

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT FARMACIE

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**CERCETĂRI INTERDIȘCIPLINARE ASUPRA UNOR
COMPUȘI CU STRUCTURI MACROCICLICE CU
POTENȚIALE APLICAȚII ÎN DIAGNOZA ȘI TERAPIA
ANTITUMORALĂ**

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC
PROF. DR. RICA BOSCHENCU

DOCTORAND
NATALIA RADULEA

2019

CUPRINS

INTRODUCERE.....	4
1 PROPRIETĂȚILE ȘI POTENȚIALUL BIOMEDICAL AL COMPUȘILOR CU STRUCTURI MACROCICLICE DE TIP PORFIRINIC.....	6
1.1 Structuri macrociclice de tip porfirinic. Proprietăți generale.....	6
1.2 Evaluarea teoretică privind aplicațiile biomedicale ale compușilor cu structuri macrociclice de tip tetrapirolic.....	16
1.2.1 Generalități privind potențialul terapeutic al porfirinelor.....	16
1.2.2 Scurt istoric al terapiei fotodinamice.....	19
1.2.3 Aspecte chimice, farmaceutice și biologice privind fotosensibilizatorii cu structuri macrociclice tetrapirolice utilizați în diagnoza și terapia antitumorală.....	22
1.3 Strategii moderne privind îmbunătățirea potențialului teranostic al compușilor cu structuri macrociclice.....	42
PARTEA EXPERIMENTALĂ	
2 DESIGNUL STRUCTURAL, SINTEZA ȘI EVALUAREA SPECTRALĂ A UNOR NOI COMPUȘI MACROCICLICI DE TIP PORFIRINIC.....	47
2.1 Evaluarea structurală <i>in silico</i> a noilor compuși macrociclici de tip ligand și combinații complexe ale acestora cu ioni metalici ai seriei 3d.....	47
2.2 Sinteza compușilor macrociclici de tip ligand și combinații complexe.....	57
2.2.1 Sinteza 5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetifenil)porfirinei...	61
2.2.2 Sinteza 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20- <i>tris</i> -(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirinei	64
2.2.3 Sinteza complexelor M(II)-5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20- <i>tris</i> -(4-acetoxi-3- metoxifenil)porfirina (M=Cu, Zn).....	73
2.2.4 Sinteza Zn(II)-5,15- <i>bis</i> -(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20- <i>bis</i> -(4- carboximetilfenil)porfirinei.....	75
2.3 Evaluarea structurală și spectrală a compușilor macrociclici nou sintetizați.....	77
2.3.1 Caracterizarea structurilor macrociclice prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier și spectroscopie de absorbție.....	77
2.3.2 Evaluarea proprietăților fluorescente ale compușilor macrociclici nou sintetizați.....	87
2.4 Concluzii.....	91
3 Evaluarea comportamentului biofizic la nivel membranal al compușilor macrociclici tetrapirolici nou sintetizați.....	92

3.1	Efectul compușilor 5,15- <i>bis</i> -(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20- <i>bis</i> -(4-carboximetilfenil) porfirina, 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20- <i>tris</i> -(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina și complexilor corespunzători cu ionul Zn(II) asupra potențialului transmembranar al celulelor din linia L929.....	92
3.2	Concluzii.....	99
4	Evaluarea <i>in vitro</i> la nivel celular a 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-<i>tris</i>-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirinei și complexilor corespunzători cu ionii Zn(II) și Cu(II). Studii pe linii de celule tumorale umane de adenocarcinom de colon HT-29, fibroblaști de șoarece din linia L929, celule PBMC și celulele monocitare umane SC.....	100
4.1	Capacitatea de localizare la nivel celular a compusului 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20- <i>tris</i> -(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina.....	103
4.2	Efectul <i>in vitro</i> al compușilor porfirinici asupra viabilității și proliferării celulare.....	108
4.3	Efectul <i>in vitro</i> al compușilor porfirinici asupra integrității membranare.....	111
4.4	Evaluarea procesului de apoptoză și necroză celulară.....	115
4.5	Efectul <i>in vitro</i> exercitat de compușii 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20- <i>tris</i> -(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina și Zn(II) 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20- <i>tris</i> -(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina în soluții cu concentrații mari de PEG 200.....	118
4.6	Concluzii.....	122
5	Evaluarea <i>in vitro</i> a profilului citotoxic al 5, 15-<i>bis</i>-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-<i>bis</i>-(4-carboximetilfenil)porfirinei și complexului Zn(II)-5,15-<i>bis</i>-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-<i>bis</i>-(4-carboximetilfenil)porfirină. Studii pe linii de celule tumorale umane de adenocarcinom de colon HT-29 și fibroblaști de șoarece din linia L929.....	124
5.1	Efectul exercitat <i>in vitro</i> de compusul 5,15- <i>bis</i> -(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20- <i>bis</i> -(4-carboximetilfenil)porfirină asupra celulelor tumorale umane de adenocarcinom de colon HT-29.....	125
5.2	Efectul exercitat <i>in vitro</i> de compusul 5,15- <i>bis</i> -(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20- <i>bis</i> -(4-carboximetilfenil)porfirină asupra fibroblastilor normali de șoarece din linia L929.....	128
5.3	Efectul exercitat <i>in vitro</i> de compusul Zn(II)-5,15- <i>bis</i> -(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20- <i>bis</i> -(4-carboximetilfenil)porfirină asupra celulelor tumorale umane de adenocarcinom de colon HT-29 și fibroblastilor normali de șoarece din linia L929.....	131
5.4	Concluzii.....	134
	CONCLUZII GENERALE.....	135
	Bibliografie	140
	Lista lucrărilor științifice publicate.....	161
	Anexe.....	163

INTRODUCERE

Cercetările interdisciplinare privind obținerea unor forme farmaceutice care să asigure identificarea și terapia formațiunilor de natură tumorală într-un singur pas, ocupă un loc aparte în domeniul biomedical și se constituie ca tematici prioritare ale obiectivelor ce vizează îmbunătățirea stării de sănătate a populației.

În ciuda eforturilor specialiștilor de a găsi soluții optime în acest sens, cancerul rămâne în mare ca o amenințare globală colosală. În prezent, statisticile privind mortalitatea asociată cancerului din întreaga lume sunt alarmante. Astfel, la nivel mondial, numărul de pacienți cu cancer este speculat să ajungă de la 16,6 milioane în 2015 la 21 de milioane până în 2030. Statisticile privind implicațiile financiare în domeniul terapiei antitumorale indică costuri enorme, astfel că în 2015 costurile medicamentelor antitumorale au ajuns la nivel global la 100 de miliarde de dolari. Aceste statistici justifică necesitatea intensificării la nivel mondial a cercetărilor multidisciplinare în vederea identificării unor strategii eficiente de diagnostic și terapie a formațiunilor de natură tumorală [Roy și colab., 2016].

Obiectivul principal în realizarea tezei de doctorat a vizat obținerea de noi substanțe active, cu proprietăți de marker și fotosensibilizator, în vederea dezvoltării unei strategii terapeutice optime bazate pe activarea fotochimică a agentului teranostic.

Elementele principale ale cercetărilor sunt noi structuri macrociclice cu profil arhitectural, spectral și farmaco-toxicologic optim pentru aplicații în teranostică iar metodologia obținerii pentru astfel de structuri a fost stabilită în acord cu cerințele actuale din domeniul sintezei medicamentului.

Pentru realizarea temei alese, etapele cercetărilor experimentale au urmărit:

✚ *stabilirea designului structural și evaluarea parametrilor de stabilitate a compușilor destinați studiului,*

✚ *obținerea, evaluarea structurală și spectrală a compușilor tetrapirolici de tip ligand și combinații complexe cu ioni $Zn(II)$ și $Cu(II)$, prin abordarea celor mai noi tehnici de sinteză și analiză spectrală,*

✚ *evaluarea comportamentului biofizic la nivel membranar al compușilor tetrapirolici nou sintetizați,*

✚ *evaluarea in vitro la nivel celular a structurilor nou sintetizate utilizând linii de celule tumorale umane de adenocarcinom de colon HT-29, fibroblaști de șoarece din linia L929, celule primare mononucleare (P BMC) izolate din sânge periferic, celulele monocitare umane SC. Studiile au fost efectuate în relație cu concentrația în compus porfirinic și timpul de acțiune, prin monitorizarea gradului de incorporare celulară a structurilor tetrapirolice, a viabilității și multiplicării celulare, a integrității membranare, a gradului de apoptoză și necroză celulară.*

Au fost obținuți și evaluați din punct de vedere structural și funcțional, compuși tetrapirolici noi cu structuri asimetrice de tip A_3B sau A_2B_2 :

- 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina
- $Zn(II)$ -5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina
- $Cu(II)$ - 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina
- 5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil)porfirina
- $Zn(II)$ -5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil)porfirina

Cercetările interdisciplinare care au permis realizarea părții experimentale a tezei de doctorat s-au desfășurat în laboratoarele de cercetare ale Disciplinei de Chimie Anorganică din Facultatea de Farmacie, U.M.F. „Carol Davila”, Institutului Național de Cercetare Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale „Victor Babeș”, Centrului de Chimie Fizică Moleculară, Universitatea din Lisabona și au fost finanțate din fondurile proiectului internațional ERA NET, „*Advanced theranostic approach in cancer combining photodynamic therapy and NPs*”, proiect din colectivul căruia am făcut parte în perioada 2016-2019.

Proprietățile și potențialul biomedical al compușilor cu structuri macrociclice de tip porfirinic

Porfirinele se încadrează printre cele mai studiate structuri macrociclice tetrapirolice cu aplicabilitate apreciabilă în domeniul biomedical.

Încă de la începutul secolului XX a fost evidențiat faptul că structurile macrociclice de tip tetrapirolic prezintă caracter fotosensibil și afinitate intrinsecă în raport cu celulele tumorale, dovedind potențial de utilizare în terapia antitumorală [Dolmans si colab., 2003; Juzeniene si colab., 2007].

Caracteristicile structurale, profilul spectral și capacitatea coordinativă mare a moleculelor de tip tetrapirolic sunt factori determinanți ce guvernează potențialul terapeutic al acestora. Structurile porfirinice sunt versatile și pot fi modelate prin complexare cu biocătionii sau atașare de substituenți periferici cu grad de polaritate adecvat internalizării celulare, cu rezultat în optimizarea profilului structural și spectral și implicit a potențialului lor terapeutic. Calitatea de ligand tetradentat a porfirinelor baze libere se manifestă la interacția cu cationi metalici la valori de pH bazic; aproape toți ionii metalici formează combinații complexe porfirinice în raport ion metalic:ligand 1:1 [Sessler si Tomat, 2007]. O serie de structuri macrociclice de tip metaloporfirină îndeplinesc roluri vitale în sistemele biologice. Hemoglobina, mioglobina, clorofila, citocromii, catalazele, peroxidazele sunt exemple de macromolecule ce conțin structuri metaloporfirinice și au rol determinant în fotosinteză, transportul oxigenului molecular, procesul respirator, moartea celulară și combaterea stresului oxidativ [Battersby si colab., 1980, Mauzerall, 1977; Armstrong si Stratton, 2016, Nantes si colab., 2010].

Proprietățile structurale și spectrale unice, în special proprietățile fotochimice și fotofizice superioare, definesc profilul de candidat terapeutic al porfirinelor și metaloporfirinelor. Designul structural al unui fotosensibilizator influențează în mod direct capacitatea de internalizare la nivel celular dar și proprietățile spectrale ale moleculei respective.

Fotosensibilizatorii porfirinoizi au un spectru de absorbție tipic descris de o bandă intensă (banda Soret) localizată în regiunea spectrală 400-440 nm și patru benzi Q ($Q_y(1,0)$ $Q_y(0,0)$ $Q_x(1,0)$ $Q_x(0,0)$), mai reduse ca intensitate cu maxime ce pot fi identificate la lungimi de undă $\lambda = 440-800\text{nm}$. Banda Soret nu este relevantă pentru terapia fotodinamică a țesuturilor tumorale mai profunde, doar domeniul spectral 600-800nm este reprezentativ pentru terapia antitumorală prin efect de fotosensibilizare.

Profilul spectral al compușilor porfirinici este determinat de simetria moleculară, natura și poziția substituenților periferici macrociclului precum și natura ionului metalic în cazul metaloporfirinelor [Gouterman și colab., 1963; Gouterman, 1978]. Substituenții cu

electroni π ataşaţi poziţiilor β ale macrociclului, determină modificari spectrale prin deplasarea maximelor de absorbţie spre lungimi de undă mai mari (spre roşu) şi modificări în raportul intensităţilor benzilor Q [Milgron, 1997].

Proprietăţile remarcabile de absorbţie şi emisie ale structurilor cromofore de tip tetrapirolic sunt relevante din punct de vedere al aplicabilităţii biomedicale a acestora [Dabrowski şi colab., 2016; Meshkov şi colab., 2017; Horváth şi colab., 2016].

Structura moleculară a tetrapiroloilor imprimă acestora potenţial fluorescent cu capacitate de emisie în domeniul spectral 600-800 nm şi potenţial de generare a speciilor reactive de oxigen (ROS) prin iradiere şi în prezenţa oxigenului molecular. Spectrul de fluorescenţă al unui compus tetrapirolic include două benzi spectrale, rezultate în urma emisiilor de radiaţii ce au loc la trecerea moleculei din starea singlet S_1 (nivel energetic superior stării fundamentale) în starea fundamentală S_0 . Parametrii specifici fluorescenţei moleculare sunt: timpul de viaţă al fluorescenţei (τ_s) şi randamentul de fluorescenţă (Φ_F) şi pot fi determinaţi experimental prin analiza spectrală apelând la aparatură modernă cu laseri cu timpi de excitaţie a probelor de ordinul picosecundelor şi fotodiode cu răspuns rapid [Vieira Ferreira şi Ferreira Machado, 2007; Strickler şi Berg, 1962; Harriman şi Hosie, 1981].

Unul dintre obiectivele primordiale ale cercetărilor din domeniul farmaceutic şi oncologic este de a stabili un protocol cadru pentru vindecarea completă a cancerului, prin utilizarea de molecule cu proprietăţi farmacologice optime şi efecte adverse minime. Structurile macrociclice tetra- sau pentapirolice sunt printre cele mai studiate în ce priveşte potenţialul lor terapeutic, în special antitumoral deoarece au potenţial de generare a speciilor reactive oxigen singlet în prezenţa oxigenului molecular şi a luminii [Ethirajan, 2011; Allison şi colab., 2004; Jori, 1996; Decreau şi colab., 1999]. Acest tip de structuri au fost clasificate ca a doua generaţie de fotosensibilizatori şi reprezintă substanţa activă pentru forme farmaceutice cum sunt: *Foscan®*, *Photochlor®*, *Laserphyrin®*, *Visudyne®*, *Radachlorin®*, *Levulan®*, *Tookad®*, *Lutrin®*, *Photosens®*.

În ultimii ani, cercetările au fost orientate spre obţinerea unor fotosensibilizatori cu proprietăţi farmacologice superioare celor din a doua generaţie, prin modelarea structurală a macrociclurilor tetrapirolice cu grupe farmacologic active şi cu selectivitate mare în raport cu celula tumorală [Sandland şi Boyle, 2019].

Terapia fotodinamică a cancerului reprezintă alternativa terapeutică cu potenţial în medicina personalizată şi de aceea introducerea de fotosensibilizatori noi pentru diagnoza şi terapia antitumorală constituie un obiectiv prioritar al domeniului farmaceutic [Cui şi colab., 2015]. Ataşarea la structurile tetrapirolice a unor fragmente de acid folic, peptide, steroli, proteine, anticorpi, polietilenglicol, nanaoparticule, reprezintă strategii avansate de modelare structurală a fotosensibilizatorilor, cu scopul creşterii eficienţei biomedicale a formelor farmaceutice destinate unei abordări teranostice în cancer [Myrzakhmetov şi colab., 2017; Clark şi colab., 2016; Zhang şi colab., 2016; Lapa şi colab., 2017; Broughton şi colab., 2016; Yan şi colab., 2011; Mokwena şi colab., 2018; Fakayode şi colab., 2018; Penon şi colab., 2017]. Aceşti compuşi reprezintă o a treia generaţie de fotosensibilizatori, caracterizaţi de selectivitate mare pentru ţesutul tumoral, asigurând o doză mai mică de tratament cu număr redus de efecte secundare. În plus, prezintă avantajul unei absorbţii optime a radiaţiei luminoase la fotoactivare şi au un clearance bun cu eliminare rapidă din organism [Yoon şi colab., 2013; Van Straten Demian şi colab., 2017].

În prezent, terapia fotodinamică constituie o metodă terapeutică eficientă, aplicată cu succes în tratamentul formațiunilor tumorale localizate la nivel cutanat, în cancerul de sân, în cancerul pulmonar dar și al tumorilor localizate la nivelul capului și gâtului [Josefsen și Boyle, 2008, Allison și colab, 2011, Banerjee și colab., 2017, Sandland și colab., 2018].

O abordare moderna în domeniul biomedical, tratamentul personalizat cu molecule noi cu potențial de marker și agent antitumoral, s-a dovedit deosebit de eficient din punct de vedere clinic, porfirinele și clorinele fiind structurile macrociclice cele mai frecvent utilizate în acest scop [Stegh, 2012, Cui și colab., 2015].

Asigurarea unei eficiențe biomedicale optime, impune respectarea de către fotosensibilizator a unor cerințe obligatorii [Sandland și colab., 2018]:

- + structura unică, bine definită, cu grad maxim de puritate și care poate fi obținută prin metode moderne și ecologice de sinteză,
- + profil structural care să permită internalizarea optimă la nivelul masei tumorale, profil descris de o distribuție bine definită a grupărilor lipofile/hidrofile la periferia macrociclului tetrapirolic,
- + profil spectral definit de maxime de absorbție moleculară în domeniul 600-850 nm, asociat cu un randament cuantic bun în generarea oxigenului singlet,
- + solubilitate în solvenți netoxici, acceptați pentru formularea farmaceutică,
- + lipsa toxicității în absența luminii,
- + eliminare rapidă din organism,
- + absența oricărui efect toxic la doza necesară efectului therapeutic,
- + absența toxicității pentru metaboliții fotosensibilizatorului.

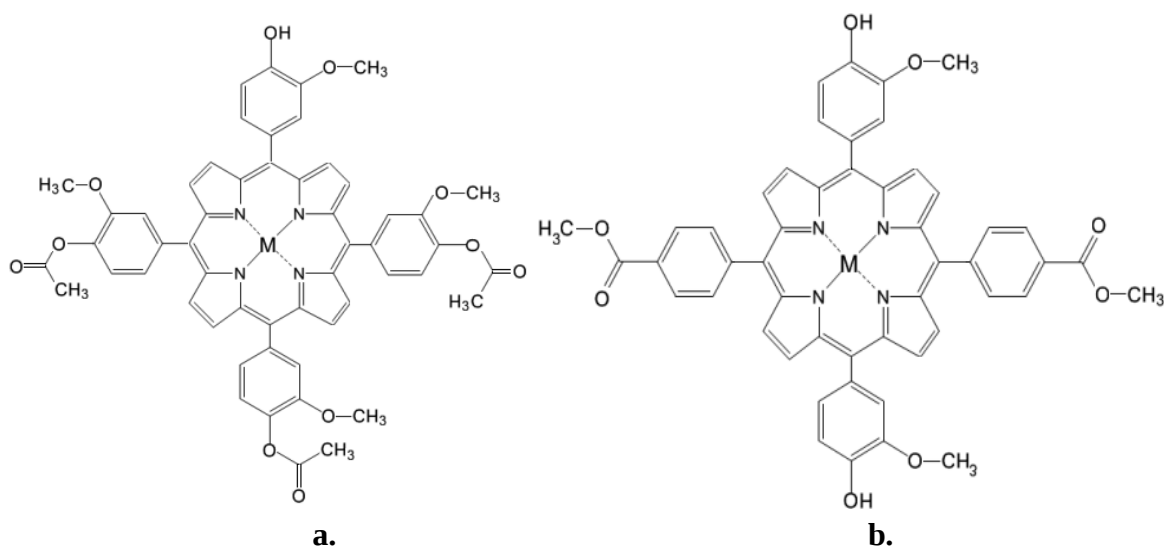
Pentru a încadra tematica lucrării în stadiul actual al cercetărilor privind identificarea de noi structuri cu potențial de marker și fotosensibilizator, obiectivul principal al cercetărilor a vizat obținerea, caracterizarea spectrală și evaluarea biologică *in vitro* la nivel celular a unor noi compuși macrociclici de tip porfirinic, cu arhitecturi structurale descrise de o distribuție asimetrică a substituenților macrociclici.

PARTEA EXPERIMENTALĂ

Evaluarea structurală in silico a noilor compuși macrociclici de tip ligand și combinații complexe ale acestora cu ioni metalici ai seriei 3d

Prima etapă în dezvoltarea părții experimentale a tezei de doctorat a fost definită de stabilirea designului structural cu evaluarea parametrilor de stabilitate pentru compuși macrociclici de tip tetrapirolic ce urmează a fi sintetizați. Programele de calcul utilizate au fost HYPERCHEM 8.0.8.[®] (metodele AM1, ZINDO1 și ZINDO/S) și WaveFunction Spartan 14[®] (metoda PM6 în cadrul optimizării structurale Semi-empirice) (HyperChem(TM) Professional 8.0.8, Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Florida 32601, USA; Wave function Spartan'14, Wave function, Inc. 18401, Von Karman Avenue, Suite 370, Irvine, CA 92612 USA).

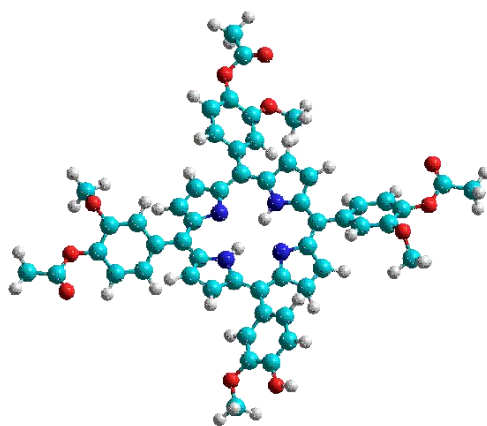
Rezultatele obținute prin rularea celor două programe de calcul au sugerat stabilitate structurală pentru compușii evaluați. Justificat de faptul că structurile incluse în studiu vor fi evaluate din punct de vedere al comportamentului la nivel celular, începând cu potențialul de acumulare intracelular, respectiv capacitatea lor de a traversa stratul membranal dublu lipidic, în analiza teoretică prin modelare *in silico* au fost calculați și parametrii ce definesc polaritatea moleculelor.



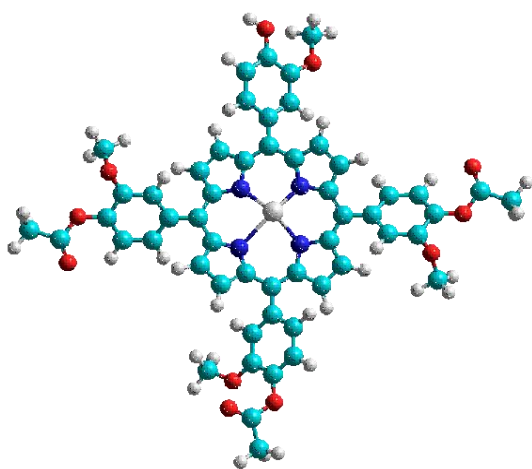
M = 2H, Zn(II), Cu(II)

- a.** 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina (P2.2)
Zn(II)-5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina (Zn(II)2.2)
Cu(II)-5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina (Cu(II)2.2)
- b.** 5,15-*bis*-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-*bis*-(4-carboximetilfenil)porfirina (P1.3)
Zn(II)-5,15-*bis*-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-*bis*-(4-carboximetilfenil)porfirina (Zn(II)1.3)

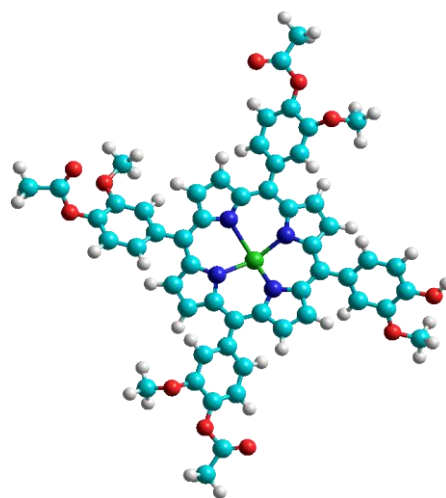
Formulele structurale ale compușilor porfirinici evaluați prin modelare *in silico* cu programele HYPERCHEM 8.0.8.[®] și WaveFunction Spartan 14[®]



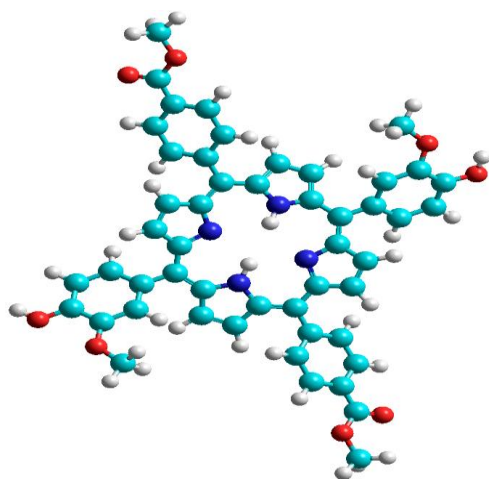
a.



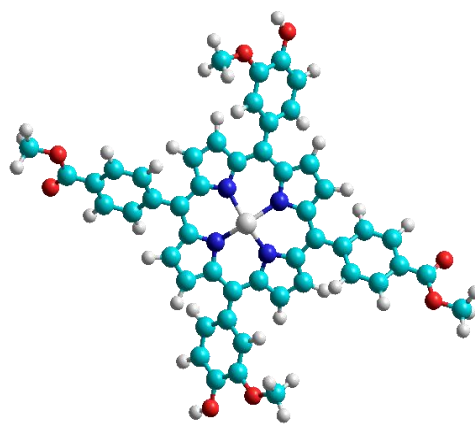
b.



c.



d.



e.

Conformații optimizate ale compușilor porfirinici **P2.2 (a)**, **Zn(II)2.2 (b)**, **Cu(II)2.2 (c)**, **P1.3 (d)**, **Zn(II)1.3 (e)**, evaluați *in silico* cu programele HYPERCHEM 8.0.8.® și WaveFunction Spartan 14®

Caracteristici fizice asociate compușilor porfirinici evaluați *in silico* cu programele HYPERCHEM 8.0.8.® și WaveFunction Spartan 14®

Compus porfirinic	Masa moleculară (u.m.a.)	Aria relativă ($\text{\AA}^2$)	Aria suprafață cadru ($\text{\AA}^2$)	Volumul ($\text{\AA}^3$)	Refractivitate ($\text{\AA}^3$)	Polarizabilitate ($\text{\AA}^3$)	Moment de dipol total (D)
P1.3	834,78	930,27	1110,58	2080,12	249,33	91,37	5,16
Zn(II)1.3	898,24	928,41	1108,95	2067,67	226,06	90,90	4,76
P.2.2	924,96	1044,08	1241,05	2319,35	267,53	98,79	5,67
Zn(II)2.2	988,32	1044,76	1242,11	2319,18	244,22	98,35	5,55
Cu(II)2.2	986,49	1044,79	1242,07	2319,12	244,26	98,31	5,34

Având în vedere realizarea unui profil teoretic al potențialului reactiv al acestor structuri, prin simulare *in silico* s-au identificat posibile zone structurale susceptibile atacului nucleofil și electrofil al diverșilor reactanți prezenți în mediul biologic.

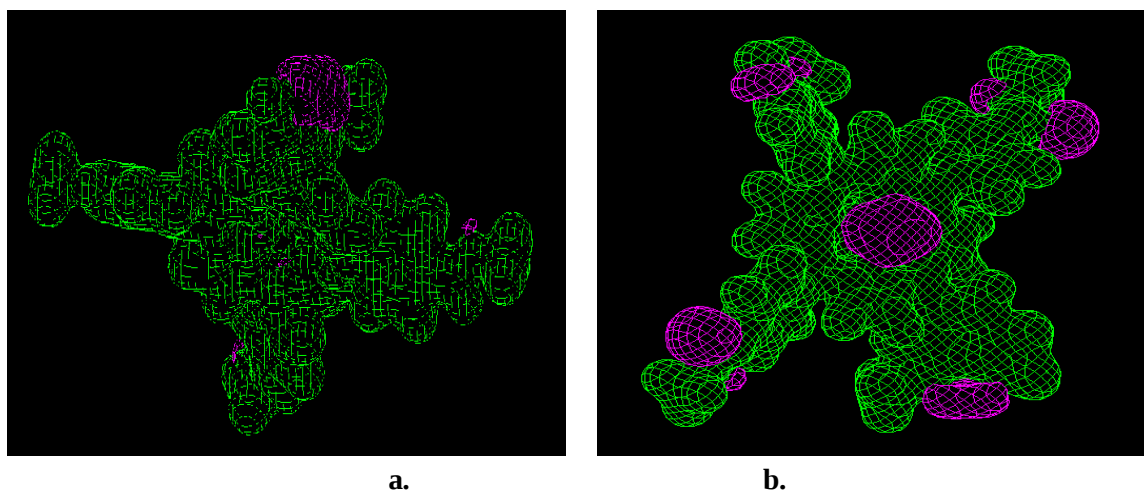


Diagrama zonelor teoretice susceptibile atacului nucleofil/electrofil rezultate din calcul în cazul compușilor P1.3 (a) și Zn(II)1.3 (b)

Sinteza compușilor macrociclici de tip ligand și combinații complexe

Studiile experimentale au urmărit obținerea de noi structuri porfirinice cu profil arhitectural, spectral și farmaco-toxicologic optim pentru aplicații în teranostica iar metodele obținerii unor astfel de structuri au fost stabilite în acord cu cerințele actuale din domeniul sintezei medicamentului. S-au utilizat metode actualizate de sinteză care decurg cu randamente optime, în condiții ecologice, cu posibilitatea monitorizării lor prin tehnici simple de laborator. Am urmărit obținerea unui set de parametri asociați reacțiilor de sinteză precum și evaluarea structurală a compușilor nou sintetizați.

Într-o primă etapă de realizare a obiectivelor tezei de doctorat am sintetizat liganzii macrociclici porfirinici cu simetrie A_3B sau A_2B_2 :

- ✚ 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina (P2.2)
- ✚ 5,15-*bis*-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-*bis*-(4-carboximetilfenil)porfirina (P1.3)

Obținerea liganzilor cu structuri macrociclice asimetric substituți s-a realizat prin:

a. procedeul clasic – procedeu adaptat după metoda Adler și Little [Adler și colab., 1967; Little și colab., 1974] și descris în ref. [Boscencu și colab., 2017]

b. procedeul iradierii cu microunde a amestecului de reactanți descris de urmatoarele etape:

✚ *reacția stoechiometrică dintre benzalhidele substituite și pirol pe suport de silicagel neutru sau oxid de aluminiu neutru, reacție care se desfășoară prin iradiere cu microunde.*

✚ *extracția compusului de interes din produsul de reacție prin dizolvare în amestec diclormetan/eter etilic și filtrare la presiune normală.*

✚ *separarea și purificarea avansată a compusului macrociclic asimetric utilizând cromatografia pe coloană și cromatografia în strat subțire (plăci PLC silica gel 60, 2mm, 20x20cm)*

✚ *recristalizarea ligandului din diclormetan*

Reactivii utilizați în realizarea sintezelor au fost de proveniență Merck: 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehida, metil 4-formilbenzoat, 4-acetoxi-3-metoxibenzaldehida, pirol, acid propionic, silicagel 60 Merck, 200-500 μ m; Al₂O₃ 90, Merck, 63-200 μ m 70-230mesh, plăci PLC cu fază staționară silica gel60, 2mm, 20x20cm, clorură de metilen p.a., dietileter p.a.

În procedeele experimentale de sinteză am utilizat: flacoane din sticlă, pipete, capilare, spatule, pâlnii de filtrare, pahare Erlenmeyer, exicator de vid, sticle de ceas, balanță analitică, coloane cromatografice. Iradierile amestecurilor de reactanți s-au desfășurat într-un sintetizator cu microunde Biotage Initiator+ cu control de putere și temperatură. Spectrele RMN s-au înregistrat cu spectrometru tip Bruker Avance DRX 400, spectrele IR cu spectrometru FT-IR de tip Bruker-Tensor 27 iar spectrele de absorbție au fost înregistrate cu spectrometrul UV-Vizibil SPECORD 200.

Sinteza 5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetifenil)porfirinei

Metoda iradierii cu microunde a amestecului de reactanți

În reacția 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehida cu metil 4-formil benzoat și pirol pe suport de oxid de aluminiu neutru, s-au obținut și izolat izomerii A₄ și A₂B₂. Procedeul de obținere s-a realizat prin iradiere cu microunde a amestecului de reactanți, respectiv 3 iradieri succesive (650W–450W-350W) a câte 5 minute fiecare. Temperatura de reacție a fost fixată la 180°C iar procedeul de sinteză a inclus racirea la interval de 5 minute a amestecului reactant. La prepararea porfirinelor de tip ligand, metil 4-formil benzoatul (25mmoli) și 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehida (25mmoli) s-au adăugat în vasul de sinteză peste 5-6 g oxid de aluminiu neutru (Al₂O₃ 90 Merck, 63-200 μ m 70-230 mesh). După omogenizarea amestecului s-a adăugat pirolul proaspăt distilat (50mmoli) și amestecul reactant a fost iradiat timp de 15 minute, cu răcirea probelor la interval de 5 minute. Evoluția calitativă a reacțiilor de condensare a fost urmărită prin prelevarea, după fiecare iradiere, a unor probe din amestecul de reactanți, dizolvarea acestora în diclormetan și înregistrarea spectrelor de absorbție în domeniul vizibil. Prezența structurilor macrociclice de tip porfirinic în produsul brut de reacție a fost confirmată de spectrul de tip etio (banda Soret și cele 4 benzi Q) obținut pentru probele test. Produsul brut obținut în reacția de condensare a fost dizolvat în amestec diclormetan/eter etilic în raport 50v/1v, soluția obținută a fost filtrată la presiune normală și concentrată prin distilare simplă. Separarea și purificarea 5,15-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil) porfirinei s-a realizat prin cromatografie pe coloană cu oxid de aluminiu neutru (Al₂O₃ 90 Merck) fază staționară și diclormetan/eter etilic în raport 50/1(v/v) eluent. Analiza RMN a compuşilor obţinuţi din fracţiile eluate pe colana cromatografică a confirmat

prezența a 6 izomeri cu structură tetrapirolică (A_4 , A_3B , $A_2B_2(cis)$, $A_2B_2(trans)$, AB_3 , B_4), în amestecul brut de reacție. În compoziția primei fracții eluate a fost evidențiat compusul porfirinic simetric substituit 5,10,15,20-*meso*-tetrakis-(4-carboximetilfenil)porfirină (P1.1), a doua fracție a evidențiat prezența în cantitate mică a 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-carboximetilfenil)porfirinei iar structura 5,15-*bis*-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-*bis*-(4-carboximetilfenil)porfirinei (P1.3) a fost identificată în a treia fracție eluată. Soluțiile porfirinice colectate au fost concentrate prin distilare simplă iar produșii obținuți au fost recristalizați din diclormetan. 5,15-*bis*-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-*bis*-(4-carboximetilfenil)porfirina a fost obținută cu un randament de 32%, sub forma de cristale violet insolubile în apă, solubile în clorură de metilen, cloroform, alcool metilic, alcool etilic, alcool isopropilic, dimetil sulfoxid, dimetilformamida, PEG200.

Metoda clasică

Un amestec format din metil 4-formil benzoat (25mmoli) și 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehida (25mmoli) a fost adus într-un balon de sinteza și refluxat la 100°C în mediu de acid propionic (100 mL). După 30 minute s-a adăugat în picătura pirolul proaspăt distilat (50mmoli); amestecul a fost lăsat sub agitare la 130°C, timp de 6 ore. Produsul de reacție a fost racit la temperatura camerei, spălat pe filtru cu multă apă pentru îndepărtarea urmelor de acid propionic. După uscare precipitatul s-a dizolvat în amestec diclormetan/eter etilic în raport 50/1 (v/v), soluția concentrată a fost cromatografiată în vederea separării compusului A_2B_2 . Pentru purificare s-a utilizat ca fază staționară oxid de aluminiu neutru (Al_2O_3 90 Merck, 63-200 μ m 70-230 mesh) iar ca eluent un amestec diclormetan/eter etilic în raport 50/1 (v/v). În etapa finală a procedurii de sinteză, compusul util a fost purificat prin cromatografie în strat subțire, utilizând plăci PLC silica gel 60, 2mm, 20x20cm și diclormetan/eter etilic ca eluent. Compusul 5,15-*bis*-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-*bis*-(4-carboximetilfenil)porfirină a fost obținut cu un randament de 9% sub formă de cristale aciculare de culoare violet, solubile în clorură de metilen, alcool etilic, dimetil sulfoxid, polietilenglicol 200.

Sinteză 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirinei

Metoda iradierii cu microunde a amestecului de reactanți

Un amestec format din 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehidă (12,5mmoli), 4-acetoxi-3-metoxibenzaldehidă (37,5mmoli), pirol proaspăt distilat (50mmoli) și oxid de aluminiu neutru (Al_2O_3 90, Merck, 63-200 μ m, 70-230 mesh) s-a omogenizat și apoi iradiat 6 minute la 650W. După 3 minute de răcire s-a reluat iradierea la 350W pentru un interval de timp de alte 6 minute. Produsul final s-a dizolvat într-un amestec diclormetan/eter etilic în raport 30v/1v, soluția obținută s-a filtrat la presiune normală; filtratul concentrat prin distilare simplă a fost purificat prin cromatografie pe coloană utilizând Al_2O_3 90, Merck, 63-200 μ m ca fază staționară și amestec diclormetan/eter etilic în raport 30v/1v pentru eluarea compușilor porfirinici. Reacția de sinteză a furnizat un amestec de 6 izomeri porfirinici (A_4 , A_3B , $A_2B_2(cis)$, $A_2B_2(trans)$, AB_3 , B_4), iar metoda cromatografică a permis separarea acestora, și obținerea compusului de interes (A_3B) cu un randament de 36%. Etapa finală a procedurii de obținere a inclus și purificarea compusului de interes apelând la cromatografia în strat subțire pe plăci de silicagel 60, 2mm, 20x20cm și eluent diclormetan/eter etilic (30v/1v). 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-acetoxi-3-metoxifenil) porfirina a fost obținută sub formă de cristale violet insolubile în apă, solubile în clorură de metilen, cloroform, alcool metilic, alcool etilic, alcool isopropilic, dimetil sulfoxid, polietilenglicol 200.

Metoda clasică

Un amestec format din 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehida (12,5mmoli), 4-acetoxi-3-metoxibenzaldehidă (37,5 mmoli) a fost dizolvat prin agitare la 100°C în acid propionic (100mL). Pirolul proaspăt distilat (50mmoli) a fost adăugat în porțiuni mici și amestecul a fost refluxat 3 ore la

125°C. Produsul de reacție a fost răcit la temperatura camerei, filtrat la vid iar precipitatul a fost spălat cu apă distilată pentru îndepărtarea urmelor de acid propionic. Purificarea compusului util s-a realizat prin metoda descrisă la varianta A. Randamentul de obținere a fost 7%, metoda clasică dovedindu-se mai puțin avantajoasă comparativ cu metoda iradierii cu microunde. Prin purificare, s-a izolat și compusul simetric, 5,10,15,20-*meso-tetrakis*-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina (**P2.1**) sub forma de cristale violet, solubile în clorură de metilen, cloroform, alcool metilic, alcool etilic, alcool isopropilic, dimetil sulfoxid, polietilenglicol 200.

Sinteza compușilor macrociclici de tip combinații complexe

Au fost sintetizate următoarele combinații complexe cu structură asimetrică:

- Zn(II)-5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil)porfirina (Zn(II)1.3)
- Zn(II)-5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina (Zn(II)2.2)
- Cu(II)- 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina (Cu(II)2.2)

Pentru obținerea combinațiilor complexe cu structuri macrociclice am abordat două variante diferite de sinteză:

a. complexarea ligandului tetrapirolic cu ionul metalic în mediu bazic, la temperaturi moderate, printr-o reacție stoechiometrică între ligand și sarea ce conține ionul metalic.

b. reacția sub acțiunea microundelor a unui amestec stoechiometric format din benzaldehide substituie, pirol, sare metalică și catalizator bazic în absența solventului pe suport de silicagel neutru sau oxid de aluminiu.

În reacțiile de sinteză s-au utilizat reactivi Merk: metil 4-formilbenzoat, 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehida, 4-acetoxi-3-metoxibenzaldehida, acetat de zinc anhidru, clorura de cupru anhidra, pirol, 2,6-dimetilpiridina, silicagel 60, 200-500 μm; 35-70 mesh, Al₂O₃ 90, 63-200 μm 70-230 mesh, plăci PLC cu fază staționară silicagel 60, 2mm, 20x20cm, clorură de metilen p.a., dietileter p.a. Compușii sintetizați au fost caracterizați prin analiză elementală, spectrometrie FT-IR, RMN, UV-Vis.

Sinteza combinațiilor complexe prin procedeul clasic

Într-o primă variantă de obținere a combinațiilor complexe am abordat reacția clasică dintre ligandul porfirinic și ionul metalic la valori de pH bazic generate de 2,6-lutidină, compus cu proprietăți de acid Lewis și capacitate de deprotonare a atomilor de azot interiori macrociclului de tip ligand. Soluțiile obținute prin dizolvarea ligandului în diclormetan au fost aduse în vasul de sinteză și încălzite ușor sub agitare timp de 5 minute în prezenta 2,6-lutidinei. În vasul de reacție s-a adăugat apoi volumul corespunzător de soluție metanolică ce conține acetat de zinc anhidru sau clorură de cupru în cantitate stoechiometrică [1mol ligand/1mol Zn(II) sau 1mol Cu(II)] și s-a refluxat amestecul de reacție sub agitare continuă timp de o oră. Gradul de interacție ligand-ion metalic a fost monitorizat prin prelevarea de probe din vasul de reacție și evaluarea spectrală a acestora în domeniul vizibil; acest tip de monitorizare a reacției de complexare este specifică clasei de compuși tetrapirolici deoarece inserarea ionului metalic în macrociclul porfirinic determină reducerea numărului de benzi Q (de la 4 la 2) în spectrul de absorbție electronică al complexelor comparativ cu ligandul. Pentru stabilirea condițiilor de purificare a complexelor sintetizați, reacția de complexare a fost monitorizată și prin cromatografie în strat subțire. Purificarea compușilor de interes s-a realizat prin cromatografierea produsului brut de reacție, cu amestec diclormetan/eter etilic, pe o coloană ce conține silicagel 60H Merck ca fază staționară. Soluțiile complexelor porfirinici au fost concentrate prin distilare simplă. Cristalele de culoare violet au fost uscate la ~100°C. Randamentele reacțiilor de sinteză a combinațiilor complexe au fost peste 80%.

Sinteza combinațiilor complexe prin procedeul iradierii cu microunde

Etapele procedurii de obținere a combinațiilor complexe prin iradiere cu microunde:

+ reacția stoechiometrică dintre benzaldehidele substituite, pirol și sarea ionului metalic pe suport de silicagel neutru (sau oxid de aluminiu neutru) sub acțiunea microundelor

+ dizolvarea produsului brut într-un amestec clorură de metilen/eter etilic (40v/1v), filtrare și concentrare prin distilare simplă a soluției obținute.

+ separarea și purificarea complexului porfirinic prin metode cromatografice

Amestecul format din cantități stoechiometrice de benzaldehide substituite și sare metalică s-a introdus în vasul de sinteză peste suportul de reacție (silicagel neutru 60H, 200–500 μ m, 35–70mesh sau Al₂O₃ 90 Merck, 63-200 μ m 70-230mesh). După omogenizare s-a adăugat pirolul proaspăt distilat și 2-3 picături de 2,6-dimetilpiridină (lutidină). Reacția de sinteză s-a desfășurat prin iradierea amestecului de reactanți pentru un interval de timp cuprins între 9 și 12 minute și putere de iradiere 350-650W, într-o instalație de tip *Biotage Initiator+* cu control de putere și temperatură. S-au efectuat iradieri cu răciri succesive la interval de 3-4 minute.

În a doua etapă a procedurii de obținere, produsul util a fost extras din amestecul de reacție prin dizolvarea într-un amestec diclormetan/eter etilic în raport 40:1 (v/v), apoi filtrat la presiune normală. Soluția obținută după filtrarea extractului s-a concentrat prin distilare simplă și s-a obținut o masă solidă, cristalină care ulterior s-a purificat prin cromatografie pe coloană.

În etapa trei s-a realizat purificarea complexului porfirinic prin cromatografiere pe coloană utilizând ca fază staționară oxid de aluminiu neutru Al₂O₃ 90, Merck, 63-200 μ m 70-230 mesh sau silicagel neutru 60H, 200–500 μ m, 35–70 mesh și eluent amestec diclormetan/eter etilic în raport 40:1(v/v) sau 30:1(v/v). Soluțiile fracțiilor colectate s-au concentrat prin distilare simplă și recristalizat; s-au obținut cristale violet solubile în: metanol, etanol, polietilenglicol 200, dimetilsulfoxid, clorură de metilen. Randamentele reacțiilor de sinteză au fost: 32% pentru Zn(II)2.2, 37% pentru Cu(II)2.2 și 30% pentru Zn(II)1.3.

Evaluarea structurală și spectrală a compușilor macrociclici nou sintetizați

Compușii cu structuri macrociclice nou sintetizați sunt caracterizați printr-o solubilitate bună în solvenți cu polarități diferite (metanol, etanol, polietilenglicol 200, dimetilsulfoxid, clorură de metilen) și au fost confirmați structural prin analiză spectrală RMN, FT-IR, UV-Vis și spectrometria de fluorescență.

În evaluarea spectrală a structurilor de tip porfirinic destinate aplicațiilor biomedicale se impune studiul comportamentului spectral al acestora raportat la medii cu polarități diferite, deoarece calitatea de marker sau agent fotosensibilizator se manifestă după localizarea în mediul celular, respectiv după traversarea stratului membranal dublu lipidic. De aceea studiile din cadrul tezei de doctorat, au inclus și analiza spectrală UV-Vis în solvenți cu polarități diferite (diclormetan, dimetilsulfoxid, etanol, polietilenglicol 200). Alegerea solvenților a fost făcută ținând cont de determinările biologice și de faptul că etanolul și PEG 200 se numără printre solvenții foarte utilizați în formularea farmaceutică a compușilor porfirinici [Harris și Chess, 2003].

**Date analitice și spectrale ale compușilor macrociclici nou sintetizați (*400 MHz, CDCl₃,
** solvent CH₂Cl₂)**

Compus Formula moleculară M (g/mol)	Analiza elementală% (calc/exp) C H N	IR (v, cm ⁻¹)	¹ H-RMN* (δ, ppm)	UV-VIS** λ _{max} (nm)
P1.3 C ₅₀ H ₃₈ N ₄ O ₈ M=822g/mol	72.99 (72.87) 4.62 (4.53) 6.81 (6.67)	3414, 3314, 2922, 2862, 1717, 1624, 1606, 1511, 1436, 1261, 1099, 1020, 867, 798, 734	-2.79 (s, 2H), 4.01 (s, 6H); 4,11 (s, 6H), 5,34 (s, 2H); 7,26 (s, 2H); 7,30 (d, 2H); 7,71 (d, 2H); 7,98 (d, 4H); 8,20 (d, 4H); 8,30 (d, 4H); 8,44 (d, 4H)	403, 498, 530, 572, 628
P2.2 C ₅₄ H ₄₄ N ₄ O ₁₁ M=924g/mol	70.13(70.02) 4.76 (4.72) 6.06 (5.94)	3460, 3165, 2945, 2854, 1692, 1663, 1587, 1509, 1428, 1298, 1264, 1151, 1121, 1026, 859, 812, 732	-2.78 (s, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.98 (s, 9H), 4.01 (s, 9H), 6,23 (s, 1H), 7,10 (d, 3H), 7,30 (s, 1H), 7,48 (d, 3H), 7,70 (d, 1H), 7,83(s, 1H), 7,85 (d, 1H); 8,90 (d, 6H); 8,96 (d, 2H)	402, 497, 532, 570, 626
Zn(II)2.2 C ₅₄ H ₄₂ N ₄ O ₁₁ Zn M=987g/mol	65.62(65.56) 4.25 (4.18) 5.67 (5.56)	3462, 2923, 2852, 1665, 1645, 1581, 1510, 1468, 1334, 1274, 1162, 1108, 1024, 838	3.93 (s, 3H), 3.97 (s, 9H), 4.00 (s, 9H), 6,19 (s, 1H), 7,05 (d, 3H), 7,26 (s, 1H), 7,43 (d, 3H), 7,73 (d, 1H), 7,79(s, 1H), 7,84 (d, 1H); 8,90 (d, 6H); 9,02 (d, 2H)	402, 527, 566
Zn(II)1.3 C ₅₀ H ₃₆ N ₄ O ₈ Zn, M=885g/mol	70.17(70.02) 4.21(4.11) 6.54(6.38)	3418, 2924, 2860, 1720, 1624, 1608, 1515, 1446, 1264, 1080, 1025, 860, 797,	3,80 (s, 6H); 4,11 (s, 6H), 5,20 (s, 2H);7,12 (s, 2H); 7,22 (d, 2H); 7,70 (d, 2H);7,82 (d, 4H); 8,20 (d, 4H); 8,38 (d, 4H); 8,64 (d, 4H)	403, 527, 566.8
Cu(II)2.2 C ₅₄ H ₄₂ N ₄ O ₁₁ Cu M=985,54g/mol	65.75(65.62) 4.26(4.18) 5.68(5.58)	3460, 2920, 2853, 1673, 1590, 1503, 1463, 1328, 1260, 1190, 1028, 856;		400, 518

Spectrele de absorbție au fost înregistrate la temperatura camerei, în soluții ale compușilor porfirinici de concentrație $c=2.5 \times 10^{-6}$ M, cu un spectrometru SPECORD 200. Comportarea spectrală a noilor porfirine în medii cu polarități diferite a confirmat absenta fenomenelor de asociere moleculară la o concentrație în compus porfirinic de 2.5×10^{-6} M și posibilitatea continuării studiilor privind comportamentul la nivel celular al acestora pentru concentrația menționată.

Maxime de absorbție ($\lambda_{\max}$) și valori ale coeficienților molari de extincție ($\lg \varepsilon$) asociați benzilor de absorbție din spectrele electronice ale compușilor porfirinici studiați ($c = 2,5 \times 10^{-6} \text{M}$)

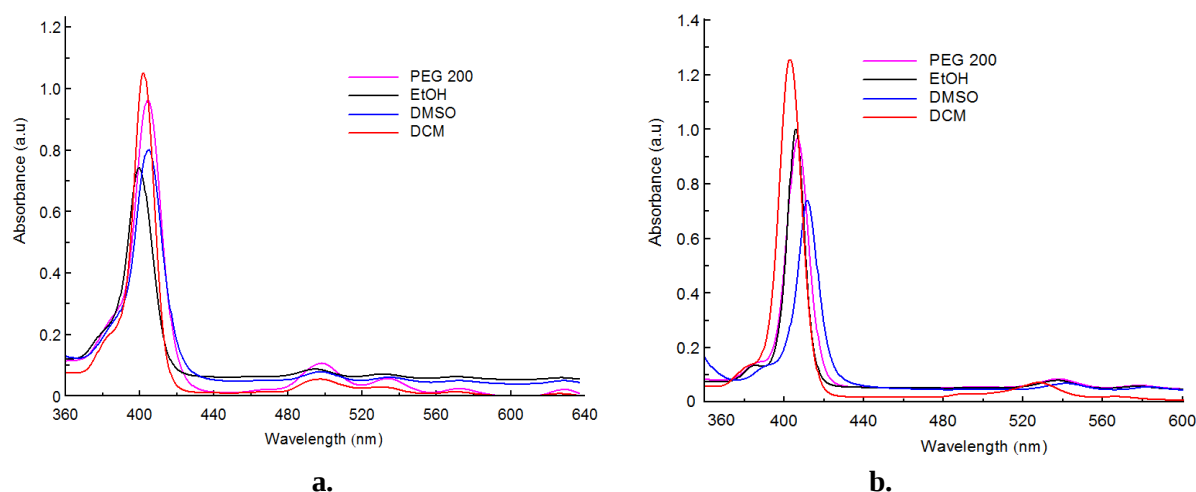
$\lambda_{\max}$ (nm) [$\lg \varepsilon$] ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)					
Solvent	Banda Soret	Qy(1,0)	Qy(0,0)	Qx(1,0)	Qx(0,0)
5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina					
CH ₂ Cl ₂	402.0[5.629]	497.6[4.340]	532.8[4.073]	570.0[3.729]	626.4[3.482]
DMSO	404.4[5.505]	498.0[4.492]	535.2[4.330]	572.8[4.200]	629.2[3.980]
EtOH	400.0[5.479]	495.6[4.542]	530.8[4.400]	571.6[4.388]	627.6[4.371]
PEG 200	404.4[5.580]	498.0[4.630]	534.0[4.358]	572.4[3.978]	628.8[3.940]
Zn(II)-5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina					
CH ₂ Cl ₂	402.8[5.706]	-----	527.6[4.459]	566.4[3.903]	-----
DMSO	411.6[5.470]	-----	542.0[4.429]	583.0[4.302]	-----
EtOH	405.6[5.602]	-----	537.6[4.450]	577.6[4.365]	-----
PEG 200	409.6[5.421]	-----	538.2[3.908]	579.5[3.602]	-----
Cu(II)- 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina					
CH ₂ Cl ₂	400.4[5.457]	-----	518.4[4.343]	-----	-----
DMSO	402.4[5.436]	-----	524.6[4.500]	-----	-----
EtOH	396.4[5.386]	-----	516.2[4.360]	-----	-----
PEG 200	400.0[5.440]	-----	521.2[4.455]	-----	-----
5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil)porfirina					
CH ₂ Cl ₂	402.8[5.560]	498.4[4.264]	530.0[4.162]	572.2[3.763]	628.4[3.526]
DMSO	405.6[5.548]	499.2[4.527]	536.8[4.433]	573.0[4.218]	629.2[3.980]
EtOH	402.4[5.480]	499.6[4.490]	533.4[4.402]	575.6[4.268]	628.8[3.886]
PEG 200	404.0[5.538]	498.2[4.560]	534.6[4.442]	573.0[4.360]	629.8[3.980]
Zn(II)-5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil)porfirina					
CH ₂ Cl ₂	403.0[5.570]	-----	527.6[4.343]	566.8[3.392]	-----
DMSO	411.8[5.620]	-----	545.6[4.442]	584.0[4.280]	-----
EtOH	410.6[5.612]	-----	539.4[4.540]	583.2[4.388]	-----
PEG 200	411.0[5.276]	-----	540.2[4.215]	582.3[3.812]	-----

Spectrele de absorbție moleculară ale compușilor nou sintetizați sunt rezultatul unei absorbții intense în domeniul lungimilor de undă ~400-409 nm (banda Soret) cu valori ale coeficienților molari de extincție (exprimate ca $\lg \varepsilon$) încadrate între 5.27-5.70 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Porfirinele asimetrice de tip ligand (P1.3, P2.2) au în spectru o banda Soret cu maxim la ~400 nm și patru benzi Q în regiunea 495–629 nm [Boscencu și colab., 2017; Boscencu și colab., 2019]. Intensitățile relative ale benzilor Q sunt într-un raport ce descrie profilul unui spectru de tip etio ($\varepsilon_{\text{IV}} > \varepsilon_{\text{III}} > \varepsilon_{\text{II}} > \varepsilon_{\text{I}}$), tipic macrociclicilor tetrapirolici. Rezultatele corelate cu datele RMN și FT-IR au confirmat formarea în reacțiile de sinteză a compușilor macrociclici de tip porfirinic. Maximul de absorbție corespunzător benzii Qx(0,0), localizata la ~628–629 nm, confirmă faptul că, structurile porfirinice de tip ligand au absorbții în domeniul fototerapeutic, relevant pentru terapia antitumorală prin efect fotodinamic. În plus, rezultatele experimentale

indică o influență slabă a polarității mediului asupra intensităților benzilor de absorbție din spectrele compușilor studiați, diferențele spectrale observate fiind în principal determinate de natura structurii electronice a ionului metalic.

Pentru combinațiile complexe porfirinice cu structură asimetrică (Zn(II)1.3, Zn(II)2.2, Cu(II)2.2.), banda Soret se localizează la $\sim 400\text{--}412\text{ nm}$ în timp ce benzile Q prezintă unul sau două maxime în domeniul spectral $516\text{--}584\text{ nm}$. Scăderea numărului de benzi Q în cazul metaloporfirinelor se explică prin modificarea simetriei moleculare de la D_{2h} în cazul liganzilor la D_{4h} în cazul complexelor. Pentru același solvent, benzile spectrale ale complexelor cu zinc sunt deplasate batocrom comparativ cu cele ale porfirinelor cu cupru, diferențe de comportament spectral care sunt în acord cu rezultatele experimentale obținute în studii anterioare și pot fi explicate pe baza efectelor de conjugare ce apar între electronii π ai nucleului tetrapirolic și electronii din stratul de valență ai ionului metalic [Ferreira și colab., 2012; Boscencu și colab., 2010; Boscencu, 2011; Boscencu, 2012; Socoteanu și colab., 2015; Oliveira și colab., 2009; Vasiliu și colab., 2014]. Interacțiunile respective determină scăderea energiei orbitalilor $a_{1u}(\pi)$ și $a_{2u}(\pi)$ comparativ cu cea a orbitalilor $e_g(\pi^*)$ și creșterea energiei necesare tranzițiilor în cazul complexelor cu ionul Cu(II), cu rezultat în deplasarea hipsocromă a benzilor de absorbție comparativ cu zinc porfirinele [Gouterman, 1978; Gouterman și colab., 1963].



Spectre UV-Vis ale 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirinei (a) și Zn(II)-5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirinei (b), în solvenți cu polarități diferite ($c=2,5 \times 10^{-6}\text{ M}$)

Evaluarea proprietăților fluorescențe ale compușilor macrociclici nou sintetizați

Profilul fluorescent al compușilor porfirinici îi recomandă pentru utilizare în diagnoza formațiunilor tumorale. De aceea, o altă etapă a cercetărilor experimentale în realizarea tezei de doctorat a urmărit evaluarea proprietăților fluorescențe ale noilor compuși macrociclici, cu determinarea *randamentului de fluorescență, a timpului de viață al fluorescenței și a randamentului cuantic de generare a oxigenului singlet*.

Determinările experimentale au fost realizate în laboratorul de cercetare al Centrului de Chimie Fizica Moleculară, Universitatea din Lisabona, sub coordonarea Prof. Dr. Luise Filipe Vieira Ferreira, și au fost finanțate din fondurile proiectului internațional ERA NET, „*Advanced theranostic approach in cancer combining photodynamic therapy and NPs*”, proiect din colectivul căruia am făcut parte pe toată durata de desfășurare.

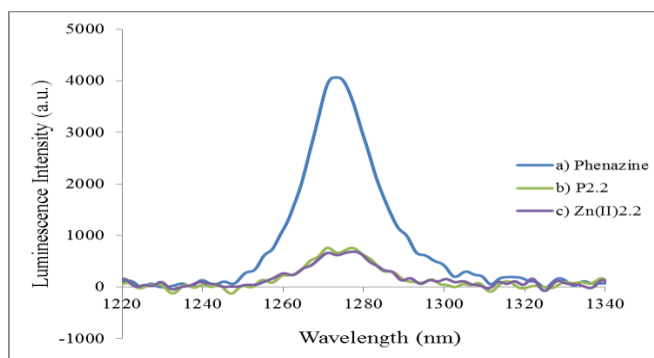
Evaluarea fotofizică a compușilor tetrapirolici s-a realizat cu laseri cu timpi de excitare a probelor de ordinul picosecundelor și fotodiode cu răspuns rapid. Timpul de viață al fluorescenței a fost determinat în intervalul 100ps-3μs cu un echipament de tip EasyLife VTM de la compania OBB (Birmingham, NJ, SUA). Tehnica utilizează surse de lumină pulsatorie de la diferite leduri (310 nm în acest caz) și masoară intensitatea fluorescenței la diferite intervale de timp după impulsul de excitare al probei. În funcție de proba studiată, atât pentru soluții cât și pentru probe solide au fost utilizate filtre de tip *cut-off* de 590 nm. Funcția de răspuns a aparatului a fost măsurată utilizând o soluție de dispersie Ludox. Softul de tip FelixGX de la OBB (Birmingham, NJ, SUA) a fost utilizat pentru analiza dinamicii degradării, de la 1 la 4 exponențiale și de asemenea analiza distribuției timpului de viață [Branco și colab., 2005; Vieira Ferreira și Ferreira Machado, 2007]. Un laser de tip N₂ (modelul PTI 2000, cca. 600 ps FWHM, ~1.0 mJ per impuls), a fost utilizat în experimentele cu luminiscentă indusă de laser.; în acest caz lungimea de undă de excitare a fost 337 nm. Lumina de la iradierea probelor cu laser a fost colectată printr-o sondă cu fascicul de colimare cuplată la o fibră optică (silice topită) și detectată de un dispozitiv Andor ICCD, model i-Star 720 (Andor Technology Limited, Belfast, UK). Dispozitivul ICCD a fost cuplat cu un spectrograf de tip Andor, model Shamrock 163. Sistemul poate fi utilizat prin captarea tuturor radiațiilor emise de probă sau în mod „*time-resolved*” și acoperă cel puțin intervalul spectral 250–950 nm. Spectrele de absorbție și emisie sunt obținute într-un interval de timp de la nanosecunde la secunde. Cu acest sistem de lucru, atât spectrele de fluorescență sunt ușor de obținut. Pentru determinările de oxigen singlet a fost utilizat un laser cu azot ca sursă de excitare și un detector model InGaAs CCD (model i-Dus de la Andor) care funcționează la temperaturi scăzute (–60°C), cuplat la un spectrograf fix (model Shamrock 163i de la Andor) [Ferreira și colab., 2016]. Randamentul cuantic de generare a oxigenului singlet, Φ_{Δ} , reprezintă numărul de molecule de oxigen singlet (¹O₂) generate de porfirină la fiecare foton absorbit; determinările experimentale s-au făcut în raport cu o referință, un compus pentru care valoarea Φ_{Δ} este cunoscută. În cazul compușilor investigați, valorile Φ_{Δ} au fost obținute prin compararea ariei totale a spectrelor de emisie a porfirinelor cu cea a referinței, în soluții obținute în același solvent și cu densități optice identice.

Prin comparație cu TPP ca referință [Wilkinson, 1985; Murov și colab., 1989; Eaton, 1989], rezultatele au demonstrat proprietăți fluorescente bune pentru compușii P2.2, P1.3, Zn(II)2.2, Zn(II)1.3 și capacitatea acestora de a genera specii reactive oxigen singlet. Complexul Cu(II)2.2 nu a dovedit proprietăți fluorescente. În studiile realizate eficiența fotosensibilizatorilor în generarea speciilor reactive, a fost evaluată prin determinarea randamentului cuantic de generare a oxigenului singlet (Φ_{Δ}). Determinările au fost realizate în soluții obținute prin dizolvarea compușilor porfirinici în chloroform; ca referință s-a utilizat fenazina.

Randament de fluorescență (Φ_F), timp de viață al fluorescenței (τ_F) și randament cuantic de generare a oxigenului singlet (Φ_{Δ}) pentru compușii sintetizați

Compus	Φ_F in EtOH	τ_F (ns) in EtOH	Φ_{Δ} in CHCl ₃
Phenazine (*)	-	-	0.84
TPP (*)	0.13	10.8 ± 0.1	-
P2.1	0.06	8.7 ± 0.1	0.21
P2.2	0.04	10.1 ± 0.1	0.16
Zn(II)2.2	0.002	1.7 ± 0.05	0.17
P1.1	0.06	5.1 ± 0.1	0.49
P1.3	0.05	8.2 ± 0.1	0.32
Zn(II)1.3	0.02	2.8 ± 0.05	0.24

(*) Ref. [Wilkinson, 1985; Murov și colab., 1989; Eaton, 1989; Rechmond și Braslavsky, 1988].



Spectre de emisie luminiscentă ale compușilor P2.2 și Zn(II)2.2 în cloroform (referință-fenazina)

Valorile Φ_{Δ} obținute experimental evidențiază un potențial bun de generare a oxigenului singlet pentru familia de fotosensibilizatori evaluată, cu rezultate mai bune în cazul porfirinelor de tip bază liberă. Rezultatele obținute se încadrează în valorile impuse unui fotosensibilizator [Murov și colab., 1989; Wilkinson, 1985] și permit atribuirea compușilor investigați (excepție Cu(II)2.2) a calității de candidați pentru terapia antitumorală prin fotosensibilizare.

Concluzii

✚ *Liganzii și combinațiile complexe corespunzătoare cu ionii metalici Zn(II) și Cu(II) au fost obținuți prin metode actualizate de sinteză, în condiții ecologice, cu posibilitatea monitorizării reacțiilor prin tehnici simple de laborator și realizării unor protocoale de transfer de tehnologie către laboratoare micropilot cu specific în sinteza substanțelor active antitumorale.*

✚ *Evaluarea structurală și spectrală a compușilor obținuți, s-a realizat prin analiza elementală, analiza spectrală RMN, FT-IR, UV-Vis și evaluarea profilului fluorescent al acestora.*

✚ *Spectrele RMN, FT-IR și UV-Vis au confirmat prezența structurilor porfirinice de tip A_2B_2 sau A_3B în probele investigate precum și implicarea celor patru atomi de azot pirolici în procesul de coordonare a ionilor metalici.*

✚ *Analiza spectrală UV-Vis a confirmat absența fenomenelor de asociere moleculară în soluție pentru concentrații de ordinul $10^{-6}M$ și absorbții în domeniul fototerapeutic pentru liganzii porfirinici P1.3 și P2.2.*

✚ *Solvenții au demonstrat o influență slabă asupra profilului spectral al compușilor investigați, cu mici modificări în poziționarea maximelor de absorbție.*

✚ *Evaluarea profilului fluorescent al noilor compuși a urmărit determinarea randamentului de fluorescență, timpului de viață al fluorescenței și randamentului cuantic de generare a oxigenului singlet. Compușii P2.2, P1.3, Zn(II)2.2 și Zn(II)1.3 au demonstrat proprietăți fluorescente bune. Cu excepția complexului Cu(II)2.2, valorile obținute pentru parametrii de fluorescență, se încadrează în valorile impuse unui fotosensibilizator și permit atribuirea compușilor investigați a calității de candidați pentru terapia antitumorală prin fotosensibilizare.*

Evaluarea comportamentului biofizic la nivel membranar al compușilor macrociclici tetrapirolici nou sintetizați

Studiile privind efectul diferitelor molecule cu potențial terapeutic asupra potențialului de membrana sunt utilizate frecvent în cercetarea biomedicală [Jensen și Bräuner-Osborne, 2004; Parent și colab., 2009; Panickar și colab., 2009; Detre și colab., 2006; Saar și colab., 2005].

Selectivitatea, transferul și distribuția moleculelor cu potențial antitumoral, în principal a structurilor de tip porfirinic, în diferite tipuri de tesuturi și celule, depinde în mod evident de arhitectura structurală a fiecărui compus, prezența unui ion metalic în macrociclul tetrapirolic și profilul amfifil al moleculei (balanta hidrofob/hidrofila a moleculei). În plus, eficiența fotodinamică a unui fotosensibilizator porfirinic este direct corelată cu mecanismul de activare a acestuia și distrugerea celulei maligne.

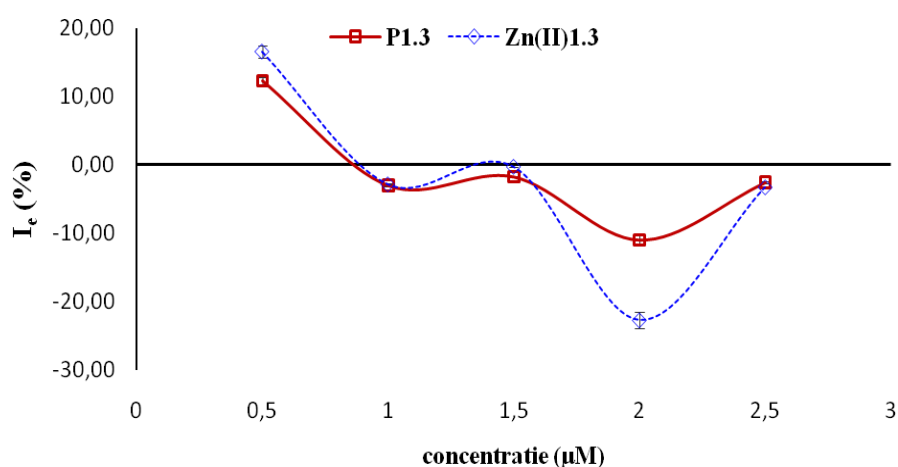
Moleculele tetrapirolice cu rol de fotosensibilizator, pot traversa membrana celulară prin difuzie, prin endocitoză nespecifică sau chiar prin pinocitoză. Agregatele mari pot fi, de asemenea, internalizate prin fagocitoză [Rosenkranz și colab., 2000]. Printre mecanismele de acțiune implicate în terapia fotodinamică, se numără peroxidarea lipidică indusă de oxigenul singlet generat prin iradiere în prezența moleculei tetrapirolice sau mecanismul de modulare a canalelor gramicidin A [Lavi și colab., 2002; Dror și colab., 2009; Rokitskaya și colab., 2015]. Studiile privind evaluarea potențialului transmembranar se realizează prin diferite tehnici, apelând la molecule (sonde) cu proprietăți fluorescente dependente de potențial și care permit o metodă indirectă de evaluare a transferului ionic prin membrana celulară. Sondele potențiometrice utile monitorizării modificărilor de potențial transmembranar în cazul celulelor neexcitabile sunt cele cu răspuns lent de tip derivati ai acidului bis-barbituric; acestea au maxime de excitație în intervalul spectral 490-590nm, leaga proteine intracelulare cu efect asupra creșterii intensității fluorescente și deplasării maximului de emisie spre lungimi de undă mai mari. Depolarizarea membranei celulare determină creșterea semnalului fluorescent. În determinările experimentale am utilizat ca sondă fluorescentă, bis(1,3 acid dibutilbarbituric)trimetin oxonolul (DiBAC₄ (3), o sondă fluorescentă care se leaga la proteinele membranei celulare cu rezultat în creșterea semnalului fluorescent. Depolarizarea membranei generează o creștere a intensității de emisie; în mod similar, hiperpolarizarea membranei diminuează fluxul sondei în celulă, prin urmare semnalul fluorescent este redus comparativ cu celula normală (control) [Klapperstück și colab., 2009].

Studiul realizat în cadrul acestei teze a urmărit evaluarea influenței expunerii unor celule din linia celulară L929 la acțiunea de lungă durată (20 min) a compușilor nou sintetizați asupra potențialului transmembranar folosind sonda fluorescentă DiBAC₄(3). Studiul s-a efectuat într-un experiment de fluorescență staționară pentru compușii P1.3, Zn(II)1.3, P2.2, Zn(II)2.2.

Pentru evaluarea modificărilor de potențial transmembranar s-a utilizat sonda de potențial lentă DiBAC₄(3), de la Molecular Probes Fisher Scientific, Inc.; sub forma de soluție 2mM (soluție stoc) în DMSO care a fost pastrată la -20°C pe parcursul experimentelor. Probe de suspensie celulară 2 mL, au fost incubate la temperatura camerei, timp de 20 minute, cu compus porfirinic în diferite concentrații (domeniul 0,5-2,5 μM) și s-a evaluat efectul porfirinelor asupra potențialului transmembranar prin monitorizarea creșterii/scăderii intensității emisiei fluorescente a sondei DiBAC₄ (3) măsurată la 513 nm, cu excitație la 495 nm (unități relative). Concentrația sondei pe celule a fost de 2 μM. Ca martor s-au folosit seturi de celule incubate numai cu solvent PEG 200. Pentru fiecare compus porfirinic de testat s-au preparat soluții stoc 0,25 mM, care s-au utilizat pentru a testa efectul porfirinelor asupra

celulelor. Determinările experimentale s-au realizat cu un spectrofluorimetru Jasco FP 6500 iar rezultatele sunt exprimate ca efect relativ al porfirinelor asupra potențialului transmembranar, utilizând formula: $I_e = 100 \times (1 - I_p/I_m)$; (I_m = semnal martor, I_p = semnal proba). Datorită faptului că porfiringa bază liberă și complexul cu Zn(II) prezintă fluorescența în apropierea lungimii de undă a sondei DiBAC₄(3), am testat pentru primă dată dacă vreo interferență spectrală a stimulilor și a sondei ar putea afecta rezultatele. Astfel, lungimea de undă de excitare a probelor de testat a fost 405 nm și semnalul de emisie a fost monitorizat în intervalul spectral 500-600 nm. S-a remarcat faptul că emisia porfirinei în acest interval este foarte slabă, astfel încât nu poate exista nici o interferență spectrală între sondă și porfirine, adică semnalul sondei nu este afectat.

Rezultatele au evidențiat faptul că, sub acțiunea porfirinelor dizolvate în PEG 200, în general, membrana celulară a fost depolarizată (adică, valoarea absolută a potențialului transmembranar a scăzut la probele incubate timp de 20 de minute cu porfirinele în comparație cu celulele martor). Depolarizarea, deși scăzută, a fost dependentă de doză. De remarcat faptul că, pentru proba ce conține cea mai mică doză de porfiringă (0,5 μM), o hiperpolarizare membranară s-a manifestat în cazul compușilor testați. Acest efect s-ar putea datora dozei mici de compus porfirinic în celule, astfel încât efectul general asupra canalului este scăzut. Pentru complexii Zn(II)1.3 și Zn(II)2.2 efectul de depolarizare asupra membranei a fost superior celui manifestat de liganzii P1.3 și P2.2. Rezultatele obținute de noi sunt în acord cu cele obținute de Horning și colab. [Horning și colab., 2013], care a demonstrat faptul că derivații de tetrafenilporfină se pot lega la canalul ionic de potasiu.



Efectul 5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil)porfirinei și Zn(II)-5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil)porfirinei ($c=0.5-2.5\mu\text{M}$, solvent PEG 200) asupra potențialului transmembranar în celule de tip L929

Studiile referitoare la influența structurilor porfirinice asupra potențialului transmembranar au demonstrat că unul dintre mecanismele prin care porfirinele pătrund în membrana celulară este difuziunea pasivă, oarecum inhibată la temperaturi mai scăzute [Szeimies și colab., 1996]; Berg și colaboratorii au aratat că *meso*-tetrafenilporfirinele anionice se acumulează inițial în lizozomi, dar la iradierea celulelor își schimbă localizarea [Berg și colab., 1991]. Redistribuirea indusă de iradiere a acestor compuși pare să depindă de starea ciclului celular [Strauss și colab., 1995]. Acest lucru poate fi de asemenea luat în considerare pentru rezultatele noastre și se impune a fi un parametru de discuție în studii ulterioare.

Concluzii

✚ Studiile au evidențiat un efect de depolarizare a membranei celulare sub influența compușilor testați, efect dependent de doza de compus porfirinic.

✚ Atât ligandul porfirinic cât și complexul corespunzător cu ionii Zn(II), exercită la concentrații mici un efect de ușoară hiperpolarizare membranară. Cu creșterea concentrației, efectul polarizant al porfirinelor se diminuează.

✚ În prezența soluțiilor cu un conținut de $2\mu\text{M}$ complex (Zn(II)1.3, Zn(II)2.2) sau ligand (P1.3, P2.2) s-au înregistrat efecte de depolarizare membranară, fenomen mai pronunțat în cazul complexelor.

✚ Studiile au evidențiat un efect de depolarizare a membranei celulare sub influența compușilor testați, efect dependent de doza de compus porfirinic.

✚ Modelul dezvoltat, prin experimentele prezentate cu stabilirea unei corelații între concentrația compusului activ și efectul de polarizare a membranei celulare, reprezintă un protocol eficient în determinările ulterioare ce vizează dezvoltarea porfirinelor ca agenți teranostici.

Evaluarea *in vitro* la nivel celular a 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirinei și complexelor corespunzătoare cu ionii Zn(II) și Cu(II). Studii pe linii de celule tumorale umane de adenocarcinom de colon HT-29, fibroblaști de șoarece din linia L929, celule PBMC și celulele monocitare umane SC

Evaluarea *in vitro* la nivel celular a compușilor seriei P2.2 s-a realizat utilizând linii de celule umane de adenocarcinom de colon HT-29 (linie standard, nr. catalog ATCC HTB-38), fibroblaști de șoarece din linia L929 (linie standard, nr. catalog ATCC CCL-1), celule primare mononucleare (PBMC) izolate din sânge periferic și celulele monocitare umane SC (linia celulară ATCC® CRL-9855™).

Determinările experimentale s-au realizat în relație cu concentrația în compus porfirinic și timpul de acțiune prin monitorizarea următorilor parametri celulari:

- gradul de incorporare celulară a structurilor tetrapirolice
- viabilitatea și multiplicarea celulară, evaluate prin testul reducerii sării de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium (MTS)
- integritatea membranară (moartea celulară), evaluată ca integritate a membranei plasmatice prin testul eliberării extracelulare a lactat dehidrogenazei (LDH)
- gradul de apoptoză și necroză celulară

Au fost realizate și investigații privind biocompatibilitatea solventului PEG 200 la diluții mai mari de 1/500. Au fost testați compușii macrociclici porfirinici de tip ligand și combinație complexă cu ioni metalici Zn(II) sau Cu(II):

- 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina (P2.2)
- Zn(II)-5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina (Zn(II)2.2)
- Cu(II)-5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina (Cu(II)2.2)

Determinările experimentale au fost realizate în cadrul Institutului Național de Cercetare Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale „Victor Babeș”, București; rezultatele obținute au fost diseminate prin publicarea lor în articolul: *Studies on the synthesis,*

photophysical and biological evaluation of some unsymmetrical meso-tetrasubstituted phenyl porphyrins, *Molecules*, 22, 1815, doi:10.3390/molecules22111815, 2017.

Evaluarea profilului citotoxic al compușilor seriei P2.2 s-a realizat *in vitro* în intervalul de concentrații 0-20 μ M. Compușii de testat au fost dizolvați inițial în PEG 200 (sigma-Aldrich) în concentrații de 10mM. Celulele tumorale HT-29 și fibroblastele L929 au fost tratate cu compuși porfirinici timp de 48 ore, în timp ce PBMC au fost tratate doar 24 ore, ținând cont de faptul că fotosensibilizatorii sunt mai rapid eliminați din sânge decât din tumori și țesuturi. Pentru prepararea soluțiilor de fotosensibilizatori a fost utilizat PEG 200, acesta fiind unul dintre solvenții des utilizați în formularea farmaceutică deoarece nu favorizează agregarea moleculară prin asocierea structurilor porfirinice. Mai mult, este cunoscut faptul că PEG 200 limitează absorbția nanostructurilor de către fagocitele sanguine, crescând astfel biodisponibilitatea acestora [Karra și Borlak, 2012]. Au fost investigate diluții necitotoxice ale PEG 200 (PEG, 1/4000-1/500). Ținând cont de faptul că PEG 200 poate atinge concentrații mai mari în sânge și țesut imediat după inocularea intravenoasă a fotosensibilizatorului, un studiu suplimentar a fost realizat și pentru concentrații mai mari în PEG 200 (diluții PEG 10x1/400-1/50). Alegerea celulelor tumorale HT-29 și fibroblastii de șoarece L929, celule relevante pentru nișa tumorală [Melzer și colab., 2017], a fost justificată de faptul că, porfirinele seriei P2.2 sunt vizate pentru utilizarea lor ca noi markeri și fotosensibilizatori în terapia fotodinamică a tumorilor solide. Alegerea celulelor tumorale HT-29 pentru studii a fost justificată de faptul că în procesul de iradiere în cadrul terapiei fotodinamice, lumina poate fi transmisă prin fibre optice, mai ușor către formațiunea tumorală, și astfel se poate obține o iradiere eficientă a tumorii și o interacțiune minimă a luminii cu țesuturile normale.

Considerând faptul că fotosensibilizatorii sunt în general administrați intravenos iar celulele de tip PBMC vor fi expuse unei concentrații semnificative de porfirină, în studiile *in vitro* la nivel celular am inclus și celule mononucleare periferice umane (PBMC). Determinările experimentale au urmărit evaluarea capacității de acumulare a compusului P2.2 la nivel celular precum și efectele P2.2, Zn(II)2.2, Cu(II)2.2 asupra funcționalității celulare, respectiv asupra parametrilor viabilitate/proliferație celulară și integritate membranară.

Celulele HT-29 și L929 au fost menținute în mediu de cultură DMEM suplimentat cu 10% ser fetal bovin (FBS, Biochrom) și soluție de antibiotic/antimicotic (Sigma-Aldrich). După încărcare, celulele aderente au fost tripsinizate utilizând 0.25%/0.02%-Trypsin/EDTA (Biochrom). Celulele primare mononucleare (PBMC) au fost izolate din sânge periferic. Sângele a fost recoltat în vacutainere cu heparina litică de la donatori voluntari sănătoși. PBMC au fost izolate din sânge prin centrifugare [Boyum, 1968], utilizând soluție de separare Biocoll (Biochrom). PBMC s-au izolat și s-au resuspendat în mediu RPMI 1640 suplimentat cu ser fetal bovin 10% (FBS, Biochrom) și soluție antibiotic-antimicotic (Sigma-Aldrich). În studiile privind gradul de incorporare celulară s-au utilizat celulele monocitare umane SC (linia celulară ATCC® CRL-9855™), cultivate în mediu de cultură IMDM (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) suplimentat cu 10% ser fetal bovin (FBS, Biochrom) și soluție de antibiotic/antimicotic (Sigma-Aldrich), 1% supliment HT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) și 0.1% 2-mercaptoetanol (Sigma). Concentrația și viabilitatea celulelor s-au determinat la microscopul optic prin numărare în camera Burkert-Turk în albastru de tripan (20 μ L suspensie celulară omogenizată cu 20 μ L albastru de tripan). Viabilitatea celulară a fost evaluată prin testul de excludere cu albastru de tripan; în experimente au fost utilizate doar suspensiile celulare cu viabilitate peste 95%. Pentru experimente, celulele au fost însămânțate în plăci de cultura cu 96 godeuri, cu densitate de: 30.000 cell HT-29/cm² și 15.000 cell L929/ cm². Celulele au fost incubate peste noapte la 37°C în 5% CO₂ pentru a permite aderența lor. Celulele PBMC și SC au fost

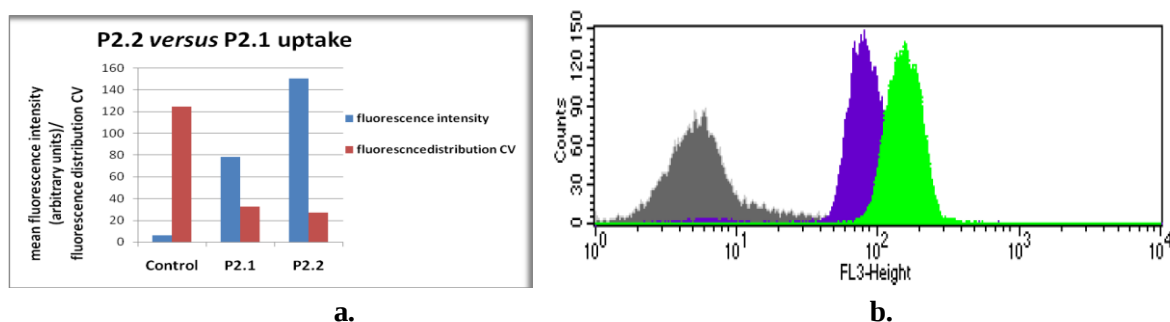
pasate și reînsămânțate în plăci de cultură sterile cu 96 godeuri la o densitate de 1×10^5 celule/godeu și s-au utilizat imediat pentru experimente. Compușii porfirinici sau solventul PEG 200 au fost adăugați în celule. Volumul probei finale a fost de 100 μ L/godeu. Probele aceluare, conținând doar mediu de cultură au fost utilizate pentru stabilirea fondului. Toate probele au fost incubate la 37°C în 5% CO₂ timp de 48 de ore în cazul liniilor celulare, sau timp de 24 de ore în cazul PBMC.

Capacitatea de localizare la nivel celular a compusului 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina (P2.2)

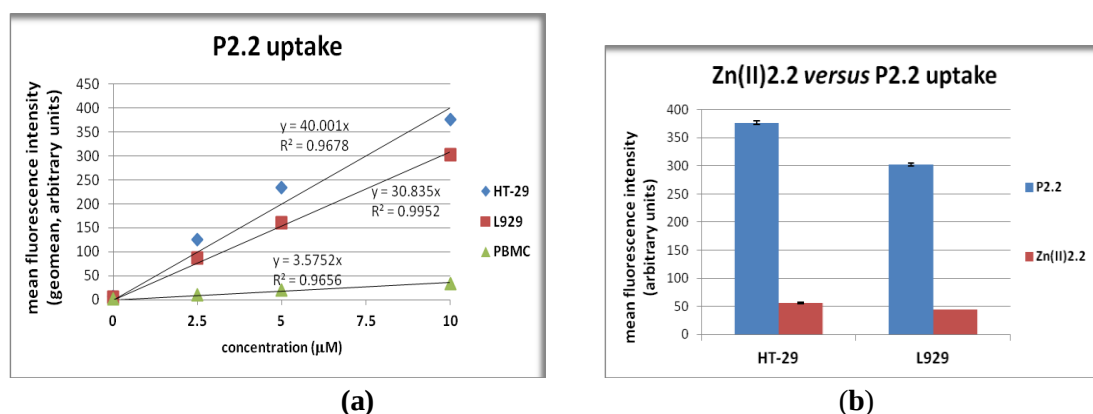
Studiul privind capacitatea de localizare intracelulară a structurilor tetrapirolice nou sintetizate s-a realizat doar asupra compusului P2.2, acesta fiind caracterizat de un profil fluorescent superior complexilor Zn(II)2.2 și Cu(II)2.2. Pentru evidențierea diferențelor structurale asupra capacității de integrare intracelulară, compusul P2.1 cu structură simetrică, a fost studiat ca referință. Datorită proprietăților fluorescente remarcabile ale compusului P2.2, încorporarea acestuia în celule s-a putut determina prin citometrie în flux ca fluorescența medie intracelulară. Celulele monocitare umane SC au fost cultivate și tratate cu P2.2. După încărcare, celulele aderente au fost tripsinizate utilizând 0.25%/0.02%-Trypsin/EDTA (Biochrom). Celulele detașate și celulele neaderente au fost spălate de două ori prin centrifugare cu tampon fosfat salin (TFS -Gibco) rece și au fost resuspendate în live cell imaging solution (Thermo Fisher Scientific). Citirea probelor s-a realizat imediat la citometrul în flux (BD FACSCalibur sau BD FACS Canto de la Becton Dickinson), utilizând pentru excitare un laser de 488 nm, iar emisia a fost înregistrată în canalul de fluorescență FL3 (roșu). Datele au fost achiziționate și prelucrate la citometrul în flux cu ajutorul programului CellQuest sau DIVA (BD Biosciences). Datele au fost exprimate ca intensitate medie de fluorescență exprimată în unități de fluorescență arbitrară. Imaginile ce redau încorporarea celulară a compusului P2.2 au fost obținute prin microscopie confocală. Celulele monocitare SC tratate cu P2.2 au fost spalate de două ori cu tampon fosfat rece, și fixate 15 minute cu FluoroFix (BioLegend, San Diego, CA, USA) și apoi colorate cu 1.0 μ g/mL 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) (Sigma-Aldrich). Probele au fost analizate cu un microscop confocal Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germania) iar imaginile au fost achiziționate cu softul LASX (Leica Microsystems). Rezultatele experimentale obținute în cazul celulelor SC monocitare umane tratate timp de 24 ore cu 10 μ M P2.2 au relevat o fluorescență intracelulară semnificativ mai mare comparativ cu cea a celulelor tratate cu P2.1 în aceleași condiții experimentale. Deoarece valorile randamentelor cuantice de emisie fluorescentă sunt apropiate în cazul celor doi compuși investigați ($\Phi_F=0.06$ pentru P2.1 și $\Phi_F=0.04$ pentru P2.2), se poate afirma că P2.2 se acumulează mult mai ușor la nivel celular comparativ cu forma simetrică P2.1. Acesta a fost unul dintre principalele argumente în continuarea evaluării potențialului biomedical al compusului porfirinic cu structura asimetrică P2.2.

Potențialul de internalizare celulară a structurii asimetrice P2.2, a fost evaluat pentru trei tipuri celulare (HT-29, L929 și PBMC), timp de incubare de 24 de ore și concentrații în compus porfirinic în intervalul 0–10 μ M. În studiu au fost incluse celule tumorale (linia celulară de adenocarcinom uman de colon HT-29) dar și celule normale (linia celulară de fibroblaste de șoarece L929 și leucocite primare izolate din sânge uman, PBMC). Celulele normale au fost utilizate pentru a identifica potențiale efecte negative exercitate la întuneric de către fotosensibilizatorii testați. Celulele tumorale au fost utilizate având în vedere aplicația medicală a fotosensibilizatorilor nou sintetizați pentru PDT în cancer (tumori solide). Cea mai mare capacitate de încorporare a fotosensibilizatorului P2.2 a fost evidențiată în cazul celulelor umane de adenocarcinom de colon HT-29, urmate de fibroblaști de șoarece din linia L929 ($p < 0,005$) și celulele primare mononucleare (PBMC). Rezultatele experimentale indică

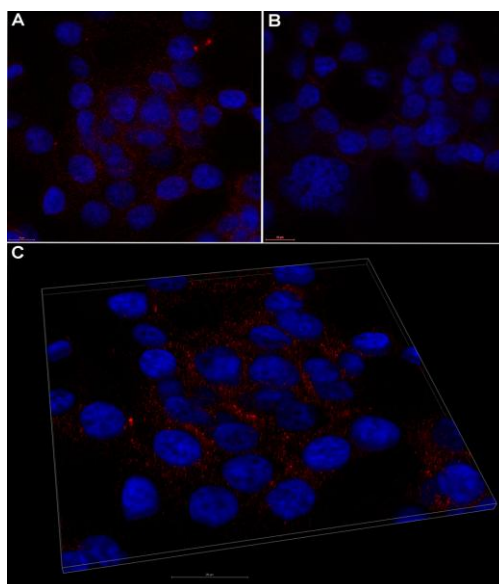
pentru porfirina P2.2, cel mai bun grad de încorporare în celulele tumorale de tip HT-29 și o biodisponibilitate bună; în celule de tip PBMC rata de acumulare a ligandului P2.2 este scăzută. Complexul Zn(II)2.2 se încorporează în celulele tumorale de tip HT-29 și cele aparținând liniei L929, dar probabil, datorită fluorescenței sale mai scăzute comparativ cu P2.2, intensitatea medie a fluorescenței celulelor tratate cu Zn(II)2.2 a fost de aproximativ șapte ori mai mică decât în cazul ligandului P2.2. Cu toate acestea, încorporarea celulară a Zn(II)2.2 poate fi monitorizată prin măsurători de fluorescență. Imaginile obținute prin microscopie electronică sugerează faptul că, pentru o concentrație de 10 μM, moleculele fotosensibilizatorului P2.2 se distribuie în citosolul celulelor tumorale HT-29, cel mai probabil lângă membrana plasmatică. Studiul detaliat privind localizarea porfirinei P2.2 la nivel subcelular este justificat de cercetările ulterioare privind stabilirea mecanismelor în procesul de terapie fotodinamică, deoarece tipul de localizare a fotosensibilizatorului poate dicta în mod decisiv rezultatul PDT relativ la tipul de moarte celulară declanșată [Agostinis și colab., 2011].



Încorporarea compușilor P2.2 și P2.1 ($c = 10 \mu\text{M}$) în celulele monocitare umane SC (timp de incubare 24 ore). Încorporare celulară evaluată prin citometrie în flux ($\lambda_{\text{excitare}} = 488 \text{ nm}$; emisia a fost înregistrată în canalul de fluorescență FL3-roșu). Rezultatele sunt prezentate ca: (a) intensitate medie de fluorescență (unități de fluorescență arbitrare) și coeficientul de variație (CV) a distribuției fluorescenței celulare (b) histograma reprezentativă (Control, P2.1, P2.2).



(a) Încorporarea celulară a compusului P2.2. în celulele tumorale umane de adenocarcinom de colon HT-29, fibroblaști normali de soarece din linia L929 și celule PBMC; timpi de incubare 24 ore, $c = 0-10 \mu\text{M}$. (b) Încorporarea celulară a complexului Zn(II)2.2 comparativ cu ligandul P2.2., în celule HT-29 și L929 tratate 24 h cu compus porfirinic de concentrație 10 μM. Încorporarea celulară a fost evaluată prin citometrie în flux (utilizând pentru excitație un laser de 488 nm; emisia a fost înregistrată în canalul de fluorescență FL3 -roșu). Rezultatele sunt prezentate ca medie $\pm$ abatere standard a mediei pentru triplicate de probe.



Imagine reprezentativă privind încorporarea de către celulele tumorale de adenocarcinom uman din linia HT-29 a compusului P2.2 (10 μ M) cu fluorescența roșie. Imaginea a fost obținută prin microscopie confocală. Nucleii au fost colorați cu DAPI (albasru).

Efectul in vitro al compușilor porfirinici asupra viabilității și proliferării celulare

Viabilitatea și proliferarea celulelor în prezența și absența compușilor porfirinici sau solventului PEG 200 a fost evaluată ca număr de celule metabolic active folosind testul reducerii MTS. În experiment s-a utilizat kitul CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay de la Promega Corporation cu aplicarea metodologiei recomandată de producător (<https://www.promega.ro/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol>). Kitul folosit în determinările experimentale conține sare de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfafenil)-2H-tetrazoliu (MTS) și un compus cuplat electronic (fenazin etosulfat; PES). MTS este încărcat negativ și nu penetrează ușor celulele, dar se combină cu acceptorul de electroni PES care poate transfera electroni din citoplasma sau membrana plasmatică pentru a facilita reducerea tetrazoliului într-un produs formazan colorat și solubil în mediu de cultura [Moravec și colab., 2004]. Această conversie este posibilă în prezența NADPH sau NADH produse de dehidrogenazele din celulele metabolic active [Berridge și Tan, 1993]. Prin măsurarea numărului de celule metabolic active, testul de reducere MTS oferă informații despre viabilitatea și proliferarea celulelor în cultură.

Celulele au fost cultivate în plăci de cultură cu 96 godeuri, în 100 μ L mediu de cultură, în absența sau prezența derivatului porfirinic sau a solventului PEG 200. Celulele aderente au fost precultivate 24 de ore pentru a permite celulelor să adere la godeu. Celulele neaderente investigate au fost direct cultivate în prezența compusului porfirinic sau a solventului PEG 200. După încheierea timpului de incubare/tratament cu porfirină a celulelor, în fiecare probă se adaugă 20 μ L din reactivul kitului. Celulele vor fi incubate încă 3 ore (depinzând de tipul de celule și de metabolismul redox al acestora) la 37°C, în atmosferă de 5% CO₂, pentru a permite dezvoltarea reacției de reducere a MTS de către celulele metabolic active. Densitatea optică (DO) a probelor și controalelor s-a măsurat la 490 nm față de referința de 620nm, la sfârșitul perioadei de incubare (cititor ELISA -Tecan Sunrise, prevăzut cu program de analiză

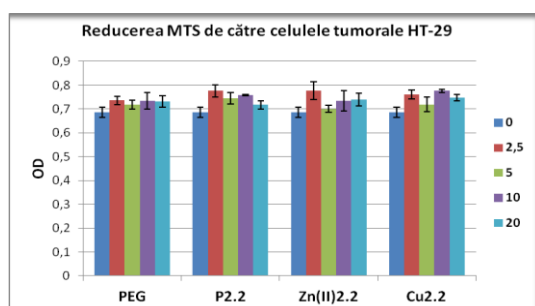
a datelor). DO a fost corectată în probele celulare prin scaderea DO a probelor aceluare (soluție derivat porfirinic în PEG 200 și mediu de cultură, sau mediu de cultură). Rezultatele sunt prezentate ca medie $\pm$ abatere standard a mediei (SEM) pentru triplicate de probă.

Rezultatele experimentale au demonstrat că proliferarea și viabilitatea celulelor tumorale HT-29 sau fibroblaștilor L929, expuse timp de 48 ore la soluțiile compușilor porfirinici nu au fost semnificativ modificate comparativ cu probele tratate doar cu solventul PEG 200.

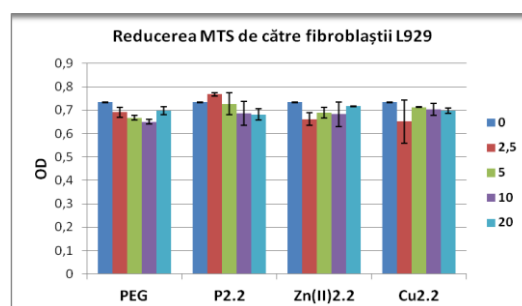
Diferențe semnificative au fost observate în culturile PBMC, pentru comportamentul compușilor porfirinici testați.

În timp ce ligandul P2.2 nu afectează semnificativ viabilitatea celulelor PBMC, reducerea MTS a fost semnificativ scăzută de complexii Zn(II)2.2 ($c=20\mu\text{M}$) și Cu(II)2.2 ($c=10\text{--}20\mu\text{M}$). În plus, s-a constatat faptul că efectul *in vitro* exercitat de Cu(II)2.2 asupra viabilității celulelor de tip PBMC, este mult mai intens comparativ cu efectul Zn(II)2.2.

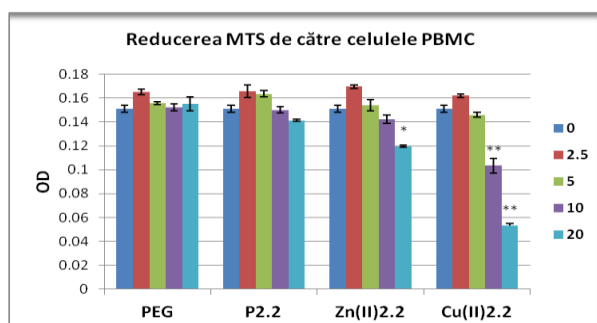
Cu(II)2.2 manifestă efect inhibitor asupra proliferării celulare începând cu concentrații mai mici ($10\mu\text{M}$) comparativ cu Zn(II)2.2 ($20\mu\text{M}$). Pentru concentrații $20\mu\text{M}$ în Cu(II)2.2, s-a înregistrat un efect inhibitor pronunțat, o scădere a reducerii MTS la 68% în PBMC tratat cu Cu(II)2.2, comparativ cu răspunsul de 77% indus de Zn(II)2.2.



a.



b.



c.

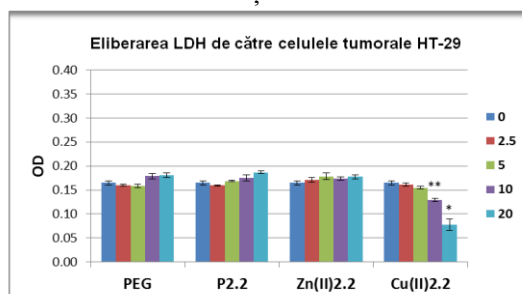
Efectul exercitat *in vitro* de compușii seriei P2.2 și solventul PEG200 asupra viabilității/multiplicării celulelor tumorale umane de adenocarcinom de colon HT-29 (a), fibroblaștilor normali de șoarece din linia L929 (b) și celulelor PBMC (c); evaluare prin testul reducerii MTS pentru concentrații în compus porfirinic $c = 0\text{--}20\mu\text{M}$, timpi de incubare 24h (PBMC) sau 48h (HT-29 și L929); rezultate exprimate ca medie $\pm$ abatere standard a mediei pentru triplicate de probă. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparativ cu solventul

Efectul in vitro al compușilor porfirinici asupra integrității membranare

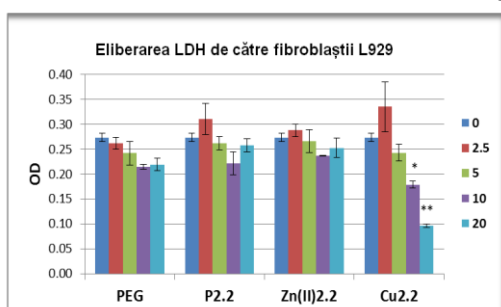
Evaluarea integrității membranare și implicit a potențialului citotoxic al compușilor testați s-a realizat prin testul eliberării lactat dehidrogenazei (LDH) utilizând kitul colorimetric *CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* (Promega Corporation) și metodologia producătorului (<https://www.promega.ro/resources/protocols/technical-bulletins/0/cytotox-96-non-radioactive-cytotoxicity-assay-protocol>). S-a analizat activitatea enzimatică a LDH în supernatantul de cultură. LDH este o enzimă solubilă, stabilă, cu localizare citosolică, care este eliberată în spațiul extracelular atunci când membrana celulară este distrusă. Prin urmare, prezența LDH în supernatantul culturii este un indicator al morții celulare, cel mai probabil reflectând necroza celulară [Chan și colab., 2013].

Pentru precizie, eliberarea LDH și reducerea MTS au fost măsurate în aceleași probe experimentale. La sfârșitul perioadei de incubare plăcile de cultură au fost centrifugate la 200rpm, 5min pentru clarificarea supernatantului de cultură în vederea recoltării a 50μL din acesta. Peste cei 50 μL de supernatant s-au adăugat 50μL din reactivul de detecție a kitului. Probele au fost incubate 30 min la temperatura camerei și la întuneric pentru a permite dezvoltarea reacției LDH. Reacția LDH a fost stopată la final cu reactivul de blocare a reacției din kitul mai sus menționat. La un cititor ELISA (Tecan Sunrise), prevăzut cu program de analiză a datelor, s-a măsurat densitatea optică (DO) a probelor și controalelor la lungimea de undă 490 nm față de referința de 620 nm. DO a fost corectată în probele celulare prin scăderea DO a probelor aceluare (soluție derivat porfirinic în PEG 200 și mediu de cultură, sau mediu de cultură). Rezultatele sunt prezentate ca medie ± abatere standard a mediei (SEM) pentru triplicate de probă.

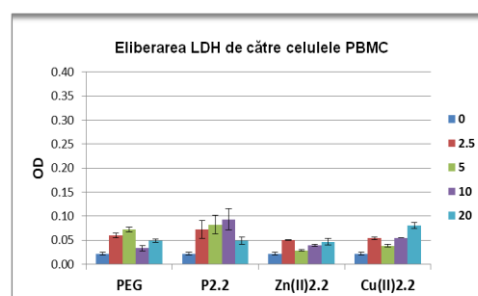
Rezultatele experimentale au demonstrat că ligandul P2.2 și complexul Zn(II)2.2 nu manifestă un efect semnificativ asupra eliberării LDH de către celulele tumorale HT-29 și fibroblaștii L929. Rezultatele obținute au fost în acord cu datele privind efectul compușilor menționați asupra reducerii MTS și anume faptul că P2.2 și Zn(II)2.2 nu afectează semnificativ viabilitatea tipurilor de celule menționate mai sus.



a.



b.



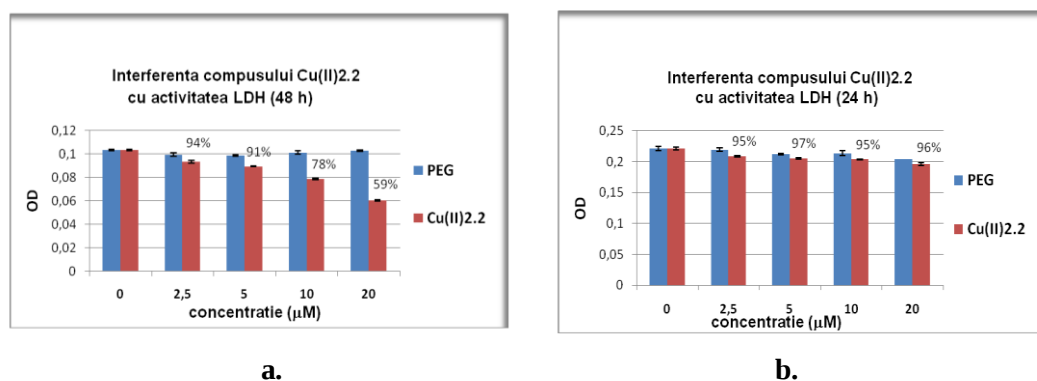
c.

Efectul exercitat *in vitro* de compușii seriei P2.2 și solventul PEG200 asupra morții celulelor tumorale umane de adenocarcinom de colon HT-29 (a), fibroblaștilor normali de șoarece din linia L929 (b) și celulelor PBMC (c); evaluare prin testul eliberării LDH pentru concentrații în compus porfirinic c = 0–20μM, timpi de incubare 24h (PBMC) sau 48h (HT-29 și L929) cu rezultate exprimate ca medie ± abatere standard a mediei pentru triplicate de proba. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparativ cu solventul

Complexul Cu(II)2.2 determină o scădere neașteptată a reacției LDH în supernatantul culturilor celulare HT-29 și L929, deși la testul reducerii MTS, Cu(II)2.2 nu a modificat numărul de celule metabolic active. Astfel, pentru o concentrație de 10 μM , Cu(II)2.2 inhibă eliberarea LDH în culturile de celule HT-29 la 72% și 83% în culturile de celule L929 ($p < 0,05$), din valoarea probelor tratate cu solvenți ($p < 0,01$).

Concentrații mai mari de Cu(II)2.2 (20 μM) au avut un efect inhibitor și mai pronunțat, determinând reducerea răspunsului LDH atât în celulele tumorale HT-29, cât și în fibroblaștii L929 până la aproximativ 44% din efectul indus de solvent ($p < 0,05$).

Acțiunea inhibitoare a fost aparent determinată de inactivarea enzimei LDH de către ionii Cu(II), așa cum s-a demonstrat în probe acelulare ce conțin doar mediul complet de cultură DMEM.



Activitatea celulară a LDH în mediu complet de cultură DMEM, tratat cu complex Cu(II)2.2 sau solvent PEG 200 timp de 48 de ore (a) sau 24 de ore (b). Rezultate exprimate ca medie $\pm$ abatere standard a mediei pentru triplicate de proba. Efectul Cu(II)2.2 raportat la PEG 200 este prezentat procentual.

Efectele suplimentare ale complexului Cu(II)2.2 asupra activității celulare a LDH, nu pot fi excluse, având în vedere că acțiunea inhibitoare a fost mai pronunțată în sistemele celulare decât cele acelulare [Pamp și colab., 2005].

În cazul celulelor PBMC, eliberarea LDH nu a fost afectată statistic de nici unul dintre compușii studiați. De remarcat faptul că la concentrații de 20 μM ale complexului Zn(II)2.2 scăderea reducerii MTS nu a fost însoțită de creșterea semnificativă a eliberării LDH. Probabil, la concentrații 20 μM , porfirina Zn(II)2.2 inhibă metabolismul celulelor PBMC, dar nu declanșează moartea celulară prin necroză.

Evaluarea procesului de apoptoză și necroză celulară

Pentru obținerea unor informații mai detaliate despre moartea celulară, s-a investigat, prin citometrie în flux, apoptoza și necroza PBMC tratate 24 h cu 5–20 μM Zn(II)2.2, utilizând ca referința celule tratate cu PEG 200.

Fenomenul fiziologic de apoptoză este caracterizat de anumite trăsături morfologice care includ pierderea asimetriei de membrană, condensarea citoplasmei și a nucleului, clivarea internucleozomală a ADN [Cheng și colab., 2008].

La nivelul celulelor apoptotice, fosfatidil serina (FS) – fosfolipid membranar – este translocată de pe fața internă pe cea externă a membranei astfel încât FS devine expusă micromediului celular extern. Anexina V este o proteină de 35–36 kDa, Ca^{2+} dependentă, care se leagă cu mare afinitate la celulele care expun FS. Anexina V poate fi conjugată cu un

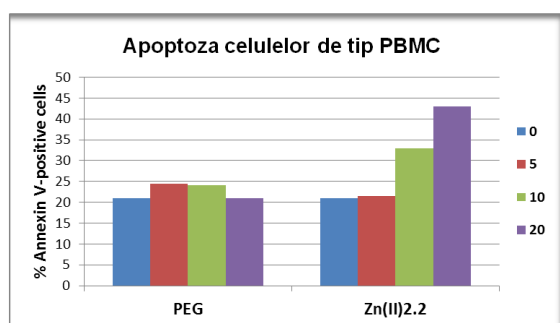
fluorocrom, FITC. Aceasta cuplare contribuie deopotrivă la menținerea afinității înalte pentru FS și servește drept marcator sensibil pentru analiza în citometrie în flux a celulelor antrenate pe calea apoptozei. Iodura de propidium (PI), este un marcator standrad în citometrie pentru viabilitate celulară, astfel celulele viabile cu membrana intactă vor exclude PI. Celulele non-viabile sunt permeabile pentru PI. Celulele marcate pozitiv pentru anexina V-FITC și negativ pentru PI, sunt apoptotice. Marcarea pozitivă atât pentru anexina V-FITC cât și pentru PI, sunt fie în apoptoză târzie, sunt angajate în necroza sau moarte. Celulele vii sunt negative atât pentru anexina V-FITC cât și pentru PI. Identificarea gradului de apoptoză la celulele incubate cu porfirinele de sinteză, s-a realizat prin marcarea cu Anexina V – FITC. Acest marcator se leagă cu înaltă specificitate de fosfolipidul de membrana fosfatidil serina, încărcată negativ, care este expusă pe fața externă a membranei doar de către celulele care s-au angajat în procesul fiziologic al apoptozei.

Apoptoza și necroza celulelor de tip PBMC a fost evaluată prin citometrie în flux utilizând testul Anexina V-Iodura de propidiu (PI) (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, Becton Dickinson)- evaluarea prin citometrie în flux a asimetriei și permeabilității membranare asociate apoptozei și respectiv necrozei celulare.

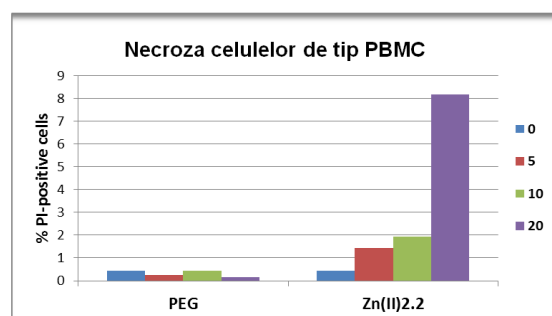
În experiment celulele PBMC la o concentrație 1×10^5 celule/ml au fost tratate pentru 24h cu compus porfirinic sau solvent PEG 200), apoi spălate de două ori cu tampon fosfat salin (PBS) rece și o dată cu Anexina V (prin centrifugare pentru 5 min la 1200 rpm și 4°C).

Celulele PBMC în Annexin V (10^5 cells/100 μ L) au fost marcate prin adăugarea de 5 μ L soluție Anexina V-FITC și 5 μ L soluție iodură de propidium; probele s-au incubat la temperatura camerei și întuneric timp de 15 minute. Marcarea a fost oprită prin adăugarea a 450 μ L tamponul de legare (Annexin V) și populațiile celulare; probele au fost analizate în decurs de o ora utilizând citometrul în flux FACSCalibur (Becon Dickinson). Achiziția și analiza datelor s-a realizat utilizând software-ul BD CellQuest (Becton Dickinson).

Rezultatele analizei sunt exprimate în procent de celule caracterizate de anumite stadii apoptotice: apoptoză timpurie, apoptoză târzie sau necroză (Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit I, Becton Dickinson). Celulele marcate pozitiv pentru Anexina V au fost considerate apoptotice; celulele marcate negativ pentru Anexina V și pozitiv pentru PI au fost considerate în necroza sau moarte.



a.



b.

Apoptoza (a) și necroza (b) celulelor de tip PBMC tratate timp de 24 h cu soluții ale Zn(II)2.2 în solventul PEG 200 ($c=0-20 \mu$ M); evaluare prin citometrie în flux utilizând testul Anexina V-Iodura de propidium (PI). Celulele marcate pozitiv pentru Anexina V au fost considerate apoptotice în timp ce pentru celulele marcate negativ pentru Anexina V și pozitiv pentru PI au fost considerate în necroză sau moarte.

Datele experimentale indică faptul că, începând de la concentrații de 10 μM, Zn(II)2.2 declanșează o creștere dependentă de concentrație a PBMC apoptotice în cultură de 24 de ore.

Necroza a fost de asemenea evidentă, dar procentul de celule PBMC necrotice nu a depășit 8%. Acesta este motivul pentru care eliberarea LDH, nu a fost considerată ca fiind semnificativ afectată de Zn(II)2.2.

Soluțiile ce conțin 10–20 μM Cu(II)2.2, induc o ușoară creștere a eliberării LDH în culturile celulare PBMC.

Prin corelarea acestor rezultate cu scăderea reducerii MTS indusă de 10–20 μM Cu(II)2.2, se confirmă faptul că, pentru concentrații mai mari de 10 μM, porfirina Cu(II)2.2 manifestă citotoxicitate în raport cu celulele PBMC umane. Corelând acest aspect cu efectul inhibitor înregistrat la 48 h în probele aceluare, se presupune că activitatea Cu(II)2.2 este dependentă de timp, efectul inhibitor se manifestă la timpi mai mari de incubare.

În concluzie, dintre compușii porfirinici investigați, ligandul P2.2 nu afectează viabilitatea și/sau proliferarea celulelor tumorale sau normale investigate și poate fi considerat candidat promițător pentru dezvoltarea lui ca fotosensibilizator destinat terapiei fotodinamice a cancerului.

Structurile porfirinice complexe Zn(II)2.2 și Cu(II)2.2 au obținut, prin determinările *in vitro* la nivel celular, un profil citotoxic mai puțin convenabil aplicării lor în PDT, comparativ cu P2.2. Din aceste considerente, aplicarea Zn(II)2.2 în terapia antitumorală (PDT) va fi limitată de efectele sale toxice manifestate pentru concentrații mai mari (20 μM), asupra metabolismului/viabilității celulelor de tip PBMC.

Pentru Cu(II)2.2 rezultatele au demonstrat o toxicitate mai mare asupra celulelor sanguine PBMC, în intervalul de concentrații 10–20 μM, nu numai prin scăderea viabilității/metabolismului celulelor PBMC, dar și prin inhibarea activității LDH. Din acest motiv complexul porfirinic Cu(II)2.2 nu poate fi considerat ca potențial agent teranostic în cancer.

Efectul in vitro exercitat de compușii 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina și Zn(II) 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina în soluții cu concentrații mari de PEG 200

Ținând cont de faptul că solventul PEG 200 poate atinge concentrații mari în sânge și țesut imediat după administrarea intravenoasă a fotosensibilizatorului, am investigat și efectul compușilor P2.2 și Zn(II)2.2 în prezența unei concentrații mai mari de PEG 200 (dilution PEG 10x, 1/400–1/50). Rezultatele au evidențiat o scădere a reducerii MTS în cazul celulelor HT-29 la 42% comparativ cu celulele netratate ($p < 0,05$), în timp ce diluțiile PEG 200 mai mari (1/500) nu au manifestat efecte semnificative.

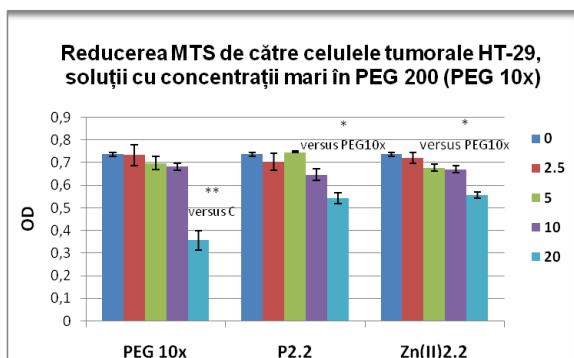
Un efect inhibitor similar al PEG 10x (diluție 1/50) a fost observat în cazul fibroblaștilor L929 pentru care reducerea MTS a scăzut la 59% din răspunsul celulelor netratate ($p < 0,001$); soluțiile diluate ale porfirinelor în PEG 200 (diluții 1/500) nu au manifestat un efect semnificativ asupra reducerii MTS.

Rezultatele experimentale au evidențiat faptul că inhibarea metabolismului celular (citotoxicitatea) apare în tumorile și țesuturile în care se poate acumula PEG 200 în timpul PDT cu fotosensibilizatorii porfirinici. La diluție 1/50 PEG 10x s-a înregistrat o tendință de scădere a procesului de reducere a MTS în cazul PBMC, fără diferențe semnificative din punct de vedere statistic comparativ cu celulele netratate. Prin urmare,

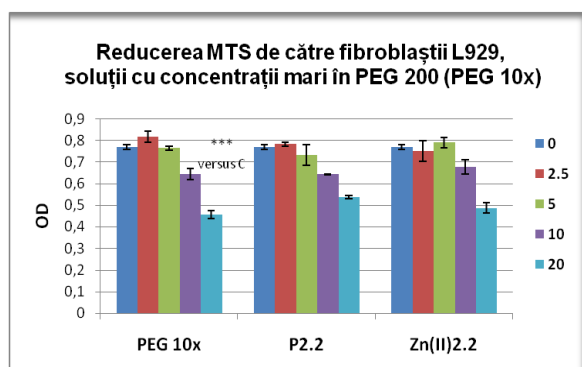
viabilitatea/metabolismul celulelor PBMC nu vor fi influențate semnificativ de concentrații mai mari ale PEG 200, concentrații rezultate prin acumularea locală a acestuia în timpul administrării intravenoase a soluției de fotosensibilizator.

Efectul exercitat asupra viabilității/multiplicării celulare de compușii P2.2 și Zn(II)2.2 pentru concentrații mari de solvent se manifestă ca efect inhibitor al solventului (PEG 10×).

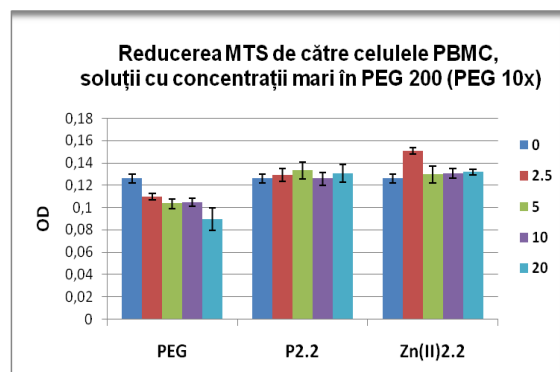
La concentrații mai mari de compus porfirinic P2.2 și Zn(II)2.2 (20 μM), se observă tendința de a proteja celulele împotriva toxicității solventului PEG 10×, dar, în general răspunsurile celulare nu au atins parametrii celulelor netratate.



a.

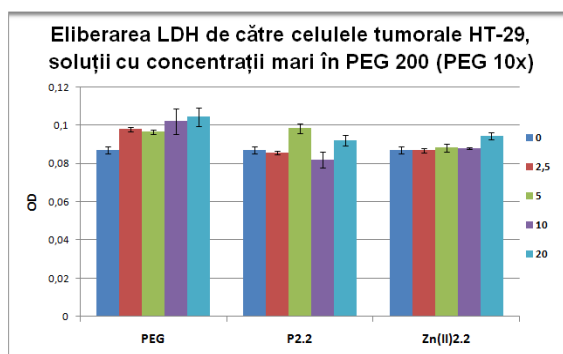


b.

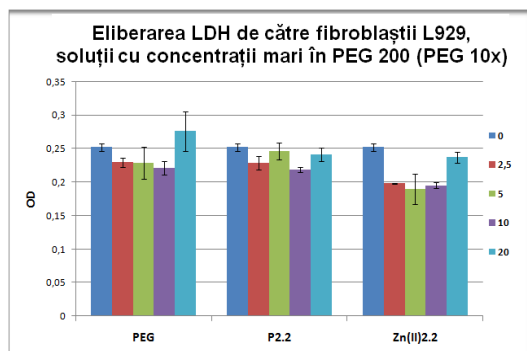


c.

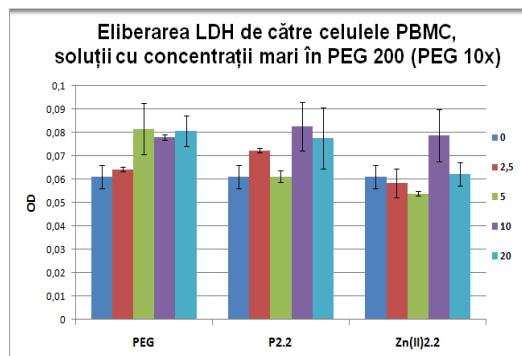
Efectul exercitat *in vitro* de compușii P2.2, Zn(II)2.2 și solventul PEG 200 asupra viabilității/multiplicării celulelor tumorale HT-29 (a), fibroblaștilor normali de șoarece din linia L929 (b) și celulelor PBMC (c); evaluare prin testul reducerii MTS pentru timpi de incubare 24h (PBMC) sau 48h (HT-29 și L929) pentru soluții cu concentrații mari în PEG 200 (PEG 10x). rezultate exprimate ca medie ± abatere standard a mediei pentru triplicate de probă. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparativ cu celule netratate (C) sau cu diluții PEG10x



a.



b.



c.

Efectul exercitat *in vitro* de compușii P2.2, Zn(II)2.2 și solventul PEG 200 asupra morții celulelor tumorale umane de adenocarcinom de colon HT-29 (a), fibroblaștilor normali de șoarece din linia L929 (b) și celulelor PBMC (c); evaluare prin testul eliberării LDH, timp de incubare 24h (PBMC) sau 48h (HT-29 și L929) pentru soluții cu concentrații mari în PEG 200 (PEG 10x); rezultate exprimate ca medie $\pm$ abatere standard a mediei pentru triplicate de probă.

Concluzii

Profilul structural și spectral al compusului porfirinic **P2.2** a determinat o comportare la nivel celular favorabilă dezvoltării ulterioare ca agent teranostic pentru PDT în tumori solide, având în vedere următoarele:

- ✚ manifestă o solubilitate bună în mediul biologic, cu un grad bun de acumulare în celule tumorale și mai mic în celule sanguine, acumularea celulară realizându-se în zona membranei plasmatică

- ✚ nu a exercitat *in vitro* efecte citotoxice semnificative asupra celulelor tumorale și normale;

- ✚ inhibarea metabolică a celulelor mononucleare din sânge (PBMC) impune utilizarea unor concentrații de compus $<10 \mu M$.

- ✚ în cazul compusului cu structură simetrică (**P2.1**) s-au evidențiat unele efecte citotoxice prin inducerea unei apoptoze moderate a celulelor, dar nu a necrozei;

- ✚ generează cantități acceptabile de singlet oxigen atunci când este activat cu lumină de lungime de undă specifică (aprox. 600 nm);

- ✚ are proprietăți fluorescente bune, care permit investigarea acumulării în celule prin citometrie în flux și microscopie confocală;

- ✚ introducerea în structura compusului P2.2 a ionului Zn(II) sau Cu(II) afectează unele dintre proprietățile relevante pentru teranostica PDT ale compusului, cum ar fi fluorescența; compusul Zn(II)2.2 are fluorescența mai mică decât compusul nemetalat, în timp ce Cu(II)2.2 nu este fluorescent și are efect inhibitor asupra activității LDH.

Efectele inhibitoare exercitate de **Zn(II)2.2** asupra metabolismului/viabilității celulelor sanguine, limitează concentrația sa pentru investigațiile biologice.

Complexul **Cu(II)2.2** nu este fluorescent și manifestă o toxicitate pronunțată asupra celulelor sanguine; la concentrații mai mari exercită un efect inhibitor drastic asupra eliberării LDH și de aceea nu poate fi considerat ca potențial agent teranostic în cancer.

Rezultatele experimentale obținute prin evaluarea structurală, spectrală și biologică a compușilor P2.2, Zn(II)2.2 și Cu(II)2.2, constituie pentru compusul P2.2 argumente consistente pentru continuarea studiilor privind dezvoltarea acestuia ca agent teranostic.

Evaluarea *in vitro* a profilului citotoxic al 5, 15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil)porfirinei și complexului Zn(II)-5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil)porfirina. Studii pe linii de celule tumorale umane de adenocarcinom de colon HT-29 și fibroblaști de șoarece din linia L929

Evaluarea profilului citotoxic al 5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil)porfirinei și complexului Zn(II)-5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil)porfirină, s-a realizat prin monitorizarea efectului exercitat asupra viabilității și proliferării celulare, în relație cu concentrația și timpul de acțiune.

Determinările experimentale au fost realizate în cadrul Institutului National de Cercetare Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale „Victor Babes” București, iar rezultatele obținute au fost diseminate parțial prin publicarea lor în brevetul de invenție: *Compus tetrapirolic cu aplicații în teranostica și procedeu de obținere a acestuia*, Brevet nr. 131946/2019.

Studiul biologic *in vitro* s-a realizat utilizând linii de celule umane de adenocarcinom de colon HT-29 și fibroblaști de șoarece din linia L929 și a urmărit investigarea următorilor parametri celulari:

- *viabilitatea și multiplicarea celulară*, evaluate prin testul reducerii sării de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium (MTS)
- *moartea celulară*, evaluată ca integritate a membranei plasmatică prin testul eliberării extracelulare a lactat dehidrogenazei (LDH);

Modelul experimental a fost cel dezvoltat în cazul compușilor seriei P2.2. Evaluarea viabilității/multiplicării și a morții celulelor de tip HT-29 și L929, s-a realizat pentru concentrații de $5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$ și $20\mu\text{M}$ ale compusului 5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil)porfirină și timpi de 24h și 48h de tratament în cultură.

În cazul complexului porfirinic Zn(II)1.3, evaluarea biologică preliminară s-a realizat în raport cu celulele de tip HT-29 și L929, pentru concentrații de compus $5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$ la 48h de tratament în cultura. Rezultatele experimentale obținute au evidențiat pentru compușii P1.3 și Zn(II)1.3 următoarele:

✚ *Compusul porfirinic P1.3 prin designul structural și solubilitatea bună în medii cu polarități diferite prezintă un grad optim de acumulare la nivel celular.*

✚ *Profiul fluorescent al P1.3 indică un randament bun în generarea speciilor reactive de oxigen singlet la iradiere cu lumina laser de 635nm.*

✚ *Evaluarea in vitro a compusului P1.3 utilizând celule tumorale din linia umană de adenocarcinom de colon HT-29 și celule normale din linia fibroblaștilor de șoarece L929, a*

evidențiat faptul că P1.3 nu manifestă citotoxicitate semnificativă în condiții de întuneric, ceea ce îl face adecvat pentru dezvoltare ulterioară ca agent fluorescent în scop diagnostic și ca fotosensibilizator pentru terapia tumorilor solide.

✚ În cazul complexului Zn(II)1.3, datele obținute prin testul reducerii MTS, referitoare la numărul de celule metabolice active în cultura, sunt confirmate de datele experimentale obținute prin testul eliberării LDH care oferă informații privind integritatea membranei plasmatică.

✚ Zn(II)1.3 nu afectează semnificativ eliberarea LDH de către celulele tumorale de adenocarcinom de colon din linia HT-29 și de către fibroblaștii normali de șoarece din linia L929 și astfel se confirmă biocompatibilitatea complexului în raport cu tipul de celule testate.

CONCLUZII GENERALE

Teza de doctorat *“Cercetări interdisciplinare asupra unor compuși cu structuri macrociclice cu potențiale aplicații în diagnoza și terapia antitumorală”*, descrie în prima parte proprietățile generale ale compușilor tetrapirolici și evaluarea teoretică privind aplicațiile lor biomedicale cumulat cu evidențierea aspectelor chimice, farmaceutice și biologice privind fotosensibilizatorii porfirinici.

Datele bibliografice referitoare la proprietățile și potențialul biomedical al acestei clase de compuși, sunt completate cu noțiuni referitoare la strategiile actuale privind modificările structurale ce conduc la îmbunătățirea potențialului biomedical al compușilor cu structuri macrociclice.

A doua parte a tezei de doctorat este structurată în patru capitole în care sunt incluse rezultatele obținute în realizarea temei propuse. Sunt prezentate datele experimentale rezultate din evaluarea structurală *in silico* a compușilor macrociclici sintetizați, urmate de descrierea metodelor de sinteză abordate, a proprietăților spectrale cumulat cu rezultate ce evidențiază comportamentul noilor compuși în raport cu diferite linii de celule tumorale.

Rezultatele obținute prin modelarea *in silico* au sugerat stabilitate structurală pentru compușii evaluați, au permis identificarea zonelor susceptibile atacului electrofil sau nucleofil al unor biomolecule asupra structurilor tetrapirolice și au definit parametrii asociați polarității moleculelor.

În capitolul 2 al lucrării sunt descrise metodele aplicate pentru obținerea noilor compuși și rezultatele evaluării structurale și spectrale a compușilor nou sintetizați.

Liganzii și combinațiile complexe corespunzătoare cu ionii metalici Zn(II) și Cu(II) au fost obținuți prin metode actualizate de sinteză, în condiții ecologice, cu posibilitatea monitorizării reacțiilor prin tehnici simple de laborator. Metodele abordate în această etapă au permis obținerea unor randamente optime în raport cu compușii de interes și posibilitatea realizării pe viitor a unor protocoale de transfer de tehnologie către laboratoare micropilot cu specific în sinteza substanțelor active antitumorale.

Procedeul aplicat în obținerea compusului 5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetifenil)porfirina a fost publicat în descrierea tehnica a brevetului de invenție, *„Compus tetrapirolic cu aplicații în teranostica și procedeu de obținere a acestuia”* (Brevet nr. 131946/2019), brevet la care sunt coautor împreună cu membrii colectivului de cercetare din care am făcut parte pe durata desfășurării studiilor doctorale.

Procedeele de separare și purificare a compușilor de tip ligand sau combinație complexă au fost alese în scopul utilizării unor cantități reduse de solvent și pentru a asigura o eficiență optimă în separarea produșilor utili. După purificarea prin cromatografie pe coloană, respectiv cromatografie în strat subțire, evaluarea structurală și spectrală a compușilor obținuți, s-a realizat prin analiza elementală, analiza spectrală RMN, FT-IR, UV-Vis și evaluarea profilului fluorescent al acestora. Rezultatele analizei spectrale UV-Vis, corelate cu datele RMN și FT-IR au confirmat formarea în reacțiile de sinteză a compușilor macrociclici de tip porfirinic. Studiile prin analiză spectrală UV-Vis au fost realizate în soluții obținute prin dizolvarea compușilor în diverși solvenți (diclormetan, dimetilsulfoxid, etanol, polietilenglicol 200), cu scopul evaluării comportamentului spectral în medii cu polarități diferite. Alegerea solvenților a fost făcută ținând cont de faptul că etanolul și PEG 200 se numără printre cei mai utilizați solvenți în formularea farmaceutică; PEG 200 a fost folosit ca solvent și pentru evaluarea *in vitro* la nivel celular a noilor porfirine. Pentru concentrațiile utilizate, profilul spectrelor de absorbție moleculară ale compușilor nou sintetizați, au demonstrat absența fenomenelor de asociere moleculară. Rezultatele experimentale au confirmat pentru liganzii porfirinici P1.3 și P2.2, structura tetrapirolică de tip porfirina și absorbții în domeniul fototerapeutic (banda spectrală la ~630 nm), relevant pentru terapia antitumorală prin efect fotodinamic. Solvenții au manifestat o influență slabă asupra profilului spectral al compușilor investigați, cu mici modificări în poziționarea maximelor de absorbție, modificări care permit utilizarea polietilenglicol 200 în procedeele de formulare ce vor fi aplicate porfirinelor de sinteză.

O altă etapă a cercetărilor experimentale în realizarea tezei de doctorat a urmărit evaluarea profilului fluorescent al noilor compuși cu determinarea parametrilor ce îl descriu, și anume randamentul de fluorescență, timpul de viață al fluorescenței și randamentul cuantic de generare a oxigenului singlet. Determinările experimentale au fost realizate în laboratorul de cercetare al Centrului de Chimie Fizică Moleculară, Universitatea din Lisabona, sub coordonarea Prof. Dr. Luise Filipe Vieira Ferreira. Rezultatele experimentale obținute au demonstrat proprietăți fluorescente bune pentru compușii P2.2, P1.3, Zn(II)2.2 și Zn(II)1.3 și capacitatea acestora de a genera specii reactive oxigen singlet Φ_{Δ} . Cu excepția complexului Cu(II)2.2, valorile obținute pentru parametrii de fluorescență, se încadrează în valorile impuse unui fotosensibilizator și permit atribuirea compușilor investigați a calității de candidați pentru diagnoza și terapia formațiunilor tumorale.

Evaluarea comportamentului biofizic la nivel membranar al compușilor nou sintetizați a fost realizată în prezența sondei fluorescente DiBAC₄(3), utilizând celule tumorale de tip L929 și timpi de expunere de 20 minute. Rezultatele experimentale au evidențiat un efect de depolarizare membranară sub influența compușilor testați, efect dependent de doza de compus porfirinic. La concentrații mici compușii testați au un efect de ușoară hiperpolarizare asupra membranei, efect care se diminuează cu creșterea concentrației. Modelul dezvoltat, prin experimentele prezentate în capitolul 3 al lucrării și stabilirea unei corelații între concentrația compusului activ și efectul asupra membranei celulare, reprezintă un protocol eficient în determinările ulterioare ce vizează dezvoltarea porfirinelor ca agenți teranostici.

În capitolele 4 și 5 ale tezei de doctorat, sunt prezentate rezultatele obținute la evaluarea *in vitro* la nivel celular a compușilor sintetizați, evaluare realizată utilizând linii de celule umane de adenocarcinom de colon HT-29, fibroblaști de șoarece din linia L929, celule primare mononucleare (PBMC) izolate din sânge periferic și celulele monocitare umane SC.

Determinările experimentale au fost efectuate în relație cu concentrația în compus porfirinic și timpul de acțiune, prin monitorizarea gradului de încorporare celulară a structurilor tetrapirolice, a viabilității și multiplicării celulare, a integrității membranare (moartea celulară), a gradului de apoptoză și necroză celulară. Alegerea solventului a fost justificată de faptul că PEG 200 este unul dintre solvenții des utilizați în formularea farmaceutică, nu favorizează fenomenele de asociere moleculară și limitează absorbția nanostructurilor de către fagocitele sanguine, crescând astfel biodisponibilitatea acestora. Pentru o evaluare corectă au fost realizate și investigații privind biocompatibilitatea solventului PEG 200 la diluții mai mari de 1/500.

Influența asimetriei moleculare asupra gradului de localizare la nivel celular a fost evaluată pentru soluții în PEG 200 ale compușilor P2.2 și Zn(II)2.2, pe un domeniu de concentrații 0–10 μM. Ținând cont de faptul că fotosensibilizatorii sunt mai rapid eliminați din sânge decât din tumori și țesuturi timpul de incubare a fost de 24 ore pentru celulele PBMC și 48 de ore pentru celule tumorale umane de adenocarcinom de colon HT-29 și fibroblaști normali de șoarece din linia L929. Rezultatele determinărilor la nivel celular au evidențiat pentru compusul P2.2 un grad de încorporare maxim în celule umane de adenocarcinom de colon HT-29, urmate de celulele L929 și celulele primare mononucleare (PBMC).

Încorporarea celulară a Zn(II)2.2 a fost monitorizată prin măsurători de fluorescență și s-a constatat un grad de internalizare celulară mai scăzut comparativ cu ligandul P2.2. În cazul ligandului, pentru o concentrație de 10 μM, rezultatele obținute prin imagini de microscopie electronică au relevat o distribuție a acestuia în citosolul celulelor tumorale HT-29, cel mai probabil lângă membrana plasmatică.

Prin evaluare *in vitro* la nivel celular s-a demonstrat că ligandul P2.2 nu afectează viabilitatea și/sau proliferarea celulelor tumorale sau normale investigate și poate fi considerat candidat promițător pentru dezvoltarea lui ca fotosensibilizator destinat terapiei fotodinamice a cancerului; inhibarea metabolică a celulelor mononucleare din sânge (PBMC) impune utilizarea unor concentrații de compus <10 μM. Pentru compusul cu structura simetrică P2.1, testele *in vitro* au evidențiat unele efecte citotoxice prin inducerea unei apoptoze moderate a celulelor, dar nu a necrozei. Structurile porfirinice complexe Zn(II)2.2 și Cu(II)2.2 au obținut la evaluarea *in vitro* un profil citotoxic mai puțin convenabil aplicării lor în PDT, comparativ cu P2.2, aplicarea Zn(II)2.2 în terapia antitumorală (PDT) fiind limitată de efectele sale toxice manifestate (pentru concentrații 20 μM), asupra metabolismului/viabilității celulelor de tip PBMC. Concluziile privind comportarea la nivel celular a complexului Cu(II)2.2 sunt rezumate la existența efectelor toxice exercitate asupra celulelor sanguine PBMC, pentru concentrații 10–20 μM, atât prin scăderea viabilității/metabolismului celulelor PBMC, dar și prin inhibarea activității LDH. Din acest motiv complexul porfirinic Cu(II)2.2 nu poate fi considerat ca potențial agent teranostic în cancer.

Pentru o evaluare comparativă privind efectul asupra funcționalității celulare a gradului de asimetrie structurală corelat cu polaritatea moleculei, studiile *in vitro* asupra compușilor P1.3 și Zn(II)1.3 s-au realizat utilizând celule tumorale din linia umană de adenocarcinom de colon HT-29 și celule normale din linia fibroblaștilor de șoarece L929. Protocolul experimental a fost similar celui aplicat compușilor seriei P2.2 iar rezultatele au evidențiat pentru ligandul P1.3 lipsa citotoxicității în condiții de întuneric, ceea ce îl recomandă pentru dezvoltare ulterioară ca agent fluorescent în scop diagnostic și ca fotosensibilizator pentru terapia tumorilor solide. În cazul complexului Zn(II)1.3 rezultatele au confirmat o biocompatibilitate bună în raport cu tipul de celule testate.

BIBLIOGRAFIE

1. Adler, A. D.; Longo, F. R.; Finarelli, J. D.; Goldmacher, J.; Assour J.; Korsakoff, L. A simplified synthesis for mesotetraphenylporphine, *J. Org. Chem.*, 1967, 32, 476–490.
2. Agostinis P., Berg K., Cengel K. A., Foster T. H., Girotti A. W., Gollnick S. O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson B.C., Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J. Clin.*, 2011, 61, 250–281.
3. Allison R., Moghissi K., Downie G., Dixon K., Photodynamic therapy (PDT) for lung cancer, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 2011, 8, 231–239.
4. Allison R. R., Mota H. C., Sibata C. H., Clinical PD/PDT in North America: an historical review, *Photodiagnosis Photodynamic Ther.*, 2004, 1, 263–277.
5. Armstrong D., Stratton R. D., *Oxidative Stress and Antioxidant Protection: The Science of Free Radical Biology and Disease*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons. 2016, 27, 415–470.
6. Banerjee S. M., Mac Robert A. J., Mosse C. A., Periera B., Bown S.G., Keshtgar M.R.S., Photodynamic therapy: inception to application in breast cancer, *Breast*, 2017, 31, 105–113.
7. Battersby A. R., Fookes C. J., Matcham G. W., Mc Donald E., Biosynthesis of the pigments of life: formation of the macrocycle, *Nature*, 1980, 285, 17–21.
8. Berg K., Madslien K., Bommer J. C., Oftebro R., Winkelman J. W., Moan J., Light induced relocalization of sulfonated meso-tetraphenylporphines in NHIK 3025 cells and effects of dose fractionation, *Photochem. Photobiol.*, 1991, 53, 203–210.
9. Berridge M. V., Tan A. S., Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1993, 303, 474–482.
10. Boscencu R., Manda G., Socoteanu R. P., Hinescu M. E., **Radulea N.**, Neagoe I., Vieira Ferreira L. F., Compus tetrapirolic cu aplicații in teranostica si procedeu de obținere a acestuia, Brevet nr. 131946/ 2019.
11. Boscencu R., Manda G., **Radulea N.**, Socoteanu R. P., Ceafalan L. C., Neagoe I. V., Machado I. F., Basaga S. H., Vieira Ferreira L. F., Studies on the synthesis, photophysical and biological evaluation of some unsymmetrical meso-tetrasubstituted phenyl porphyrins, *Molecules*, 2017, 22, 1815.
12. Boscencu R., Microwave synthesis under solvent-free conditions and spectral studies of some mesoporphyrinic complexes, *Molecules*, 2012, 17, 5592–5603.
13. Boscencu R., Unsymmetrical Mesoporphyrinic Complexes of Copper (II) and Zinc (II). Microwave-Assisted Synthesis, Spectral Characterization and Cytotoxicity Evaluation. *Molecules*, 2011, 16, 5604–5617.
14. Boscencu R., Ilie M., Socoteanu R. P., Oliveira A. S., Constantin C., Neagu M., Manda G., Vieira Ferreira L. F., Microwave Synthesis, Basic Spectral and Biological Evaluation of Some Copper (II) Mesoporphyrinic Complexes. *Molecules* 2010, 15, 3731–3743.
15. Boyum A., Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21, 1968, Suppl 97 (Paper IV), 77–89.

16. Branco T. J. F., Botelho do Rego A. M., Ferreira Machado I., Vieira Ferreira L. F., A luminescence lifetime distributions analysis in heterogeneous systems by the use of Excel's Solver., *J. Phys. Chem. B*, 2005, 109, 15958–15967.
17. Broughton L. J., Giuntini F., Savoie H., Bryden F., Boyle R.W., Maraveyas A., Madden L. A., Duramycin-porphyrin conjugates for targeting of tumour cells using photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol., B*, 2016, 163, 374–384.
18. Chan, F. K. M.; Moriwaki K., De Rosa M. J., Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity. *Methods Mol. Biol.*, 2013, 979, 65–70.
19. Cheng W. C., Leach K. M., Hardwick J. M., *Biochim. Biophys. Acta.*, 2008, 1783(7), 1272-1279.
20. Clark P. A., Alahmad A. J., Qian T., Zhang, R. R., Wilson H. K., Weichert J. P., Palecek S. P., Kuo J. S., Shusta E. V., Analysis of Cancer-targeting Alkylphosphocholine Analog Permeability Characteristics Using A Human Induced Pluripotent Stem Cell Blood-Brain Barrier Model. *Mol. Pharmaceutics*, 2016, 13, 3341–3349.
21. Cui L., Lin Q., Jin C. S., Jiang W., Huang H., Ding L., Muhanna N., Irish J. C., Wang F., Chen J., Zheng G., A PEGylation-free biomimetic porphyrin nanoplatform for personalized cancer theranostics, *ACS Nano.*, 2015, 9, 4484–4495.
22. Dabrowski J. M., Pucelik B., Regiel-Futyr A., Brindell M., Mazuryk O., Kyzioł A., Arnaut L. G., Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers., *Coord. Chem. Rev.*, 2016, 325, 67–101.
23. Decreau R., Richard M. J., Verrando P., Chanon M., Photodynamic activities of silicon phthalocyanines against achromic M6 mela-noma cells and healthy human melanocytes and keratinocytes, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 1999, 48, 48-56.
24. Detre C., Kiss E., Varga Z., Ludányi K., Pászty K., Enyedi d Á, Kövesdi D., Panyi G., Rajnavölgyi É., Matkó J., Death or survival: Membrane ceramide controls the fate and activation of antigen-specific T-cells depending on signal strength and duration, *Cellular Signalling*, 2006, 18, 294– 306.
25. Dolmans D. E., Fukumura D., Jain R. K., Photodynamic therapy for cancer, *Nat. Rev. Cancer*, 2003, 3, 380-387.
26. Dror S. B., Bronshtein I., Garini Y., O'neal W. G., Jacobi P. A., Ehrenberg, B, The localization and photosensitization of modified chlorin photosensitizers in artificial membranes, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2009, 8, 354-361.
27. Eaton D. F., Luminescence Spectroscopy. In *Handbook of Photochemistry*, 2nd ed.; CRC Press.: New York, NY, USA, 1989.
28. Ethirajan M., Chen Y., Josi P., Pandey R. K., The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, 40, 340-362.
29. Fakayode O. J., Kruger C. A., Songca S. P., Abrahamse H., Oluwafemi O. S., Photodynamic therapy evaluation of methoxypolyethyleneglycol-thiol-SPIONs-gold-meso-tetrakis(4-hydroxyphenyl)porphyrin conjugate against breast cancer cells., *Mater. Sci. Eng., C*, 2018, 92, 737–744.
30. Ferreira, D. P., Conceição D. S., Calhella R. C., Sousa T., Socoteanu R., Ferreira I.C.F.R., Vieira Ferreira L.F., Porphyrin dye into biopolymeric chitosan films for localized photodynamic therapy of Cancer., *Carbohydr. Polym.*, 2016, 151, 160–171.

31. Ferreira L.F., Ferreira D. P.; Oliveira A. S., Boscencu R., Socoteanu R.; Ilie M., Constantin C., Neagu M., Synthesis, Photophysical and Cytotoxicity Evaluation of A₃B Type Mesoporphyrinic Compounds. *Dyes& Pigment*, 2012, 95, 296–303.
32. Gouterman M., Optical Spectra and Electronic Structure of Porphyrins and Related Rings, In *The Porphyrins*, Dolphin D., Ed. Academic Press: New York, NY, USA, 1978, Volume 3, 11–87.
33. Gouterman M., Wagniere G. H., Snyder L. C., Spectra of porphyrins: Part II. Four orbital model, *J. Mol. Spectrosc.*, 1963, 11, 108–127.
34. Harriman A., Hosie R.J., Luminescence of porphyrins and metalloporphyrins. Fluorescence of substituted tetraphenylporphyrins, *J. Photochem.*, 1981,15, 163-167.
35. Harris J. M., Chess R. B., Effect of pegylation on pharmaceuticals, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2003, 2, 214–221.
36. Hornig, S., Ohmert, I., Trauner, D., Ader, C., Baldus, M., Pongs, O., Tetraphenylporphyrin derivative specifically blocks members of the voltage-gated potassium channel subfamily Kv1, *Channels*, 2013, 7, 473-482.
37. Horváth O.; Valicsek Z.; Fodor M. A., Major M. M., Imran M., Grampp G., Wankmüller A., Visible light-driven photophysics and photochemistry of water-soluble metalloporphyrins. *Coord. Chem. Rev.* 2016, 325, 59–66.
38. Jensen A. A., Bräuner-Osborne H., Pharmacological characterization of human excitatory amino acid transporters EAAT1, EAAT2 and EAAT3 in a fluorescence-based membrane potential assay, *Biochemical Pharmacology*, 2004, 67, 2115–2127.
39. Jori G., Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy, *J. Photochem. Photobiol B: Biol.*, 1996, 36, 87-93.
40. Josefsen L. B., Boyle R. W., Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? *Br. J. Pharmacol.*, 2008, 154, 1–3.
41. Juzeniene A., Peng Q., Moan J., Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2007, 6, 1234–1245.
42. Klapperstück T., Glanz D., Klapperstück M., Wohlrab J., Methodological aspects of measuring absolute values of membrane potential in human cells by flow cytometry, *Cytometry A*, 2009, 75, 593-608.
43. Lapa C., Schreder, M., Schirbel A., Samnick S., Kortüm K. M., Hermann H., Kropf S., Einsele H., Buck A. K., Wester H. J., et al., [68Ga]Penixafor-PET/CT for imaging of chemokine receptor CXCR4 expression in multiple myeloma - Comparison to [18F]FDG and laboratory values, *Theranostics*, 2017, 7, 205–212.
44. Lavi A., Weitman H., Holmes R. T., Smith K. M., Ehrenberg B., The depth of porphyrin in a membrane and the membrane's physical properties affect the photosensitizing efficiency, *Biophys. J.*, 82, 2002, 2101- 2110.
45. Little R.A., Anton J.A., Loach P.A., Ibers J.A., The synthesis of some substituted tetraarylporphyrins. *J. Heter.Chem.*, 1974, 12, 343–349.
46. Mauzerall D., Porphyrins, Chlorophyll, and Photosynthesis. Vol. 5. Berlin, Heidelberg: Springer; 1977. pp. 117–124. DOI: 10.1007/978-3-642–66505-9_5
47. Meshkov I. N., Bulach V., Gorbunova Y. G., Gostev F. E., Nadtochenko V. A., Tsivadze A. Y., Hosseini M. W., Tuning photochemical properties of phosphorus (V) porphyrin photosensitizers, *Chem. Commun.*, 2017, 53, 9918–9921.

48. Milgrom L. R., What porphyrins are and what they do. In *The Colours of Life. An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*, Oxford University Press, Oxford, UK, 1977. Volume 1, pp. 1–85.
49. Mokwena M. G., Kruger C. A., Ivan M., Heidi A., A review of nanoparticle photosensitizer drug delivery uptake systems for photodynamic treatment of lung cancers. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2018, 22, 147–154.
50. Moravec R. A.; Riss T. L.; Niles A. L., Duellman S., Benink H. A., Tracy J., Worzella T. J., Minor L., Cell Viability Assays. In *Assay Guidance Manual* [Internet]; Sittampalam, G.S., Coussens, N.P., Brimacombe, K., Eds.; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda, MD, USA, 2004.
51. Murov S. L., Carmichael I., Hug G. L., *Handbook of Photochemistry*, 2nd ed.; CRC Press: New York, NY, USA, 1989.
52. Myrzakhmetov B., Arnoux P., Acherar S., Vanderesse R., Frochot C., Folic acid conjugates with photosensitizers for cancer targeting in photodynamic therapy: Synthesis and photophysical properties. *Bioorg. Med. Chem.*, 2017, 25, 1–10.
53. Nantes I. L., Crespilho F. N., Mugnol K. C. U., Araujo-Chaves J. C., Luz RAS, Nascimento O. R., Pinto S.M.S., Magnetic Circular Dichroism Applied in the Study of Symmetry and Functional Properties of Porphyrinoids. David S. Rodgers. (Org.). *Circular Dichroism: Theory and Spectroscopy*. 1st ed. New York; Nova Science Publishers. 2010. pp. 321–344
54. Oliveira A. S., Licsandru D., Boscencu R., Socoteanu R., Nacea V., Ferreira L.F., A Singlet Oxygen Photogeneration and Luminescence Study of Unsymmetrically-Substituted Meso-Porphyrinic Compounds., *Int. J. Photoenergy*, 2009, doi:10.1155/2009/413915.
55. Pamp K., Bramey T., Kirsch M., De Groot H., Petrat F., NAD(H) enhances the Cu(II)-mediated inactivation of lactate dehydrogenase by increasing the accessibility of sulfhydryl groups. *Free Radic Res.*, 2005, 39(1), 31-40.
56. Panickar K. S., Jayakumar A. R., Rama Rao K. V., Norenberg M. D., Ammonia-induced activation of p53 in cultured astrocytes: Role in cell swelling and glutamate uptake, *Neurochemistry International*, 2009, 55, 98–105.
57. Parent N., Winstall E., Beauchemin M., Paquet C., Poirier G. G., Bertrand R., Proteomic analysis of enriched lysosomes at early phase of camptothecin-induced apoptosis in human U-937 cells, *J. Proteomics*, 2009, 72, 960-973.
58. Penon O., Marín M. J., Russell D. A., Pérez-García L. Water soluble, multifunctional antibody-porphyrin gold nanoparticles for targeted photodynamic therapy. *J. Colloid Interface Sci.*, 2017, 496, 100–110.
59. Rokitskaya T. I., Firsov A. M., Kotova E. A., Antonenko Y. N., Photodynamic inactivation of gramicidin channels in bilayer lipid membranes: Protective efficacy of singlet oxygen quenchers depends on photosensitizer location, *Biokhim.*, 2015, 80, 745-751.
60. Roy Chowdhury M., Schumannb C., Bhakta-Guhac, D.; Guhac, G. Cancer nanotheranostics: Strategies, promises and impediments, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 84 291–304.
61. Rosenkranz A.A., Jans D.A., Sobolev A.S., Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency, *Immun. Cell Biol.*, 78, 2000, 452-464.

62. Saar K., Lindgren M., Hansen M., Eiríksdóttir E., Jiang Y., Rosenthal-Aizman K., Sassian M., Langel Ü., Cell-penetrating peptides: A comparative membrane toxicity study, *Analytical Biochemistry*, 2005, 345, 55–65.
63. Sandland J., Malatesti N., Boyle R., Porphyrins and related macrocycles: Combining photosensitization with radio- or optical-imaging for next generation theranostic agents, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2018, 23, 281–294.
64. Sandland J. and Boyle R. W., Photosensitizer Antibody–Drug Conjugates: Past, Present, and Future, *Bioconjugate Chem.*, 2019, 30, 975–993.
65. Sessler J. L., Tomat E., Transition-metal complexes of expanded porphyrins, *Acc. Chem. Res.*, 2007, 40, 371–379.
66. Socoteanu R., Manda G., Boscencu R., Vasiliu G., Oliveira A. S., Synthesis, Spectral Analysis and Preliminary in Vitro Evaluation of Some Tetrapyrrolic Complexes with 3d Metal Ions, *Molecules*, 2015, 20, 15488–15499.
67. Stegh A. H. Toward personalized cancer nanomedicine – past, present, and future, *Integr. Biol.* 2012, 5, 48–65.
68. Strauss W. S., Gschwend M. H., Sailer R., Schneckenburger H., Steiner R., Ruck A., Intracellular fluorescence behaviour of meso-tetra(4-sulphonatophenyl)porphyrin during photodynamic treatment at various growth phases of cultured cells, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 1995, 28, 155–161.
69. Strickler S. J., Berg R. A., Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules, *J.Chem.Phys.*, 1962, 37, 814–822.
70. Szeimies R.M., Karrer S., Abels C., 9-Acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(beta-methoxyethyl)-porphycene (ATMPn), a novel photosensitizer for photodynamic therapy: uptake kinetics and intracellular localization, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 1996, 34, 67–72.
71. Van Straten Demian, Mashayekhi Vida, Henriette S. de Bruijn , Oliveira Sabrina, Dominic J. Robinson, *Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions, Cancers*, 2017, 9, 19, 1–54.
72. Vasiliu G.; Boscencu R.; Socoteanu R.; Nacea V., Complex combinations of some transition metals with new unsymmetrical porphyrins. *Rev. Chim.*, 2014, 65, 998–1001.
73. Vieira Ferreira L.F.; Ferreira Machado I.L. Surface photochemistry: Organic molecules within nanocavities of calixarenes. *Curr. Drug Discov. Technol.*, 2007, 4, 229–245.
74. Wilkinson, F. Triplet quantum yields and singlet-triplet intersystem crossing. In *Organic Molecular Photophysics*; Birks, J.B., Ed.; John Wiley and Sons: London, UK, 1985.
75. Yan G., Li Z., Xu W., Zhou C., Yang L., Zhang Q., Li L., Liu F., Han L., Ge Y., et al. Porphyrin-containing polyaspartamide gadolinium complexes as potential magnetic resonance imaging contrast agents. *Int. J. Pharm.*, 2011, 407, 119–125.
76. Yoon I., Li J.Z., Shim Y.K., Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy, *Clin. Endosc.*, 2013, 46, 7–23.
77. Zhang R. R., Swanson K. I., Hall L. T., Weichert J. P., Kuo J. S., Diapleutic cancer-targeting alkylphosphocholine analogs may advance management of brain malignancies. *CNS Oncol.*, 2016, 5, 223–231.

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

Articole in extenso publicate in reviste indexate I SI

1. *Studies on the synthesis, photophysical and biological evaluation of some unsymmetrical meso-tetrasubstituted phenyl porphyrins*, R. Boscencu, G. Manda, **N. Radulea***, R. P. Socoteanu, L. C. Ceafalan, I. V. Neagoe, I. F. Machado, S. H. Basaga, L. F. V. Ferreira, *Molecules*, 22, 1815, <https://doi.org/10.3390/molecules22111815>, **2017, (I.F.=3,098)**.
2. *New A₃B porphyrins as potențial candidates for theranostic. Synthesis and photochemical behaviour*, R. Boscencu, R. P. Socoteanu, G. Manda, **N. Radulea**, M. Anastasescu, A. Gama, I. Ferreira Machado, L. F. Vieira Ferreira, *Dyes and Pigments*, 160, 410-417, <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.08.028>, **2019, (I.F.= 4,08)**.
3. *The effect of some amphiphilic porphyrins on the transmembrane potențial of cultured L929 cells*, **N. Radulea**, R. Boscencu, R. Socoteanu, G. Manda, I. V. Neagoe, *Revista de Chimie*, 70, 4, 1288-1292, <http://www.revistadechimie.ro/>, **2019, (I.F.= 1,605)**.

Brevet

Compus tetrapirolic cu aplicații in teranostica si procedeu de obținere a acestuia, **Brevet nr. 131946/2019**; autori: R. Boscencu, G. Manda, R. P. Socoteanu, M. E. Hinescu, **N. Radulea**, I. Neagoe, L. F. Vieira Ferreira

Lucrari comunicate la manifestari stiintifice internationale

1. *Eco-friendly features in long-chain studies for pharmaceutical tetrapyrroles formulation targeting efficient drug delivery*, R. Socoteanu, R. Boscencu, M. Anastasescu, **N. Radulea**, I. Ferreira Machado, L.F. Vieira Ferreira, 9th world Congress on Green Chemistry and Technology, Amsterdam, The Netherlands, **17-19 September 2018**; abstract in *Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 5, 80, doi 10.4172/2380-2391-C2-006, ISSN: 2380-2391, 2018.

Contract de cercetare

Advanced theranostic approach in cancer combining photodynamic therapy and nanoparticles, proiect international ERA.NET - HORIZON 2020, cu perioada de desfasurare 2016–2019; membru in colectivul de cercetare al proiectului.

(<https://umfcd.ro/cercetare-si-dezvoltare/proiecte/proiecte-internationale/proiect-nanother/>)

Premii obținute

❖ Premii UEFSCIDI acordate în cadrul programului "Premierea rezultatelor cercetării – Articole", Subprogramul 1.1., pentru articolele științifice:

✚ *Studies on the synthesis, photophysical and biological evaluation of some unsymmetrical meso-tetrasubstituted phenyl porphyrins*", *Molecules*, 22, 1815, doi:10.3390/molecules22111815, **2017**, autori: R. Boscencu, G. Manda, **N. Radulea**, R. P. Socoteanu, L. C. Ceafalan, I. V. Neagoe, I. F. Machado, S. H. Basaga, L. F. V. Ferreira.

✚ *New A₃B porphyrins as potențial candidates for theranostic. Synthesis and photochemical behaviour*, *Dyes and Pigments*, 160, 410-417, <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.08.028>, **2019**, autori: R. Boscencu, R. P. Socoteanu, G. Manda, **N. Radulea**, M. Anastasescu, A. Gama, I. Ferreira Machado, L. F. Vieira Ferreira.

❖ Premiul UEFSCIDI acordate în cadrul programului "Premierea rezultatelor cercetării – brevete de invenție", Subprogramul 1.1., pentru invenția:

✚ *Compus tetrapirolic cu aplicații în teranostica și procedeu de obținere a acestuia*, **Brevet nr. 131946/2019**; autori: R. Boscencu, G. Manda, R. P. Socoteanu, M. E. Hinescu, **N. Radulea**, I. Neagoe, L. F. Vieira Ferreira