištenje imerzijskog ulja kod 60x povećanja. Slike su dobivene i obrađene te je izračunat Pearsonov korelacijski koeficijent pomoću korespondirajućeg softvera *CellSense*. Slike snimljene na mikroskopu dodatno su obrađene u programu *Image J*.

5. Rezultati i rasprava

5.1. Sinteza spojeva

Strategija sinteze fluorescentnih indikatora **1** i **2** temelji se na pripravi BODIPY kiseline koja je pripravom amidne veze prevedena u BODIPY-morfolinski i BODIPY-sulfonski derivate. Nadalje, strategija sinteze spoja **3** temeljila se na pripravi BODIPY fenolnog derivata koji je trebao biti preveden u alkin te koristeći klik-kemiju u konačnici spojen s fosfonijevom soli.

Početni korak u pripremi BODIPY spoja **6** je stavljanje benzilne zaštite na 4-karboksibenzaldehidu. Provedena je S_N2 nukleofilna supstitucija na benzilnom bromidu s karboksilatnom kao nukleofilom (Shema 16). Karboksilatni ion je slab nukleofil, dok je ugljikov atom supstituiran s bromom elektrofil. Kao produkt ove reakcije nastaje željeni ester **4** u izvrsnom iskorištenju, te NaBr i H_2CO_3 kao nusprodukti.



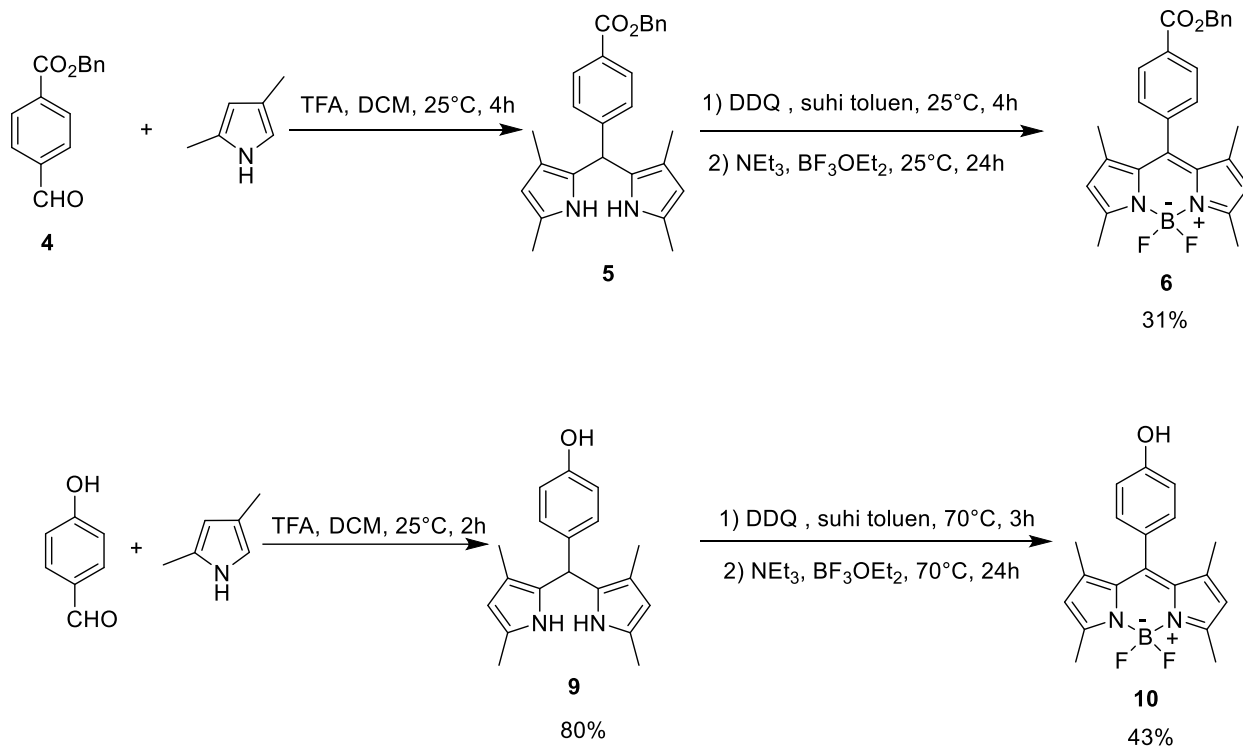
Shema 16. Sinteza spoja **4**.

Produkt **4** okarakteriziran je spektroskopijom 1H NMR. U spektru 1H NMR spoja **4** vidljivi su karakteristični jako odsjenjeni singlet aldehydnog protona na δ 10,09 ppm, te dva dubleta s karakterističnom spregom di-supstituirane fenilne jezgre. Ulazak benzilne skupine razvidan je po karakterističnom singletu CH_2 skupine na δ 5,40 ppm, 3 signala fenilne skupine, jednog dubleta

intenziteta 2H na δ 7,46 ppm, jednog dublet dubleta intenziteta 2H na 7,40 ppm te tripleta intenziteta 1H na 7,37 ppm.

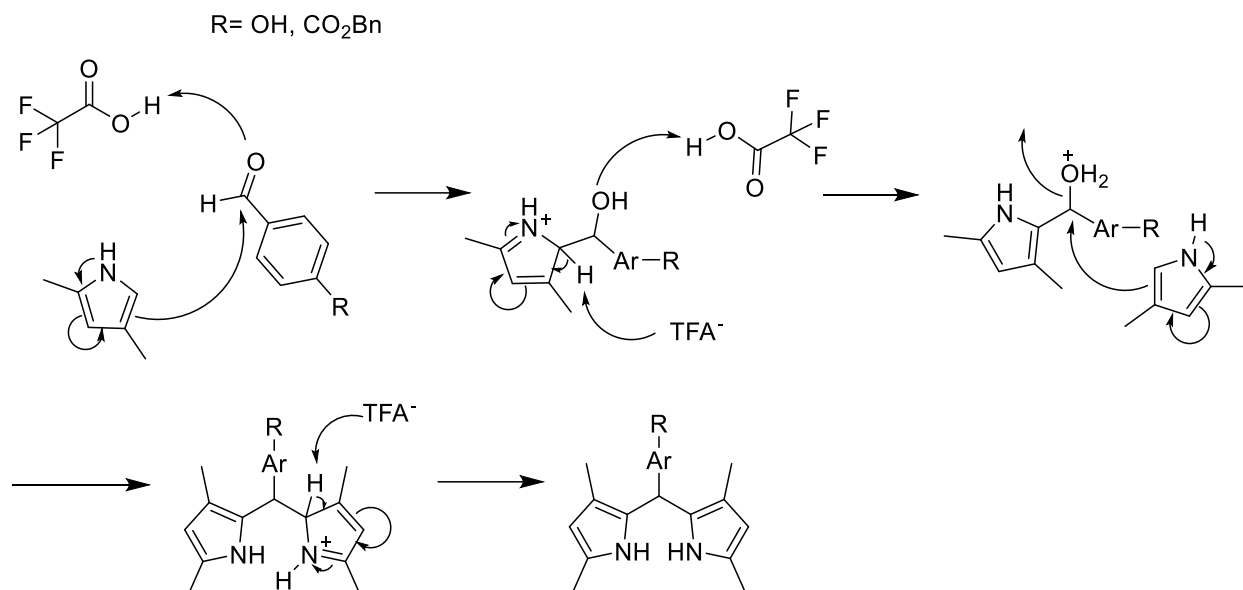
Za sintezu BODIPY spojeva **6** i **10** korištene su poznate, literaturno opisane reakcije pripreme BODIPY jezgre (Shema 17). Korištena je Lindseyjeva metoda (51) gdje je prvi korak kiselo katalizirana kondenzacija pirola s aromatskim aldehidom pri čemu nastaje diprometan **5** i **9**. Nakon toga slijedi oksidacija DDQ-om koja rezultira nastankom dipirometena. Sljedeći korak je kompleksiranje dipirometena s $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ kao Lewisovom kiselinom u prisutnosti baze uz nastajanje BODIPY spojeva **6** i **10**. Reakcija se provodi u suvišku Et_3N kako bi se deprotonirao dipirometen i vezao za Lewisovu kiselinu te ujedno i neutralizirao nastali HF.

Spoj **6** pokušali smo pripremiti na dva načina. U prvom slučaju smo u reakciji dobivanja dipirometana **5** proveli ekstrakciju i pročišćavanje dipirometana kolonskom kromatografijom. Međutim, dipirometan **5** je nestabilan, vrlo osjetljiv na kisik, svjetlost, te tragove kiseline (silikagel je kiseo) te se prilikom njegova pročišćavanja raspada što rezultira smanjenjem iskorištenja. Dobiven je grubo-pročišćen spoj **5** s kojim se išlo dalje u sintezu BODIPY spoja **6** bez karakterizacije. Pri tome je spoj **6** dobiven u iskorištenju od 31 %. Kako bi izbjegli pročišćavanje nestabilnog dipirometana, provedena je i 'one-pot' sinteza u tri koraka, ali iskorištenje nije bilo bolje od prethodno navedenog postupka; spoj **6** izoliran je u iskorištenju od svega 3 %.



Shema 17. Sinteza BODIPY spojeva **6** i **10**.

Pojednostavljeni reakcijski mehanizam dobivanja dipirometana **5** i **9** prikazan je na shemi 18 (52). Reakcija započinje dodatkom trifluoroctene kiseline (TFA) koja djeluje kao katalizator što dovodi do protoniranja karbonilne skupine benzaldehida. Nukleofilnim napadom pirola na karbonilni C atom benzaldehida i dehidratacije nastalog međuprodukta nastaje vrlo reaktivni karbokation (nije prikazan na shemi). Navedeni karbokation je sklon daljnjoj oligomerizaciji.



Shema 18. Pojednostavljeni reakcijski mehanizam Lindseyjeve sinteze dipirometana (52).

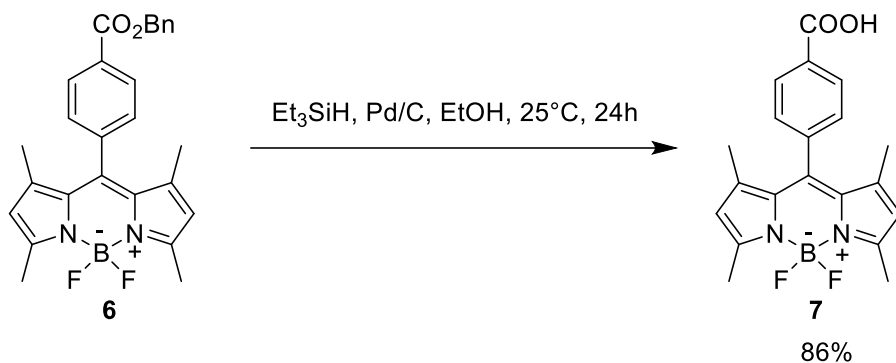
Produkti **6**, **9** i **10** okarakterizirani su spektroskopijom ¹H i ¹³C NMR. U spektru ¹H NMR spoja **6** vidljivo je 7 signala, dva dubleta intenziteta 2H na δ 8,21 ppm i 7,49 ppm u aromatskom području koji odgovaraju protonima na di-supstituiranom benzenskom prstenu, multiplet intenziteta 5H koji odgovara protonima fenilne skupine benzilne zaštite, singlet intenziteta 2H na δ 5,99 ppm karakterističan za protone pirolnih prstenova, singlet intenziteta 2H koji odgovara protonima CH₂ skupine benzilne zaštite te 2 singleta intenziteta 6H koji odgovaraju metilnim skupinama. U ¹³C NMR spektru vidljivo je 17 signala, 6 dubleta i 8 singleta u aromatskom području koji odgovaraju benzenskim i pirolnim ugljicima te *meso*-ugljiku, 1 signal na δ 67,3 ppm koji odgovara benzilnom CH₂ ugljiku te 2 signala u alifatskom dijelu spektra koji odgovaraju metilnim skupinama.

U spektru ¹H NMR spoja **9** vidljivo je 6 signala. U aromatskom dijelu spektra, dva dubleta intenziteta 2H na δ 6,86 ppm i 6,67 ppm koji odgovaraju protonima na disupstituiranom benzenskom prstenu, singlet intenziteta 2H

odgovara pirolnim H signalima u položaju 3, dok je u alifatskom dijelu spektra vidljiv jedan singlet intenziteta 1H koji odgovara protonu u *meso*-položaju te dva singleta intenziteta 6H koji odgovaraju metilnim skupinama. U ^{13}C NMR spektru vidljivo je 11 signala, 3 dubleta i 5 singleta u aromatskom području koji odgovaraju benzenskim i pirolnim ugljicima, jedan dublet koji odgovara ugljiku u *meso*-položaju, te 2 signala koji odgovaraju metilnim skupinama.

^1H NMR spektar spoja **10** sličan je spektru spoja **9**, razlika je u odsustvu jednog signala koji odgovara protonu u *meso*-položaju molekule. ^{13}C NMR spektar također je sličan spektru spoja **9**. Vidljivo je 10 signala, 6 singleta i 3 dubleta u aromatskom području koji odgovaraju benzenskim i pirolnim ugljicima, dok je jedan signal u alifatskom području od dva para različitih metilnih skupina.

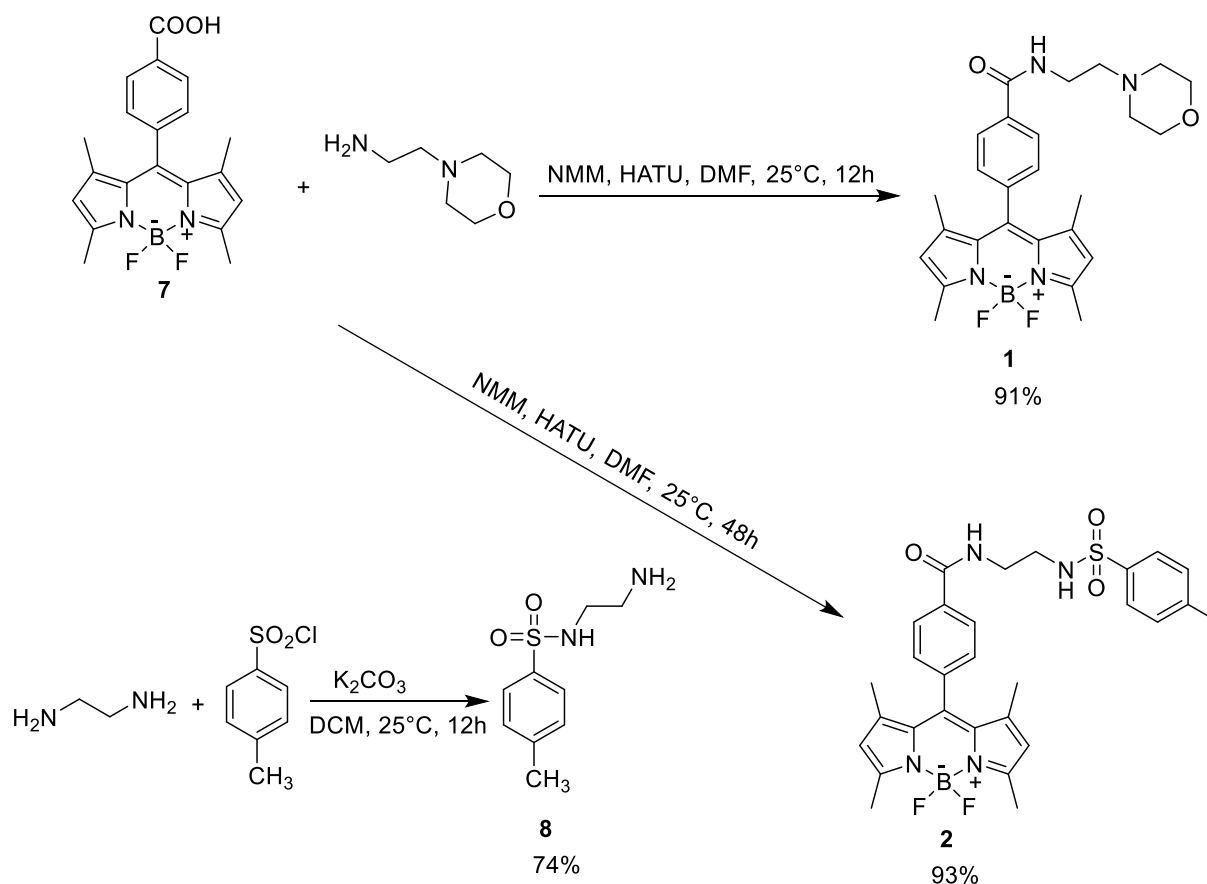
Nakon dobivanja spoja **6**, slijedi uklanjanje zaštitne benzilne skupine katalitičkim hidrogeniranjem. U ovom slučaju provedena je reakcija transfer - hidrogenacije s Et_3SiH uz Pd/C kao katalizator (53) te je dobivena slobodna BODIPY kiselina **7** (Shema 19). Generiranje vodika *in situ* dodavanjem Et_3SiH katalizatoru Pd/C rezultira selektivnim i učinkovitim uklanjanjem benzilne zaštitne skupine pod blagim, neutralnim uvjetima. Bolje prinose na produktu **7** moguće je dobiti kada se reakcija provodi na većoj šarži. Pokušaji uklanjanja benzilne skupine katalitičkim hidrogeniranjem uz vodik i Pd/C rezultirali su raspadom molekule, vjerojatno zbog kompetitivnih redukcija dvostrukih veza u dipirometenskoj strukturi.



Shema 19. Reakcija uklanjanja benzilne zaštite.

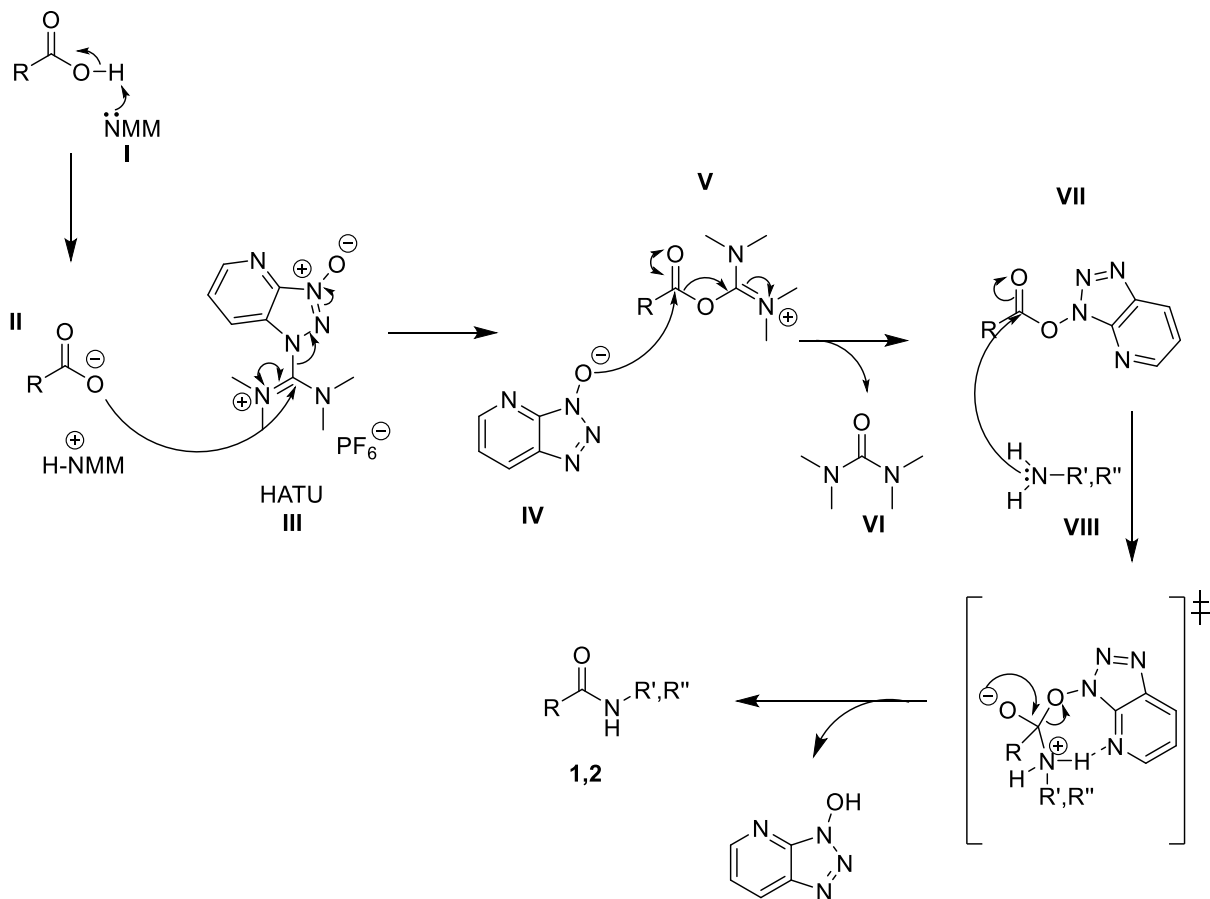
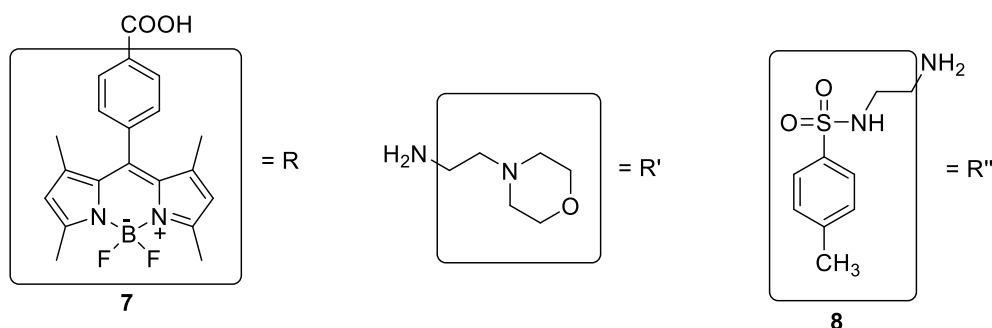
U spektru ^1H NMR spoja **7** vidljivo je 5 signala koji imaju isti oblik i intenzitet kao kod spoja **6**, ali s malom razlikom u kemijskim pomacima. Važna razlika sa spektrom NMR spoja **6** koja ukazuje na uspješno uklanjanje benzilne skupine je nedostatak signala na δ 7,36-7,46 ppm. Tako su u spektru spoja **7** vidljiva dva dubleta intenziteta 2H u aromatskom području na δ 8,24 ppm i 7,51 ppm koji odgovaraju protonima na disupstituiranom benzenskom prstenu, singlet intenziteta 2H na δ 6,11 ppm što odgovara pirolskim protonima te dva singleta intenziteta 6H koji odgovaraju metilnim skupinama. U ^{13}C NMR spektru vidljivo je 11 signala, jako odsjenjeni signal pripada karbonilnom ugljikovom atomu na δ 169,1 ppm, 7 singleta i 3 dubleta u aromatskom području koji odgovaraju benzenskim i pirolnim ugljicima te *meso*-ugljiku, te 2 signala u alifatskom području koji odgovara C-atomima metilnih skupina.

Sljedeći korak u sintezi je priprava amidne veze koristeći reagense za nastajanje peptidne veze. U našem slučaju koristili smo kao aktivator HATU reagens i NMM kao bazu (**54**) pri čemu su dobiveni spojevi **1** i **2** u izvrsnim iskorištenjima (Shema 20).



Shema 20. Sinteza BODIPY produkta **1** i **2** te sulfonamidnog reagensa **8**.

Mehanizam reakcije nastajanja amidne veze prikazan je na shemi 21. U prvom koraku, dodatkom NMM-a **I** BODIPY kiselina **7** se deprotonira i nastaje karboksilatni anion **II**, koji reagira s HATU reagesom **III**. Vezanjem spoja **IV** nastaje aktivirani oblik kiseline (aktivni ester) **V**, koji se pregrađuje u **VII**, i ureidni nusprodukt **VI**. Slobodna amino skupina spojeva **VIII** nukleofilno reagira na **VII** i nastaju spojevi **1** ili **2** (54).



Shema 21. Predloženi mehanizam nastajanja amidne veze s HATU reagensom.

Spoj **8** koji je služio je kao izvor amina u sintezi spoja **2** pripravili smo tosilitanjem etilendiamina (Shema 20). Radi se o reakciji S_N2 supstitucije na sumporovom atomu gdje je amino skupina služila kao nukleofil koji napada elektrofilni sumpor. Reakcija je uspješno provedena na način da je u otopinu etilendiamina postepeno dodavan 4-metilbenzensulfonilklorid. Kada je

reakcija provedena na način da su reaktanti odmah zajedno pomiješani, dobiven je ditosilirani produkt.

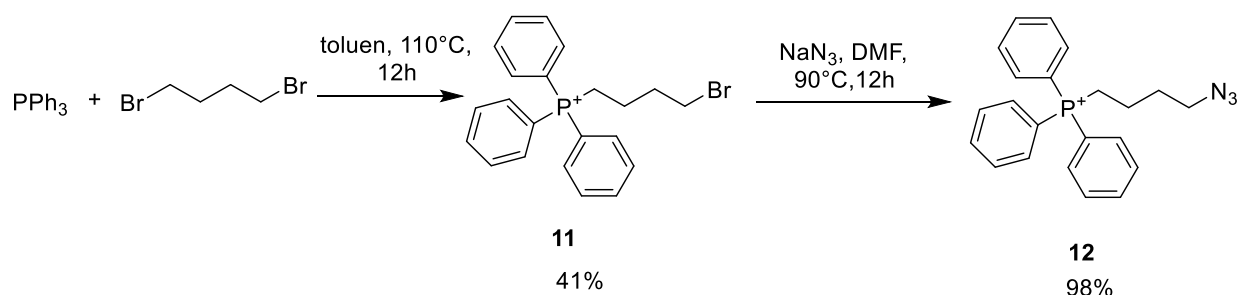
Produkti **1**, **2** i **8** okarakterizirani su spektroskopijom ^1H i ^{13}C NMR. U spektru ^1H NMR spoja **1** vidljivo je 10 signala od kojih je 5 signala jednako kao i kod spoja **7**, ali su kemijski pomaci blago različiti. Razlika je u morfolinskom supstituentu na karboksilnom kraju. Stoga je dodatno vidljiv triplet intenziteta 1H na δ 6,90 ppm koji odgovara amidnom protonu, dublet dubleta intenziteta 4H na δ 3,75 ppm i multiplet intenziteta 4H koji odgovaraju morfolinskim protonima, dublet dubleta intenziteta 2H na δ 3,60 ppm i triplet intenziteta 2H na δ 2,65 ppm u alifatskom dijelu. U ^{13}C NMR spektru vidljivo je 16 signala, jako odsjenjeni signal pripada karbonilnom ugljikovom atomu, 6 singleta i tri dubleta u aromatskom području koji odgovaraju benzenskim, pirolnim i *meso*-ugljiku, 2 signala koja odgovaraju morfolinskim ugljicima, 2 signala koja odgovaraju etilenskoj prenosnici te 2 signala koja odgovaraju metilnim skupinama.

U spektru ^1H NMR spoja **2** vidljivo je 12 signala od kojih je ponovno 5 signala karakteristično za spoj **7**. Razlika je u dodanom amidoalkilnom sulfonamidnom dijelu molekule na karboksilnom kraju. Tako su vidljiva dva dubleta intenziteta 2H na δ 7,36 ppm i δ 7,30 ppm karakteristični za disupstituirani benzenski prsten, triplet intenziteta 1H na δ 7,12 ppm i singlet intenziteta 1H na 5,37 ppm koji odgovaraju sulfonamidnom i amidnom protonu, dva dublet dubleta intenziteta 2H koji odgovaraju etilenskoj prenosnici te singlet intenziteta 3H koji odgovara metilnoj skupini. U ^{13}C NMR spektru vidljivo je 17 signala, jako odsjenjeni signal pripada karbonilnom ugljikovom atomu, 11 signala u aromatskom području koji odgovaraju benzenskim, pirolnim ugljicima te *meso*-ugljiku, 2 signala koja odgovaraju alifatskoj etilenskoj prenosnici te 2 signala koji odgovaraju metilnim skupinama. Međusobno različita dva para metilnih signala na BODIPY jezgri

preklapaju se i pojavljuju kao jedan signal, dok je drugi metilni signal od tosilne skupine.

U spektru ^1H NMR spoja **8** vidljivo je 5 signala koji su prethodno opisani kod spoja **2** s blago različitim kemijskim pomacima. Jedina razlika je što kod spoja **8** nisu vidljivi amidni i sulfonamidni protoni. U ^{13}C NMR spektru vidljivo je 7 signala, 2 singleta i 2 dubleta u aromatskom području koji odgovaraju ugljicima na benzenskom prstenu, 2 signala koja odgovaraju etilenskoj premosnici te 1 signal karakterističan za metilnu skupinu.

Dobivanje fosfonijeve soli **11** i azida **12** provedeno je u reakcijama $\text{S}_{\text{N}}2$ supstitucije (Shema 22). U prvom koraku PPh_3 služi kao nukleofil koji napada ugljikov atom 1,4-dibrombutana te u drugom azid služi kao nukleofil koji napada elektrofilni ugljikov atom i zamjenjuje drugi brom u molekuli.



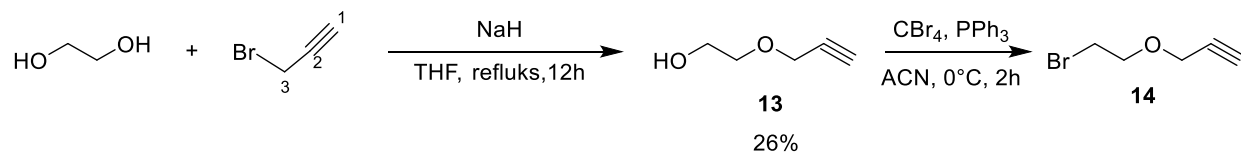
Shema 22. Sinteza spojeva **11** i **12**.

Produkti **11** i **12** okarakterizirani su spektroskopijom ^1H i ^{13}C NMR. U spektru ^1H NMR spoja **11** vidljivo je 7 signala, dublet tripleta intenziteta 3H ppm koji odgovara protonima u *para*-položaju na benzenskom prstenu, dva multiplleta intenziteta 6H koji odgovaraju protonima u *ortho*- i *meta*- položaju na benzenskom prstenu, triplet, dva multiplleta te dublet dubleta intenziteta 2H koji odgovaraju CH_2 protonima u alifatskom dijelu. U ^{13}C NMR spektru vidljivo je 8 signala. Četiri signala vidljiva su u aromatskom području koji odgovaraju ugljicima na benzenskom prstenu koji su cijepani zbog sprege s

atomom fosfora kroz jednu, dvije, tri ili četiri veze. Ostala 4 signala u alifatskom dijelu spektra pojavljuju se kao dubleti tripleta, također zbog sprege s atomom fosfora. ^1H NMR i ^{13}C spektri spoja **12** skoro su isti kao i kod spoja **11** uz male razlike u kemijskim pomacima s obzirom na zamjenu Br s N_3 .

Produkt **13** dobiven je Williamsovom sintezom etera (55) (Shema 6). NaH , suspendiran u tetrahidrofuranu, reagira s alkoholom tvoreći alkoksid i H_2 . Alkoksidni ion jak je nukleofil i vrlo jaka baza. Nakon tvorbe alkoksida polako je dokapavan 3-bromoprop-1-in što je rezultiralo nastankom etera **13** i NaBr . Začuđujuće je relativno nisko izolabilno iskorištenje na eterskom produktu **13** u Williamsovoj sintezi. Pretpostavili smo da je mogući razlog laka hlapljivost spojeva koji su pogubljeni prilikom uparavanja nakon kromatografskog čišćenja. Drugi mogući razlog je relativno spora reakcija za koju su potrebni žešći uvjeti. Tako je provedbom reakcije na sobnoj temperaturi tijekom 24 h postignuto iskorištenje od 5 %, dok je zagrijavanjem reakcijske smjese na temperaturi refluksa postignuto iskorištenje od 26 %.

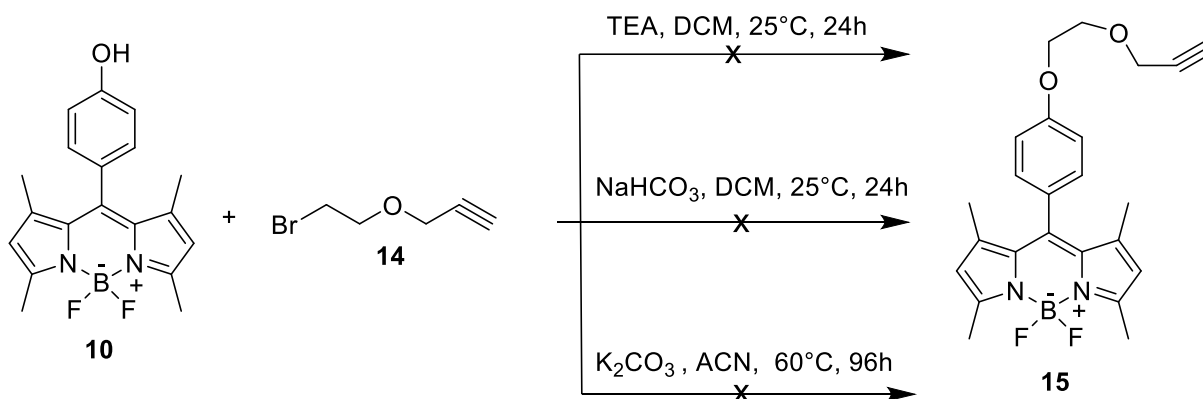
Appelovom reakcijom (56) dobiven je produkt **14** (Shema 23). Reakcija se odvija aktivacijom trifenilfosfina s tetrahalometanom (CBr_4), nakon čega slijedi napad kisika alkohola na fosfor kako bi se stvorio oksifosfonijev intermedijer. Kisik se zatim transformira u izlaznu skupinu trifenilfosfin-oksida i dolazi do zamijene u $\text{S}_{\text{N}}2$ reakciji s halogenidom, pri čemu dolazi do inverzije konfiguracije ako je ugljikov atom na kojem se reakcija odvija kiralan.



Shema 23. Sinteza spojeva **13** i **14**.

Produkti **13** i **14** okarakterizirani su spektroskopijom ^1H i ^{13}C NMR. U spektru ^1H NMR spoja **13** vidljivo je 5 signala, dublet intenziteta 2H na δ 4,21 ppm, dva tripleta intenziteta 2H na δ 3,78 ppm i δ 3,66 ppm koji odgovaraju CH_2 protonima na alifatskom dijelu, triplet intenziteta 1H na δ 1,94 ppm koji odgovara protonu pokraj trostruke veze te singlet intenziteta 1H karakterističan za proton alkohola. ^1H NMR spektar spoja **14** sličan je spektru spoja **13**, jedina razlika je odsutstvo signala protona alkohola. ^{13}C NMR spektri spoja **13** i **14** prikazuju 5 signala.

Pokušana je Williamsova sinteza etera sa spojevima **10** i **14**, ali uz sve prikazane uvjete reakcije nije došlo do nastanka željenog produkta (Shema 24). Zbog nemogućnosti pripreve spoja **15**, odustalo se od sinteze fluorescentnog indikatora **3**.

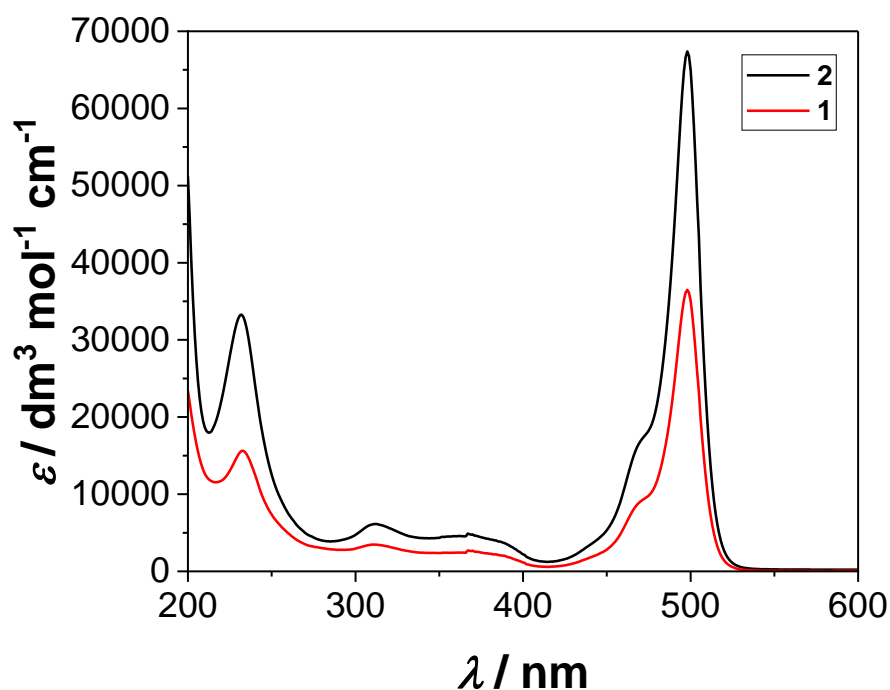


Shema 24. Neuspjeli pokušaji sinteze BODIPY spoja **15**.

5.2. Fotofizička svojstva

Za primjenu fluorescencijskih indikatora u mikroskopiji, potrebno je istražiti njihova fotofizička svojstva. Poželjno je da spojevi imaju maksimume apsorpcije u vidljivom području elektromagnetskog spektra kao i velike molarne apsorpcijske koeficijente što velika većina BODIPY derivata i pokazuje (7,57,58). Nadalje, poželjno je da spojevi imaju visoke kvantne prinose fluorescencije, te relativnu osjetljivost fluorescencije na promjene u okolišu molekule, kao što je polarnost otapala (4,7). Stoga su spojevima **1** i **2** snimljeni apsorpcijski i emisijski spektri u otapalima različite polarosti.

Spojeve **1** i **2** u acetonitrilnoj otopini karakterizira apsorpcijski maksimum na oko 498 nm uz molarne apsorpcijske koeficijente u rasponu od 35000–70000 M⁻¹ cm⁻¹ (Slika 15). Navedeni spojevi pokazuju izrazito oštre, uske vrpce u vidljivom području koje odgovaraju HOMO→LUMO prijelazu, odnosno populaciji S₁ stanja što je tipično za BODIPY spojeve (7,59). Na glavnoj vrpci u vidljivom području nazire se i rame vrpce koje odgovara 0-1 vibracijskom prijelazu. U spektru su vidljive i manje vrpce u UV području koje odgovaraju energetskim prijelazima u viša pobuđena stanja (7,59). Ne postoji značajna razlika u maksimumu apsorpcijskog spektra spojeva **1** i **2**, ali znatno se razlikuju u molarnom apsorpcijskom koeficijentu. Navedena razlika vjerojatno nije posljedica različite vjerojatnosti prijelaza i oscilatorske moći za taj prijelaz s obzirom da se radi o istom kromoforu, već su razlike vjerojatno uslijed relativne molekulske mase.

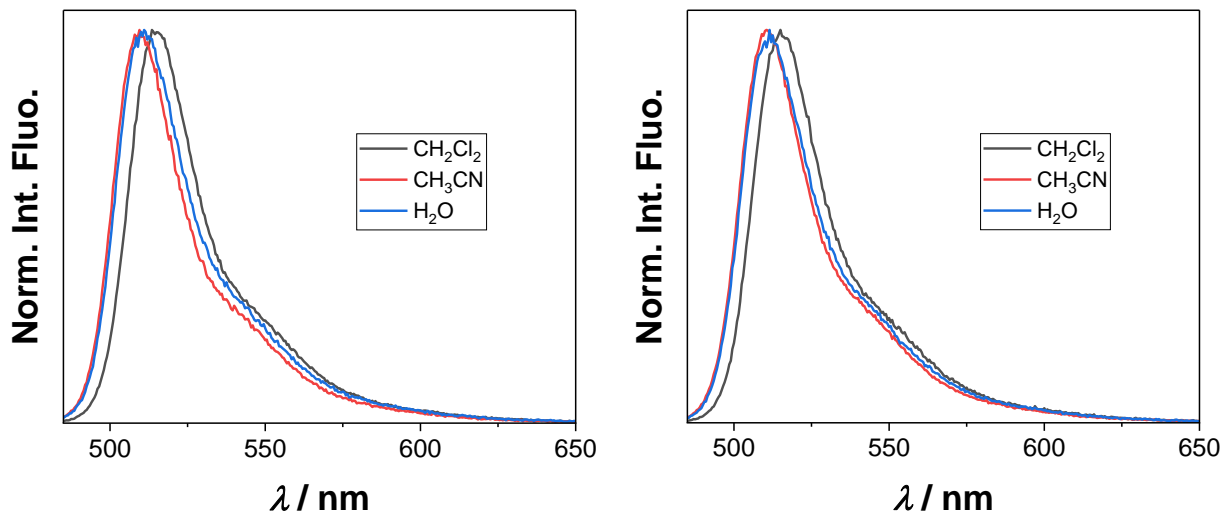


Slika 15. Apsorpcijski spektri spojeva **1** i **2** u CH₃CN.

Fluorescencijski spektri dobiveni su koristeći stacionarnu fluorescencijsku spektroskopiju te su potom određeni kvantni prinosi fluorescencije, dok su vremena života singletnih pobuđenih stanja određena vremenski koreliranim brojanjem pojedinačnih fotona (*eng. Time-Correlated Single Photon Counting, TC-SPC*).

Fluorescencijski spektri za spojeve **1** i **2** snimljeni su u tri različita otapala: CH₂Cl₂, CH₃CN i H₂O (Slika 16). Emisijski spektri pokazuju vrlo malene razlike u maksimumu emisija za iste spojeve u različitim otapalima, što ukazuje da spojevi ne pokazuju fluoro-solvatokromna svojstva, kao što je čest slučaj kod BODIPY spojeva (60,61). Povećanjem polarnosti otapala od diklormetana do acetonitrila dolazi do vrlo malog hipsokromnog pomaka, ≈ 5 nm, dok povećanje protičnosti otapala (usporedba acetonitrila i vode) ima

gotovo neznan učinak, u protičnom otapalu se spektar pomiče batokromno ≈ 1 nm.



Slika 16. Normalizirani emisijski spektri ($\lambda_{\text{exc}} = 270$ nm) spoja **1** (lijevo) i spoja **2** (desno) u različitim otapalima.

Kvantni prinosi fluorescencije spojeva **1** i **2** (Tablica 1) određeni su koristeći rodamin B u metanolu kao standard ($\Phi_F = 0,66$) (50). Iako spojevi ne pokazuju fluoro-solvatokromne pomake, kvantni prinos fluorescencije malo opada s povećanjem polarosti otapala. Međutim, važno je napomenuti da morfolinski derivat **1** ne pokazuje znatnu ovisnost fluorescencije o polarosti otpala što sugerira da se spoj ne deaktivira iz singletnog pobđenog stanja fotoinduciranim prijenosom elektrona s amino skupine morfolina na BODIPY, kao što je slučaj s nekim drugim amino-derivatima BODIPY molekula (62,63). Nadalje, spojevi **1** i **2** otopljeni u vodi i dalje pokazuju kvantni prinos fluorescencije veći od 50 % što im omogućuje primjenu u fluorescencijskoj mikroskopiji.

Opadanje intenziteta fluorescencije za BODIPY spojeve **1** i **2** može se prikazati monoeksponencijalnom kinetikom, a vremena života pobuđenog stanja su im slična te iznose $\approx 2,5\text{--}3,0$ ns (Tablica 1). Iz vremena života singletnog pobuđenog stanja i kvantnog prinosa fluorescencije mogu se izračunati konstante brzine deaktivacije iz singletnog pobuđenog stanja zračenjem (k_R) i bez zračenja (k_{NR}). Tako je zanimljivo da se povećanjem polarности otapala istovremeno smanjuje k_R dok se k_{NR} povećava.

Tablica 1. Fotofizička svojstva BODIPY boja **1** i **2** u različitim otapalima.

Spoj	Otapalo	Φ_F^a	τ / ns ^b
1	CH ₂ Cl ₂	0.70 ± 0.02	2.73 ± 0.02
	CH ₃ CN	0.55 ± 0.01	2.60 ± 0.02
	H ₂ O	0.51 ± 0.05	3.00 ± 0.01
2	CH ₂ Cl ₂	0.75 ± 0.02	2.59 ± 0.02
	CH ₃ CN	0.50 ± 0.01	2.57 ± 0.02
	H ₂ O	0.51 ± 0.02	2.70 ± 0.01

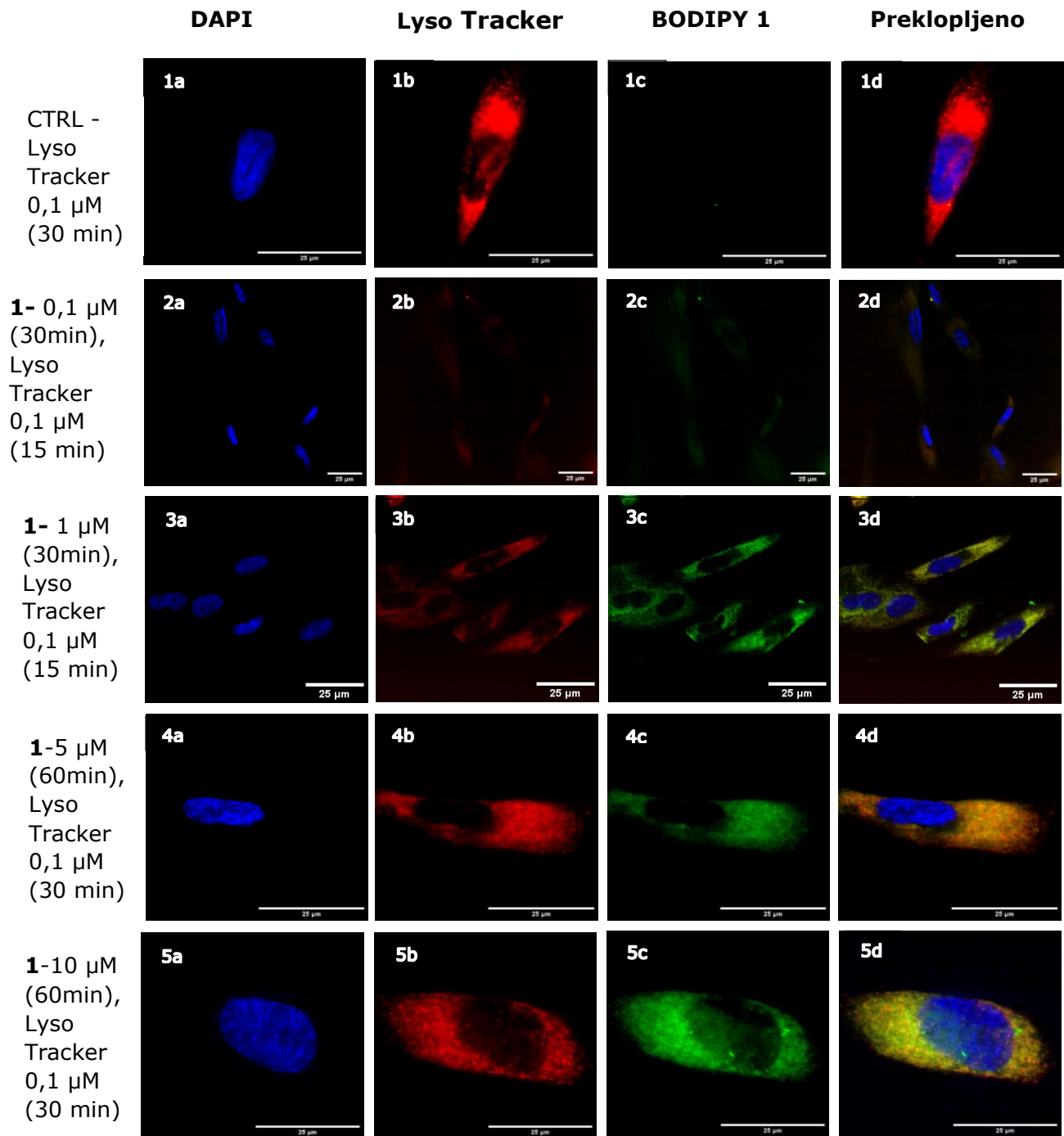
^a Kvantni prinos fluorescencije izmjeren korištenjem rodamina B u CH₃OH kao referentnog spoja ($\Phi_F = 0,66$) (50). ^b Životni vijek pojedinačnog pobuđenog stanja izmjeren pomoću TC-SPC

5.3. Eksperimenti u staničnoj kulturi

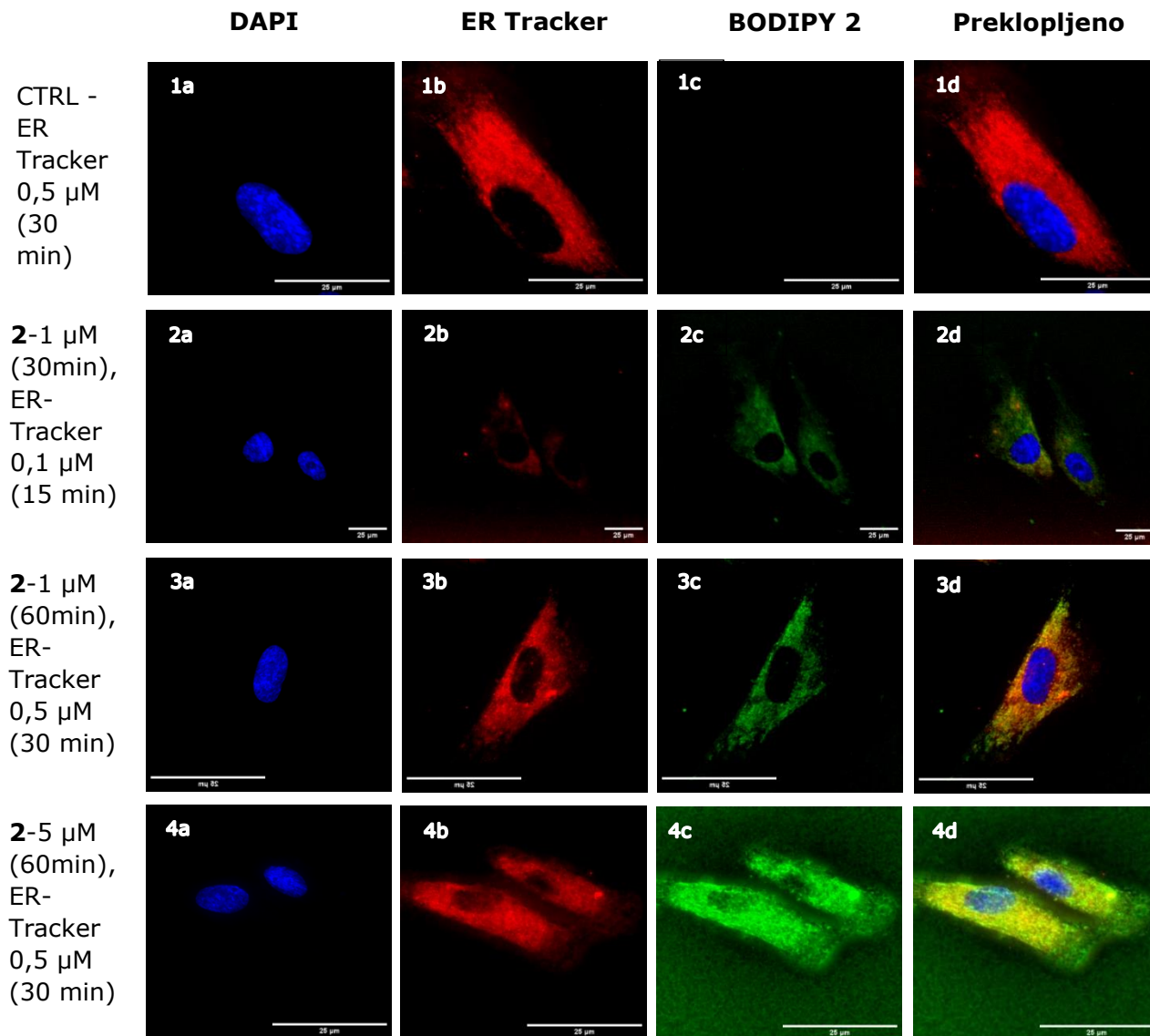
Kako bi se istražila intracelularna lokalizacija derivata **1** i **2**, ispitana je njihova kolokalizacija s poznatim markerima za organele. Prvobitno su sintetizirani derivati **1** i **2** (0,1 i 1 μM) inkubirani 30 min s HFF stanicama, nakon čega su uklonjeni te su markeri za organele (ER-Tracker i Lyso-Tracker, 0,1 μM) posebno inkubirani s istim stanicama 15 min. Stanice su nakon toga ispirane, fiksirane te su im obojane jezgre. Slike su dobivene korištenjem fluorescentnog mikroskopa. Rezultati su pokazali da svi testirani spojevi lako ulaze u stanice, ali je potrebno još dodatno optimizirati koncentracije i vremena inkubacije BODIPY derivata **1** i **2** te markera za organele. Kod spoja **1** pri koncentraciji 0,1 i 1 μM vidljivi su obrisi fluorescencije, no jako slabog intenziteta (Slika 17-2c,3c). Nadalje, spoj **2** prikazuje jači intenzitet fluorescencije pri istim koncentracijama (Slika 18-2c) dok je intenzitet fluorescencije ER-Trackera pri koncentraciji od 0,1 μM jedva vidljiv (Slika 18-2b).

U drugoj seriji eksperimenata na stanicama, temeljem rezultata prvog eksperimenta, promijenjene su koncentracije derivata **1** i **2**, koncentracija ER-Trackera te je produljeno vrijeme inkubacije s testiranim BODIPY spojevima. HFF stanice su tretirane sintetiziranim derivatima **1** i **2** u različitim koncentracijama (derivat **1** u koncentracijama 5 μM i 10 μM , te derivat **2** u koncentracijama 1 μM i 5 μM) 30 minuta. Nakon inkubacije, stanicama su dodani komercijalni markeri organela u koncentracijama 0,5 μM (ER-tracker) za endoplazmatski retikulum, i 0,1 μM (Lyso Tracker) za lizosome te se inkubiralo dodatnih 30 min. Fluorescentna mikroskopija kod stanica tretiranih spojem **1** pri koncentraciji 5 μM i ukupnoj inkubaciji od 60 min prikazala je zadovoljavajući intenzitet fluorescencije (Slika 17-4c) te je Pearsonov koeficijenta korelacije (R_r) Lyso-trackera i BODIPY-derivata **1** pri navedenoj koncentraciji iznosio 0.93. Kod dodatnog povećanja koncentracije derivata **1**

(10 μM) vidljivo je da spoj ulazi i u jezgru te se Pearsonov koeficijent korelacije smanjio (Slika 17-5c). Nadalje, kod derivata **2** koncentracije 1 μM , produljenjem vremena inkubacije dobiven je željeni intenzitet fluorescencije (Slika 18-3c), dok je koncentracija od 5 μM prevelika što se očituje snažnim intenzitetom fluorescencije te ulaskom u jezgru (Slika 18-4c). Promjenom koncentracije ER-Trackera s 0,1 na 0,5 μM te povećanjem vremena inkubacije s 15 min na 30 min intenzitet fluorescencije se povećao. Pearsonov koeficijent korelacije ER-Trackera (0,5 μM) i BODIPY derivata **2** pri koncentraciji 1 μM iznosio je 0,85.



Slika 17. Fluorescentne slike HFF stanica tretiranih s različitim koncentracijama BODIPY derivata **1** i Lyso Trackerom s vremenskim povećanjem inkubacije



Slika 18. Fluorescentne slike HFF stanica tretiranih s različitim koncentracijama BODIPY derivata **2** i ER-Trackerom s vremenskim povećanjem inkubacije.

6. Zaključak

U okviru diplomskog rada uspješno je provedena sinteza novih BODIPY spojeva sa supstituentima u *meso*-položaju koji specifično ciljaju određene organele: 4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametil-5H-4 λ ⁴,5 λ ⁴-dipirolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-il)-*N*-(2-morfolinoetil)benzamida (**1**, $\eta = 91\%$, za lizosome) i 4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametil-5H-4 λ ⁴,5 λ ⁴-dipirolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-il)-*N*-(2-((4-metilfenil)sulfonamido)etil)benzamida (**2**, $\eta = 93\%$, cilja endoplazmatski retikulum). Pokušana je sinteza spoja **3** koji bi ciljao mitohondrije (4-(4-((2-(4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametil-5H-4 λ ⁴,5 λ ⁴-dipirolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-il)fenoksi)etoksi) metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)butil)trifenilfosfonij, ali nije bila uspješna jer nije uspješno provedena Williamsova sinteza etera na BODIPY fenolnom derivatu. Novopripremljeni BODIPY spojevi okarakterizirani su spektroskopskim metodama, spektrometrijom masa te su ispitivani u staničnoj kulturi.

Fotofizička svojstva novih spojeva **1** i **2** ispitana su korištenjem UV-Vis i fluorescencijske spektroskopije. Spojevima su izmjereni apsorpcijski spektri u acetonitrilu koji imaju maksimume u vidljivom području elektromagnetskog spektra ($\lambda_{\text{aps}}=489$ nm) te visoke molarne apsorpcijske koeficijente (35000-70000 M⁻¹ cm⁻¹). Navedena svojstva su poželjna za primjenu fluorescencijskih indikatora u mikroskopiji. Spojevima su također izmjereni fluorescencijski spektri u tri otapala: diklormetanu, acetonitrilu i vodi te su im određeni kvantni prinosi fluorescencije ϕ_f . Emisijski spektri pokazuju minimalne razlike u maksimumu emisije za iste spojeve u različitim otapalima, što ukazuje da spojevi ne pokazuju fluoro-solvatokromna svojstva. Iako spojevi ne pokazuju fluoro-solvatokromne pomake, kvantni prinos fluorescencije opada s povećanjem polarnosti otapala (od 0,75 do 0,50). Vremena života singletnih pobuđenih stanja kreću se od 2,6-3,0 ns.

U eksperimentima na živim HFF stanicama pomoću fluorescencijske mikroskopije prikazano je da svi testirani spojevi lako ulaze u stanice te specifično boje lizosome ili endoplazmatski retikulum. Koncentracije pri kojima su spojevi prikazali optimalni intenzitet fluorescencije za derivat **1** iznosi 5 μM , dok za derivat **2** iznosi 1 μM .

Budući rad u ovom području temeljio bi se na modificiranju metode pripreme derivata **3** te dodatnim eksperimentima na stanicama koje obuhvaćaju testove citotoksičnosti i fotoizbjeljivanja. Dobiveni rezultati bi upotpunili sliku o spojevima **1** i **2** koji bi mogli naći primjenu u medicini i biologiji kao fluorescentni indikatori za specifično ciljanje organela.

7. Literatura

1. Valeur B, Berberan-Santos MN. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Second Edition. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Second Edition. 2012 May 3;
2. Lichtman JW, Conchello JA. Fluorescence microscopy. *Nat Methods*. 2005 Dec;2(12):910–9.
3. Martynov VI, Pakhomov AA. BODIPY derivatives as fluorescent reporters of molecular activities in living cells. *Russian Chemical Reviews*. 2021 Nov 1;90(10):1213–62.
4. Boens N, Leen V, Dehaen W. Fluorescent indicators based on BODIPY. *Chem Soc Rev*. 2012 Jan 17;41(3):1130–72.
5. Alfred Treibs von, Kreuzer FH. Difluorboryl-Komplexe von Di-und Tripyrrylmethenen. Vol. 718, *Liebigs Ann. Chem*. 1968.
6. Monsma FJ, Barton AC, Chol Kang H, Brassard DL, Haugland RP, Sibley DR. Characterization of novel fluorescent ligands with high affinity for D1 and D2 dopaminergic receptors. *J Neurochem*. 1989;52(5):1641–4.
7. Ulrich G, Ziesel R, Harriman A. The chemistry of fluorescent bodipy dyes: Versatility unsurpassed. Vol. 47, *Angewandte Chemie - International Edition*. 2008. p. 1184–201.
8. Sameiro M, Gonçalves T. Fluorescent labeling of biomolecules with organic probes. *Chem Rev*. 2009 Jan 14;109(1):190–212.
9. Kowada T, Maeda H, Kikuchi K. BODIPY-based probes for the fluorescence imaging of biomolecules in living cells. *Chem Soc Rev*. 2015 Jul 21;44(14):4953–72.
10. Ortiz MJ, Garcia-Moreno I, Agarrabeitia AR, Duran-Sampedro G, Costela A, Sastre R, et al. Red-edge-wavelength finely-tunable laser action from new BODIPY dyes. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2010 Jul 6;12(28):7804–11.
11. Awuah SG, You Y. Boron dipyrromethene (BODIPY)-based photosensitizers for photodynamic therapy. *RSC Adv*. 2012 Oct 29;2(30):11169–83.

12. Singh SP, Gayathri T. Evolution of BODIPY Dyes as Potential Sensitizers for Dye-Sensitized Solar Cells. *European J Org Chem.* 2014 Aug 1;2014(22):4689–707.
13. Benstead M, Mehl GH, Boyle RW. 4,4'-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenes (BODIPYs) as components of novel light active materials. *Tetrahedron.* 2011 May 20;67(20):3573–601.
14. Kamkaew A, Lim SH, Lee HB, Kiew LV, Chung LY, Burgess K. BODIPY dyes in photodynamic therapy. *Chem Soc Rev.* 2012 Dec 3;42(1):77–88.
15. Boens N, Verbelen B, Ortiz MJ, Jiao L, Dehaen W. Synthesis of BODIPY dyes through postfunctionalization of the boron dipyrromethene core. *Coord Chem Rev.* 2019 Nov 15;399:213024.
16. Boens N, Verbelen B, Dehaen W. Postfunctionalization of the BODIPY Core: Synthesis and Spectroscopy. *European J Org Chem.* 2015 Oct 1;2015(30):6577–95.
17. Littler BJ, Miller MA, Hung CH, Wagner RW, O'shea DF, Boyle PD, et al. Refined Synthesis of 5-Substituted Dipyrromethanes. 1999;
18. Alešković M, Basarić N, Halasz I, Liang X, Qin W, Mlinarić-Majerski K. Aryl substituted adamantane-dipyrromethanes: Chromogenic and fluorescent anion sensors. *Tetrahedron.* 2013 Feb 11;69(6):1725–34.
19. Boens N, Verbelen B, Ortiz MJ, Jiao L, Dehaen W. Synthesis of BODIPY dyes through postfunctionalization of the boron dipyrromethene core. Vol. 399, *Coordination Chemistry Reviews.* Elsevier B.V.; 2019.
20. Wu L, Burgess K. A new synthesis of symmetric boraindacene (BODIPY) dyes. *Chemical Communications.* 2008 Oct 16;(40):4933–5.
21. Ray S. *The Cell: A Molecular Approach.* Yale J Biol Med. 2014;87(4):603.
22. Zhu H, Fan J, Du J, Peng X. Fluorescent Probes for Sensing and Imaging within Specific Cellular Organelles. *Acc Chem Res.* 2016 Oct 18;49(10):2115–26.
23. Dou WT, Han HH, Sedgwick AC, Zhu GB, Zang Y, Yang XR, et al. Fluorescent probes for the detection of disease-associated biomarkers. *Sci Bull (Beijing).* 2022 Apr 30;67(8):853–78.

24. Gonçalves RCR, Belmonte-Reche E, Pina J, Costa da Silva M, Pinto SCS, Gallo J, et al. Bioimaging of Lysosomes with a BODIPY pH-Dependent Fluorescent Probe. *Molecules*. 2022 Nov 1;27(22).
25. Zhang YZ, Diwu Z, P. Haugland R. US5869689A. United States; 1999.
26. Freundt EC, Czapiga M, Lenardo MJ. Photoconversion of LysoTracker Red to a green fluorescent molecule. *Cell Res*. 2007 Nov;17(11):956–8.
27. Kong X, Di L, Fan Y, Zhou Z, Feng X, Gai L, et al. Lysosome-targeting turn-on red/NIR BODIPY probes for imaging hypoxic cells. *Chemical Communications*. 2019;55(77):11567–70.
28. Ye Z, Xiong C, Pan J, Su D, Zeng L. Highly photostable, lysosome-targeted BODIPYs with green to near-infrared emission for lysosome imaging in living cells. *Dyes and Pigments*. 2018 Aug 1;155:30–5.
29. Gonçalves RCR, Belmonte-Reche E, Pina J, Costa da Silva M, Pinto SCS, Gallo J, et al. Bioimaging of Lysosomes with a BODIPY pH-Dependent Fluorescent Probe. *Molecules*. 2022 Nov 1;27(22).
30. Javadov S, Kozlov A V., Camara AKS. Mitochondria in Health and Diseases. *Cells* 2020, Vol 9, Page 1177. 2020 May 9;9(5):1177.
31. Yang J, Zhang R, Zhao Y, Tian J, Wang S, Gros CP, et al. Red/NIR neutral BODIPY-based fluorescent probes for lighting up mitochondria. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2021 Mar 5;248.
32. Xu W, Zeng Z, Jiang JH, Chang YT, Yuan L. Discerning the Chemistry in Individual Organelles with Small-Molecule Fluorescent Probes. *Angewandte Chemie International Edition*. 2016 Oct 24;55(44):13658–99.
33. Gao T, He H, Huang R, Zheng M, Wang FF, Hu YJ, et al. BODIPY-based fluorescent probes for mitochondria-targeted cell imaging with superior brightness, low cytotoxicity and high photostability. *Dyes and Pigments*. 2017 Jun 1;141:530–5.
34. Zhang X, Xiao Y, Qi J, Qu J, Kim B, Yue X, et al. Long-wavelength, photostable, two-photon excitable BODIPY fluorophores readily modifiable for molecular probes. *J Org Chem*. 2013 Sep 20;78(18):9153–60.

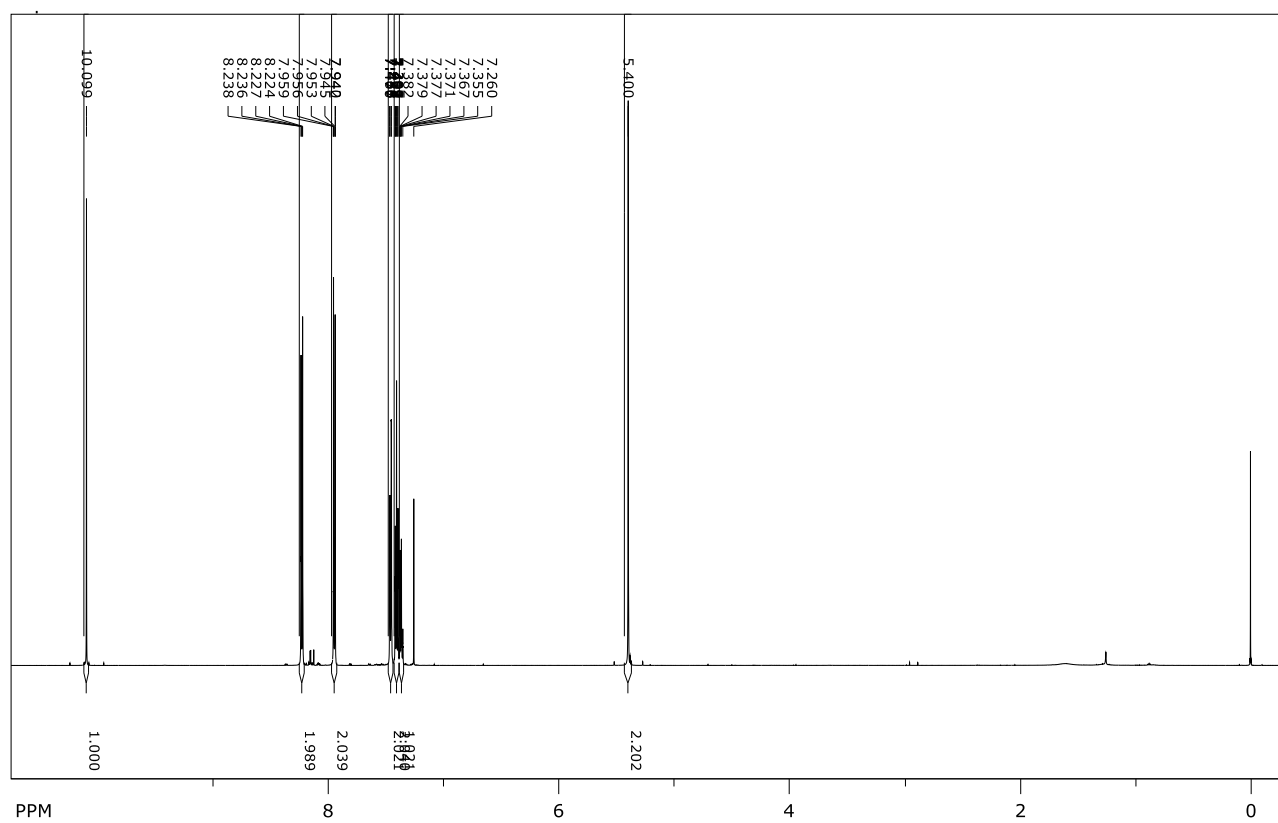
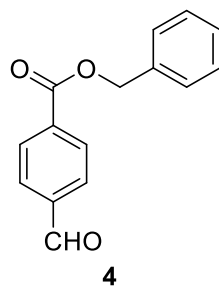
35. Sui B, Tang S, Woodward AW, Kim B, Belfield KD. A BODIPY-Based Water-Soluble Fluorescent Probe for Mitochondria Targeting. *European J Org Chem.* 2016 Jun 1;2016(16):2851–7.
36. Jiang N, Fan J, Liu T, Cao J, Qiao B, Wang J, et al. A near-infrared dye based on BODIPY for tracking morphology changes in mitochondria. *Chemical Communications.* 2013 Oct 17;49(90):10620–2.
37. Zhang S, Wu T, Fan J, Li Z, Jiang N, Wang J, et al. A BODIPY-based fluorescent dye for mitochondria in living cells, with low cytotoxicity and high photostability. *Org Biomol Chem.* 2012 Dec 20;11(4):555–8.
38. Greene FC. Interactions of anionic and cationic fluorescent probes with proteins: The effect of charge. *J Protein Chem.* 1984 Apr 17;3(2):167–80.
39. Zhao L, Ackerman SL. Endoplasmic reticulum stress in health and disease This review comes from a themed issue on Membranes and organelles Edited by Pietro de Camili and Antonella de Matteis. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18:444–52.
40. de Jong F, Pokorny J, Manshian B, Daelemans B, Vandaele J, Startek JB, et al. Development and characterization of BODIPY-derived tracers for fluorescent labeling of the endoplasmic reticulum. *Dyes and Pigments.* 2020 May 1;176.
41. Shi Y, Wang S, Wu J, Jin X, You J. Pharmaceutical strategies for endoplasmic reticulum-targeting and their prospects of application. Vol. 329, *Journal of Controlled Release.* Elsevier B.V.; 2021. p. 337–52.
42. Bousseksou A, Salmon L, Cobo S. WO2011058277A1. 2011.
43. Lee H, Yang Z, Wi Y, Kim TW, Verwilt P, Lee YH, et al. BODIPY-Coumarin Conjugate as an Endoplasmic Reticulum Membrane Fluidity Sensor and Its Application to ER Stress Models. *Bioconjug Chem.* 2015 Dec 16;26(12):2474–80.
44. Xu W, Zeng Z, Jiang JH, Chang YT, Yuan L. Wahrnehmung der chemischen Prozesse in einzelnen Organellen mit niedermolekularen Fluoreszenzsonden. *Angewandte Chemie.* 2016 Oct 24;128(44):13858–902.

45. Yang Z, Wi Y, Yoon YM, Verwilt P, Jang JH, Kim TW, et al. BODIPY/Nile-Red-Based Efficient FRET Pair: Selective Assay of Endoplasmic Reticulum Membrane Fluidity. *Chem Asian J.* 2016 Feb 1;11(4):527–31.
46. Yang Z, He Y, Lee JH, Chae WS, Ren WX, Lee JH, et al. A Nile Red/BODIPY-based bimodal probe sensitive to changes in the micropolarity and microviscosity of the endoplasmic reticulum. *Chemical Communications.* 2014 Sep 9 ;50(79):11672–5.
47. Pagano RE, Martin OC, Kang HC, Haugland RP. A novel fluorescent ceramide analogue for studying membrane traffic in animal cells: accumulation at the Golgi apparatus results in altered spectral properties of the sphingolipid precursor. *J Cell Biol*;113(6):1267–79.
48. Nakamura A, Takigawa K, Kurishita Y, Kuwata K, Ishida M, Shimoda Y, et al. Hoechst tagging: a modular strategy to design synthetic fluorescent probes for live-cell nucleus imaging. *Chem Commun (Camb).* 2014 May 13;50(46):6149–52.
49. B. S. Furniss AJHPWGSART. Vogel's textbook of practical organic chemistry. 5th ed. New York: John Wiley & Sons; 1989. 156–169 p.
50. Boens N, Qin W, Basarić N, Hofkens J, Ameloot M, Pouget J, et al. Fluorescence lifetime standards for time and frequency domain fluorescence spectroscopy. *Anal Chem.* 2007 Mar 5;79(5):2137–49.
51. Wagner RW, Lindsey JS. Boron-dipyrromethene dyes for incorporation in synthetic multi-pigment light-harvesting arrays. *Pure and Applied Chemistry.* 1996 Jan 1;68(7):1373–80.
52. Biaggi C, Benaglia M, Raimondi L, Cozzi F. Organocatalytic synthesis of dipyrromethanes by the addition of N-methylpyrrole to aldehydes. *Tetrahedron.* 2006 Dec 25;62(52):12375–9.
53. Mandal PK, McMurray JS. Pd-C-induced catalytic transfer hydrogenation with triethylsilane. *Journal of Organic Chemistry.* 2007 Aug 17;72(17):6599–601.
54. Han SY, Kim YA. Tetrahedron report number 672 Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis.
55. Freedman HH, Dubois RA. An improved Williamson ether synthesis using phase transfer catalysis. *Tetrahedron Lett.* 1975 Jan 1;16(38):3251–4.

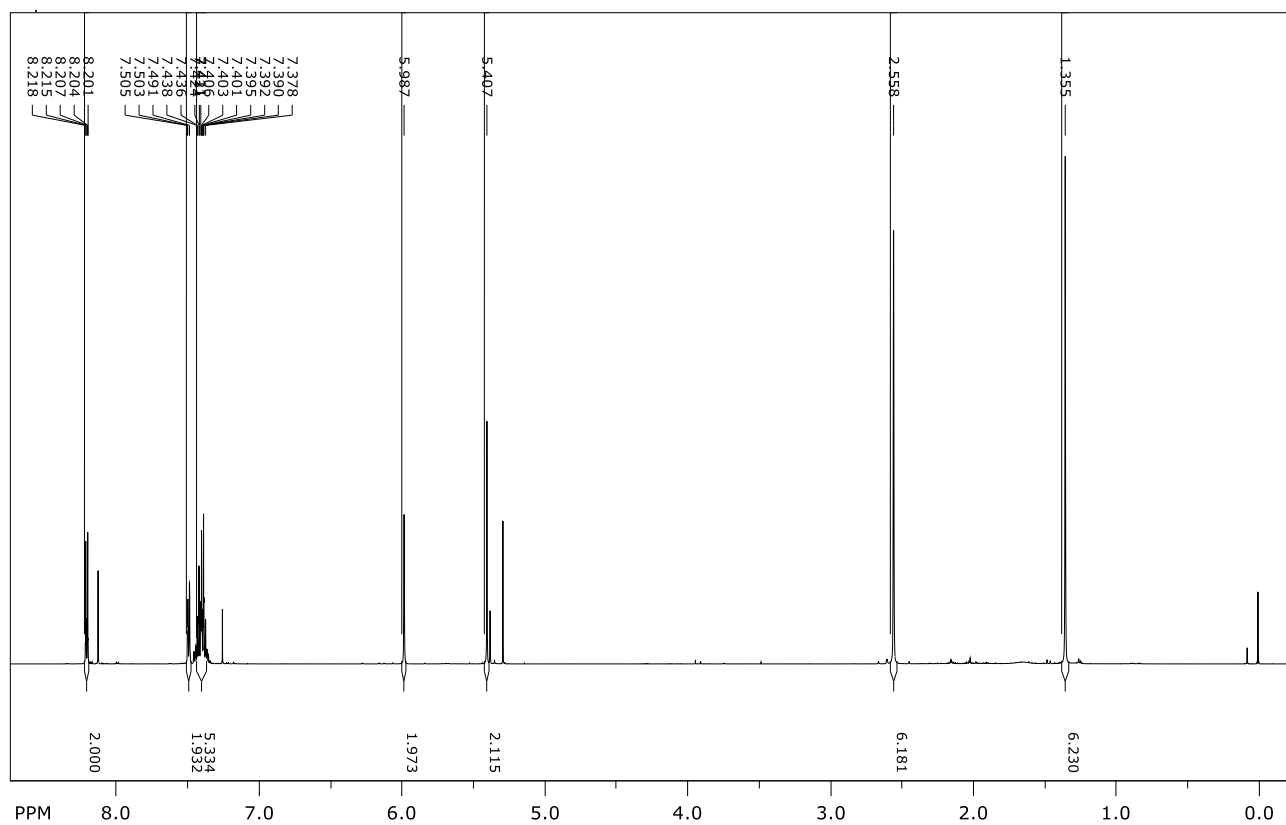
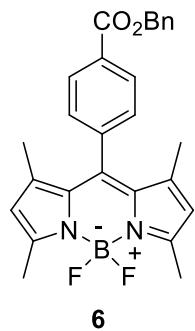
56. Appel R. Tertiary Phosphane/Tetrachloromethane, a Versatile Reagent for Chlorination, Dehydration, and P ? N Linkage. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1975 Dec 1;14(12):801–11.
57. Loudet A, Burgess K. BODIPY dyes and their derivatives: Syntheses and spectroscopic properties. Vol. 107, *Chemical Reviews*. 2007. p. 4891–932.
58. Banfi S, Nasini G, Zaza S, Caruso E. Synthesis and photo-physical properties of a series of BODIPY dyes. *Tetrahedron*. 2013 Jun 17;69(24):4845–56.
59. Boens N, Qin W, Baruah M, De Borggraeve WM, Filarowski A, Smisdom N, et al. Rational design, synthesis, and spectroscopic and photophysical properties of a visible-light-excitable, ratiometric, fluorescent near-neutral pH indicator based on BODIPY. *Chemistry - A European Journal*. 2011 Sep 19;17(39):10924–34.
60. Telegin FY, Marfin YS. New insights into quantifying the solvatochromism of BODIPY based fluorescent probes. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2021 Jul 5;255:119683.
61. Telegin FY, Karpova VS, Makshanova AO, Astrakhantsev RG, Marfin YS. Solvatochromic Sensitivity of BODIPY Probes: A New Tool for Selecting Fluorophores and Polarity Mapping. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 1;24(2):1217
62. Rurack K, Kollmannsberger M, Daub J. A highly efficient sensor molecule emitting in the near infrared (NIR): 3,5-distyryl-8-(p-dimethylaminophenyl)difluoroboradiaza-s-indacene. *New Journal of Chemistry*. 2001 Jan 1;25(2):289–92.
63. Kollmannsberger M, Rurack K, Resch-Genger U, Daub J. Ultrafast Charge Transfer in Amino-Substituted Boron Dipyrromethene Dyes and Its Inhibition by Cation Complexation: A New Design Concept for Highly Sensitive Fluorescent Probes. *Journal of Physical Chemistry A* . 1998 Dec 10;102(50):10211–20.

8. Prilozi

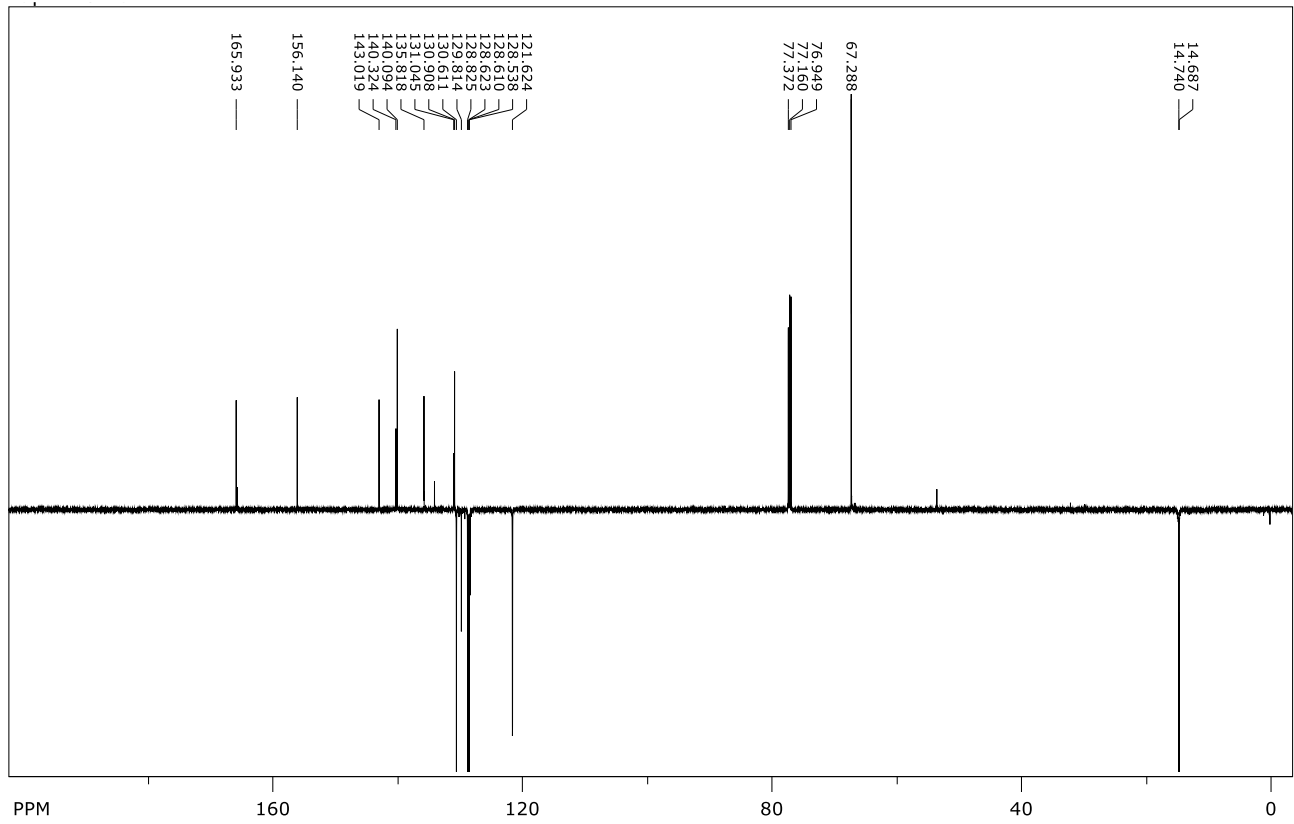
8.1. NMR spektri



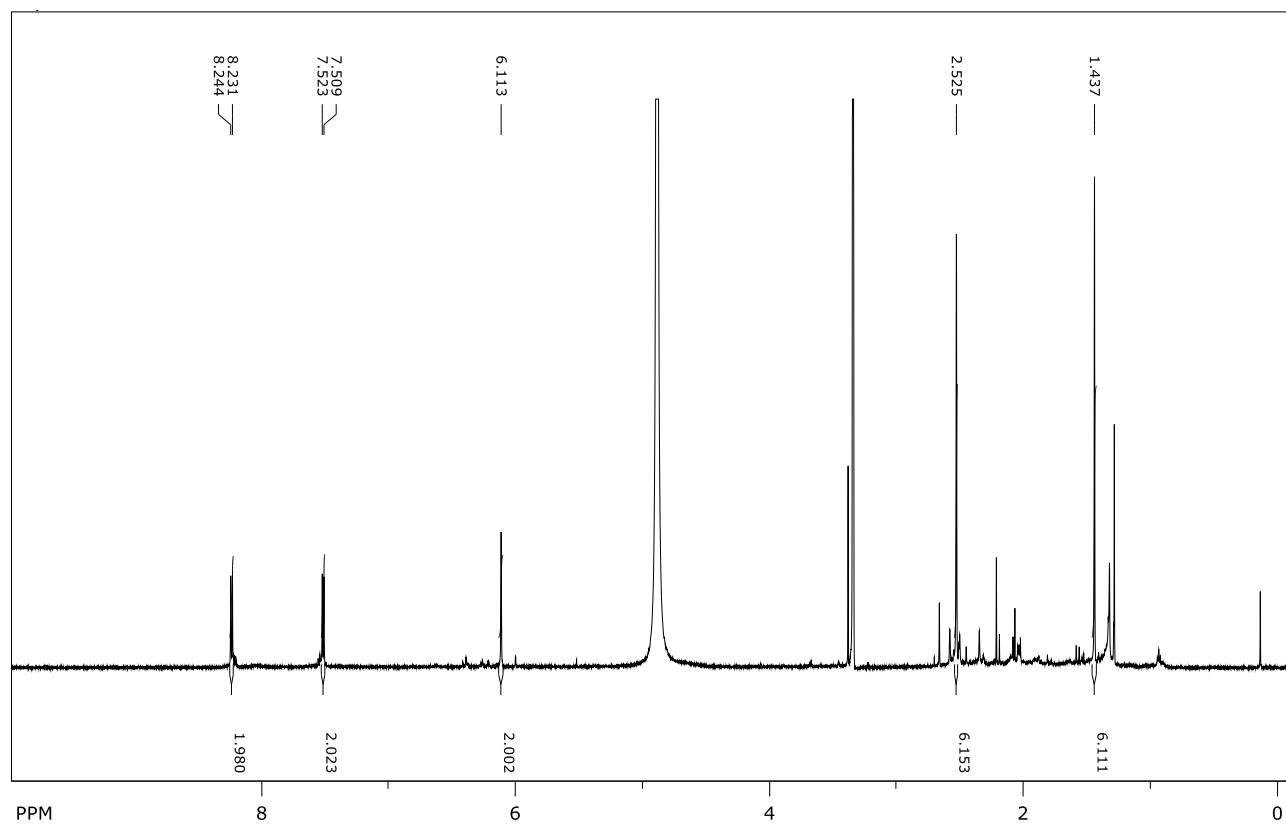
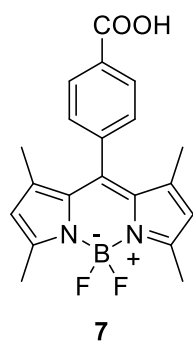
Slika 19. ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) spekter spoja **4**.



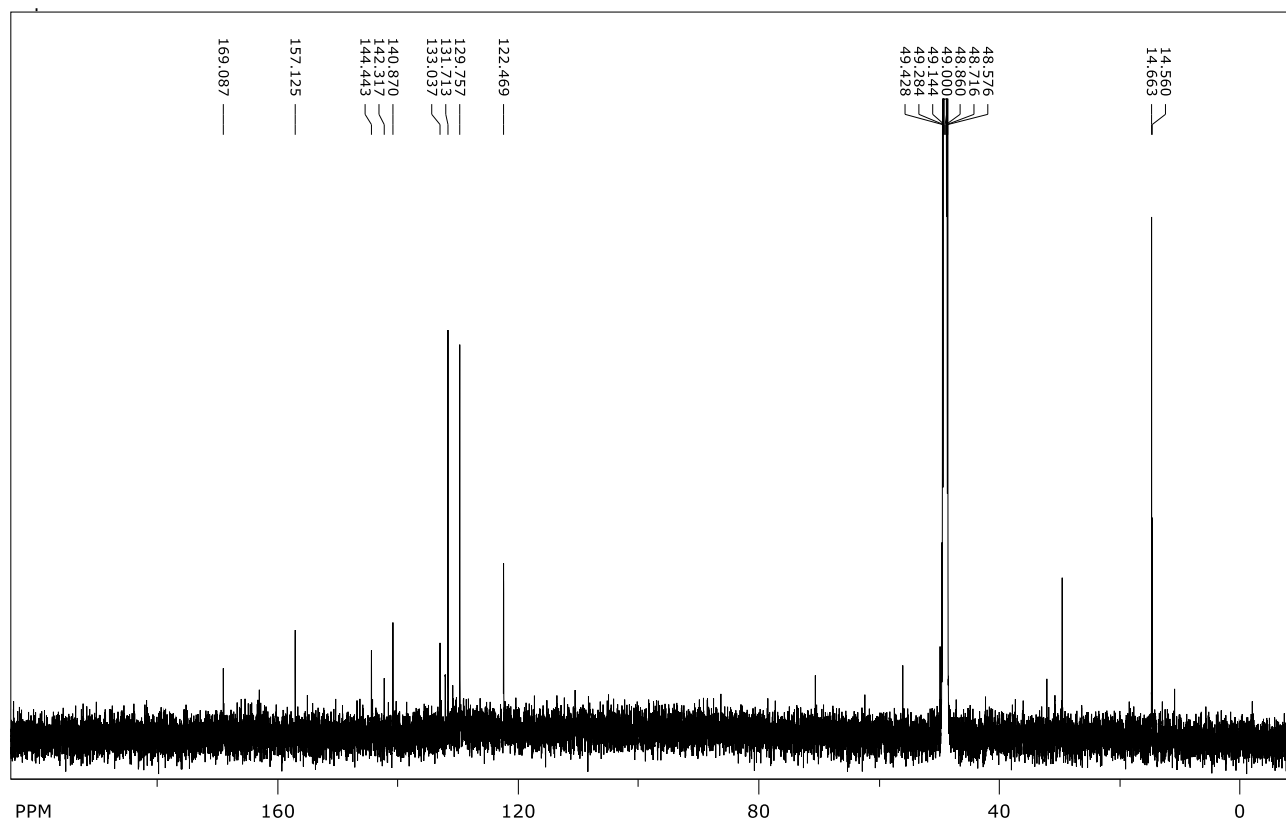
Slika 20. ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) spektar spoja **6**.



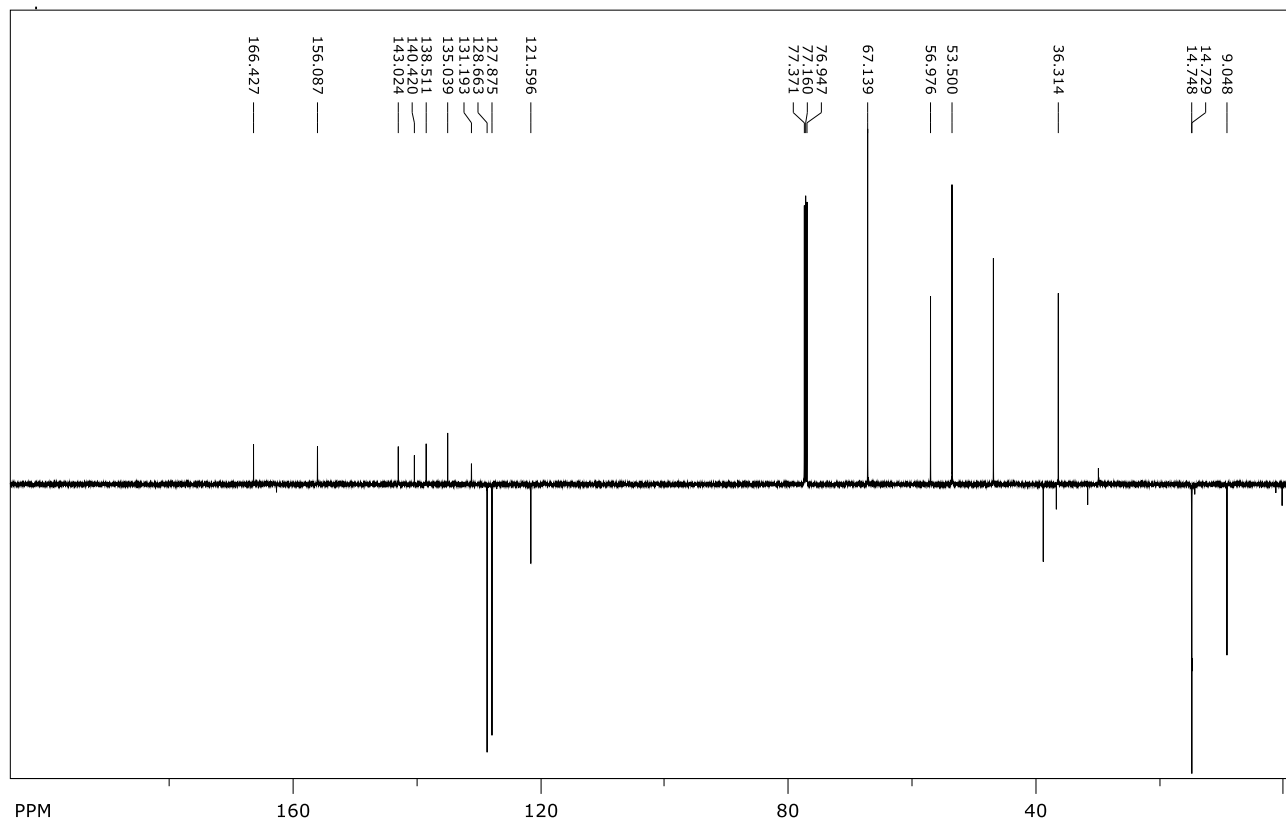
Slika 21. ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) spektar spoja **6**.



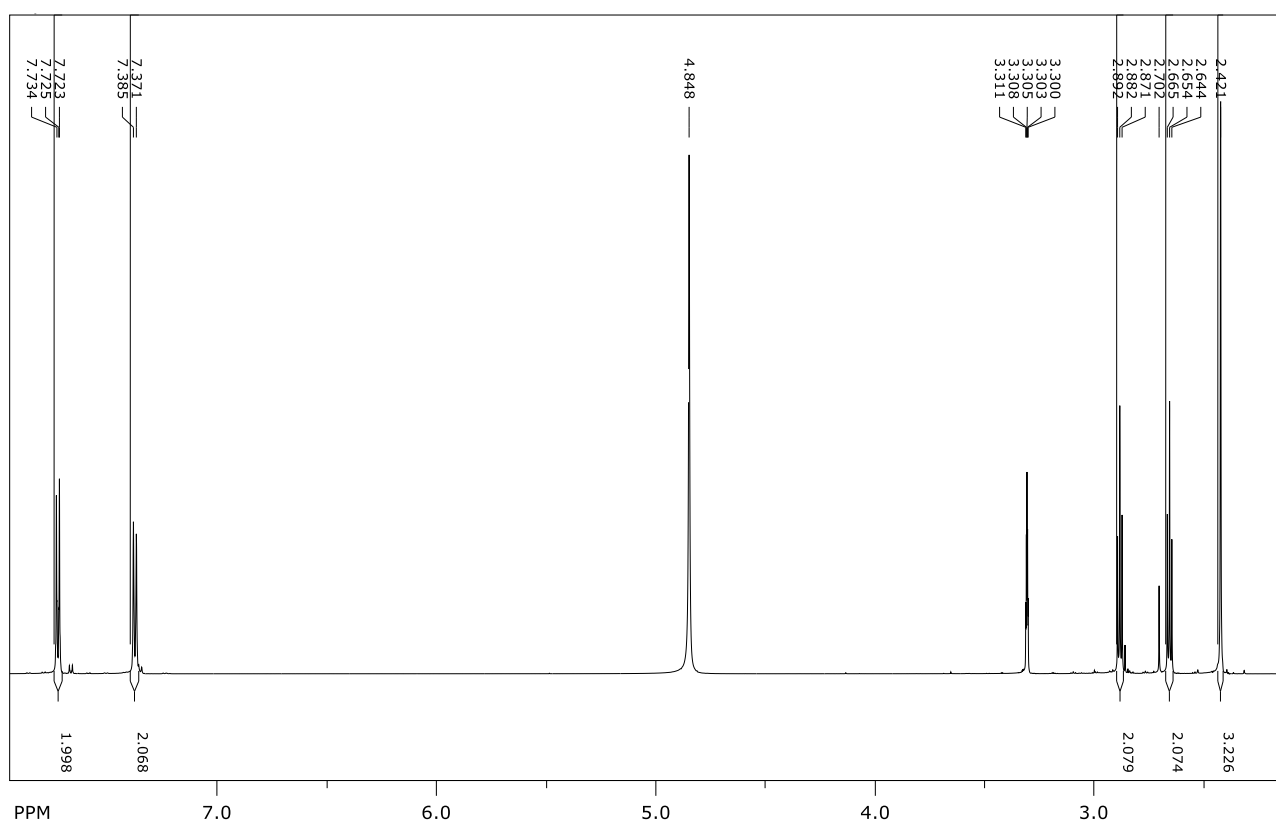
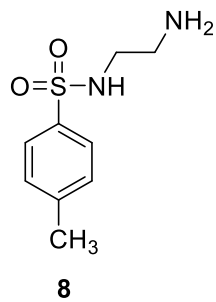
Slika 22. ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) spektar spoja **7**.



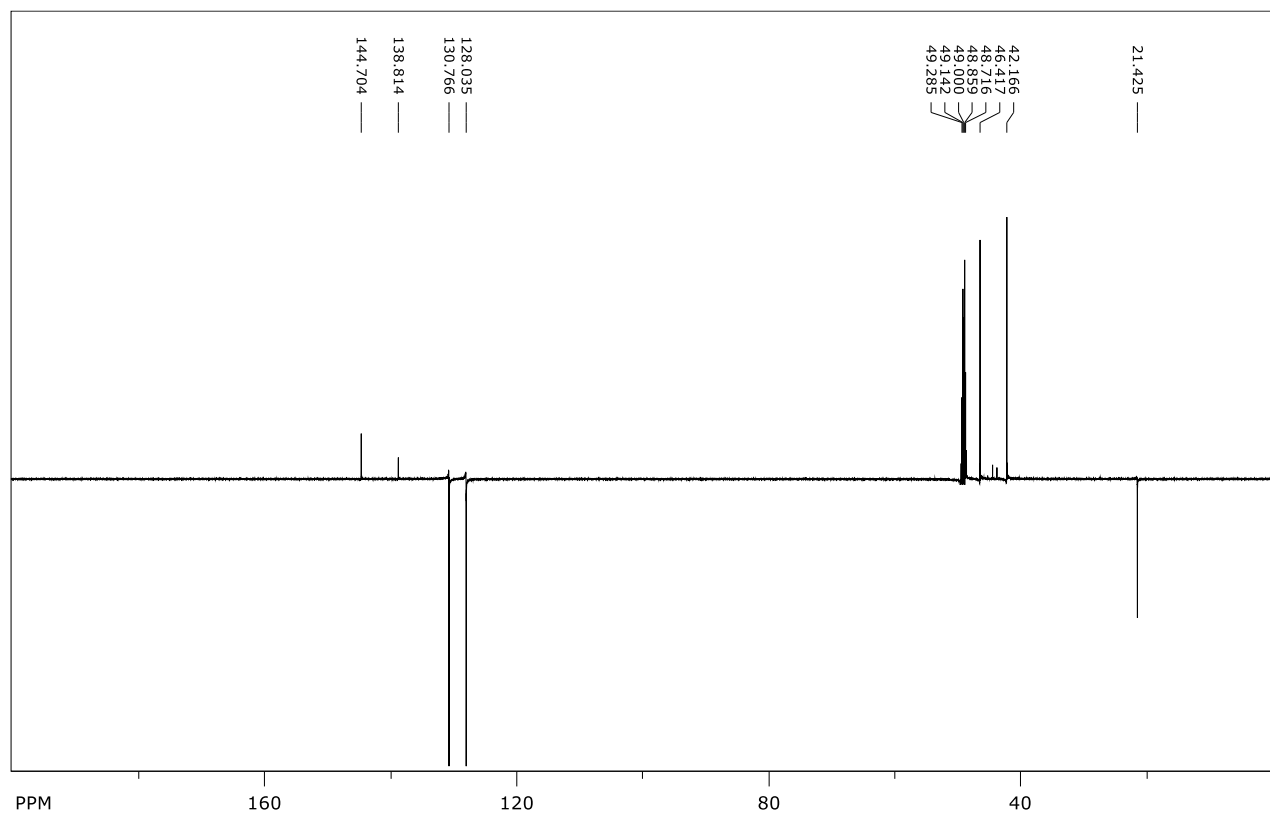
Slika 23. ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) spektar spoja **7**.



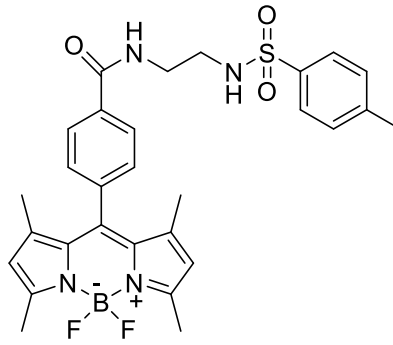
Slika 25. ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) spektar spoja **1**.



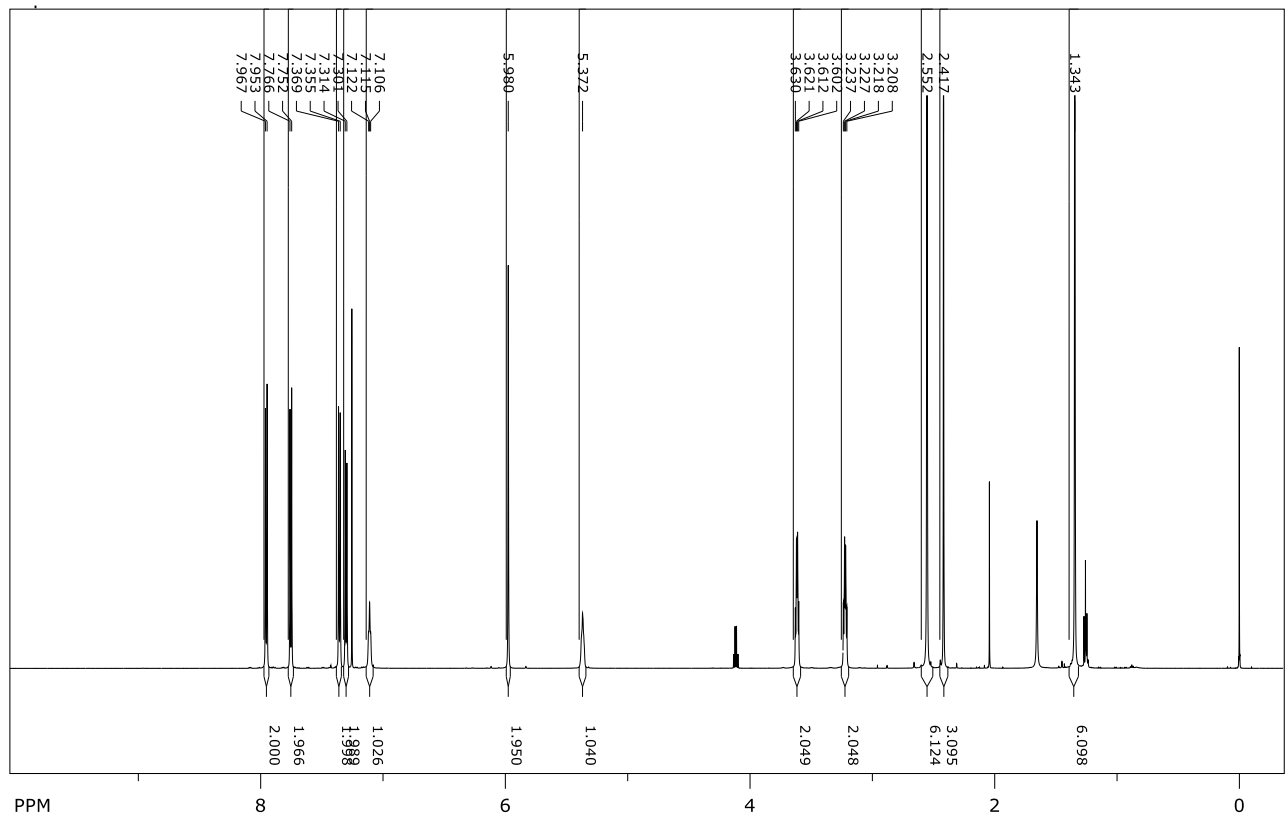
Slika 26. ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) spektar spoja **8**.



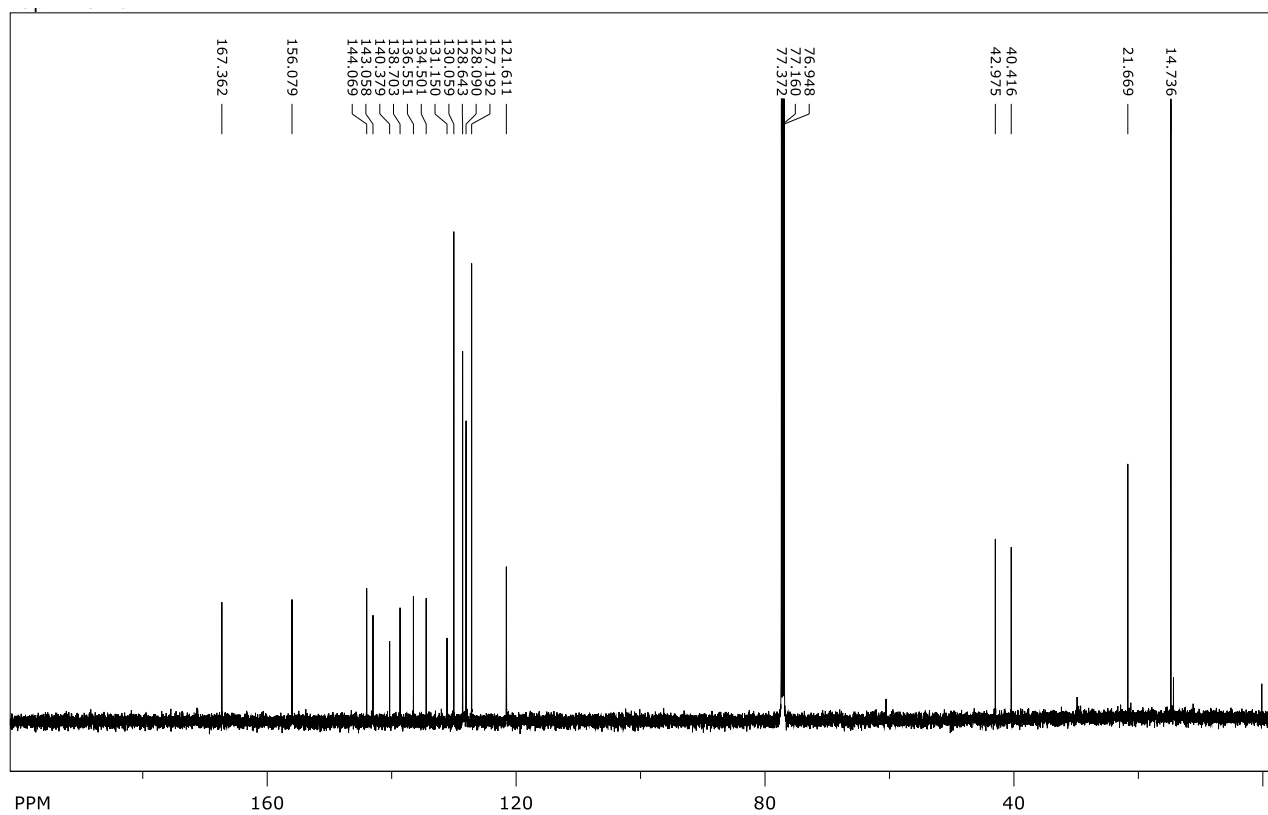
Slika 27. ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz) spektar spoja **8**.



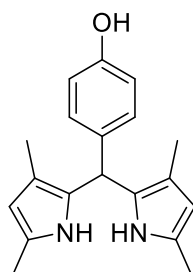
2



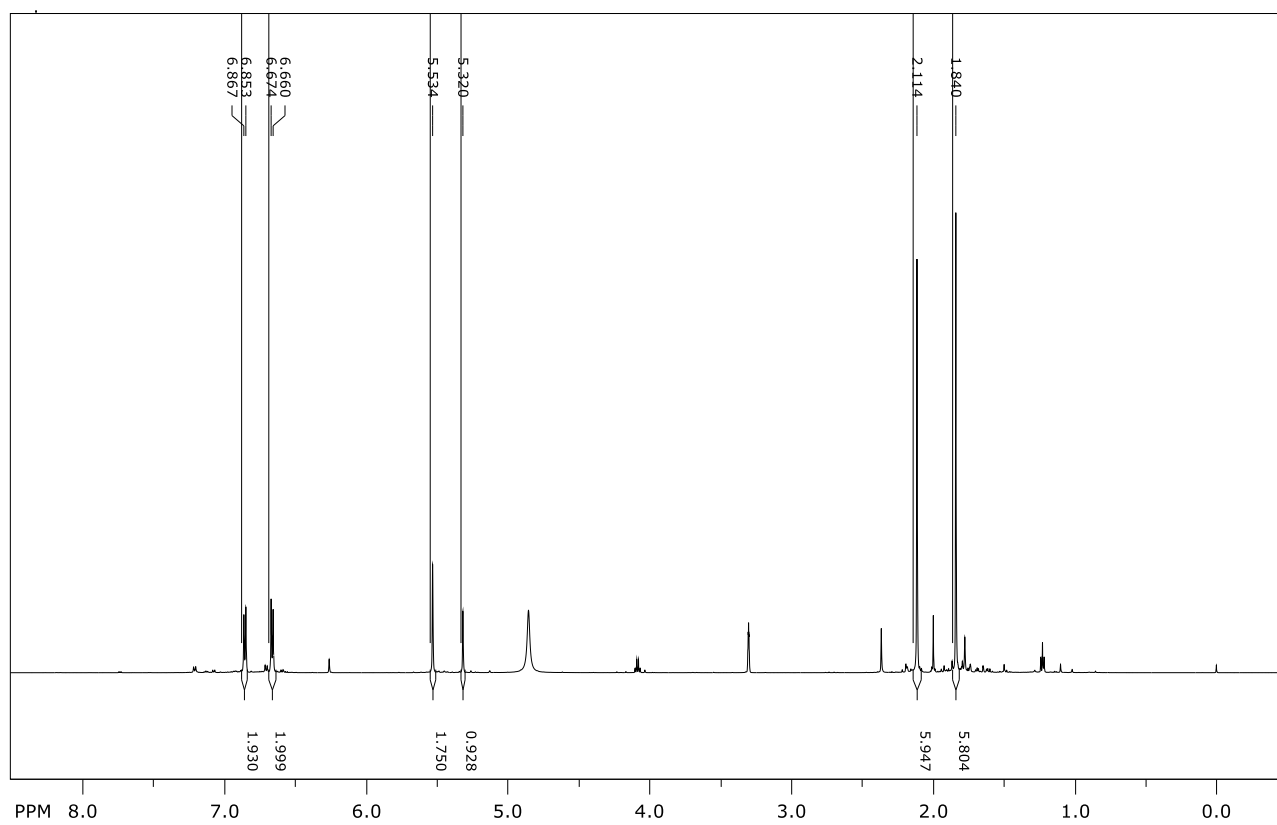
Slika 28. ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) spektar spoja 2.



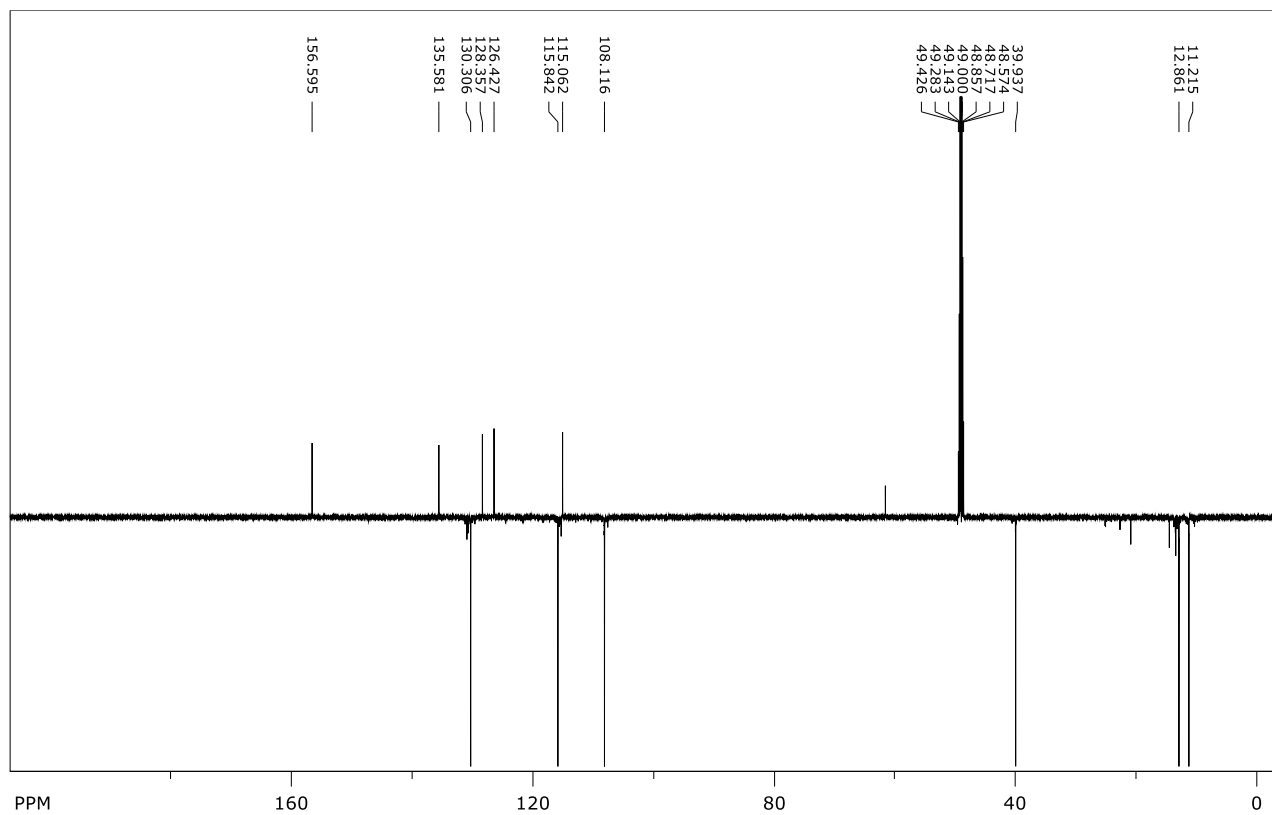
Slika 29. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) spektar spoja **2**.



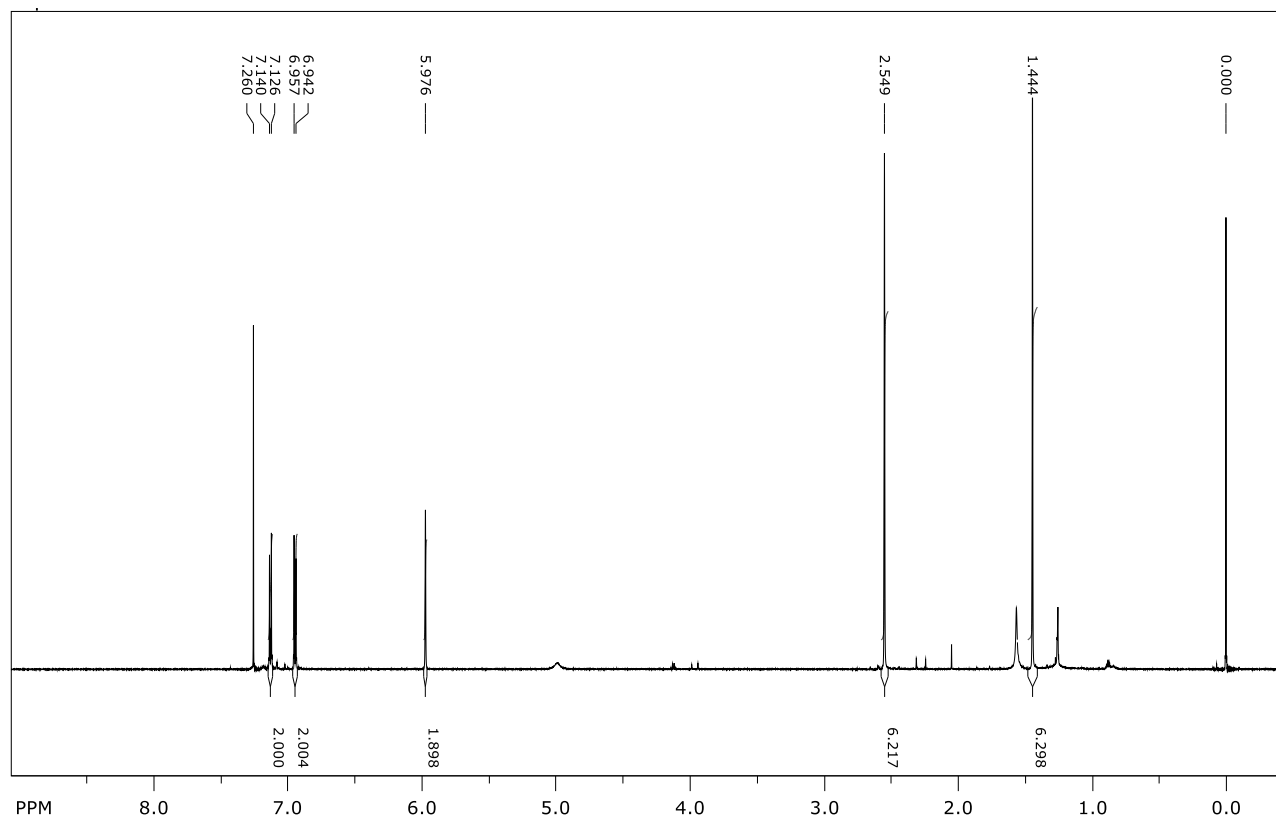
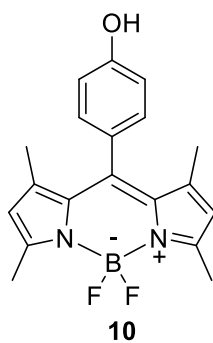
9



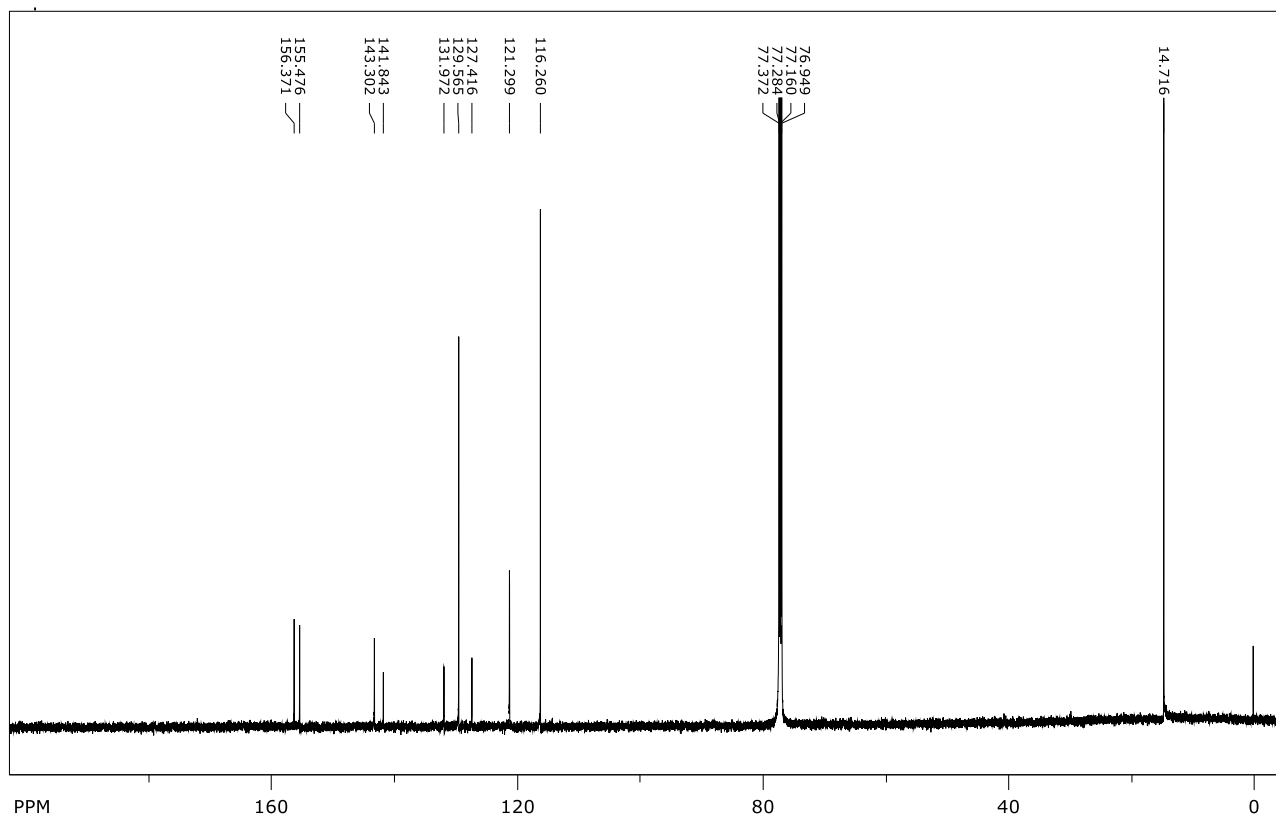
Slika 30. ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) spektar spoja **9**.



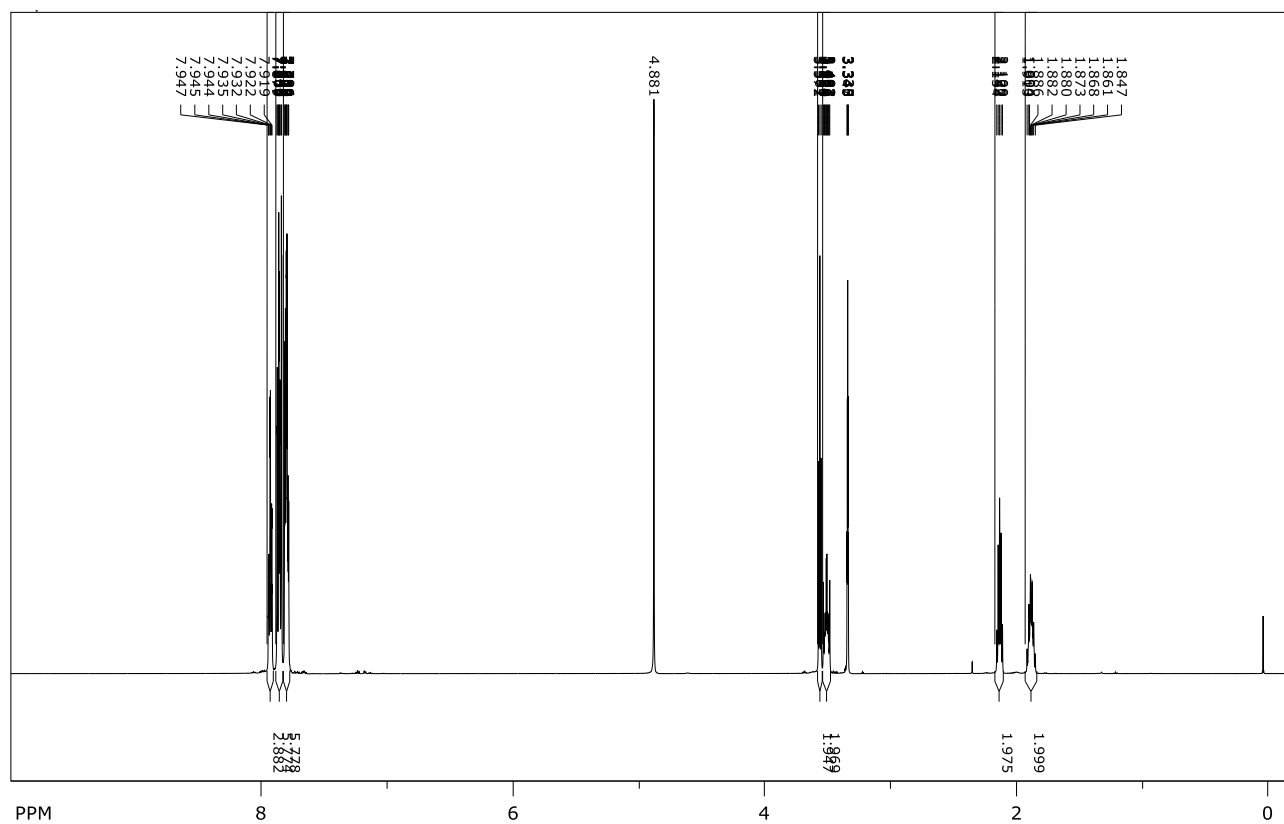
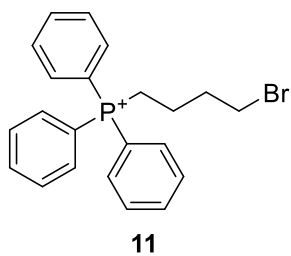
Slika 31. ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) spektar spoja **9**.



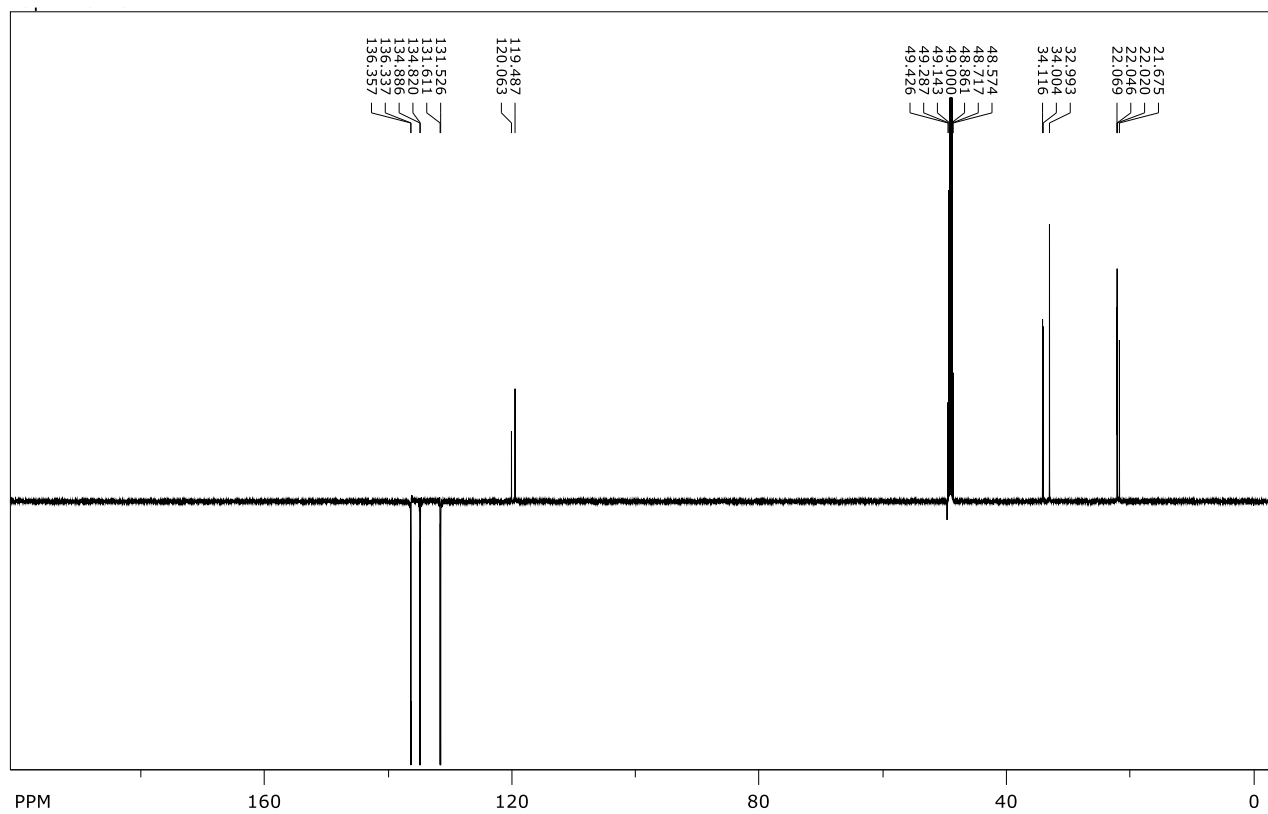
Slika 32. ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) spektar spoja **10**.



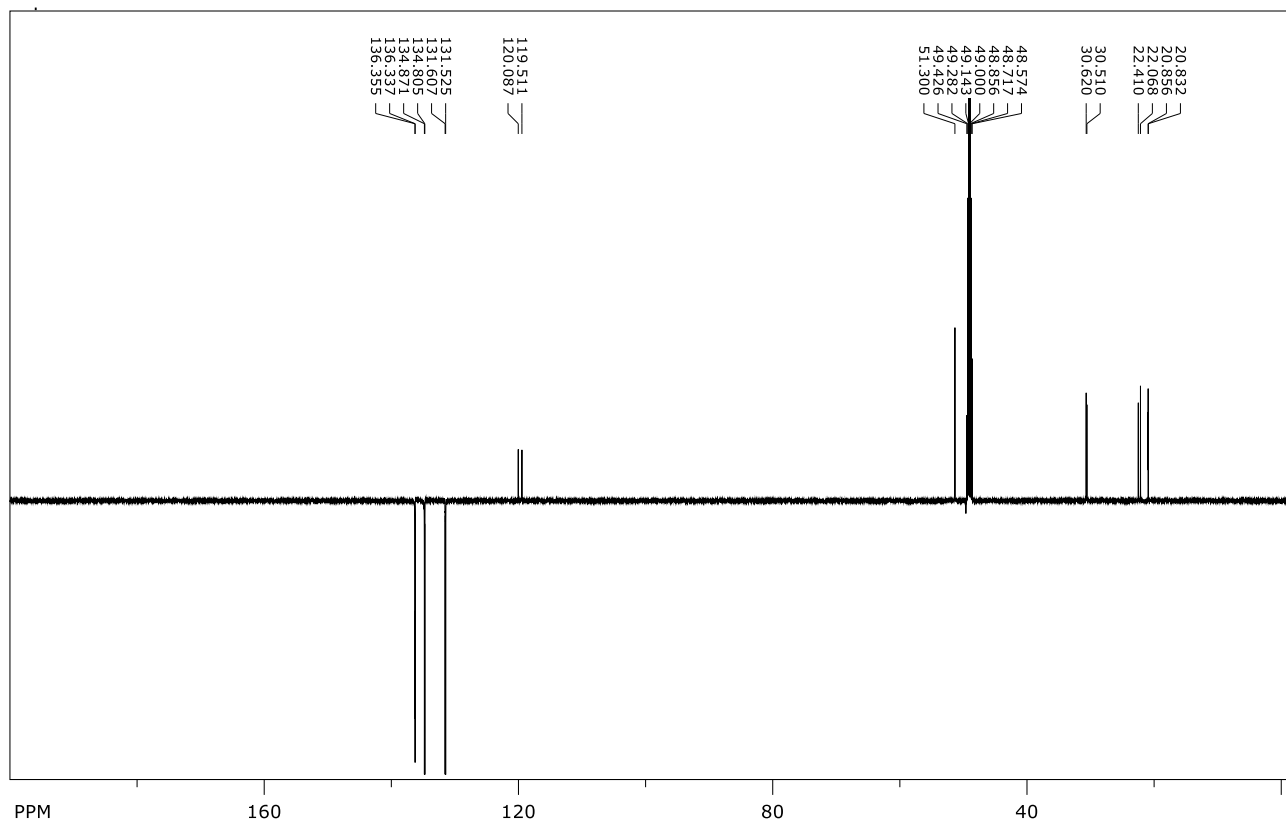
Slika 33. ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) spektar spoja **10**.



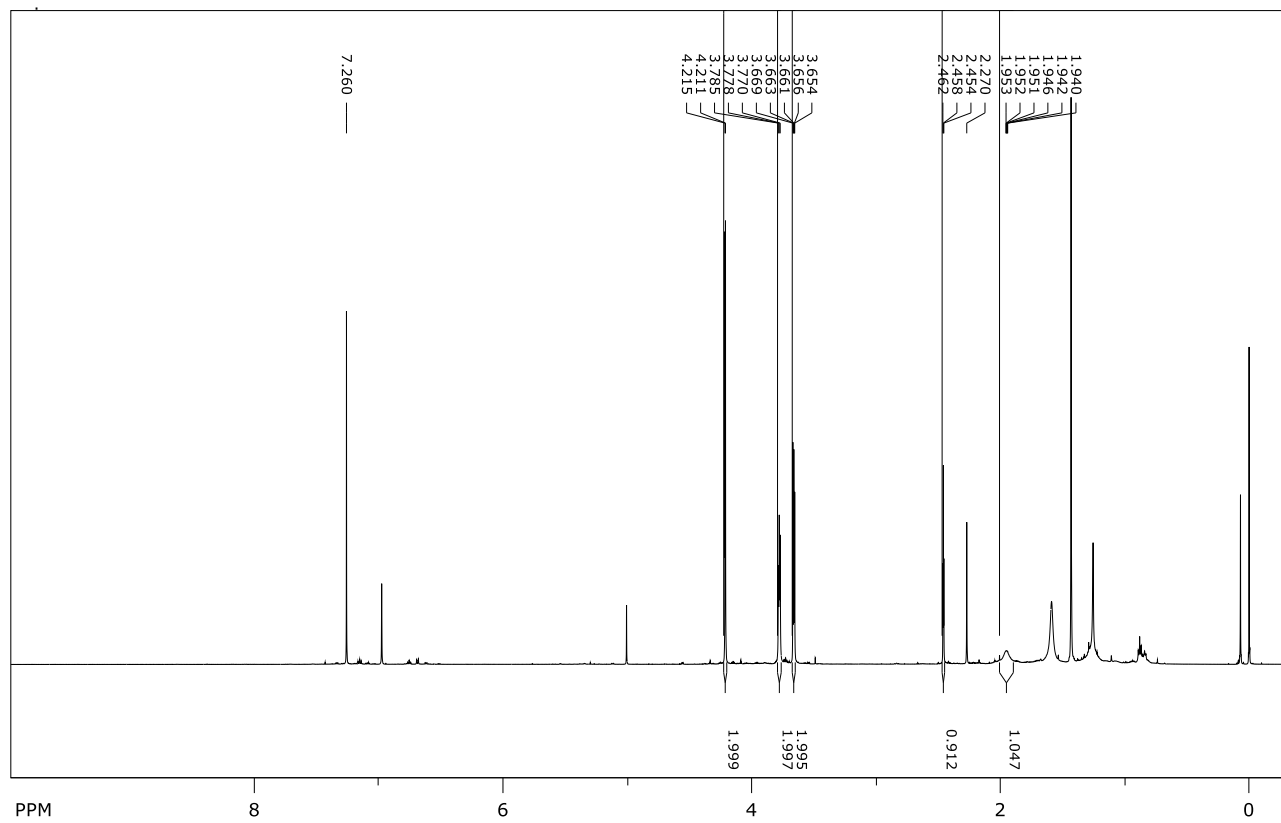
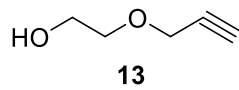
Slika 34. ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) spektar spoja **11**.



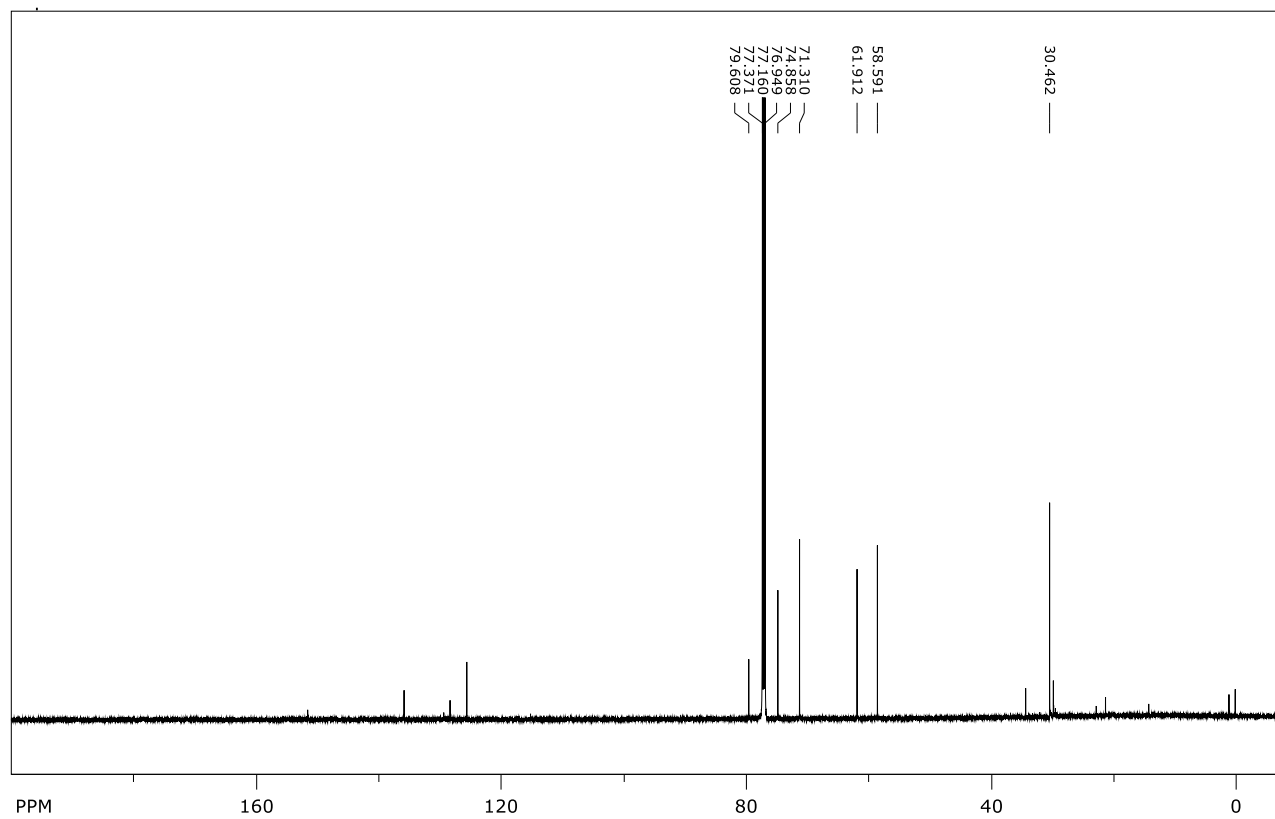
Slika 35. ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz) spektar spoja **11**.



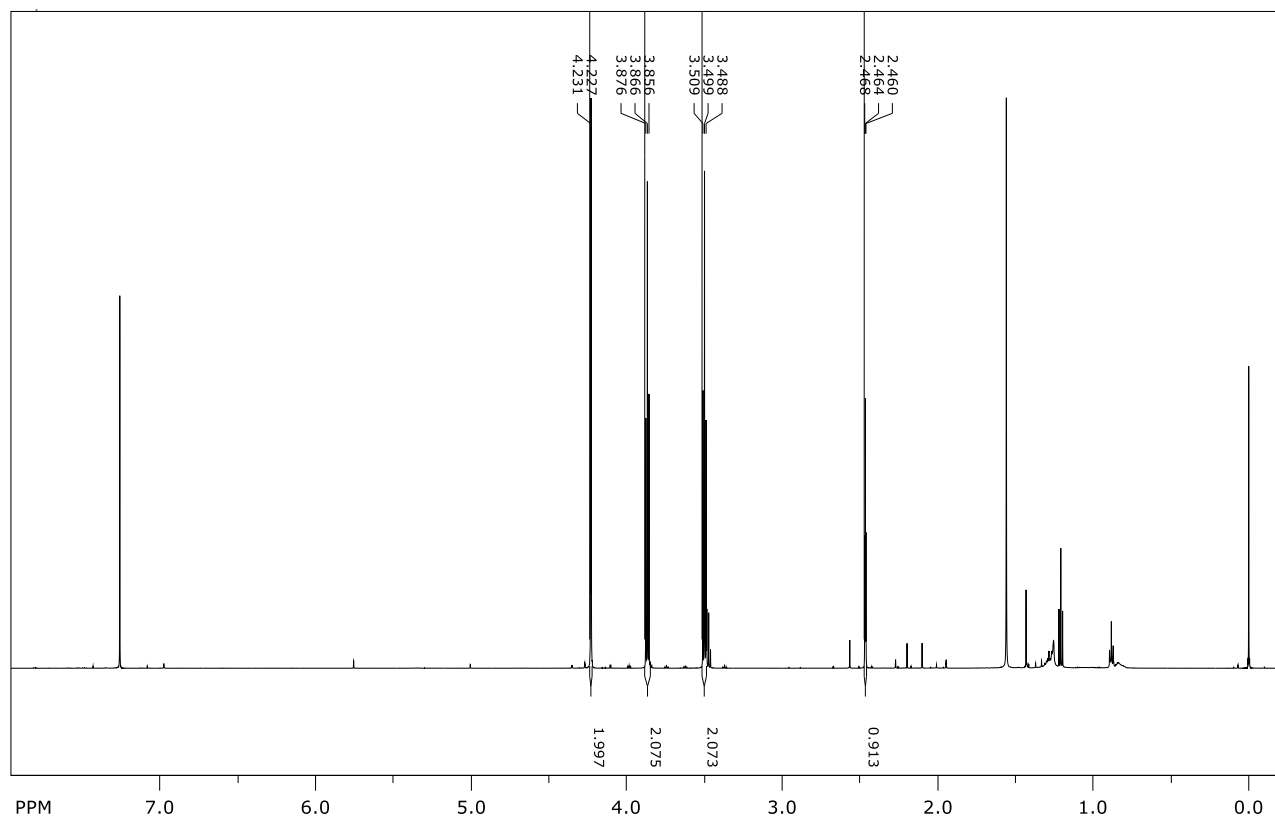
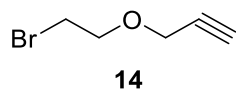
Slika 37. ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) spektar spoja **12**.



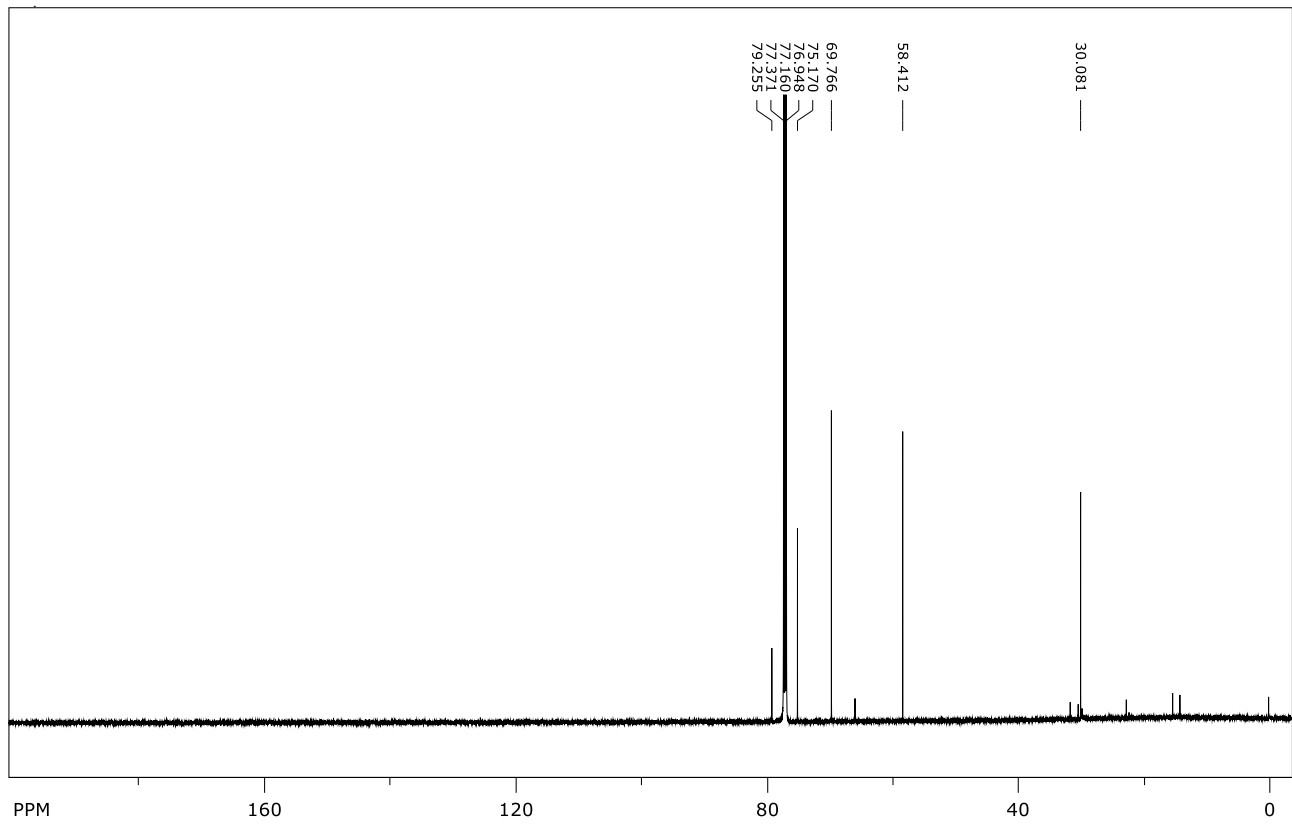
Slika 38. ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) spektar spoja **13**.



Slika 39. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) spektar spoja **13**.

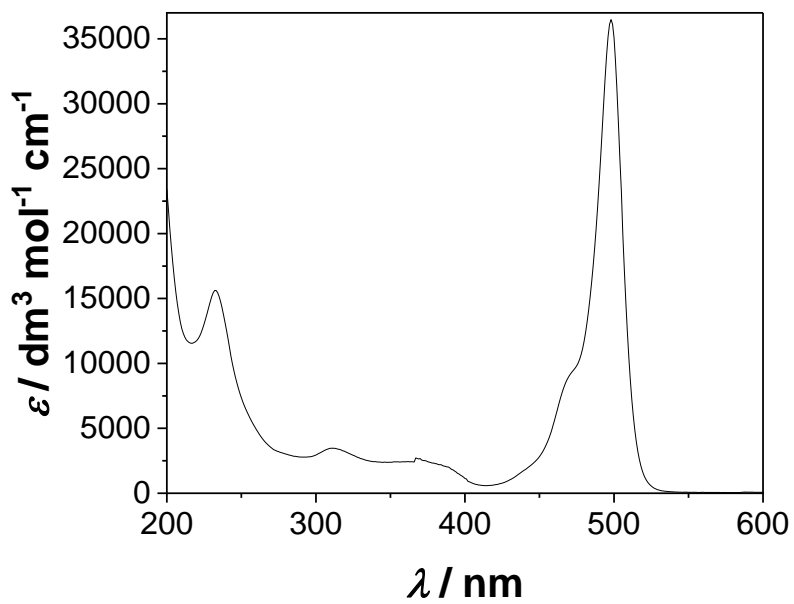


Slika 40. ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) spektar spoja **14**.

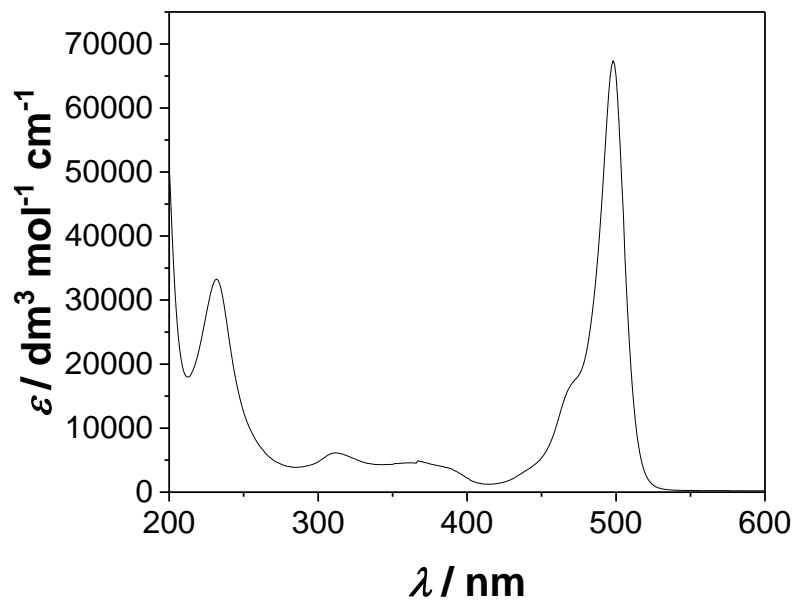


Slika 41. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) spektar spoja **14**.

8.2. UV-Vis spektri

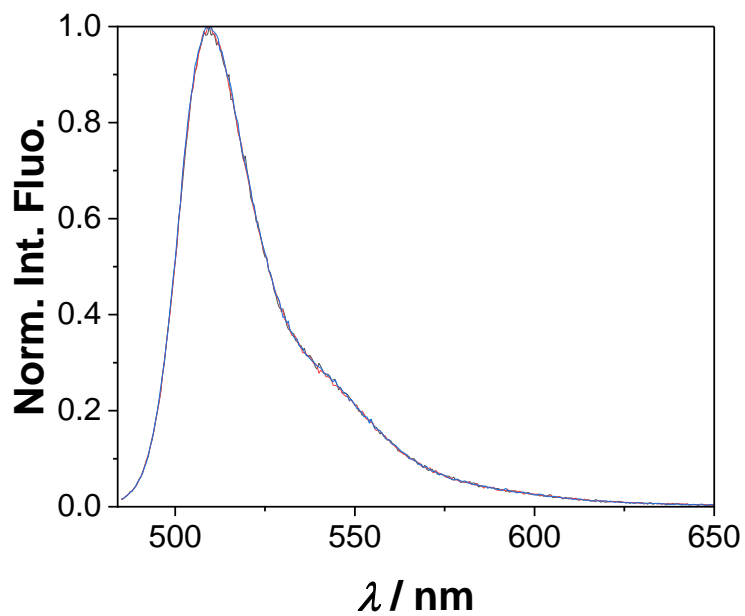


Slika 42. UV-Vis spektar spoja **1** u acetonitrilu.

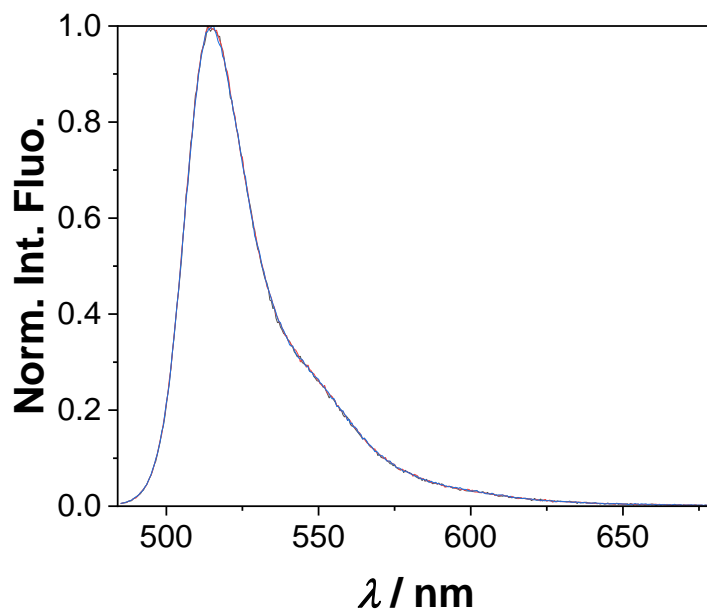


Slika 43. UV-Vis spektar spoja **2** u acetonitrilu.

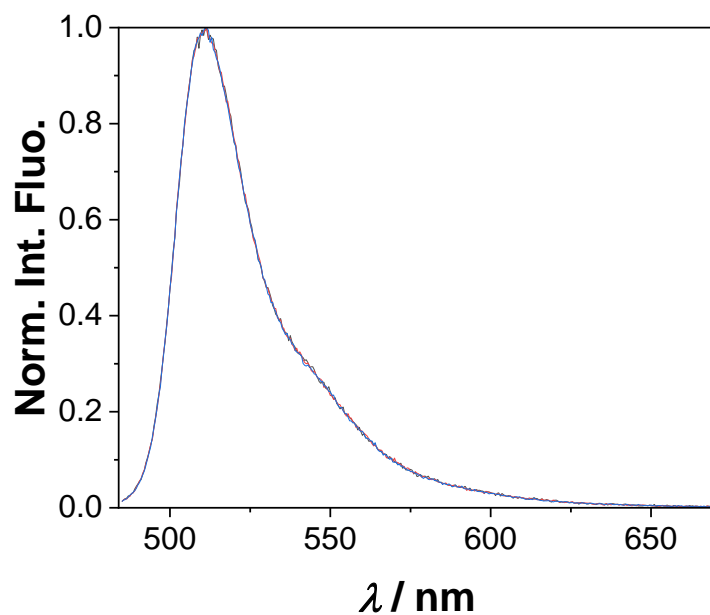
8.3. Fluorescencijski spektri



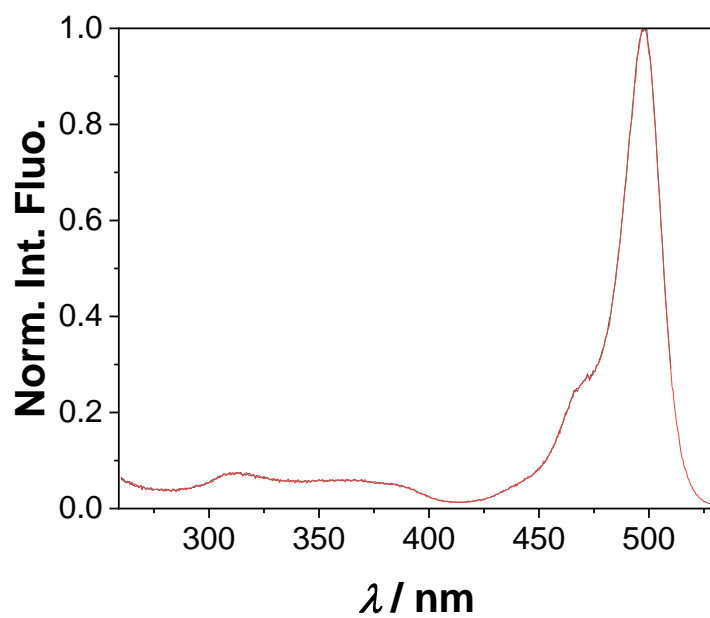
Slika 44. Normalizirani emisijski spektar spoja **1** u acetonitrilu ($\lambda_{\text{ex}}=460,470,480$).



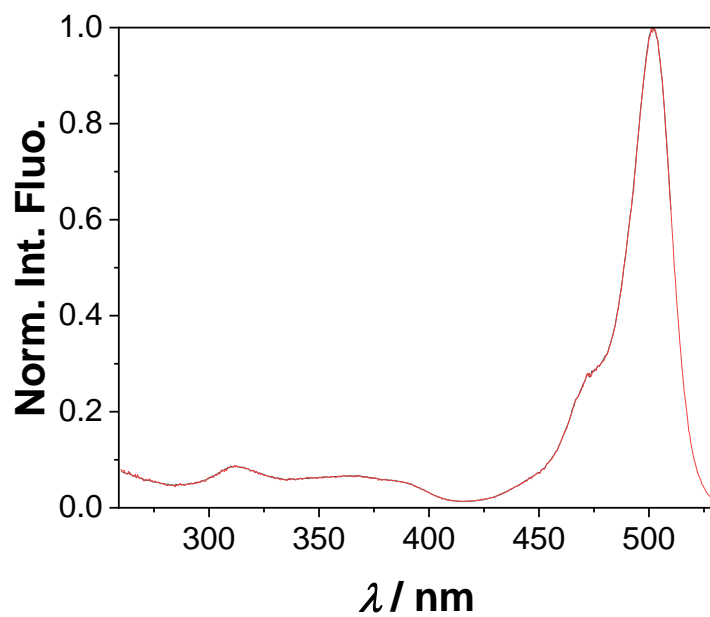
Slika 45. Normalizirani emisijski spektar spoja **1** u diklormetanu ($\lambda_{\text{ex}}=460,470,480$).



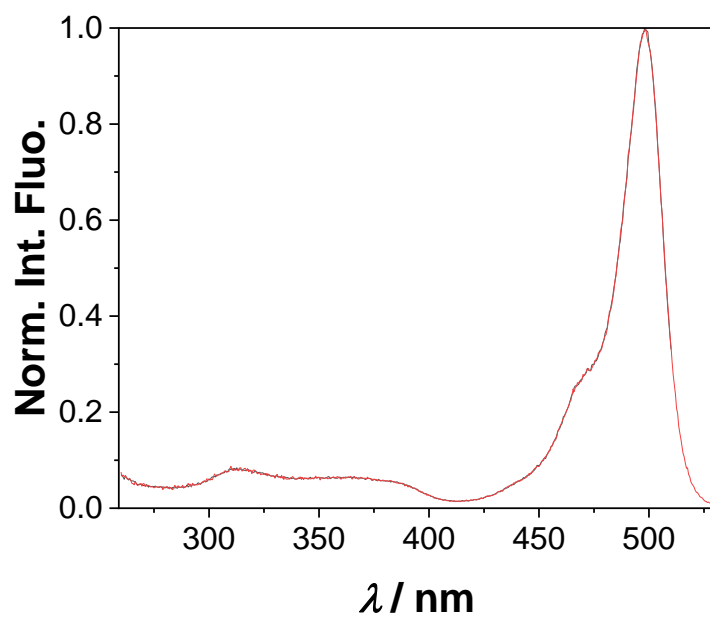
Slika 46. Normalizirani emisijski spektar spoja **1** u vodi ($\lambda_{\text{ex}}=460,470,480$).



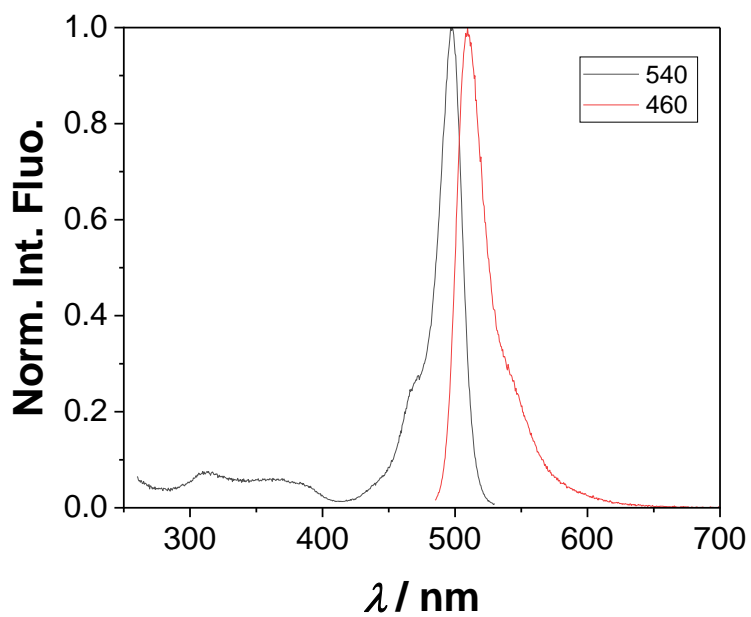
Slika 47. Normalizirani ekscitacijski spektar spoja **1** u acetonitrilu ($\lambda_{\text{em}}=520,540$).



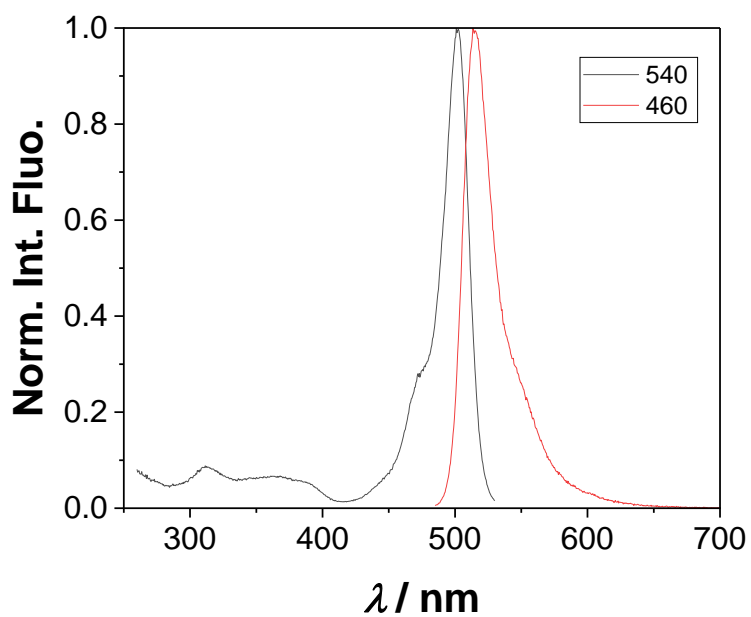
Slika 48. Normalizirani ekscitacijski spektar spoja **1** u diklormetanu ($\lambda_{em}=520,540$).



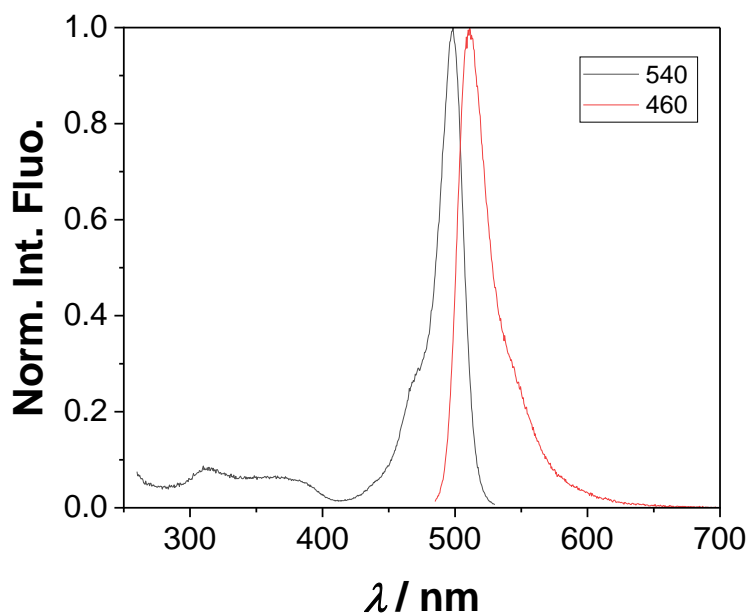
Slika 49. Normalizirani ekscitacijski spektar spoja **1** u vodi ($\lambda_{em}=520,540$).



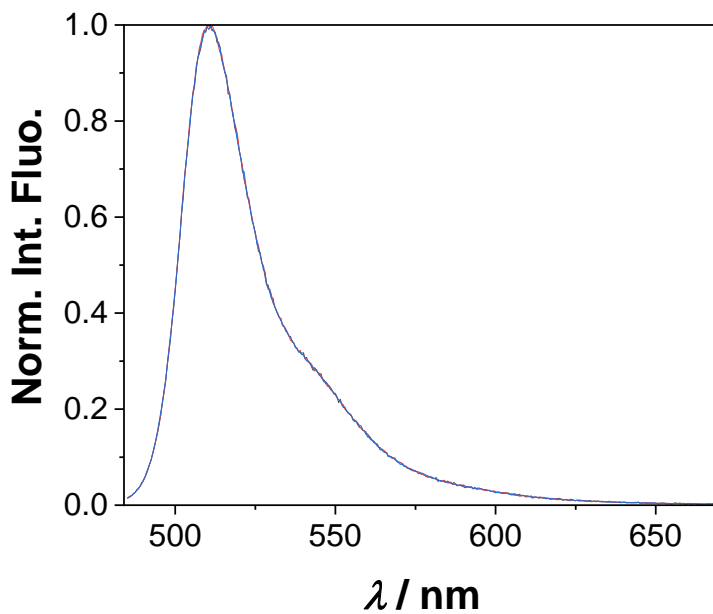
Slika 50. Normalizirani ekscitacijski i emisijski spektri spoja **1** u acetonitrilu.



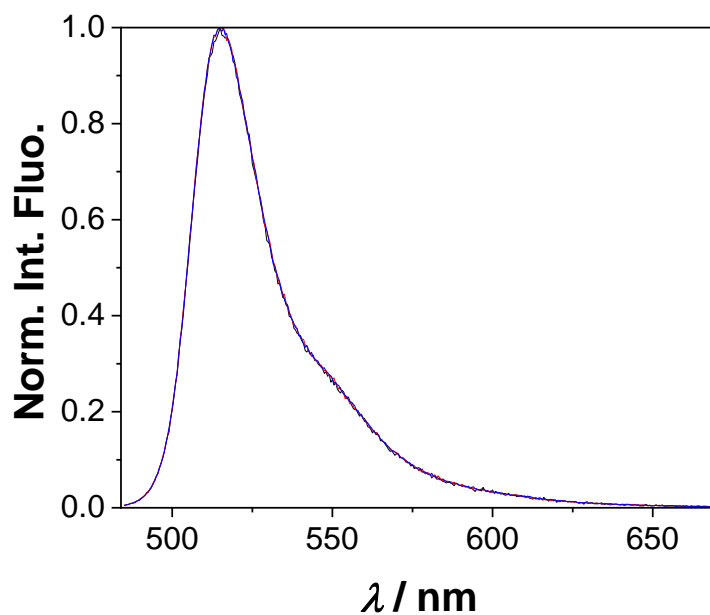
Slika 51. Normalizirani ekscitacijski i emisijski spektri spoja **1** u diklormetanu.



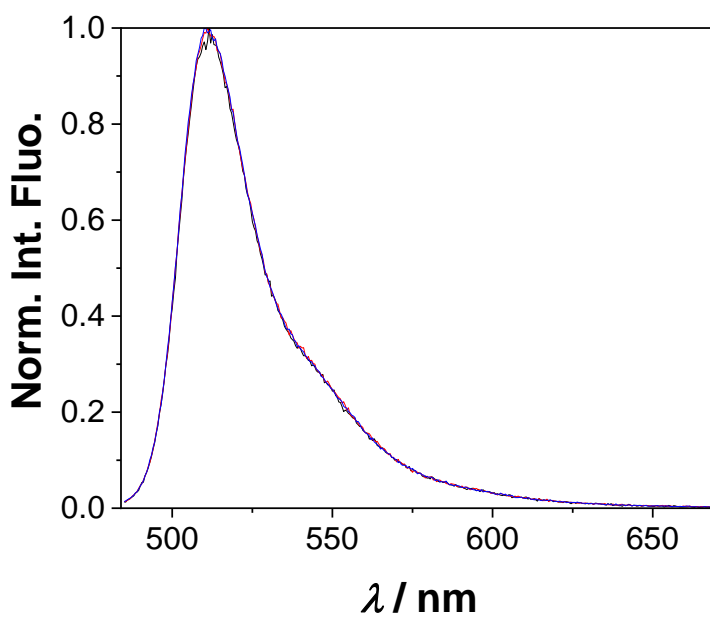
Slika 52. Normalizirani ekscitacijski i emisijski spektri spoja **1** u vodi.



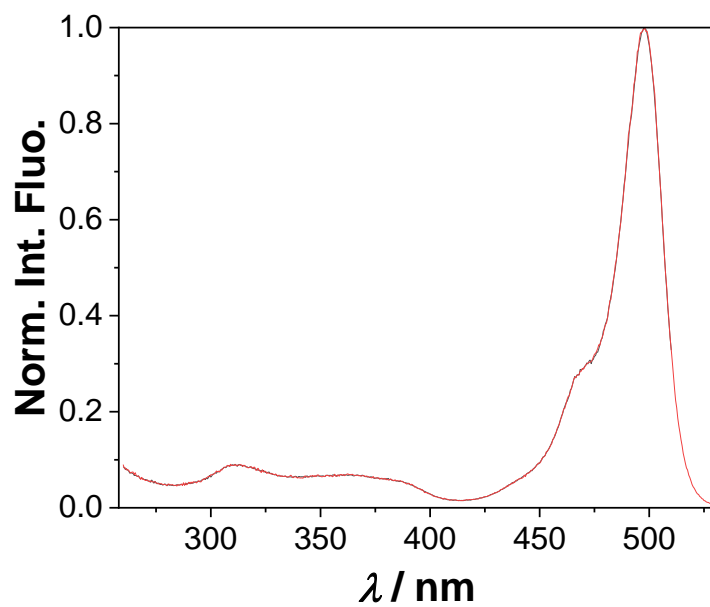
Slika 53. Normalizirani emisijski spektar spoja **2** u acetonitrilu ($\lambda_{\text{ex}}=460,470,480$).



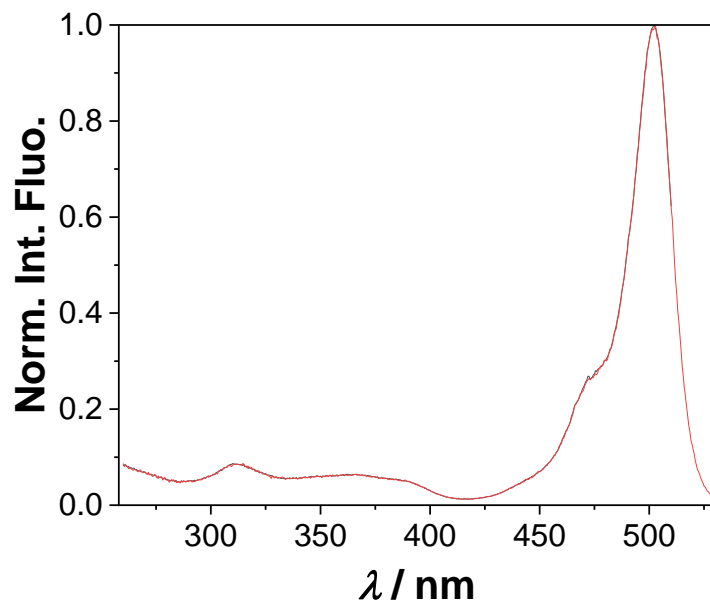
Slika 54. Normalizirani emisijski spektar spoja **2** u diklormetanu ($\lambda_{\text{ex}}=460,470,480$).



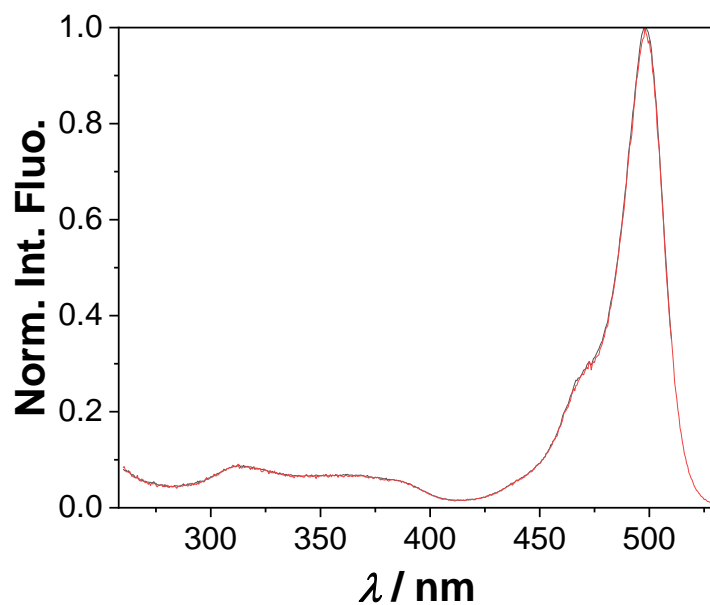
Slika 55. Normalizirani emisijski spektar spoja **2** u vodi ($\lambda_{\text{ex}}=460,470,480$).



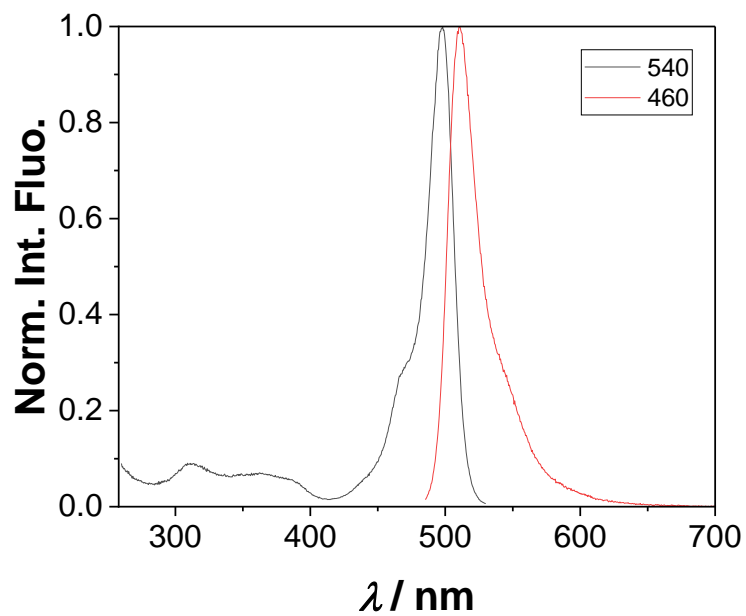
Slika 56. Normalizirani ekscitacijski spektar spoja **2** u acetonitrilu ($\lambda_{\text{em}}=520,540$).



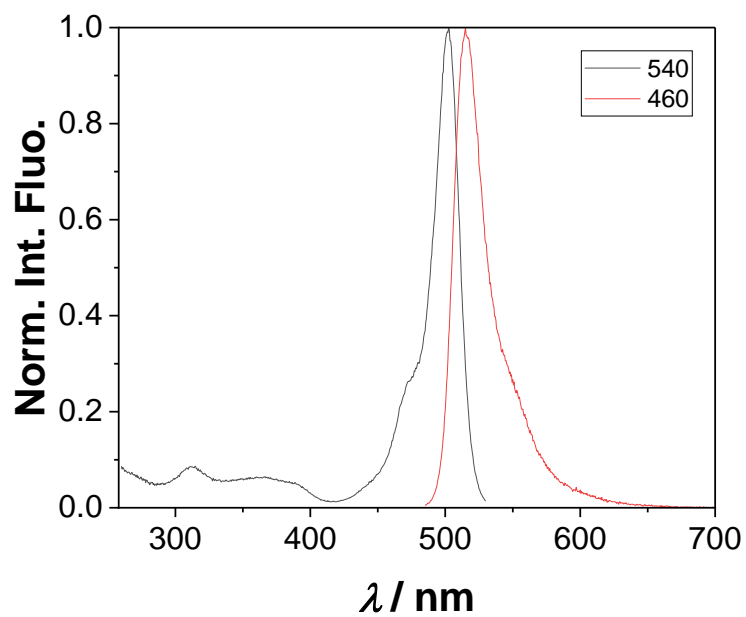
Slika 57. Normalizirani ekscitacijski spektar spoja **2** u diklormetanu ($\lambda_{\text{em}}=520,540$).



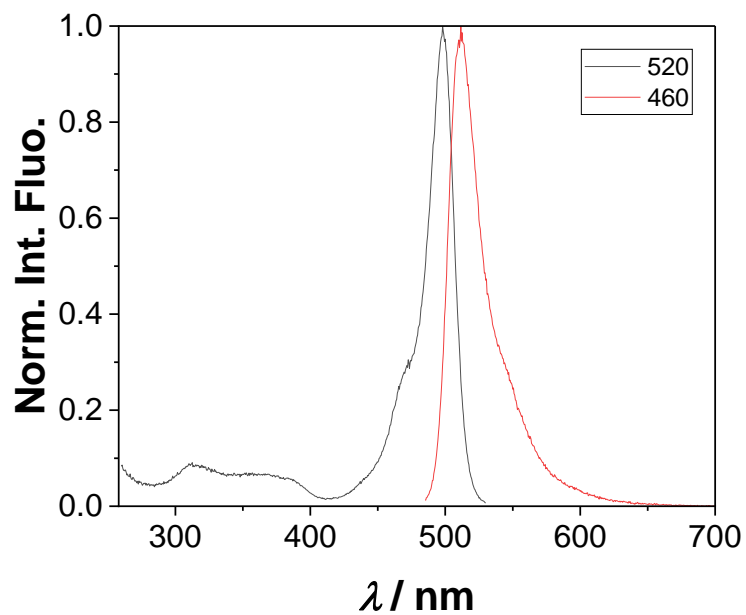
Slika 58. Normalizirani ekscitacijski spektar spoja **2** u vodi ($\lambda_{em}=520,540$).



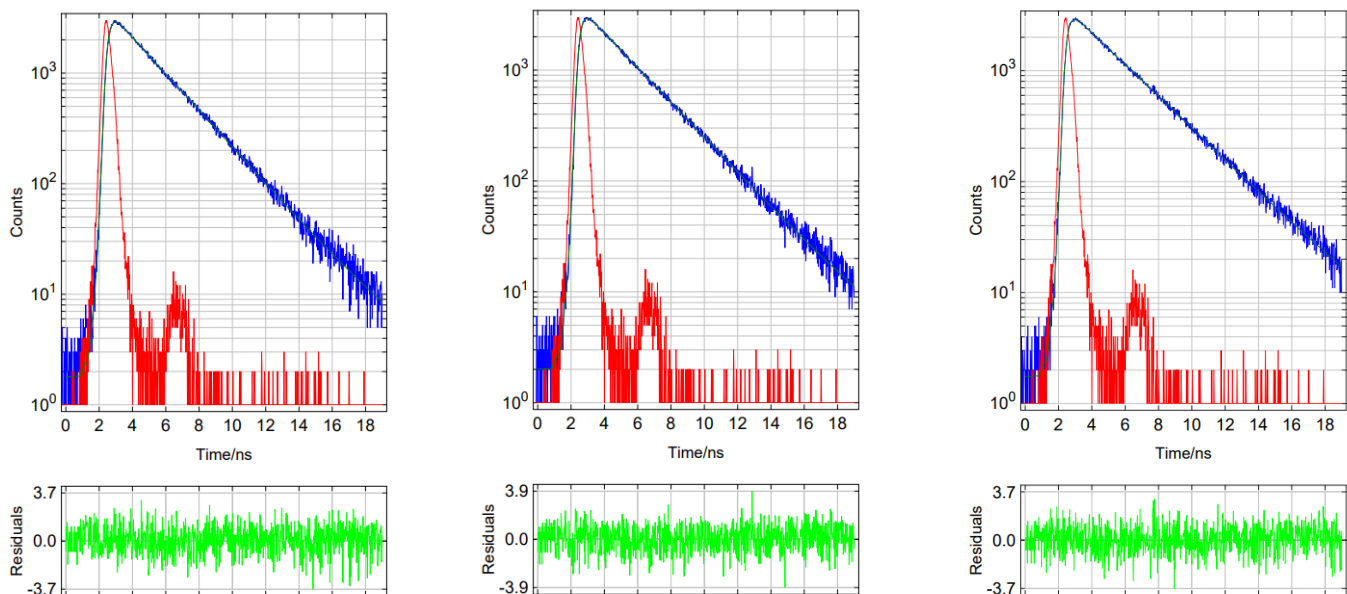
Slika 59. Normalizirani ekscitacijski i emisijski spektri spoja **2** u acetonitrilu.



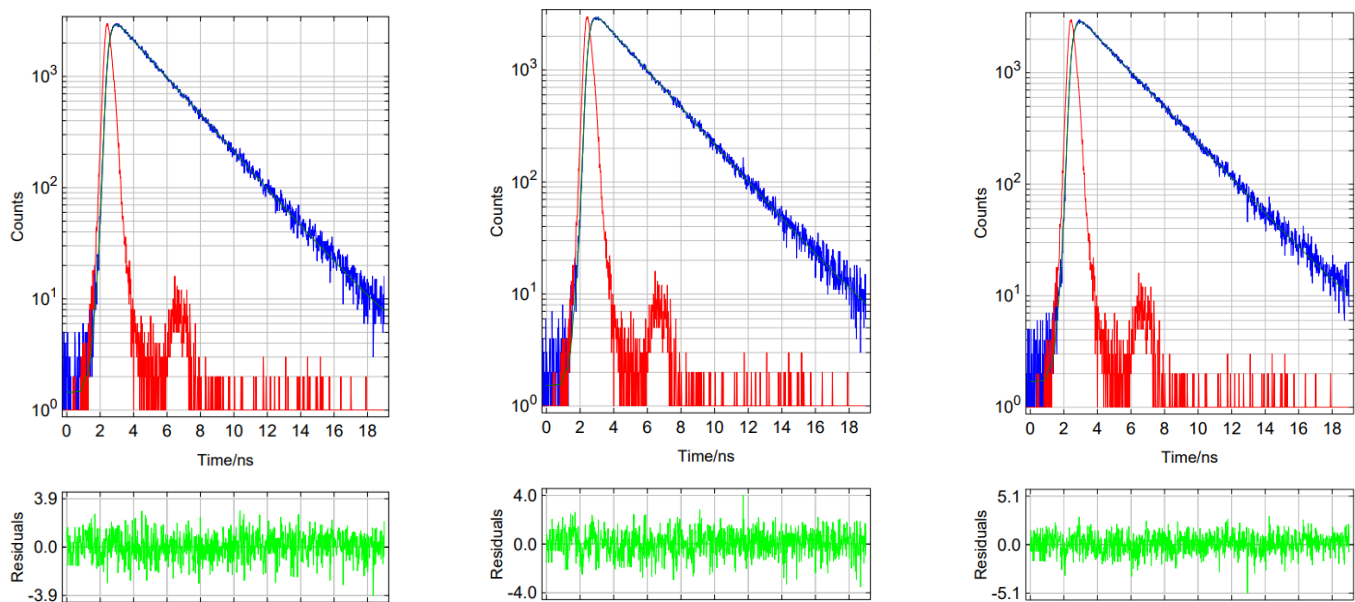
Slika 60. Normalizirani ekscitacijski i emisijski spektri spoja **2** u diklormetanu.



Slika 61. Normalizirani ekscitacijski i emisijski spektri spoja **2** u vodi.

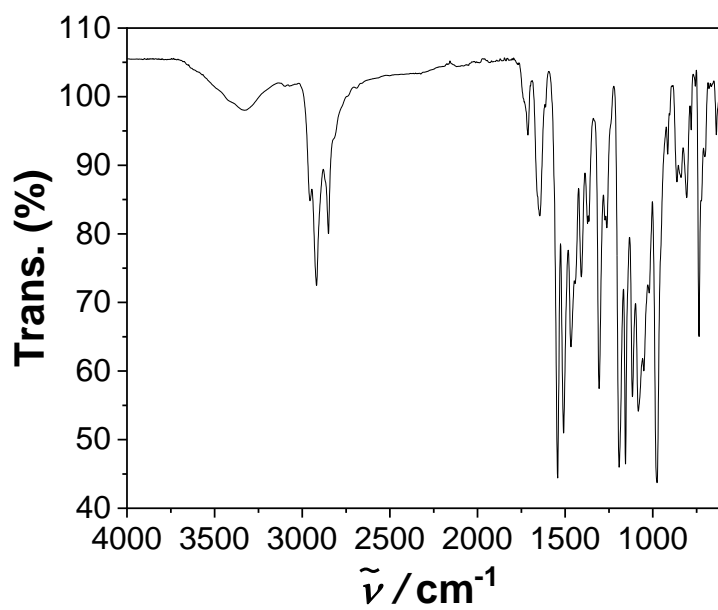


Slika 62. Opadanja intenziteta fluorescencije spoja **1** u acetonitrilu (lijevo), diklormetanu (sredina) i vodi (desno) dobiven tehnikom TC-SPC uz pobudu pri $\lambda = 445$ nm i detekciju emisije pri $\lambda = 520$ nm (gore). Razlika između izračunatih i eksperimentalnih vrijednosti prema modelu monoeksponencijalnog opadanja prikazana je na donjim slikama.

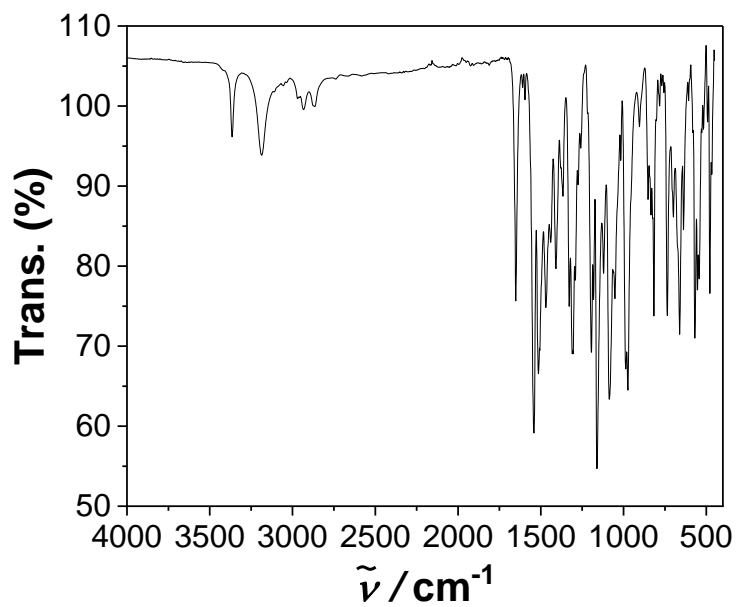


Slika 63. Opadanja intenziteta fluorescencije spoja **2** u acetonitrilu (lijevo), diklormetanu (sredina) i vodi (desno) dobiven tehnikom TC-SPC uz pobudu pri $\lambda = 445$ nm i detekciju emisije pri $\lambda = 520$ nm (gore). Razlika između izračunatih i eksperimentalnih vrijednosti prema modelu monoeksponencijalnog opadanja prikazana je na donjim slikama.

8.4. IR-spektri

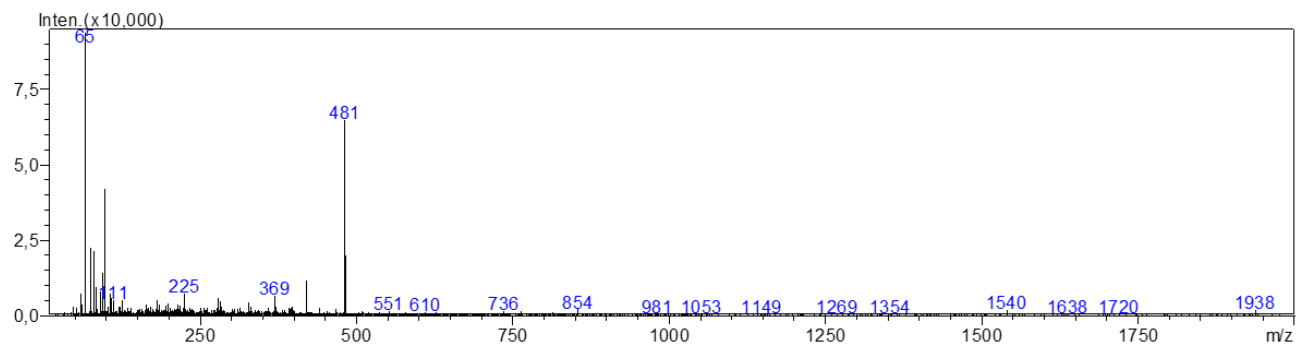


Slika 64. IR-spektar spoja **1**.

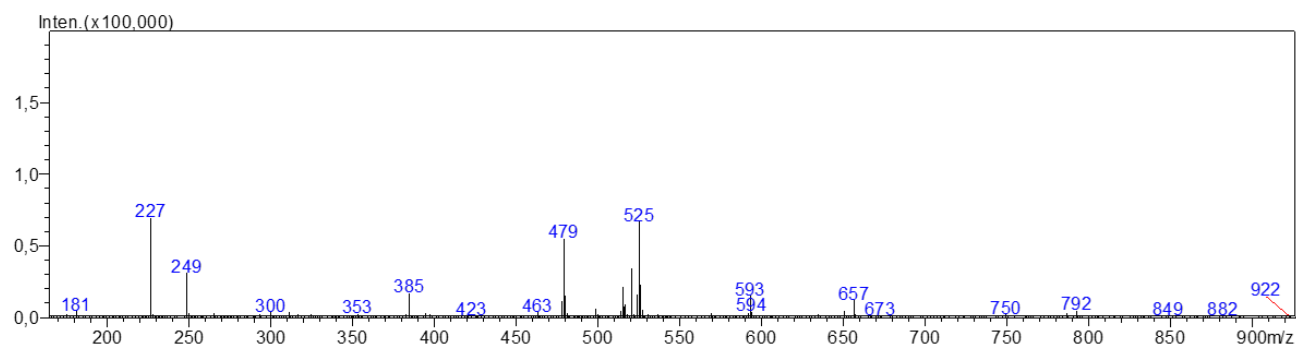


Slika 65. IR-spektar spoja **2**.

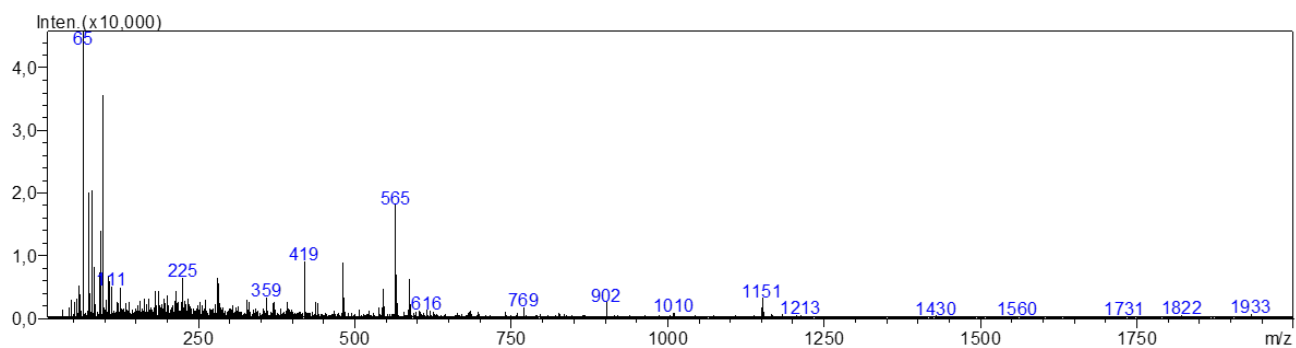
8.5. LC-MS spektri masa



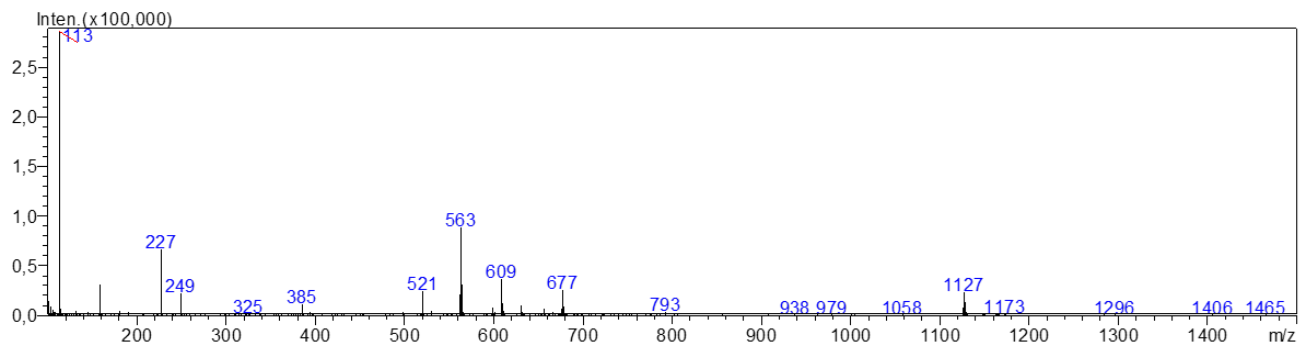
Slika 66. Spektar masa uzorka spoja **1** u području m/z 0-2000.



Slika 67. Spektar masa uzorka spoja **1** u području m/z 150-900.



Slika 68. Spektar masa uzorka spoja **2** u području m/z 0-2000.



Slika 69. Spektar masa uzorka spoja **2** u području m/z 100-1500.

9. Životopis

Lorena Vidoša

Datum rođenja: 14/02/2000 | **Državljanstvo:** hrvatsko | **Telefonski broj:** (+385) 981309850 (Mobilni telefon) |

E-adresa: vidosa.lorena@gmail.com | **Adresa:** Turnišće 20, 49282, Konjščina, Hrvatska (Kućna)

● RADNO ISKUSTVO

01/03/2023 – TRENUTAČNO Zagreb, Hrvatska

LABORATORIJ ZA SINTETSKU ORGANSKU KEMIJU INSTITUT RUĐER BOŠKOVIĆ

U akademskoj godini 2022./2023. izrađujem diplomski rad pod naslovom „Sinteza BODIPY spojeva koji ciljaju unutarstanične organele“ pod mentorstvom dr. sc. Nikole Basarića s Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.

01/11/2022 – 01/03/2023 Rijeka, Hrvatska

LABORATORIJ ZA ORGANSKU KEMIJU I KEMIJU ČVRSTOG STANJA ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Usvajanje spektroskopskih tehnika koje su važne za karakterizaciju organskih boja. Analiza fotosenzibilizatora, sintetiziranih za primjene u fotodinamičkoj terapiji, uz pomoć apsorpcijske i fluorescentne spektroskopije.

01/07/2021 – 14/07/2021 Zabok, Hrvatska

MEDICINSKO BIOKEMIJSKI LABORATORIJ OPĆA BOLNICA ZABOK I BOLNICA HRVATSKIH VETERANA BRAČAK

Obavezna stručna praksa.

● OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

01/10/2021 – TRENUTAČNO Rijeka, Hrvatska

STUDENTICA DRUGE GODINE DIPLOMSKOG SVEUČILIŠNOG STUDIJA 'ISTRAŽIVANJE I RAZVOJ LIJEKOVA' Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju

Adresa Radmile Matejčić 2, 51000, Rijeka, Hrvatska | **Internetske stranice** <http://www.biotech.uniri.hr/hr/>

01/10/2018 – 01/10/2021 Rijeka, Hrvatska

UNIV. BACC. BIOTECHN. ET PHARM. INV. Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju

Adresa Radmile Matejčić 2, 51000, Rijeka, Hrvatska | **Internetske stranice** <https://www.biotech.uniri.hr/hr/> |

Konačna ocjena Magna cum laude

01/09/2014 – 01/09/2018 Zlatar, Hrvatska

OPĆA GIMNAZIJA Srednja škola Zlatar

Adresa Braće Radića 10, 49250, Zlatar, Hrvatska | **Internetske stranice** <https://sszlatar.hr/>

● JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik/jezici: **HRVATSKI**

Drugi jezici:

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna produkcija	Govorna interakcija	
ENGLESKI	C1	C1	B2	B2	B2

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

● DIGITALNE VJEŠTINE

Sposobnost prilagodavanja promjenama | Sposobna raditi u timu | poznavanje programa PyMOL, Avogadro, ChemAxon Marvin, VMD, GAMESS, MacMOLPit | Molekularni dizajn (Avogadro, PyMOL, UCSF Chimera, VDM, Marvin, Gamess) | Komunikacijski programi (Skype, MS Teams, Zoom) | Vješto korištenje Internetom | Pristupačna | Komunikacijski programi (Skype Zoom TeamViewer)

● DODATNE INFORMACIJE

KONFERENCIJE I SEMINARI

22/10/2022 – Zagreb

Simpozij studenata kemičara (SISK) Sudjelovanje na simpoziju kao partner. Održavanje edukativne radionice izrade prirodne kozmetike u sklopu projekta 'Naturis'.

30/06/2022 – 03/07/2022 – Rijeka

Inflammation and proteinopathy in ALS FTD spectrum disorder Sudjelovanje na simpoziju kao pasivni sudionik.

POČASTI I NAGRADE

01/10/2019

STEM STIPENDIJA – Ministarstvo znanosti i obrazovanja

Državna stipendija u STEM područjima znanosti.

KOMUNIKACIJSKE I MEĐULJUDSKE VJEŠTINE

Komunikacijske i međuljudske vještine Iznimno sam komunikativna, pristupačna, dobro organizirana te sposobna raditi u timu. Prilagođavanje promjenama mi ne predstavlja problem, snalažljiva sam.

VOLONTIRANJE

01/10/2018 – TRENUTAČNO Rijeka

UDRUGA STUDENATA BIOTEHNOLOGIJE RIJEKA (USBRI) Aktivnosti u kojim sudjelujem kao volonter su: provođenje edukativnih radionica prirodne kozmetike u sklopu projekta Naturis, čija sam i suvoditeljica od listopada 2022. godine, humanitarna akcija 'Kuglice dobrih želja', projekt 'Studenti mentori' te projekt za popularizaciju znanosti 'Putujući znanstvenici'.

Poveznica <http://www.usbri.uniri.hr/>

LABORATORIJSKE VJEŠTINE

Laboratorijski rad

U sklopu različitih kolegija (npr. Opća kemija, Biokemija, Organska kemija, Imunologija, Osnove biotehnologije i istraživanja lijekova, i dr.) sam u praktikumima vrlo uspješno odrađivala laboratorijski rad. Također, poznajem korištenje programa koji uključuju računalnu kemiju i molekularni dizajn.