Tripletna pobuđena stanja i prinosi singletnog kisika meso-supstituiranih porfirina

Baričević, Vanja

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:138555

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository

zir.nsk.hr

UNIRI DIGITALNA KNJIŽNICA

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Preddiplomski sveučilišni studij

Biotehnologija i istraživanje lijekova

VANJA BARIČEVIĆ

Tripletna pobuđena stanja i prinosi singletnog kisika *meso*-supstituiranih porfirina

Završni rad

Rijeka, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Preddiplomski sveučilišni studij

Biotehnologija i istraživanje lijekova

VANJA BARIČEVIĆ

Tripletna pobuđena stanja i prinosi singletnog kisika *meso*-supstituiranih porfirina

Završni rad

Rijeka, 2019.

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

Završni rad obranjen je dana _____

pod povjerenstvom:

1._____

2._____

3._____

Rad ima 37 stranica, 19 slika i 32 literaturna navoda.

Sažetak

Popularnost fotodinamičke terapije proizlazi iz citotoksičnog učinka koji se postiže na ciljano tkivo, bez uništenja zdravog tkiva. Sastoji se od administracije fotosenzibilne molekule, primjene svjetla odgovarajuće valne duljine i reakcije s molekularnim kisikom. Ključan proces je prijelaz fotosenzibilizatora u tripletno pobuđeno stanje te nastanak reaktivnog singletnog kisika. Zbog toga, modifikacijom svojstava fotosenzibilizatora, nastoji se pojačati efikasnost ove terapije. Traži se molekula visokih kvantnih prinosa tripletnog pobuđenog stanja i singletnog kisika. Meta istraživanja su većinom porfirini od kojih su posebice zanimljivi *meso* supstituirani porfirini čiji supstituenti znatno mijenjaju vrijednosti istaknutih kvantnih prinosa. S obzirom da se može utjecati na broj i vrstu supstituenta u *meso* poziciji porfirinskog prstena, to je fokus velikog broja znanstvenika. Pokazani su rezultati uvođenja elektron-donorskih i akceptorskih skupina, silicija, halogenih elemenata, te ugljikovodičnih lanaca različite duljine. Dao se osvrt i na pulsnu fluorescentnu tehniku te tehniku mjerenja udjela porfirina u tripletnom pobuđenom stanju. S obzirom da je derivat s bromom pokazao najveći prinos tripletnog pobuđenog stanja (Φ_T = 0.98), a derivat sa silicijem najveći prinos singletnog kisika (Φ_Δ = 0.77), obećavajući porfirini su oni u čijoj se *meso* poziciji nalazi brom te silicij. Dao se uvid i u indirektan utjecaj supstituenata na kvantne prinose fotofizikalnih procesa, na primjeru ugljikovodičnih lanaca u *meso* poziciji. Lanac sa 22 ugljikova atoma je hidrofoban supstituent koji povećava agregaciju porfirina u vodenom mediju. Na taj način smanjuje njegovu učinkovitost u fotodinamičkoj terapiji (Φ_T < 0.08). Nasuprot navedenih zaključaka, rezultati koji se ne mogu sa sigurnošću interpretirati i trebaju dodatna istraživanja su metoksifenilna skupina i atom fluora u *meso* poziciji.

Ključne riječi: *meso*-supstituirani porfirini, fotodinamička terapija, kvantni prinos, tripletno pobuđeno stanje, singletni kisik

Summary

The popularity of photodynamic therapy results from a cytotoxic effect achieved on target tissue without destroying healthy tissue. It is based on administration of a photosensitizer, light of the appropriate wavelength and reaction with molecular oxygen. The key process is transition of the photosensitizer to the triplet excited state and generation of reactive singlet oxygen. Therefore, the goal is to enhance the efficacy of the therapy by modifying properties of the photosensitizer. For this there is a need for a molecule of high quantum yields of a triplet excited state and a singlet oxygen. Target of the current research are porphyrins, of which the most interesting are *meso*-substitued porphyirins. Their substituents significantly change the value of mentioned quantum yields. Since number and type of substituents is adjustable, this is the focus of many studies and investigations. Here are shown the results of introduction of electron-donor and electron-acceptor groups to the porphyrin ring, as well as alkyl chains, silylation and halogenation. Also, here is given the overview of two techniques, pulse train fluorescence technique and measurement of the porphyrins in triplet excited state. Since the bromine derivative showed the highest quantum yield of triplet excited state (Φ_T = 0.98) and silylated derivative the highest quantum yield of singlet oxygen (Φ_Δ = 0.77), the promising porphyrins are the ones with bromine and silicon in the *meso* position. Also, the example of alkyl chains in *meso* position, gives the insight in the indirect impact of substituents on quantum yields. Alkyl chain with 22 carbon atoms is hydrophobic and it increases the aggregation of porphyrins in aquatic medium. In that way, the efficacy of photosensitizer is decreased (Φ_T < 0.08). As opposed to these conclusions, results that cannot be interpreted with same certainty and need more research are metoxyphenyl group and fluorine in *meso* position.

Key words: *meso*-substitued porphyrins, photodynamic therapy, quantum yield, triplet excited state, singlet oxygen

Sadržaj:

1. Uvod 1

2. Svrha rada 5

3. Fotoaktivacija porfirina 6

3.1. Apsorpcijski spektar porfirina 7

3.2. Dijagram Jablonskog 11

3.3. Mehanizam fotodinamičke terapije 12

4. Utjecaj supstituenata na tripletno pobuđeno stanje *meso* supstituiranih porfirina 15

4.1. Elektron-donorske i elektron-akceptorske skupine u *meso* poziciji porfirina 16

4.1.1. Pulsna fluorescentna tehnika (*eng*. Pulse train fluorescence technique, PTF) 19

4.2. Hidrofilnost i sililacija 21

4.2.1. Mjerenje kvantnog prinosa singletnog kisika (Φ_Δ) 24

4.3. Supstitucija porfirina halogenim elementima 25

5. Utjecaj agregacije na fotofizikalna svojstva *meso* supstituiranih porfirina 29

5.1. Fotofizikalna svojstva *meso* supstituiranih kationskih porifirina u fiziološkoj otopini (PBS) i 2% otopini natrijevog dodecil sulfata (SDS) 30

5.1.1. Model molekularnog ekscitona 32

5.2. Utjecaj modifikacije svojstava otapala na agregaciju porfirina topivih u vodi 33

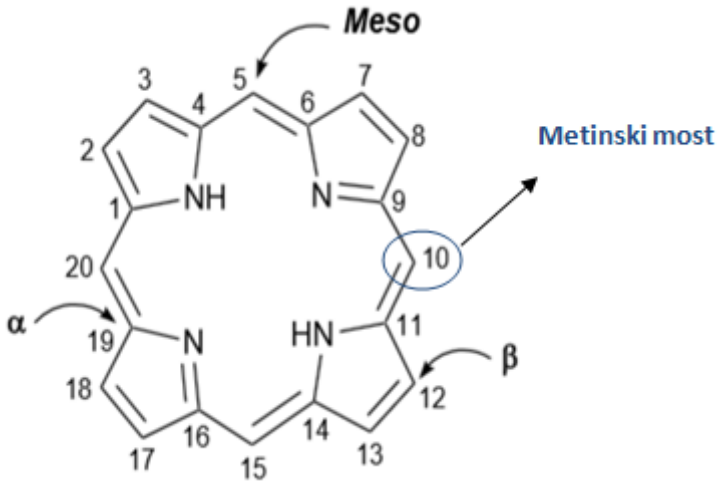
6. Zaključak 34

7. Literatura 36

1. Uvod

Porfirini su velika grupa obojenih pigmenata, prirodnog ili sintetičkog podrijetla, čije ime dolazi od grčke riječi *porphura* što znači ljubičasto. Radi se o makrocikličkim spojevima koji imaju veoma važne biološke uloge, za što su najbolji primjer hem, metaloporfirin koji gradi hemoglobin, te reducirani metaloporfirin, klorin, koji gradi klorofil.[1] S obzirom na sve procese u kojima sudjeluju: vezanje i transport kisika (hemoglobin), prijenos elektrona i energije (citokromi i klorofil), kataliza (citokrom P450), život bez ovakvih spojeva ne bi bio moguć.[2]

Svim porfirinima zajednički je supstituirani makrociklički prsten koji se sastoji od četiri pirolna prstena povezana sa četiri metinska (CH) mosta. Tetrapirolni makrociklički prsten predstavlja visoko stabilni, konjugirani, 18π elektronski sustav (prema Hückelovom 4n+2 pravilu aromatičnosti), a naziva se porfin. Uobičajenu nomenklaturu koja se koristi u kemiji porfirina razvio je Hans Fischer.[2] Pirolne podjedinice porfina povezane su u *α*-pozicijama (1, 4, 6, 9, 11, 14, 16 i 19) preko metinskih mostova (5, 10, 15, 20) koji predstavljaju *meso* ugljikove atome/pozicije (Slika 1).



Slika 1 Struktura porfina.[3]

Porfin može biti supstituiran na *meso* i/ili β poizicijama (2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 i 18). Ukoliko se na navedenim pozicijama nalazi vodikov atom, a dva unutarnja dušikova atoma su protonirana, radi se o slobodnoj porfirinskoj bazi. Ako se vodikovi atomi na *meso* i/ili β pozicijama supstituiraju ne-vodikovim atomima ili grupama, rezultirajući spoj zove se porfirin.[3] Također, u slučaju kada porfirin tvori kompleks s metalom, spoj se naziva metaloporfirin.[4]

Porfirinske molekule naveliko su istraživani spojevi zbog svojih zanimljivih svojstava, te široke primjene. Pokazali su se veoma efikasnim u molekularnom oslikavanju (eng. imaging), dijagnostici te terapiji raznih bolesti, uključujući tumore. U ovom kontekstu, porfirini su fotosenzibilizatori (PS), molekule koje pobuđene elektromagnetskim zračenjem u obliku svjetla, induciraju fotokemijske reakcije stvarajući citotoksične agense. Ti su citotoksični agensi uzrok uništenja ciljnog tkiva.[3]

Bitna svojstva ovih spojeva koja definiraju njihovu međusobnu interakciju, interakciju sa okolinom, te kako će biti apsorbirani i akumulirani u stanicama, jesu struktura, naboj i hidrofobnost. Također, u lokalizaciji PS-a treba uzeti u obzir i fiziologiju tumorskog tkiva koja se razlikuje od zdravog (pH, drugačiji krvožilni sustav, abnormalni protok krvi). Prema tome, korisnim PS-om smatra se onaj spoj koji će prijeći navedene prepreke, te se uspjeti lokalizirati i akumulirati u ciljnom tkivu, u koncentraciji letalnoj nakon osvjetljavanja.[5]

Primjena porfirina kao fotosenzibilizatora uvelike se istražuje u kontekstu fotodinamičke terapije (PDT). Radi se o medicinskom postupku kombinacije fotosenzibilizatora i svjetla što rezultira uništenjem ili modifikacijom neželjenog ili tumorski promijenjenog tkiva. Naziva se još i binarnim načinom tretiranja bolesti što potiče još iz davnina. Stari Egipćani su prije više od 4000 godina uspješno tretirali vitiligo kombinacijom oralno unesene biljke, čiji je aktivni sastojak

fotosenzibilizator psoralen, i sunčeve svjetlosti.[6] Nešto bliža primjena PDT-a bila je 1900. kada je po prvi put klinički istražen njen utjecaj u liječenju epilepsije. Kasnije, publiciran je i prvi izvještaj o upotrebi PDT-a u liječenju tumora ljudskih pacijenata. Radilo se o prijedlogu primjene eozina koji bi, nakon aktivacije svjetlom, djelovao na tumore kože (von Tappeiner i Jesionek). Naknadno, von Tappeiner primjećuje veliku ulogu molekularnog kisika u cijelom procesu, zbog čega i predlaže ime „Fotodinamičko djelovanje". Oko 1950.-e zanimanje za ovu vrstu terapije počinje rasti. Usljedilo je istraživanje porfirina kao potencijalnih fotosenzibilizatora, nakon čega je i zabilježen protutumorski učinak PDT-a. Sintetizirani su i različiti tipovi fotosenzibilizatora od kojih su neki, kroz pretklinička i klinička istraživanja, dospjeli i na tržište.[7]

Danas, uobičajena upotreba fotodinamičke terapije sastoji se u tretiranju raznih vrsta tumora, uključujući one prisutne u glavi, vratu, mokraćnom mjehuru, plućima te koži. Također, efikasno se koristi u liječenju mnogih ne-malignih oboljenja poput ateroskleroze i psorijaze, a primjećena je i antivirusna učinkovitost.[4] Tehnika ima i ograničenja kao, na primjer, specifičnost i potentnost fotosenzibilizatora. Isto tako, kada se radi o pacijentima sa već poodmaklom bolešću, koji ne odgovaraju na druge terapije, lokalni efekt PDT nema velikog učinka na sistemskoj razini.[8] Bez obzira na navedene nedostatke, PDT ima puno veći broj prednosti (za razliku od tradicionalnih načina tretiranja raka, npr. kemoterapije): lako se kontrolira, selektivno djeluje na maligno promjenjene stanice pri čemu ne uništava zdravo tkivo, primjenjiva je na starijim osobama i svim pacijentima koji zbog bilo kojeg razloga ne mogu biti operirani ili ne mogu primiti kemoterapiju, može se izvesti i na mjestima koje nije moguće operirati, neinvazivna je metoda koja se može koristiti kao primarna ili dodatna terapija raznih vrsta solidnih tumora, te nije toksična za organe niti ima značajne nuspojave.[9]

Veliki udio u efikasnosti fotodinamičke terapije ima fotosenzibilizator. Veoma je važno koja svojstva ima, te zato postoje određeni kriteriji koje bi idealni fotosenzibillizator trebao zadovoljiti:

- apsorpcija u području 600-850 nm (dublja penetracija svjetla tih valnih duljina u tkivo);
- efektivni generator singletnog kisika i drugih reaktivnih kisikovih vrsta;
- pogodna fotofizikalna svojstva: visoki kvantni prinos ($\Phi_T \geq 0.5$) i relativno dugo vrijeme života (τ_T, u mikrosekundama) tripletnog stanja, visoki kvantni prinos singletnog kisika ($\Phi_\Delta \geq 0.5$), te visoku energiju tripletnog stanja ($\geq$ 94 KJ mol^{-1});
- što manja toksičnost i citotoksičnost u mraku/odsutstvu svjetla;
- preferenacijalna akumulacija u ciljnom tkivu, a što manja u zdravom tkivu;
- brzo izlučivanje iz tijela;
- jedan, dobro karakterizirani spoj sa poznatim i reproducibilnim sastavom;
- jednostavan i stabilan lijek;
- topiv u biološkom mediju, kako bi omogućio direktnu intravenoznu administraciju i transport do ciljnog tkiva.[4]

Veoma bitna značajka fotosenzibilizatora su njegova fotofizikalna svojstva. Kvantni prinosi pojedinih stanja u kojima će se fotosenzibilizator naći, nakon interakcije s fotonima svjetla, određuju koliko će visoko reaktivnog singletnog kisika nastati. Što je veći kvantni prinos tripletnog pobuđenog stanja, to će više singletnog kisika moći nastati. Gotovo svi PDT fotosenzibilizatori imaju visoke kvantne prinose pobuđenog tripletnog stanja (0.3 – 0.6), te, posljedično, visoke kvantne prinose singletnog kisika (0.3 – 0.5).[10] Na kvantni prinos tripleta porfirinskog PS-a utječe: priroda i pozicija supstituenta,[11] otapalo[12] te agregacija navedenih spojeva.[1] O navedenom će više biti riječi u slijedećim poglavljima.

2. Svrha rada

Svrha ovog rada je analizirati i pokazati dosadašnje spoznaje o kvantnom prinosu tripletnog i singletnog pobuđenog stanja, radijacijskih i ne-radijacijskih procesa, te prinose singletnog kisika *meso*-supstituiranih porfirina. Sljedeći cilj je pokazati razlike u rezultatima prethodno navedenih prinosa između različitih porfirina s obzirom na vrstu, svojstva i broj supstituenata u *meso* poziciji. Različite vrijednosti kvantnih prinosa bit će proučene ovisno o vrsti otapala, te tendenciji porfirina da stvaraju agregate. Dat će se osvrt najznačajnijih metoda i tehnika pomoću kojih se dolazi do takvih podataka.

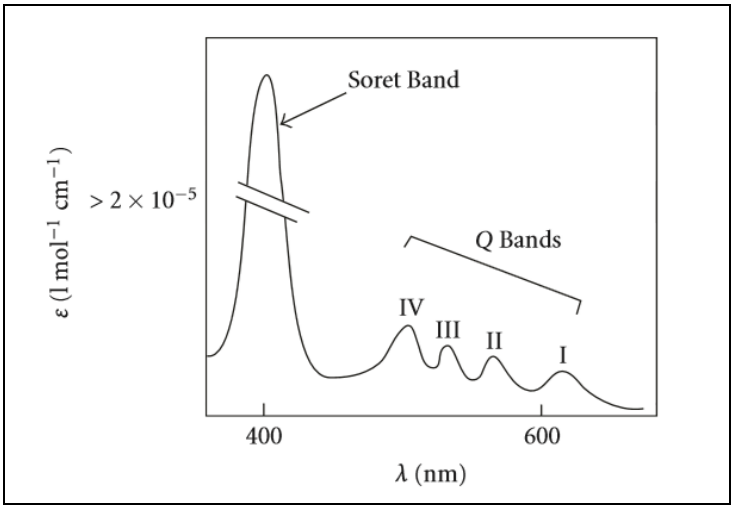
Navedeno je od velikog značaja u daljnjem razvitku fotosenzibilizatora, s obzirom da je učinkoviti prijelaz u pobuđeno tripletno stanje i visoki prinos singletnog kisika jedno od najvažnijih svojstava fotosenzibilizatora i preduvjeta za primjenu fotodinamičke terapije.

3. Fotoaktivacija porfirina

Porfirini su organske molekule, koje u strukturi imaju visoko konjugirani π elektronski sustav, zbog čega apsorbiraju elektromagnetsko zračenje ultraljubičastog (UV zračenje) i vidljivog dijela spektra (Vis zračenje). Koja će valna duljina navedenog dijela spektra biti apsorbirana ovisi o energiji fotona te elektronskoj konfiguraciji molekule, odnosno o energijskim razlikama između elektronskih stanja u molekuli. Intenzitet apsorpcije fotona na određenoj valnoj duljini (molarni apsorpcijski koeficijent) u ovisnosti o valnoj duljini zračenja prikazuje apsorpcijski spektar. Apsorpcija fotona uzrokuje premještanje elektrona iz popunjenih orbitala niže energije u prazne molekulske orbitale više energije, pri čemu molekula prelazi u elektronski pobuđeno stanje.[13]

Osim u važnim procesima u organizmu, porfirini imaju primjenu i u raznim područjima u kojima veliku ulogu igraju njihova fotofizikalna svojstva. Radi se o interakciji molekule i svjetla, odnosno elektrona molekule i fotona elektromagnetskog zračenja. Pritom se proučavaju dinamika osnovnog i pobuđenog stanja molekule, elektronske i vibracijske relaksacije te prijenos energije.[14] Veoma aktualna tema je fotodinamička terapija u kojoj porfirini predstavljaju primjenjive fotosenzibilizatore. Za takvu primjenu od velike su važnosti tripletno pobuđeno stanje molekule i brzina međusustavnog prijelaza (*eng*. Intersystem crossing rate). Razlog tomu je da efikasnost fotodinamičke terapije ovisi o citotoksičnom učinku visoko reaktivnog singletnog kisika, za čiji je nastanak odgovorna molekula u tripletnom pobuđenom stanju.[15]

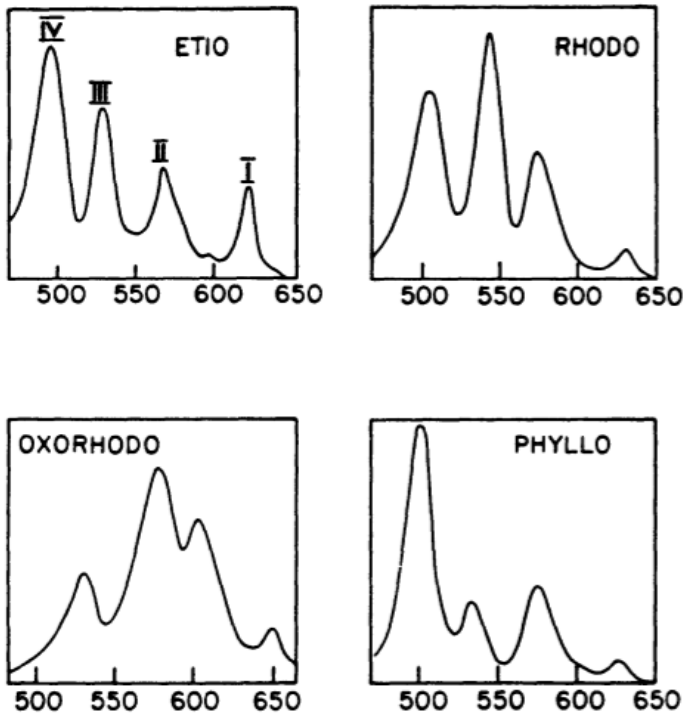
3.1. Apsorpcijski spektar porfirina



Slika 2 Tipični apsorpcijski spektar porfirina.[4]

Porfirini su poznati po karakterističnom apsorpcijskom spektru u UV/VIS području elektromagnetskog zračenja. Spektar je karakteriziran intenzivnom vrpcom oko 400 nm, koja se naziva Soret-ova ili B vrpca, nakon koje slijede četiri slabije vrpce, u rasponu 450-700 nm, koje se nazivaju Q vrpce (označene rimskim brojevima IV-I) (Slika 2).[4] Soret-ova vrpca rezultat je tranzicije iz S_0 u S_2, dok su Q vrpce posljedica S_0 u S_1 prijelaza. Pritom, u oba slučaja, događa se prijelaz iz najviše popunjene π vezne orbitale (HOMO) u najnižu nepopunjenu π* protuveznu orbitalu (LUMO).[16] Četiri Q vrpce javljaju se u apsorpcijskom spektru slobodnih porfirinskih baza, dok metaloporfirine karakteriziraju dvije Q vrpce.[11] Intenzitet i točna pozicija vrpci ovisi o otapalu, koncentraciji porfirina te prirodi vezanih supstituenata.[2] Soret-ova vrpca se može naći u rasponu 380-500 nm ovisno o supstituentu na *β* ili *meso* poziciji, a odnos Q vrpci ne mora uvijek biti u redoslijedu kao na slici 2, već se mijenja ovisno o vrsti i položaju supstituenta na makrocikličkom prstenu (Slika 3). Dakle, prema odnosu inzenziteta Q vrpci, porfirini se mogu klasificirati u četiri skupine: *etio, rhodo, oxo-*

rhodo i phyllo, pri čemu *phyllo* tip spektra odgovara *meso*-supstituiranim porfirinima.[1]



Slika 3 Četiri osnovna tipa vidljivog apsorpcijskog spektra (etio, rhodo, oxorhodo i phyllo) tetrapirolnih makrocikala.[2]

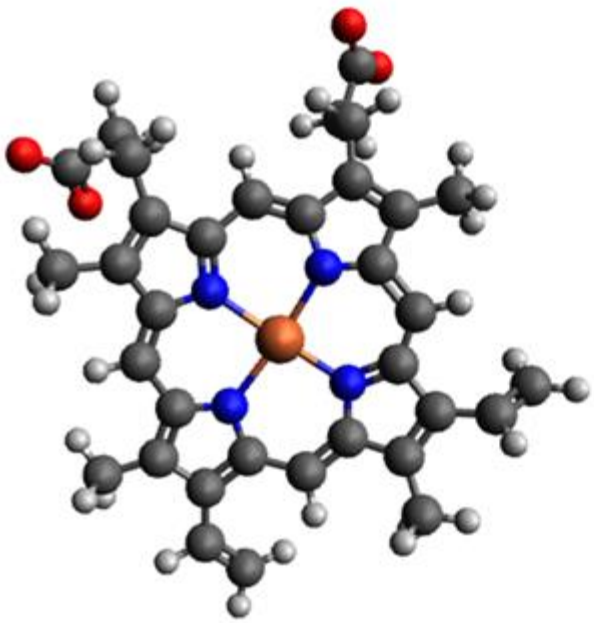
Osim supstituenata na periferiji, pomak vrpci apsorpcijskog spektra može biti uzrokovan i metalom u centru porfirinskog prstena. Metalni ioni (Fe^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+} i drugi) vežu elektrone unutarnjih dušikovih atoma tetrapirolnog prstena i tako mijenjaju spektralna svojstva porfirina. Promjene su posljedica interakcije atomskih orbitala metalnog iona i molekulskih orbitala porfirina. Ovisno o kojem se metalnom ionu radi, pomak vrpci može biti u smjeru većih valnih duljina, crvene boje elektromagnetskog spektra (*eng*. red shift), ili u smjeru manjih valnih duljina, plave boje elektromagnetskog spektra (*eng*. blue shift). Na primjer, jedan od biološki važnijih metaloporfirina je protohem, odnosno protoporfirin IX sa Fe^{2+} u centru. Fe^{2+} povećava energetsku barijeru

između π i π* orbitala protoporfirina IX, zbog čega uzrokuje pomak vrpci njegova apsorpcijskog spektra prema manjim valnim duljinama.[17,18]

Navedeno se može potvrditi računalnim izračunima HOMO i LUMO orbitala protoporfirina IX, sa (Slika 4) i bez Fe^{2+} u središtu (Slika 5). Kada je prisutan Fe^{2+}, elektroni padaju u dublju energetsku jamu (HOMO-3, -134.461eV) te je potrebno više energije da bi ih se pobudilo nego u slučaju slobodno baznog protoporfirina IX (HOMO, -116.542eV). Na količinu energije koju je potrebno dovesti molekuli za prijelaz elektrona iz HOMO u LUMO orbitalu, upućuje razlika energija tih dviju orbitala (ΔE). Za protoporfirin IX bez Fe^{2+}, ΔE iznosi 23.397eV, a kada je Fe^{2+} prisutan, ΔE iznosi 42.353eV. Iz navedene energije moguće je izračunati pripadajuću valnu duljinu elektromagnetskog zračenja (λ), koristeći slijedeću formulu: $\lambda = (ch)/\Delta E$. Pritom, brojnik predstavlja umnožak dviju konstanti: c, brzina svjetlosti (3×10^8 m/s) i h, Planckova konstanta (6.626×10^{-34} Js), a jedina nepoznanica je λ. Da bi se dobila njena vrijednost u metrima, potrebno je preračunati ΔE iz eV u mjernu jedinicu Joule (J). S obzirom da 1eV iznosi 1.602×10^{-19} J, pripadajuće vrijednosti ΔE, za protoporfirin IX sa i bez Fe^{2+}, iznose, redom, 67.850×10^{-19} J i 37.482×10^{-19} J. Prema tome, konačne vrijednosti λ pripadajućih energija jesu, redom, 29.297nm i 53.037nm te ne pripadaju valnim duljinama UV/VIS dijela spektra.

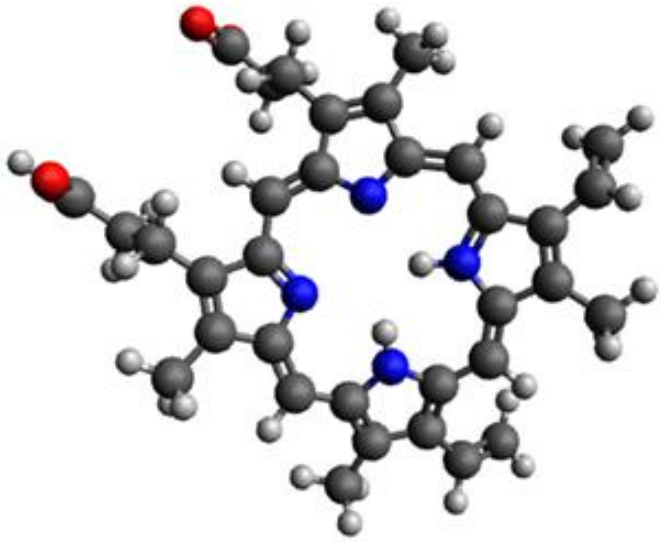
S obzirom da se računalni izračuni ne slažu sa teorijom, potrebno je pronaći uzrok neslaganja. Da bi λ bila u navedenom dijelu spektra, ΔE bi morao iznositi 2.339eV i 4.235eV. Naime, vrijednosti energija HOMO i LUMO orbitala računate su računalnim programom Gamess, koristeći najjednostavnije postavke (Slater type orbital, STO-3G i Restricted Hartree Fock, RHF). Pritom, nije korišten uobičajeni model za opis apsorpcijskih spektara porfirina – Gouterman-ov model četiri molekulske orbitale[16], što je razlog odstupanja rezultata. Daljnja računanja uključivala bi navedeni model i pronalazak njoj odgovarajućih postavki u programu Gamess. Za potrebe ovog rada, dovoljno je naglasiti važnost navedenih

izračuna, s obzirom da je apsorpcija odgovarajuće valne duljine jedno od svojstava prema kojima se molekula klasificira kao dobar ili loš PS. Dobri PS-ovi apsorbiraju valne duljine u području 600-850nm, jer to svjetlo dublje penetrira u tkivo i tako povećava efikasnost PDT-a.[4] Svakako, Fe^{2+} smanjuje učinkovitost metaloporfirina u PDT.



166	LUMO+5	431.814	A
165	LUMO+4	382.206	A
164	LUMO+3	321.639	A
163	LUMO+2	266.478	A
162	LUMO+1	188.067	A
161	LUMO	92.108	A
160	HOMO	76.189	A
159	HOMO-1	51.015	A
158	HOMO-2	44.055	A
157	HOMO-3	-134.461	A
156	HOMO-4	-310.533	A
155	HOMO-5	-316.234	A

Slika 4 3D struktura protoporfirina IX sa Fe^{2+} i pripadne vrijednosti energija HOMO i LUMO orbitala.

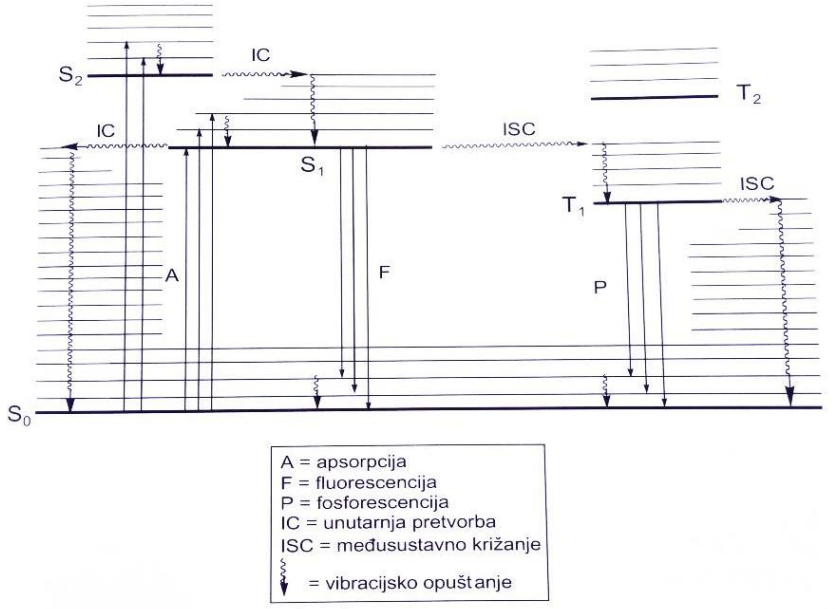


154	LUMO+4	223.089	A
153	LUMO+3	207.170	A
152	LUMO+2	158.672	A
151	LUMO+1	111.211	A
150	LUMO	93.145	A
149	HOMO	-116.542	A
148	HOMO-1	-146.381	A
147	HOMO-2	-181.255	A
146	HOMO-3	-186.808	A
145	HOMO-4	-193.768	A

Slika 5 3D struktura protoporfirina IX bez Fe^{2+} i pripadne vrijednosti HOMO i LUMO orbitala.

3.2. Dijagram Jablonskog

Prilikom apsorpcije svjetla, molekula prelazi iz osnovnog elektronskog stanja (S_0) u pobuđeno (singletno S_n, i tripletno T_n, n=1, 2,...), pri čemu se u pobuđenom stanju zadržava određeno vrijeme. Pritom je S_1 kratkoživuće (10^{-6} s), dok T_1 ima puno dulje vrijeme života (10^{-2} s), što je direktno vezano uz potrebu promjene spina. Nakon toga, molekula se vraća u osnovno stanje pri čemu se razlikuje više procesa deaktivacije (Slika 6).



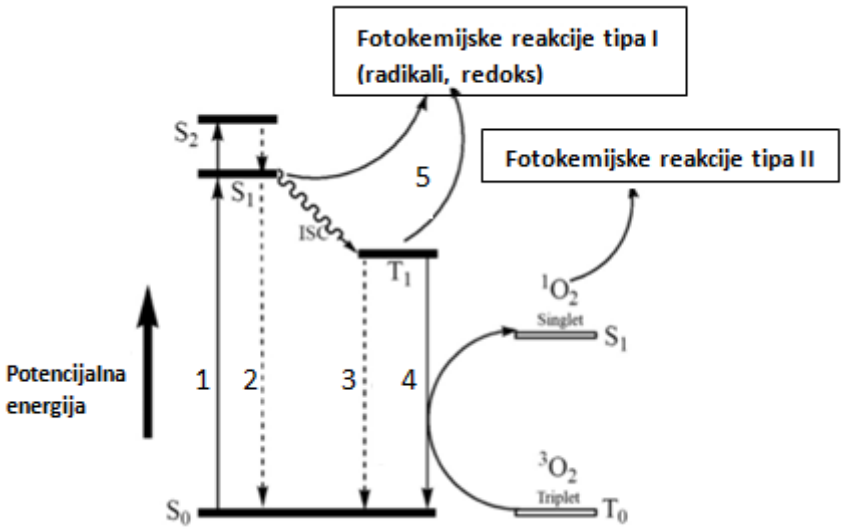
Slika 6 Dijagram Jablonskog (debljim horizontalnim linijama naznačena su elektronska stanja (singletna: S_0, S_1..., te tripletna: T_1, T_2...), a tanjim, vibracijske razine (v=0, v=1,...)).[13]

Mogući su procesi uz zračenje, fluorescencija i fosforescencija, te procesi bez zračenja, unutarnja pretvorba, međusustavno križanje i vibracijska relaksacija. Prvi proces koji nastupa odmah nakon apsorpcije (10^{-13} do 10^{-9} s) je vibracijska relaksacija. Interakcija fotona i elektrona omogućuje prijelaz elektrona u molekulsku orbitalu više energije, što označava prijelaz molekule iz S_0 u S_n. Molekula će prijeći u pobuđeno vibracijsko stanje (v>0) određenog singletnog stanja (S_n), te se posljedično i

relaksirati natrag, u niže vibracijsko stanje istog singletnog stanja (npr. $S_2(v=2) \rightarrow S_2(v=0)$). Pobuđeni elektron može prelaziti između stanja istih multipliteta (npr. $S_2(v=0) \rightarrow S_1(v=n)$) što se naziva unutarnja pretvorba. Tako će elektron zauzeti prvo singletno pobuđeno stanje, najnižu vibracijsku razinu ($S_1(v=0)$). Iz tog elektronskog stanja dogodit će se fluorescencija - prijelaz u osnovno singletno stanje, prilikom čega dolazi do emisije zračenja. Osim prijelaza istog multipliteta (npr. singlet-singlet), mogući su i prijelazi pri kojima se multiplitet mijenja (npr. singlet-triplet; triplet-singlet). Jedan od njih je i međusustavno križanje. Radi se o izoenergijskom, spin zabranjenom procesu, pri čemu elektron prelazi iz singleta u triplet (npr. $S_1(v=0) \rightarrow T_1(v=n)$). Jednom kad se elektron nađe u tripletnom pobuđenom stanju (T_1), slijedi fosforescencija - vraćanje u osnovno singlet stanje što rezultira emisijom zračenja. S obzirom da dolazi do promjene multipliteta, fosforescencija je također spin zabranjen proces.[3,13]

3.3. Mehanizam fotodinamičke terapije

Korištenje svjetla u kombinaciji s bojom u svrhe liječenja tumora potiče još iz 1903. kada je prva takva primjena bila tretiranje raka kože.[9] Danas se to naziva fotodinamička terapija (PDT), te je veoma obećavajuća tehnika uništavanja raznih vrsta tumora, ali i terapija protiv ne-malignih bolesti. Ima veliki potencijal i kao protumikrobna terapija, posebice u slučaju lokaliziranih infekcija rezistantnih na standardne antibiotike.[19] Razlog popularnosti PDT-a je specifičnost i limitirano djelovanje na ciljano tkivo, pri čemu zdravo tkivo ostaje netaknuto.[7] Tehnika zahtjeva fotosenzibilnu molekulu (PS), izvor svjetla i molekularni kisik, a pripadajući protokol započinje s administracijom PS-a, te nakon njegove akumulacije u ciljnom tkivu slijedi aplikacija svjetla određene valne duljine.[20] Jednom kada PS apsorbira foton, njegovo pobuđivanje rezultira fotokemijskim reakcijama tipa I i II (Slika 7).



Slika 7 Fotokemijske reakcije tipa I i II prikazane pojednostavljenim dijagramom Jablonskog. S_0, osnovno singletno stanje fotosenzibilizatora (PS), S_1 prvo pobuđeno singletno stanje PS-a, S_2, drugo pobuđeno singletno stanje PS-a, T_1, prvo pobuđeno tripletno stanje PS-a; ISC, međusustavni prijelaz; $^3O_2$, tripletni kisik; $^1O_2$, singletni kisik; 1) apsorpcija, 2) fluorescencija, 3) fosforescencija, 4) prijenos energije, 5) prijenos elektrona. Modificirano prema[7]

Fotokemijskim reakcijama prethode fotofizikalni procesi objašnjeni slikom 2. Nakon apsorpcije fotona, PS prelazi iz S_0 u kratkoživuće S_1 stanje. Osim fluorescencijom, deaktivacija S_1 stanja moguća je i međusustavnim prijelazom, što je bitan proces u PDT. Međusustavnim prijelazom PS iz S_1 prelazi u dugoživuće T_1 stanje koje se može deaktivirati fosforescencijom, no, važnija je interakcija T_1 stanja s okolnim supstratima (biomolekulama).[7] Fotokemijske reakcije tipa I označavaju redoks reakcije prijenosa elektrona (ili protona) kisiku ili drugim molekulama što rezultira nastajanjem radikala. Radikali, potom, reagiraju s molekularnim kisikom, pri čemu nastaju reaktivne kisikove vrste (hidroksil-radikal, superoksidni anion i sl.). Kompetitivne reakcije su fotokemijske reakcije tipa II, u kojima PS u T_1 predaje energiju $^3O_2$ dajući visoko reaktivni singletni kisik $^1O_2$. Nastale reaktivne vrste reagiraju s velikim brojem biomolekula (proteini, lipidi, nukleinske kiseline) uzrokujući ireverzibilna oštećenja stanica, što dovodi do nekroze, apoptoze ili autofagije, te uništenja ciljnog

tkiva. U PDT-u, fotokemijske reakcije tipa I i II događaju se istovremeno, međutim, primjećeno je da dominiraju reakcije tipa II.[7]

4. Utjecaj supstituenata na tripletno pobuđeno stanje *meso*-supstituiranih porfirina

Fokus suvremenih istraživanja je primjena porfirina u procesima induciranim svjetlom, pri čemu je fotodinamička terapija najbolji primjer.[14] Efikasnost porfirina u fototerapiji tumora određena je njegovim tripletnim pobuđenim stanjem koje ovisi o mnogo čimbenika. Primjenjiva molekula koja će dati dobre rezultate je ona koja apsorpcijom fotona brzo prelazi u singletno pobuđeno stanje, a potom brzim međusustavnim prijelazom okupira tripletno pobuđeno stanje. Brzina kojom se događa $S_1 \rightarrow T_1$ prijelaz naziva se brzina međusustavnog prijelaza, k_{ISC} (*eng*. ISC rate). Jedan od važnih čimbenika koji utječu na brzinu $S_1 \rightarrow T_1$ prijelaza jesu supstituenti porfirina. Svojstva različitih supstituenata te njihova pozicija mijenjaju delokalizaciju π elektrona prstena, što povećava ili smanjuje brzinu $S_1 \rightarrow T_1$ prijelaza. S obzirom da je moguće modificirati strukturu porfirina te vezati određenu skupinu/atom u željenu poziciju, mnogo znanstvenika na ovaj način pokušava pronaći optimalni porfirin za primjenu u fotodinamičkoj terapiji.[11]

Ključno mjerenje u mnogim fotokemijskim tehnikama je fotokemijski kvantni prinos (Φ). Navedena veličina govori o tome koliko je pojedini proces učinkovit. Prema Stark-Einstenovom zakonu, sa svakim fotonom kojeg uzorak apsorbira, pobuđena je jedna molekula, međutim, kasnije se ustanovilo da svaki kvant apsorbirane radijacije pobuđuje jednu česticu (Drugi zakon fotokemije). Kvantni prinos se može opisati na više načina, pri čemu je kod njegova računanja nužno odrediti o kojem se procesu radi:

1) Kvantni prinos je omjer broja molekula koje podliježu određenom fotokemijskom ili fotofizikalnom procesu i količine apsorbiranih fotona,

Φ = broj molekula koje reagiraju u određenoj reakciji / broj fotona koje su molekule apsorbirale

2) Kvantni prinos je omjer brzine kemijske reakcije (d[x]/dt) i intenziteta apsorbiranog svjetla (I_{abs}),

$$\Phi = (d[x]/dt)/I_{abs}$$

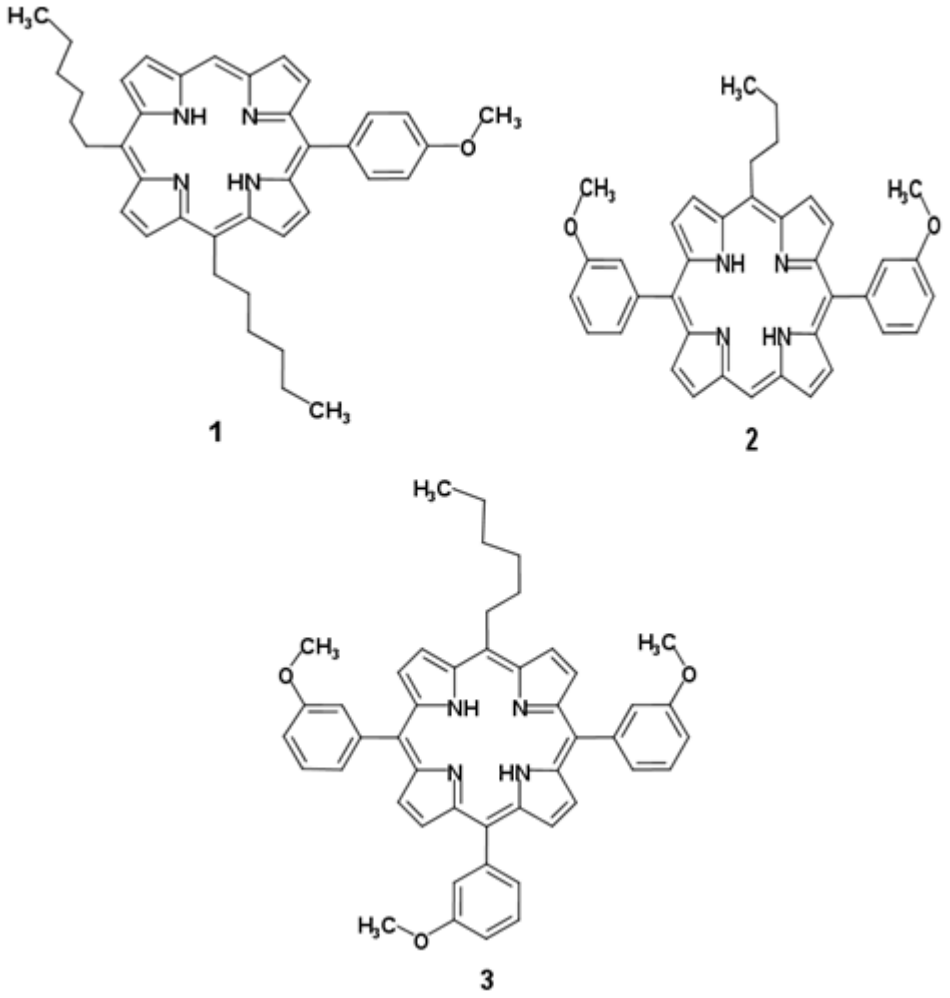
U pravilu, vrijednost kvantnog prinosa kreće se od nula do jedan, odnosno ne može biti veća od 1 ($\Phi \leq 1$). Iznimka su sekundarne reakcije kojima podliježe fotokemijski produkt, a odvijaju se iz međuprodukata nastalih primarnim fotokemijskim procesom. U tom slučaju kvantni prinos može biti veći od jedan. Ako je kvantni prinos veći od dva, radi se o seriji lančanih reakcija unutar uzorka.

U primjeni porfirina kao fotosenzibilizatora, važnu ulogu igra kvantni prinos singletnog kisika (Φ_Δ). Za idealni fotosenzibilizator vrijednost mora biti veća ili jednaka 0.5, a određuje se kao umnožak frakcija molekula u tripletnom pobuđenom stanju koje su uhvaćene molekularnim kisikom kako bi nastao visoko reaktivni singletni kisik (S_Δ), te kvantnog prinosa tripletnog pobuđenog stanja (Φ_T), $\Phi_\Delta = S_\Delta \Phi_T$.[4,13]

4.1. Elektron-donorske i elektron-akceptorske skupine u *meso* poziciji porfirina

Bezera de Suoza i suradnici,[11] fokusirali su se na *meso*-supstituirane porfirine te utjecaj njihovih elektron-donorskih i elektron-akceptorskih skupina na k_{ISC} te tripletna pobuđena stanja. Sintetizirano je devetnaest različitih *meso*-supstituiranih porfirina, a Φ_T izmjereni su pulsnom fluorescentnom tehnikom koja se fokusira na glavni mehanizam deaktivacije prvog singletnog pobuđenog stanja, uzimajući u obzir pobuđena singletna i tripletna stanja. Eksperimentalni podaci istaknuli su utjecaj metoksifenilne i nitrofenilne skupine. Metoksifenilna skupina, kao

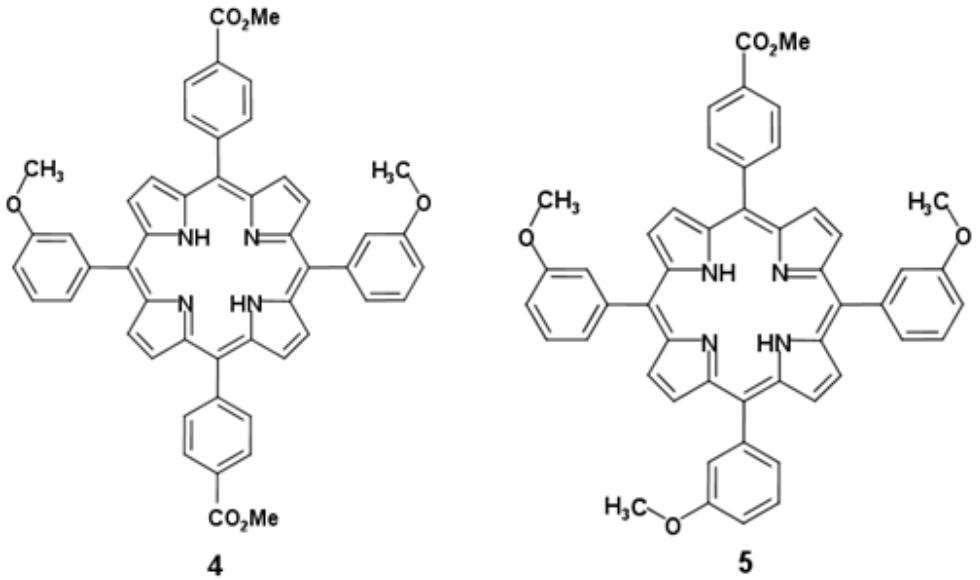
jaki elektron-donor, reducira delokalizaciju π elektrona čime doprinosi povećanju brzine međusustavnog prijelaza. Zaključak je donesen na temelju Φ_T molekula **1** (Φ_T = 0.70), **2** (Φ_T = 0.75) i **3** (Φ_T = 0.81) (Slika 8).



Slika 8 Strukture derivata porfirina sa metoksilfenilnim skupinama u *meso* pozicijama.[11]

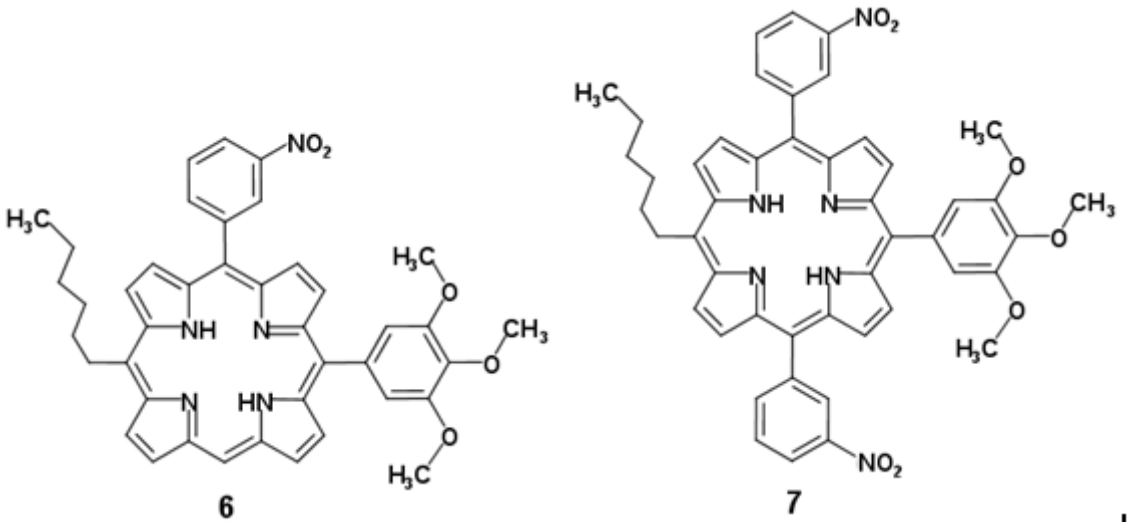
U skupini ispitivanih spojeva, ove molekule su pokazale najveći Φ_T, pri čemu je pokazana i korelacija broja metoksifenilnih skupina s navedenim vrijednostima. Što je veći broj metoksifenilnih skupina na *meso* poziciji porfirinskog makrocikla, to je veći prinos tripletnog pobuđenog stanja molekule. Zaključeno je da će metoksifenilna skupina uvijek povećati Φ_T pripadajućeg porfirina, međutim, iz rezultata drugih molekula, to nije

posve točno. Molekule **4** i **5** (Slika 9) imaju dvije i tri metoksifenilne skupine u *meso* poziciji, a pripadajuće vrijednosti Φ_T su, redom, 0.51 i 0.52.



Slika 9 Strukture derivata porfirina sa metoksifenilnim i metoksikarbonilfenilnim skupinama u meso pozicijama.[11]

Dakle, u ovom slučaju, na prinos tripleta puno veći utjecaj ima metoksikarbonilfenilna skupina kao elektron-akceptor, nego spomenuta metoksifenilna skupina kao elektron-donor.



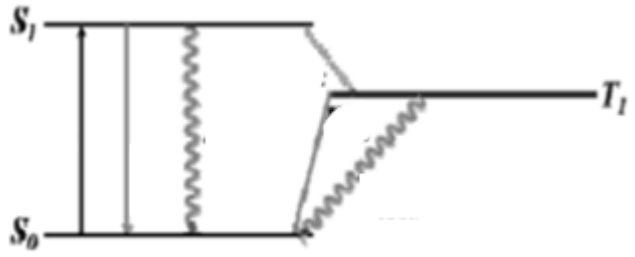
Slika 10 Strukture derivata porfirina sa nitrofenilnom skupinom u *meso* poziciji.[11]

Suprotno porfirinima pod utjecajem elektron-donora, molekule **6** i **7**, (Slika 10) pokazale su najniži Φ_T (0.30 i 0.37). Smatra se da je za navedeni rezultat odgovorna elektron-akceptorska nitrofenilna skupina koja povećava π konjugaciju porfirina u pobuđenom stanju te na taj način pospješuje deaktivaciju radijacijskim procesima.[11]

.

4.1.1. Pulsna fluorescentna tehnika (*eng*. Pulse train fluorescence technique, PTF)

Pulsna fluorescentna tehnika koristi jedan snop zraka te omogućuje detekciju bez pozadinskog šuma. Detektira dinamiku deaktivacije prvog singletnog pobuđenog stanja u tripletno, na temelju fluorescentnog signala. Fluorescencija je inducirana setom pulseva laserskih zraka te se mjeri kao funkcija vremena i ozračivanja jednim snopom.[15] Uzorak se pobuđuje jednim snopom zraka trideset puta (u obliku pulseva), pri čemu je vremenski razmak između svake ekscitacije 13,2 ns.[11] Dinamika zauzimanja određenih elektronskih stanja može se prikazati dijagramom Jablonskog u tri razine (Slika 11).



Slika 11 Dijagram Jablonskog u tri razine: S_0 (osnovno stanje), S_1 (prvo singletno pobuđeno stanje), T_1 (tripletno pobuđeno stanje). Ravne linije označavaju radijacijske procese, a valovite neradijacijske procese.[11]

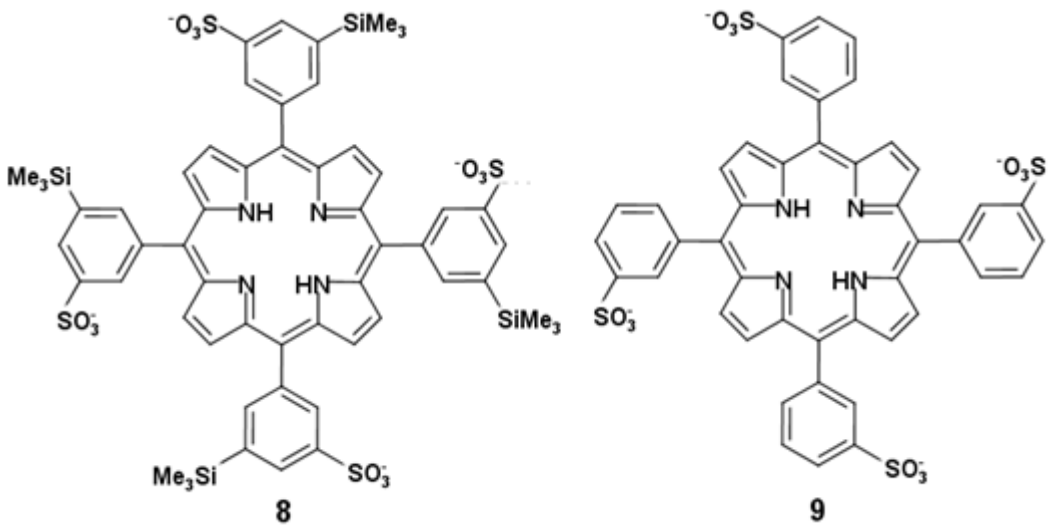
Nakon prvog pulsa molekule prelaze iz osnovnog u prvo pobuđeno singletno stanje. Molekule se iz pobuđenog stanja mogu relaksirati u osnovno stanje radijacijskim ili neradijacijskim procesima, ili, međusustavnim prijelazom prelaze u tripletno stanje. Kako bi se pojednostavilo računanje, zanemareni su prijelazi u viša pobuđena stanja jer se relaksacija događa u pikosekundama, odnosno njihovo vrijeme života je puno kraće od vremena trajanja pulsa. Također, zanemarena je i fosforescencija s obzirom da je njeno vrijeme u mikrosekundama, što je dulje od vremena trajanja fluorescencije. Tokom interakcije laserskog snopa zraka s molekulom, nema dovoljno vremena za relaksaciju u osnovno stanje, zbog čega elektroni ostaju u prvom tripletnom pobuđenom stanju. T_1 ima dulje vrijeme života od trajanja jednog pulsa pa je svakim novim snopom zraka uzorak u drugačijem stanju jer je novi dio molekule pobuđen i međusustavnim prijelazom zauzeo T_1 stanje. Radi se o kumulativnom procesu ponavljanja, sve dok zadnji snop zraka nije pušten na uzorak. Na početku, intenzitet fluorescencije je proporcionalan intenzitetu ekscitacije, međutim, kasnije, što veći broj pulseva pobuđuje uzorak, to veći broj molekula ostaje zarobljen u tripletnom pobuđenom stanju, smanjujući efektivan signal fluorescencije. Na temelju navedenog, koristeći vrijednosti apsorpcije pri valnoj duljini ekscitacije, te

pripadajući intenzitet fluorescencije, indirektno se određuju vrijednosti brzine međusustavnog prijelaza te prinosa tripleta.[11,15,21]

4.2. Hidrofilnost i sililacija

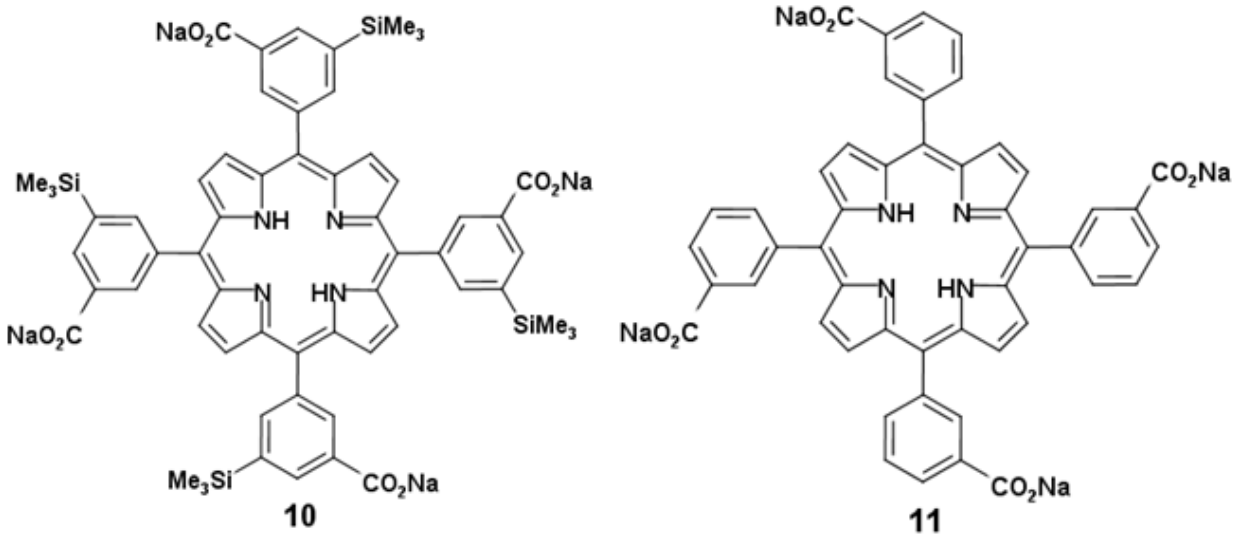
U području kemijske modifikacije porfirina, velike rezultate dao je silicij. Smatra se da ima potencijal poboljšati farmakološku i/ili fotokemijsku efikasnost molekula u koje je uveden, pri čemu je već pokazano poboljšanje fotofizikalnih i kemijskih svojstava aromatskih molekula.[22] Mnoge studije pokazuju da uvođenje silicija u molekule već poznatih lijekova, dovodi do značajnih promjena u njihovoj biološkoj aktivnosti.[23] To je navelo mnoge znanstvenike na razmišljanje o poboljšanju svojstava fotosenzibilizatora uvođenjem silicija unutar porfirinskog makrocikla.

Prvu sintezu porfirina sa silicijevim skupinama proveli su Kato i ostali[24]. Pokazali su da silicijeva skupina u *meso* poziciji ima veći utjecaj na porfirin nego ona u *β* poziciji. Nadalje, Horiuchi i ostali[23], fokusirali su se na usporedbu fotodinamičke aktivnosti derivata tetrafenilporfirina sa i bez silicijeve skupine. Sililacija se pokazala veoma efikasnom u povećanju prinosa singletnog kisika, što su i demonstrirali u staničnoj kulturi ljudskih tumorskih stanica. Znanstvenicima je bio cilj sintetizirati porfirin koji će zadovoljiti pet svojstava idealnog fotosenzibilizatora: topiv u vodi, selektivno se akumulira u tumorskom tkivu, lako je apsorbiran u stanicu, ima visoki molarni apsorpcijski koeficijent te visoki prinos singletnog kisika. Sintezom 5,10,15,20-tetrakis(4-trimetilsililfenil) porifirin natrijeve soli (SiTPP) postignut je veći prinos singletnog kisika u odnosu na tetrafenilporfirin (TPP), no SiTPP nije topiv u vodi pa se ne može klasificirati kao idealni fotosenzibilizator. Sljedeći pokušaj bila je sinteza 5,10,15,20-tetrakis(3-sulfonatofenil)porifirin natrijeve soli ($TPPS_4$, porfirin **9**) i njegovog derivata u kojeg je uvedena silicijeva skupina ($SiTPPS_4$, porfirin **8**) (Slika 12).



Slika 12 Strukture derivata tetrafenilporfirina sa silicijem (porfirin 8, $SiTPPS_4$) i bez silicija (porfirin 9, $TPPS_4$).[23]

$TPPS_4$ je u vodi topiv derivat porfirina zbog uvedene sulfonatne skupine. Njegova fotofizikalna svojstva uspoređena su s onima izmjerenim za $SiTPPS_4$. Na temelju spektra fosforescencije singletnog kisika, dobivenog ekscitacijom $TPPS_4$ i $SiTPPS_4$ pri 355 nm, određen je prinos singletnog kisika (Φ_Δ) za oba spoja. Φ_Δ za $TPPS_4$ iznosi 0.57, dok za $SiTPPS_4$ iznosi 0.66. Usporedbom rezultata Φ_Δ za $TPPS_4$ i TPP (Φ_Δ = 0.58), zaključuje se da sulfonatna grupa ne dovodi do značajnih promjena u prinosu singletnog kisika. Oba derivata porfirina u koje su uvedene silicijeve skupine ($SiTPPS_4$ i SiTPP), pokazale su veće prinose singletnog kisika (Φ_Δ (SiTPP) = 0.77, Φ_Δ ($SiTPPS_4$) = 0.66), u odnosu na iste derivate bez silicijeve skupine. Iz navedenog može se zaključiti da sililacija povećava prinose singletnog kisika porfirinskih derivata.[23]



Slika 13 Strukture derivata tetrafenilporfirina, porfirin 10 ($SiTPPC_4$) i porfirin 11 ($TPPC_4$).[22]

Horiuchi i znanstvenici u istraživanje su uključili i još jedan par derivata porfirina: 5,10,15,20-tetrakis(3-karboksifenil)porfirin natrijevu sol ($TPPC_4$) i njegov derivat sa silicijevom skupinom, $SiTPPC_4$ (Slika 13). Poznato je da je karboksilna skupina manje hidrofilna od sulfonatne, te je već uvedena u mnoge fotosenzibilizatore za fotodinamičku terapiju, uključujući i, u klinici korišten, Fotofrin. Znanstvenici su u istraživanje ušli s pretpostavkom da će uvedena karboksilna skupina povećati lipofilnost i fotodinamičku aktivnost porfirina. Vrijednosti Φ_Δ za $SiTPPC_4$ i $TPPC_4$ iznose, redom, 0.72 i 0.56, čime se pokazalo da sililacija povećava prinos singletnog kisika, kao što je to bilo u slučaju TPP (Kato 2015.) i $TPPS_4$.[23] Također, važna je i usporedba Φ_Δ za $SiTPPC_4$ i $SiTPPS_4$ kojom se uočava veća vrijednost Φ_Δ za $SiTPPC_4$ nego za $SiTPPS_4$, dok su vrijednosti za derivate bez silicijeve skupine ($TPPS_4$ i $TPPC_4$) slične.[22]

Utjecaj sililacije na fototoksičnost istražen je na U251 ljudskim tumorskim stanicama, gdje je $SiTPPC_4$ dao puno bolje rezultate u odnosu na $SiTPPS_4$. Veća fototoksičnost $SiTPPC_4$ je razlog većeg prinosa singletnog kisika, te veće lipofilnosti navedenog derivata. Dakle, znanstvenici su potvrdili poboljšanje fotodinamičke aktivnosti porfirina sililacijom, pri čemu su

dodatno povećali efikasnost fotosenzibilizatora zamjenom sulfonatne skupine karboksilnom.[22]

4.2.1. Mjerenje kvantnog prinosa singletnog kisika (Φ_Δ)

U slučaju sililacije TPP i $TPPS_4$, povećanje Φ_Δ nije objašnjeno promjenom kvantnog prinosa međusustavnog prijelaza, već povećanjem frakcije tripletnog senzibilizatora koji uhvaćen molekularnim kisikom daje singletni kisik (f_Δ^T). Isti mehanizam objašnjava povećanje Φ_Δ karboksilnih derivata.[22] Prinos singletnog kisika opisan je slijedećom jednadžbom:

$$\Phi_\Delta = \Phi_T P_T^{O2} f_\Delta^T$$

Φ_T predstavlja kvantni prinos međusustavnog prijelaza, a određen je kao relativna vrijednost iz apsorpcije tripletnog pobuđenog stanja na 665 nm. P_T^{O2} je efikasnost kojom molekularni kisik hvata tripletno stanje porfirina, a određen je preko konstante brzine nestajanja tripletnog pobuđenog stanja u prisutnosti molekularnog kisika ($k_{TS}^{O_2}$) te argona (k_{TS}^{Ar}):

$$P_T^{O2} = (k_{TS}^{O_2} - k_{TS}^{Ar}) / k_{TS}^{O_2}$$

f_Δ^T je frakcija porfirina u tripletnom stanju koja je odgovorna za nastanak singletnog kisika (efikasnost senzibilizatora). Za $SiTPPS_4$ i $TPPS_4$ f_Δ^T iznosi, redom, 0.76 i 0.66, na temelju čega je zaključeno da je povećanje efikasnosti senzibilizatora, f_Δ^T , odgovorno za poboljšanje kvantnog prinosa singletnog kisika, Φ_Δ.[23]

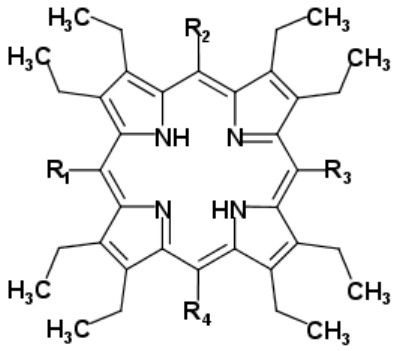
4.3. Supstitucija porfirina halogenim elementima

U PDT-u, visoko reaktivni singletni kisik nastaje na temelju dugoživućeg tripletnog pobuđenog stanja PS-a, te je ključno maksimizirati kvantni prinos formacije tripletnog stanja bez skraćivanja njegovog poluživota. To se postiže uvođenjem metalnih kationa (Mg^{2+}, Zn^{2+}, Al^{3+}, Sn^{4+}) u porfirinsku jezgru, međutim takva molekula ima neželjenih učinaka (promjene u topivosti, redoks reakcijama, toksičnosti te energijama pobuđenih stanja PS-a). Zato je razvijena alternativna tehnika povećanja prinosa tripletnog pobuđenog stanja, a poziva se na učinak unutarnjeg teškog atoma (*eng*. internal heavy-atom effect), pri čemu teški atom predstavlja halogeni element.[25] Navedeni fenomen, učinak teškog atoma, dopušta prijelaz singletnog pobuđenog stanja u tripletno koje je, prvim selekcijskim pravilom, zabranjeno. Elektronski prijelazi između stanja različite multipletnosti (S → T) su zabranjeni, međutim, postoje mnogi načini na koje se selekcijska pravila krše, te se u stvarnosti navedeni prijelazi ipak događaju.[13] Tokom gibanja elektrona nastaje magnetno polje te dolazi do interakcije spinskog magnetskog momenta elektrona i magnetnog polja uslijed gibanja jezgre. Navedena interakcija poznata je kao sprezanje spina i orbite (*eng*. spin-orbit coupling), a uzrokuje kvantno mehaničko miješanje stanja različite multipletnosti. S obzirom da je veličina magnetnog polja jezgre direktno proporcionalna naboju jezgre, a prema tome, i atomskom broju, sprezanje spina i orbite raste povećanjem atomskog broja. Posljedično, povećanje brzine radijacijskih i ne-radijacijskih, spin zabranjenih procesa, često se uočava upravo u molekulama s atomom velikog atomskog broja.[26]

Halogeni elementi kao teški atomi koji su uvedeni u porfirinsku jezgru povećavaju sprezanje spina i orbite. Na taj način mijenjaju fotofizikalna svojstva molekula, što su Bonnett, Harriman i Kozyrev istražili na halogeniranim oktaalkilporfirinima. Tri su dostupna mjesta za uvođenje

halogenog elementa u porfirin: *meso*, *β*-pirolni i alkilni ugljikov atom, a njegovim direktnim inkorporiranjem preferira se međusustavni prijelaz.

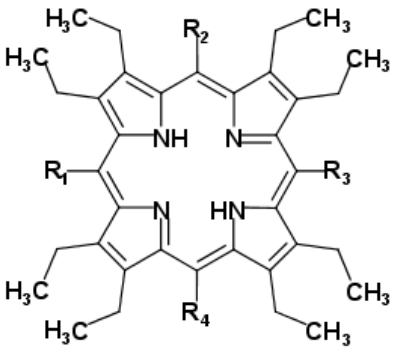
Insercijom halogena (F, Cl, Br) u *meso* poziciju, formirani su spojevi **12**-**14** (Slika 14), pri čemu nije bilo moguće sintetizirati derivat s jodom. Halogenirani derivati pokazali su niže prinose i vremena života fluorescencije, više prinose tripletnog pobuđenog stanja, te smanjenje vremena života tripleta.



12 $R_1 = F; R_2 = R_3 = R_4 = H$
13 $R_1 = Cl; R_2 = R_3 = R_4 = H$
14 $R_1 = Br; R_2 = R_3 = R_4 = H$

Slika 14 Struktura porfirina s pripadajućim halogenim elementima (F, Cl, Br) u *meso* pozicijama.[25]

Najveći učinak imao je brom, a potom, klor i fluor, što je zaključeno na temelju prinosa tripletnog stanja molekula sa slike 14 (Φ_T (**12**) = 0.70, Φ_T (**13**) = 0.89, Φ_T (**14**) = 0.98). Sintetizirani su i derivati **15**, **16**, **17** i **18** (Slika 15) koji se razlikuju po broju fluoridnih supstituenata. Na temelju rezultata prinosa tripletnog stanja ovih molekula (Φ_T (**15**) = 0.81, Φ_T (**16**) = 0.72, Φ_T (**17**) = 0.78, Φ_T (**18**) = 0.65), ne može se zaključiti da veći broj fluoridnih supstituenata povećava prinos tripleta, kao što predviđa teorija sprezanja spina i orbite. Smatra se da je tome razlog fluor kao snažan elektron-akceptor.

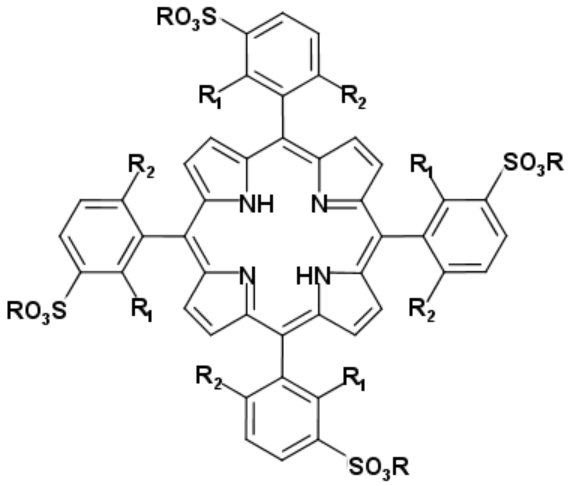


12 $R_1 = F; R_2 = R_3 = R_4 = H$
15 $R_1 = F; R_2 = H; R_3 = F; R_4 = H$
16 $R_1 = F; R_2 = F; R_3 = H; R_4 = H$
17 $R_1 = R_2 = R_3 = F; R_4 = H$
18 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = F$

Slika 15 Struktura porfirina s atomom fluora u *meso* pozicijama.[25]

Supstituenti u *meso* poziciji pokazali su veći efekt na sprezanje spina i orbite, ali s obzirom da mijenjaju elektronsku strukturu prstena te znatno skraćuju vrijeme života tripleta, supstituenti u alkilnoj i pirolnoj poziciji su bolji izbor za PDT.[25]

a R = $-C_3H_7$
b R = $-C_3H_4F_3$
c R = $-C_4H_9$
d R = $-C_4H_3F_6$
e R = $-C_5H_6F_5$



19 R_1 =H; R_2 = F
20 R_1 =R_2 = F

Slika 16 Struktura porfirina 19 i 20 sa pripadajućim spstituentima (a-e) u *meso* pozicijama.[27]

Atomi fluora uvedeni su i u mnoge biološki aktivne komponente sa svrhom modifikacije njihovih fizikalno-kemijskih i farmakokinetičkih svojstava te učinkovitosti u biomedicinskom području. Simoes i drugi,[27] osim strategije uvođenja fluora, opisuju i način postizanja amfifilnosti sulfonatnog estera porfirina birajući broj atoma fluora te duljine alkilsulfonatnog esterskog lanca. Sintetizirali su *meso* (sulfonatne esterfluoroarilne) porfirine (**19a-e**, **20a-e**) (Slika 16), te opisali njihova fotofizikalna svojstva u svrhu selekcije potencijalnih PS-a za primjenu u PDT. Svi derivati porfirina pokazali su niske kvantne prinose fluorescencije, iz čega se zaključuje da je glavni put deaktivacije singletnog stanja međusustavni prijelaz. Nasuprot rezultatima Bonetta i ostalih,[25] Simoes i drugi[27] pokazali su suprotne rezultate: povećanjem broja fluorovih atoma dobiveni su veći Φ_Δ porfirinskih derivata (Slika 17). Povećanje Φ_Δ direktno je vezano uz povećanje Φ_T (učinak teškog atoma), što je zaključeno na temelju neznatnih promjena vrijednosti konstante brzine prijenosa energije sa tripletnog PS-a na molekularni kisik. Najveći Φ_Δ, koji iznosi 1, dao je **20d**-$F_2PC_5H_3F_6$ zbog čega se pokazao primjenjivim PS-om za PDT. Također, zaključuje se i da, uvođenje fluorova atoma u derivate tetrafenilporfirina, može poboljšati njihovu učinkovitost u PDT.[27]

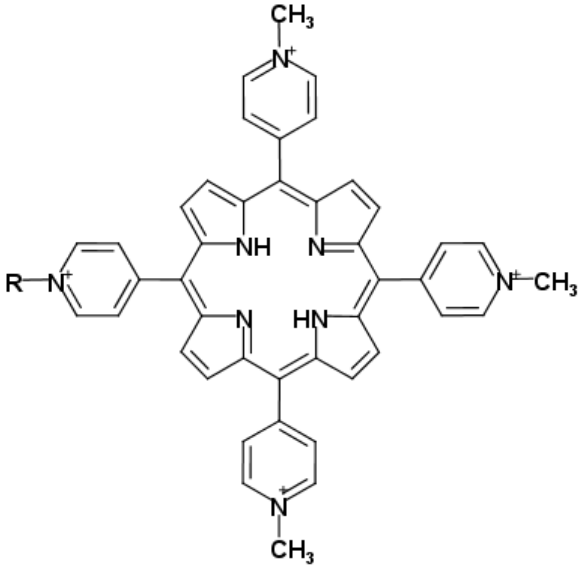
Porfirin	Φ_Δ
20b – $F_2PC_3H_4F_3$	0.74+/-0.03
19d – $FPC_4H_3F_6$	0.81+/-0.02
19a – FPC_3H_7	0.74+/-0.02
20d – $F_2PC_4H_3F_6$	1.00+/-0.04

Slika 17 Tablica vrijednosti kvantnog prinosa singletnog kisika (Φ_Δ) za slijedece porfirine: 20b-$F_2PC_3H_4F_3$ (5,10,15,20-Tetrakis[2,6-difluoro-3(-3-trifluoropropiloksi)-sulfonilfenil] porfirin), 19d-$FPC_4H_3F_6$ (5,10,15,20-Tetrakis[2-fluoro-5-(2,2,3,4,4,4-heksafluorobutiloksi)sulfonilfenil] porfirin), 19a-FPC_3H_7 (5,10,15,20-Tetrakis[2-fluoro-5-(3-propiloksi)-sulfonilfenil] porfirin), 20d-$F_2PC_5H_3F_6$ (5,10,15,20-Tetrakis[2,6-difluoro-3-(2,2,3,4,4,4-heksafluorobutiloksi)sulfonilfenil] porfirin). Modificirano prema[27]

5. Utjecaj agregacije na fotofizikalna svojstva *meso*-supstituiranih porfirina

Molekulsko samoudruživanje (*eng*. self – assembly), vođeno nekovalentnim intermolekularnim interakcijama (Van der Waals, vodikove veze, elektrostatske interakcije, metal – ligand interakcije)[19], veoma je značajno u prirodi, a posebice u živom organizmu (npr. agregati klorofila u fotosintezi). Pritom, sve je veći interes za primjenu agregacije molekula, posebice π konjugiranih sustava, u proizvodnji raznih materijala, optici te imitaciji fotofizikalnih procesa. Agregacije i dimerizacije porfirina uvelike mijenjaju njihove spektroskopske te energetske karakteristike i tako utječu na njihovu efikasnost u raznim primjenama.[1] Važnost fenomena agregacije u PDT-u dolazi iz povezanosti agregacije sa promjenom u hidrofobnosti, apsorpciji, fluorescencijskim svojstvima, transportu kroz membranu te lokalizaciji u stanici.[2] U PDT-u, PS je ključna molekula koja da bi djelovala na ciljno tkivo mora biti apsorbirana u stanicu. Porfirini imaju tendenciju agregacije u vodenom sustavu, pri čemu intenzitet agregacije ponajviše ovisi o polarnosti supstituenta tetrapirolnog prstena.[28] Mnoge studije pokazuju da formiranje agregata značajno mijenja UV/VIS spektar, kvantne prinose, vremena života singletnog i tripletnog stanja, a time i stvaranje reaktivnog singletnog kisika.[19]

5.1. Fotofizikalna svojstva *meso*-supstituiranih kationskih porifirina u fiziološkoj otopini (PBS) i 2% otopini natrijevog dodecilsulfata (SDS)



21 R = $-CH_3$

22 $-CH_2(CH_2)_4CH_3$

23 $-CH_2(CH_2)_8CH_3$

24 $-CH_2(CH_2)_{12}CH_3$

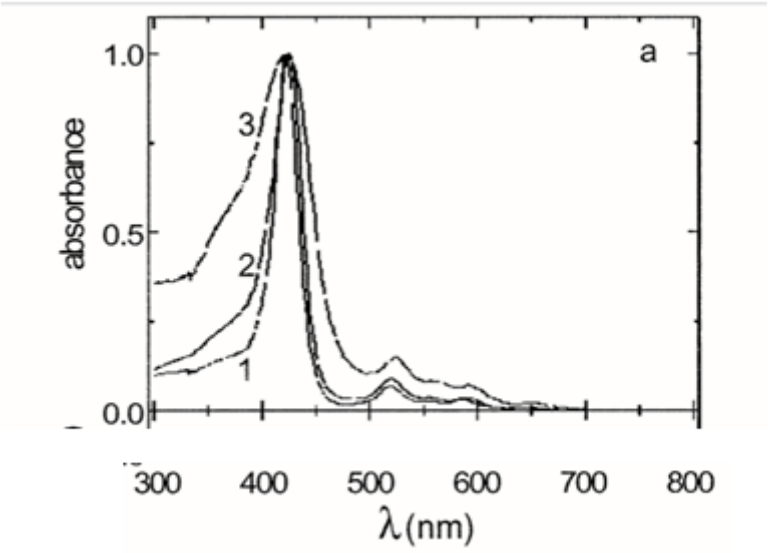
25 $-CH_2(CH_2)_{16}CH_3$

26 $-CH_2(CH_2)_{20}CH_3$

Slika 18 Kemijska struktura T_4MPyP (porfirin 21) i njegovih derivata (porfirini 22-26) s jednim *N*-alkilnim supstituentom (ugljikovodični lanci sa rastućim brojem ugljikovih atoma).[12]

Reddi i ostali[12] istražili su fotofizikalna i fotosenzibilizatorska svojstva pet derivata 5, 10, 15, 20 – tetrakis – (4–*N*–metilpiridil) porfina (T_4MpyP, porfirin **21**) kojem je *N*-metilna skupina zamijenjena ugljikovodičnim lancem od 6, 10, 14, 18 i 22 ugljikova atoma (Slika 18). Cilj je bio uočiti efekt alkilnih supstituenata porfirina na njihovu fototoksičnost te afinitet za bakterijsku stanicu. Od navedenih derivata istaknuo se porfirin **26** sa

najduljim ugljikovodičnim lancem (22 ugljikova atoma). Prva uočena razlika bila je apsorpcijski spektar (Slika 19).



Slika 19 Apsorpcijski spektar T_4MPyP (1), C18 (2) i C22 (3) u fiziološkoj otopini pri pH = 7.4.[12]

T_4MPyP pokazuje tipični spektar *meso* supstituiranog slobodno baznog porfirina (Soret vrpca na 422nm, Q vrpce na 520-640nm). Povećanjem duljine ugljikovodičnog lanca (do 14 C atoma), u njegovim derivatima, ne uočava se promjena u spektru, dok porfirin **26** pokazuje znatnu promjenu. U području Soret vrpce uočava se proširenje, što ukazuje na agregaciju ovog porfirina. Slijedeće mjerenje bilo je mjerenje Φ_F derivata u PBS-u i 2% vodenoj otopini SDS-a. Φ_F za porfirin **26** u PBS-u iznosi 0.001, dok za ostale derivate iznosi približno 0.02. Nasuprot tome, njegov Φ_F u SDS-u iznosi 0.029 što je približno jednako vrijednostima Φ_F drugih derivata. Razlog velikog odstupanja Φ_F porfirina **26** u PBS-u je njegova niska topljivost u neutralnoj vodenoj otopini, što uzrokuje agregaciju. Dodatak SDS surfaktanta uzrokuje razgradnju agregata, što za posljedicu ima povećanje Φ_F. Ništa drugačije nisu pokazale niti vrijednosti Φ_T. Porfirin **26** pokazao je najniži Φ_T u PBS-u (Φ_T (**21**) = 0.73, Φ_T (**22-24**) ≈ 0.5, Φ_T (**25**) = 0.17, Φ_T (**26**) < 0.08; svi rezultati imaju odstupanje +/- 15%). Pretpostavka da porfirin **26** ima znatno drugačija fotofizikalna svojstva u

neutralnoj vodenoj otopini, potvrđena je time da se njegova svojstva i efikasnost izjednačavaju s ostalim derivatima u prisutnosti SDS-a.[12]

5.1.1. Model molekularnog ekscitona

Ponašanje agregata u pobuđenom stanju opisano je modelom molekularnog ekscitona. Navedeni model definiran je kao interakcija pobuđenih stanja između slabo povezanih molekularnih agregata, a opisuje prijenos ekscitacijske energije.[29] Jedna od teorija je Frenkel eksciton teorija koja elektronsku strukturu molekularnih agregata objašnjava uzimajući u obzir njegove monomere u interakciji. Na svakom od monomera lokaliziran je eksciton kojeg čine elektron i „rupa" suprotnog naboja.[30] Tako se unutar formiranog agregata stvaraju putevi koji povećavaju vjerojatnost deaktivacije pobuđenih stanja neradijacijskim procesima (ponajviše unutarnjom konverzijom). Zbog navedenog, posljedica agregacije je brza disipacija ekscitacijske energije što rezultira smanjenjem kvantnih prinosa i vremena života pobuđenih stanja.[31]

5.2. Utjecaj modifikacije svojstava otapala na agregaciju porfirina topivih u vodi

Stvaranje agregata može biti inducirano i kontrolirano kroz ionsku jakost, pH otopine, interakcije porfirina i surfaktanta ili koncentracije monomera.[31] U slučaju porfirina topivih u vodi, koji su karakterizirani ionizirajućim supstituentima (npr. *meso*-arilporfirini sa sulfonatnim i karboksilnim skupinama), razina dimerizacije ovisi o svojstvima vodenog medija. Mnoge studije pokazuju da je smanjenje formacije dimera moguće dodatkom elektrolita u otopinu ili pak podešavanjem pH otopine na onu vrijednost pri kojoj su bočni lanci nabijeni. U oba slučaja, uzrok smanjenja agregacije porfirina je njihovo elektrostatsko odbijanje. Primjećeno je i da se dodatkom alkohola u vodenu otopinu povećava agregacija porfirina jer alkohol, kao manje polarno otapalo, smanjuje dielektričnu konstantu vode, zbog čega se ona više nije u stanju jednakom jačinom suprotstaviti elektrostatskim privlačenjima porfirina. Pritom, razina monomerizacije ovisi o dielektričnoj konstanti smjese otapala, a ne o postotku dodanog alkohola. Uočeno je i da, pri ionskoj jakosti od 0.1M, neki porfirini intenzivno dimeriziraju, dok pri ionskoj jakosti blizu nule, dimerizacija nije zamijećena.[2,32]

6. Zaključak

Fotodinamička terapija je neinvazivni tretman čija su ograničenja definirana specifičnošću i potentnošću fotosenzibilizatora. Efektivnim fotosenzibilizatorima pokazali su se makrociklički spojevi kojima pripadaju porfirini. Cilj sve većeg broja istraživanja je pronaći idealni fotosenzibilizator s visokim kvantnim prinosom tripletnog pobuđenog stanja i singletnog kisika. U tom području sve više se istražuju *meso*-supstituirani porfirini, s obzirom da svojstva supstituenata u *meso* poziciji značajno utječu na vrijednosti navedenih prinosa. Sintezom novih porfirina ili kemijskom modifikacijom derivata čija se svojstva pokušavaju poboljšati, nastoji se pronaći idealni fotosenzibilizator.

Jedan od uspješnih istraživanja je usporedba fotodinamičke aktivnosti derivata tetrafenilporfirina sa i bez silicijeve skupine. Uvođenjem silicija u *meso* supstituente tetrafenilporfirina, pokazano je povećanje prinosa singletnog kisika, u odnosu na derivate bez silicija. Od ispitivanih, 5,10,15,20-tetrakis(4-trimetilsililfenil)porifirin natrijeva sol pokazala je najveći prinos singletnog kisika, no s obzirom da nije topiva u vodi, idealniji PS, bliske vrijednosti prinosa singletnog kisika je derivat 5,10,15,20-tetrakis(3-karboksifenil) porfirin natrijeve soli ($TPPC_4$) sa silicijem (porfirin **10**).

Istražuje se i učinak teškog atoma na međusustavni prijelaz, zbog čega su u *meso* pozicije porfirina uvedeni halogeni elementi (F, Br i Cl). Porfirin **14**, sa Br u *meso* poziciji, pokazao je najveći prinos tripletnog pobuđenog stanja, dok je fluor u dva istraživanja dao različite rezultate. Ovisno o tome nalazi li se fluor sam u *meso* poziciji porfirina ili je dio neke skupine, veći broj fluorovih atoma u porfirinu može uzrokovati povećanje ili smanjenje prinosa tripletnog pobuđenog stanja i singletnog kisika. Veliki učinak na međusustavni prijelaz imaju i elektron-donorske te elektron-

akceptorske skupine u *meso* pozicijama. Iako je zaključak istraživanja da elektron-donorska, metoksifenilna skupina (porfirini **1**, **2**, **3**), izrazito povećava prinos tripletnog pobuđenog stanja, a elektron-akceptorska, nitrofenilna skupina (porfirini **6** i **7**), izrazito smanjuje, to ne potvrđuju svi istraženi porfirini sa navedenim skupinama te su potrebna dodatna istraživanja.

Supstituenti, osim direktnog utjecaja, fotofizikalna svojstva porfirina mogu mijenjati i indirektno, utječući na njihovu međusobnu interakciju te interakciju sa okolinom. Primjer su derivati 5, 10, 15, 20 – tetrakis – (4–*N*–metilpiridil) porfina (porfirin **21**) u kojima je jedna *N*-metil skupina zamijenjena ugljikovodičnim lancem (porfirini **22-26**). Derivati su se razlikovali po duljini ugljikovodičnog lanca i fotofizikalnim svojstvima. Porfirin **26**, sa najduljim ugljikovodičnim lancem, u vodenoj otopini, imao je najniži prinos tripletnog pobuđenog stanja, dok je dodatkom surfaktanta, ta vrijednost bila približna ostalim porfirinima. Razlog tome jesu agregati porfirina, čiije je stvaranje u vodenoj otopini potaknuto prisutstvom izrazito hidrofobnog supstituenta. Bitan čimbenik specifičnosti i potentnosti porfirina kao fotosenzibilizatora jesu supstituenti koji, ne samo da mijenjaju njegovu tetrapirolnu strukturu, već i način na koji porfirini interagiraju međusobno i sa okolinom u kojoj se nalaze.

7. Literatura

1 Giovannetti R. The Use of Spectrophotometry UV-Vis for the Study of Porphyrins. In: Uddin J (ed). *Macro To Nano Spectroscopy*. InTech, 2012 doi:10.5772/38797.

2 Wijesekera TP, Dolphin D. Some Preparations and Properties of Porphyrins. In: Kessel D (ed). *Methods in Porphyrin Photosensitization*. Springer US: Boston, MA, 1985, pp 229–266.

3 Josefsen LB, Boyle RW. Unique Diagnostic and Therapeutic Roles of Porphyrins and Phthalocyanines in Photodynamic Therapy, Imaging and Theranostics. *Theranostics* 2012; **2**: 916–966.

4 Josefsen LB, Boyle RW. Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitisers. *Met-Based Drugs* 2008; **2008**: 1–23.

5 Macdonald IJ, Dougherty TJ. Basic principles of photodynamic therapy. *J Porphyr Phthalocyanines JPP* 2001; **05**: 105–129.

6 Sternberg ED, Dolphin D, Brückner C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron* 1998; **54**: 4151–4202.

7 Zhang J. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharm Sin B* 2018; **8**: 137–146.

8 Dolmans. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Publ Group* 2003; **3**: 380–387.

9 Ethirajan M. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. *Chem Soc Rev* 2011; **40**: 340–362.

10 Juzeniene A, Nielsen KP, Moan J. Biophysical Aspects of Photodynamic Therapy. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2006; **25**: 7–28.

11 de Souza TGB. Studying the intersystem crossing rate and triplet quantum yield of *meso* -substituted porphyrins by means of pulse train fluorescence technique. *J Porphyr Phthalocyanines* 2016; **20**: 282–291.

12 Reddi E. Photophysical Properties and Antibacterial Activity of Meso-substituted Cationic Porphyrins¶. *Photochem Photobiol* 2007; **75**: 462–470.

13 Odak I, Škorić I. *Organska fotokemija - principi i primjena*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu: Zagreb, 2017.

14 Perun S, Tatchen J, Marian CM. Singlet and Triplet Excited States and Intersystem Crossing in Free-Base Porphyrin: TDDFT and DFT/MRCI Study. *ChemPhysChem* 2008; **9**: 282–292.

15 De Boni L. Pulse train fluorescence technique for measuring triplet state dynamics. *Opt Express* 2011; **19**: 10813.

16 Prushan. Absorption and Fluorescence Spectroscopy of Tetraphenylporphyrin§ and Metallo-Tetraphenylporphyrin. 2005; : 1–9.

17 Kim BF, Bohandy J. SPECTROSCOPY OF PORPHYRINS. *John Hopkins APL Technical Digest* 1981; **2**: 11.

18 Dayer M, Moosavi-Movahedi A, Dayer M. Band Assignment in Hemoglobin Porphyrin Ring Spectrum: Using Four-Orbital Model of Gouterman. *Protein Pept Lett* 2010; **17**: 473–479.

19 Moreira LM. Photodynamic Therapy: Porphyrins and Phthalocyanines as Photosensitizers. *Aust J Chem* 2008; **61**: 741.

20 Plaetzer K. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci* 2009; **24**: 259–268.

21 Gotardo F. Investigating the intersystem crossing rate and triplet quantum yield of Protoporphyrin IX by means of pulse train fluorescence technique. *Chem Phys Lett* 2017; **674**: 48–57.

22 Horiuchi H. Silylation Improves the Photodynamic Activity of Tetraphenylporphyrin Derivatives In Vitro and In Vivo. *Chem - Eur J* 2014; **20**: 6054–6060.

23 Horiuchi H. Silylation enhancement of photodynamic activity of tetraphenylporphyrin derivative. *J Photochem Photobiol Chem* 2011; **221**: 98–104.

24 Kato K. Peripherally Silylated Porphyrins. *Chem - Eur J* 2015; **21**: 13522–13525.

25 Bonnett R. Photophysics of halogenated porphyrins. *J Chem Soc Faraday Trans* 1992; **88**: 763.

26 Koziar JC, Cowan DO. Photochemical heavy-atom effects. *Acc Chem Res* 1978; **11**: 334–341.

27 Simões AVC. Amphiphilic meso(sulfonate ester fluoroaryl)porphyrins: refining the substituents of porphyrin derivatives for phototherapy and diagnostics. *Tetrahedron* 2012; **68**: 8767–8772.

28 Redmond RW, Land EJ, Truscott TG. Aggregation Effects on the Photophysical Properties of Porphyrins in Relation to Mechanisms Involved in Photodynamic Therapy. In: Kessel D (ed). *Methods in Porphyrin Photosensitization*. Springer US: Boston, MA, 1985, pp 293–302.

29 Kasha M. EnergyTransferMechanismsand the MolecularExciton Model for MolecularAggregates"2. *Radiat Res* 1963; **20**: 55–71.

30 Schröter M. Exciton–vibrational coupling in the dynamics and spectroscopy of Frenkel excitons in molecular aggregates. *Phys Rep* 2015; **567**: 1–78.

31 Gonçalves PJ. Excited-state dynamics of meso-tetrakis(sulfonatophenyl) porphyrin J-aggregates. *Opt Mater* 2012; **34**: 741–747.

32 White, Dolphin. *The Porphyrins V5: Phyisical Chemistry, Dio 3.* Academic Press: New York, 1978.

Zahvala

Zahvaljujem se svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Neli Malatesti, na pruženoj prilici za pisanje završnog rada, trudu koji je uložila te na svim informacijama, uputama i smjernicama. Bila mi je čast i užitak pisati završni rad pod Vašim mentorstvom.

Hvala Vam.

europass Životopis

OSOBNE INFORMACIJE

Vanja Baričević

Janka Polić Kamova 73, 51 000 Rijeka (Hrvatska)

091 462 5598

vanja.baricevic@gmail.com

Datum rođenja 18.03.1998. | Državljanstvo hrvatsko

RADNO ISKUSTVO

2018.

Demonstrator na kolegiju „Organska kemija“
Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2016-danas

Student
Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)

2012-2016

Gimnazija Andrije Mohorovičića Rijeka, Rijeka (Hrvatska)
-prirodoslovno-matematički smjer

2004-2012

Osnovna škola Ivana Mažuranića, Novi Vinodolski (Hrvatska)

2006-2012

Osnovna glazbena škola pri Osnovnoj školi Ivana Mažuranića, Novi Vinodolski (Hrvatska)

2010-2012

Prva pomoć, Gradsko društvo Crvenog križa Novi Vinodolski

OSOBNE VJEŠTINE

europass Životopis

Materinski jezik: hrvatski

Strani jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	B2	B2	B2	B2	B2
njemački	A2	A2	A2	A2	A2

Stupnjevi: A1/2: Temeljni korisnik - B1/B2: Samostalni korisnik - C1/C2 Iskusni korisnik
Zajednički europski referentni okvir za jezike

Digitalne vještine

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Iskusni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik

Stupnjevi: Temeljni korisnik - Samostalni korisnik - Iskusni korisnik
Digitalne vještine - tablica za samoprocjenu

-vješto korištenje Windows Office osnovnim programima (Word, Excel, PowerPoint)
-poznavanje rada u kemijskim programima MarvinSketch, Chimera, Avogadro, PyMOL, Gamess
-poznavanje rada u programima Python, HTML
-pretraživanje baza podataka kao npr. Protein Data Bank (PDB)

Vozačka dozvola: B kategorija

DODATNE INFORMACIJE

Priznanja i nagrade

Državno prvenstvo školskih športskih društava Republike Hrvatske (2.-4.05.2012); 3.mjesto u sportu Plivanje
Natjecanje mladih Hrvatskog Crvenog križa, Gospić – 1.mjesto (2012.)
Sudjelovanje na XVI. državnom Natjecanju mladih Hrvatskog Crvenog križa (2012.)
Fužinarski polumaraton „Tri jezera“- 2018., 21.097km – 1.mjesto u kategoriji FU23
8. Adria Advent Maraton (2019.), 21.0975km – 2.mjesto u kategoriji FU23
Molo longo trk 6km (Homo si teć, 2019.) – 3.mjesto u kategoriji FU22
Fužinarski polumaraton „Tri jezera“- 2019., 21.097km – 1.mjesto u kategoriji FU23

Radionice

Program vršnjačke pomoći (Teorija izbora i realitetne terapije Williama Glassera; 2009./10.)
„Uvod u spektroskopiju nuklearne magnetske rezonancije“ („Kemijsko-inženjerska radionica HDKI-ja“, 14 i 15.12.2018.)

Certifikati

Konferencija „Budućnost i perspektiva studija“ (2018.)
Zadar - Wings for Life World Run (2017., 2018.)
Fužinarski polumaraton „Tri jezera“ - 2018., 2019.
4. ZAGREB21 – Zagrebački proljetni polumaraton (2019.)
8. Adria Advent Maraton (2019.)

Volontiranje

2. državni susreti MATP-a, Kraljevica (2012.)
Otvoreni dan Odjela za Biotehnologiju, Sveučilišta u Rijeci (2018.)
Vertikalno lice Platka (2019.)