

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



**Sulfonované azaftalocyany - syntéza a hodnocení jejich
fotodynamické aktivity**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Alena Jančárová



školitel: doc. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.

Hradec Králové, 2018

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá na získanie iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové dňa

.....

Chcem poďakovať svojmu školiteľovi doc. PharmDr. Petrovi Zimčíkovi, Ph.D. za odborné vedenie, cenné rady a pomoc pri vypracovaní tejto diplomovej práce, RNDr. Miloslavovi Macháčkovi, Ph.D. za pomoc pri testoch na bunkách a tiež Mgr. Janovi Kollárovi za spoluprácu v laboratóriu a usmernenie pri písaní tejto práce. Ďakujem za finančnú podporu projektu Špecifického vysokoškolského výzkumu (SVV 260 401) a Grantovej agentúre Univerzity Karlovy (projekt číslo 1060216).

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Autor: **Alena Jančárová**

Školiteľ: **doc. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.**

Konzultant: **RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.**

Názov diplomovej práce: **Sulfonované azaftalocyaniny - syntéza a hodnocení jejich fotodynamické aktivity**

Fotodynamická terapia je jednou z metód používaných na zničenie nežiaducich buniek. Kombinuje tri v zásade netoxické zložky: svetlo, kyslík a fotosenzitizér. Azaftalocyaníny (AzaPc) sú nádejné zlúčeniny s fotosenzitívnymi vlastnosťami. Ich hlavnou nevýhodou je nízka rozpustnosť vo vode a značná agregácia, ktorá znižuje ich fotodynamickú aktivitu.

Cieľom tejto práce bolo nasyntetizovať anionický derivát AzaPc substituovaný sulfónovými skupinami na periférii a charakterizovaný dobrou rozpustnosťou vo vode a otestovať jeho fotodynamické vlastnosti.

Prvým krokom syntézy bola kondenzácia diaminomaleonitrilu s benzilom za vzniku 5,6-difenylpyrazín-2,3-dikarbonitrilu. Následne prebehla cyklotetramerizácia s octanom zinočnatým za použitia 2-dimetylaminoetanolu ako rozpúšťadla. Výsledný produkt bol získaný sulfonáciou kyselinou chlórsulfónovou, po ktorej nasledovala hydrolýza hydrogenuhličitanom sodným. Produkt zelenej farby bol potom prečistený gélovou chromatografiou s využitím stacionárnej fázy Superdex®. Nasyntetizovaná zlúčenina je rozpustná vo vode, ale na základe absorpčných spektier je čiastočne agregovaná.

Testy na fotodynamickú aktivitu boli vykonané na HeLa bunkách s použitím bezsérového média (fototoxicita $EC_{50} = 0,938 \pm 0,388 \mu\text{M}$, toxicita v tme $TC_{50} > 1000 \mu\text{M}$). Látka bola v médiu obsahujúcom sérum prakticky neaktívna kvôli silnej väzbe na plazmatické bielkoviny.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Author: **Alena Jančárová**

Supervisor: **doc. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.**

Co-supervisor: **RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.**

Title of diploma thesis: **Sulfonated azaphthalocyanines – synthesis and evaluation of their photodynamic activity**

Photodynamic therapy is one of the methods used for destruction of undesirable cells. It combines three essentially nontoxic components: light, oxygen and a photosensitizer. Azaphthalocyanines (AzaPcs) are promising compounds with photosensitizing properties. However, their major disadvantage is their low water solubility and significant aggregation that decreases their photodynamic activity.

The aim of this work was to synthesize an anionic derivative of AzaPc substituted with sulfonic groups on periphery characterized by good solubility in water and to evaluate its photodynamic properties.

The first step in the synthesis was condensation of diaminomaleonitrile with benzil giving 5,6-diphenylpyrazine-2,3-dicarbonitrile. Subsequently, the cyclotetramerisation with zinc acetate in 2-dimethylaminoethanol as a solvent was performed. The final product was obtained by sulfonation with chlorosulfonic acid followed by hydrolysis with sodium hydrogen carbonate. The green colored product was then purified by gel chromatography using Superdex® as stationary phase. Synthesized AzaPc is soluble in water but according to absorption spectra it is partially aggregated.

The tests for photodynamic activity were performed on HeLa cells using serum-free medium (phototoxicity $EC_{50} = 0.938 \pm 0.388 \mu\text{M}$, dark toxicity $TC_{50} > 1000 \mu\text{M}$). It was practically inactive in serum-containing medium due to its strong binding to plasma proteins.

Obsah

1	Zoznam použitých skratiek.....	8
2	Cieľ práce.....	9
3	Teoretická časť	10
3.1	Úvod.....	10
3.2	História PDT.....	10
3.3	Priebeh PDT	11
3.4	Mechanizmus účinku.....	13
3.5	Biologická odpoveď na PDT.....	14
3.6	Fotosenzitizéry	16
3.6.1	Základné štruktúrne typy PS	17
3.6.2	Delenie PS do generácií.....	19
3.6.3	Prehľad niektorých najvýznamnejších PS v klinickej praxi	20
4	Experimentálna časť	28
4.1	Vybavenie pre syntetickú časť	28
4.2	Syntéza 5,6-difenylypyrazín-2,3-dikarbonitrilu (1).....	29
4.3	Syntéza 2,3,9,10,16,17,23,24-oktafenyltetrapyrazinoporfyrazináto zinočnatého komplexu (2).....	30
4.4	Syntéza sodnej soli 2,3,9,10,16,17,23,24- oktakis(sulfonátofenyl)tetrapyrazinoporfyrazináto zinočnatého komplexu (3).....	31
4.5	Vybavenie pre prácu s bunkovou líniou	33
4.6	Príprava bunkovej línie HeLa na testovanie	35
4.6.1	Pasážovanie	35
4.6.2	Stanovenie počtu životaschopných buniek.....	36
4.7	Fotodynamická aktivita.....	36
4.7.1	Nasadzovanie buniek na experimenty.....	36
4.7.2	Stanovenie fototoxicity.....	37
4.7.3	Stanovenie toxicity v tme.....	37
4.7.4	Vyhodnotenie cytotoxicitných experimentov	38
4.8	Fotografická dokumentácia	39
4.8.1	Subcelulárna lokalizácia	39

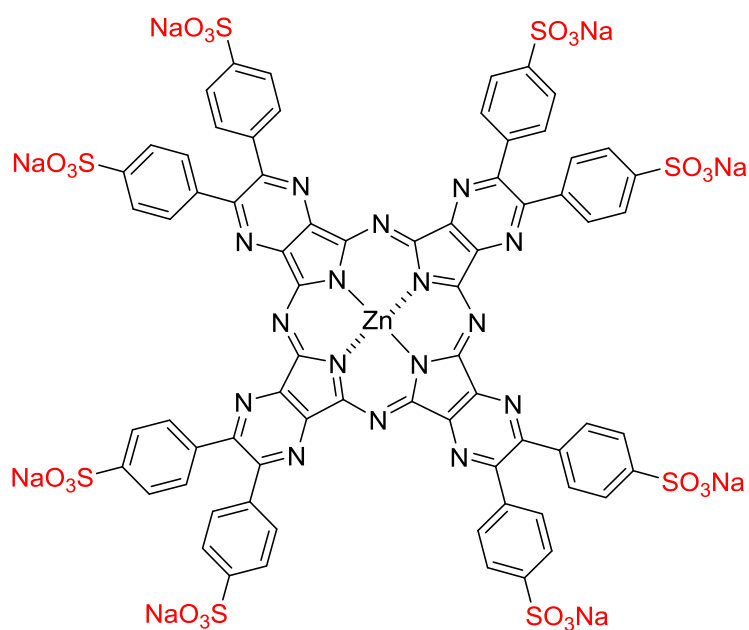
4.8.2	Morfologické zmeny.....	39
4.9	Meranie závislosti fotofyzikálnych vlastností na zmene pH.....	40
4.10	Meranie závislosti fotofyzikálnych vlastností na väzbe na hovädzí albumín	40
5	Výsledky a diskusia.....	41
5.1	Syntéza.....	41
5.2	UV/VIS spektrá	43
5.3	Fotofyzikálne vlastnosti	44
5.4	Fotodynamická aktivita.....	45
5.4.1	Fototoxicita	46
5.4.2	Toxicita v tme	47
5.5	Pozorovanie subcelulárnej lokalizácie a morfológických zmien po ožiarení.....	48
5.6	Vplyv pH.....	50
5.7	Vplyv bielkovín	51
6	Záver.....	54
7	Zoznam citovanej literatúry	55

1 Zoznam použitých skratiek

$^1\text{O}_2$	singletový kyslík
ALA	kyselina 5-aminolevulová
AzaPc	azaftalocyanín
BSA	hovädzí albumín (bovine serum albumin)
DMAE	2-(dimetylamino)etanol
EC ₅₀	stredná efektívna koncentrácia
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
FBS	fetálne bovinné sérum (fetal bovine serum)
FDA	Úrad pre kontrolu potravín a liečiv (Food and Drug Administration)
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazínetsulfónová
Hp	hematoporfyrín
HpD	hematoporfyrínový derivát
NR	neutrálna červeň (neutral red)
NRU	neutral red uptake assay (test vychytávania neutrálnej červene)
PBS	fosfátový pufer (phosphate-buffered saline)
PDT	fotodynamická terapia
PS	fotosenzitizér
ROS	reaktívne formy kyslíka (reactive oxygen species)
SCM	médium so sérom (serum-containing cell culture medium)
SFM	bezsérové médium (serum-free medium)
TC ₅₀	stredná toxická koncentrácia
THF	tetrahydrofurán
TPyzPz	tetrapyrazinoporfyrázín

2 Cieľ práce

- syntéza anionického derivátu AzaPc s centrálne viazaným zinočnatým kationom a s 8 sulfónovými skupinami na periférii s potenciálnym využitím ako fotosenzitizér vo fotodynamickej terapii (Obr. 1)
- hodnotenie fotodynamickej aktivity syntetizovanej zlúčeniny *in vitro* (stanovenie fototoxicity a toxicity v tme)
- určenie subcelulárnej lokalizácie daného fotosenzitizéru
- štúdium jeho fotofyzikálnych vlastností



Obrázok 1 Štruktúra zlúčeniny syntetizovanej a testovanej v rámci tejto diplomovej práce

3 Teoretická časť

3.1 Úvod

Tetrapyrazinoporfyráziny (TPyzPz) sú najviac študovanou skupinou azaftalocyanínov (AzaPc). Ich systematické štúdium začalo v šesťdesiatych rokoch minulého storočia a odvtedy záujem o ne stále rastie. Dôvodom sú široké možnosti ich praktického využitia, napríklad ako farbivá v tlačiarenskom atramente a toneroch, materiál pre rôzne elektronické prístroje, komponenty elektroluminiscenčných a elektrochemických zariadení, zhášače fluorescence a mnohé iné. Z hľadiska tejto diplomovej práce je najdôležitejšia ich ďalšia možnosť využitia a to ako fotosenzitizéry vo fotodynamickej terapii.¹

Fotodynamická terapia (PDT) je elegantná, minimálne invazívna a vysoko selektívna metóda odstraňovania nežiaducich tkanív využívajúca tri základné zložky - kyslík, svetlo a fotosenzitizér (PS), ktoré sú samy osebe netoxické, no spolu vedú k tvorbe cytotoxického singletového kyslíka (1O_2). Pôvodne bola PDT využívaná iba na odstraňovanie nádorov, no neskôr sa jej využitie rozšírilo aj do mnohých ďalších oblastí ako sú dermatológia, kozmetika, oftalmológia, stomatológia, kardiológia či antiinfekčná terapia.^{2,3}

3.2 História PDT

Prvé zmienky o využívaní slnečného svetla pri terapii (tzv. helioterapia) pochádzajú zo starovekého Egypta, Indie, Číny a neskôr aj Grécka z obdobia pred približne 5000 rokmi. Kombinácia svetla a chemickej látky začala byť využívaná až o 2000 rokov neskôr a to na repigmentáciu vitiliga s využitím psoralénu.

V roku 1900 nemecký študent medicíny Oscar Raab pozoroval smrť nálevníkov v prítomnosti akridínovej oranže, ktoré boli vystavené intenzívnemu svetlu počas búrky. Neskôr dokázal, že tento účinok je oveľa silnejší ako účinok samotného akridínu alebo svetla alebo akridínu vystaveného svetlu a následne

pridaného k nálevníkom. Tiež postuloval, že pri tom dochádza k premene svetelnej energie na chemickú.

O niekoľko rokov neskôr von Tappeiner spolu s dermatológom Jesionekom použili kombináciu topicky podaného eozínu a bieleho svetla na liečbu kožných nádorov. Von Tappeiner a Jodlbauer potom dokázali potrebu kyslíka pri tomto procese a v roku 1907 zaviedli pojem „fotodynamická akcia“.

V roku 1913 Meyer-Betz sám na sebe otestoval fotosenzibilizujúce účinky hematoporfyrínu (Hp) a v roku 1924 Policard pozoroval fluorescenciu ožiareného Hp v nádorovom tkanive.

V roku 1955 Schwartz modifikoval štruktúru Hp za vzniku hematoporfyrínového derivátu (HpD), ktorý mal vhodnejšie fototoxické a tumor lokalizujúce vlastnosti, čo dokázal pri testoch na myšiach a v nasledujúcich rokoch to potvrdil aj Lipson testami na ľuďoch. V sedemdesiatych rokoch 20. storočia Dougherty preukázal klinickú účinnosť HpD po ožiarení červeným svetlom pri terapii rôznych typov maligných nádorov.

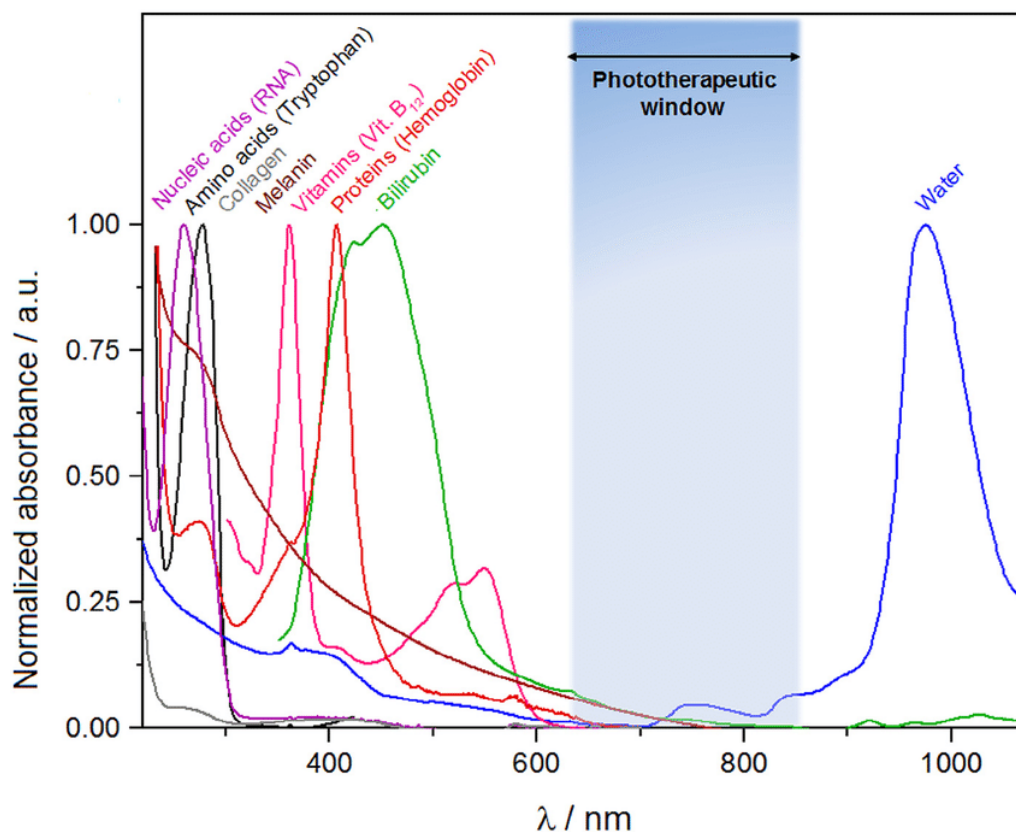
Prvýkrát bola PDT oficiálne schválená v roku 1993 v Kanade a to na liečbu nádora močového mechúra s využitím dôkladnejšie prečisteného a lepšie charakterizovaného HpD s názvom porfimér sodný pod komerčným názvom Photofrin®. Odvtedy celosvetový záujem o PDT stále rastie a vyvíjajú sa nové PS s vylepšenými vlastnosťami.^{4,5}

3.3 Priebeh PDT

PDT je metóda navodenia bunkovej smrti s uplatnením najmä v onkológii. Zvyčajne prebieha ako dvojkroková procedúra. Prvým krokom je intravenózne alebo lokálne podanie PS, ktorý sa po aplikácii hromadí v poškodenom (nádorovom) tkanive. Po určitom časovom intervale, ktorý závisí od vlastností PS, nasleduje druhý krok a to ožiarenie cieľového tkaniva svetlom vhodnej intenzity a vlnovej dĺžky (zodpovedajúcej absorpcii PS), čím dochádza k aktivácii PS a navodeniu cytotoxickej fotodynamickej reakcie. Tým je docielená až dvojitá selektivita PDT, nízka systémová toxicita a minimum nežiaducich účinkov.^{2,6,7}

V súčasnosti nie je celkom objasnené, ako a prečo sa PS kumuluje prednostne v nádorovom tkanive, avšak na základe doterajších poznatkov je uptake PS do cieľového tkaniva kombináciou viacerých faktorov a môže sa u jednotlivých PS odlišovať. Významnú úlohu pritom zohráva transport PS do buniek prostredníctvom lipoproteínových receptorov, ktoré sú na maligných bunkách upregulované kvôli vyššej potrebe živín. K nádorovej selektivitě ďalej prispieva samotné prostredie nádora s množstvom nových ciev s vysokou priepustnosťou a neefektívnym odstraňovaním cudzorodých látok a vedľajších produktov metabolizmu. Zvýšené vychytávanie PS je spôsobené aj fagocytózou makrofágmi v nádorových ložiskách.⁸

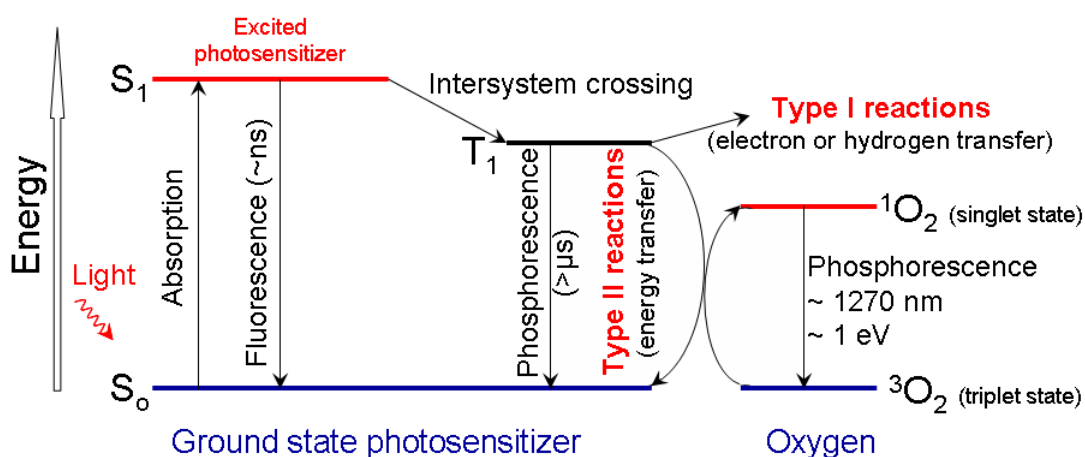
Ožarovanie pri PDT nastáva ideálne v oblasti 650 – 850 nm. Táto časť spektra sa vyznačuje maximálnou penetráciou svetla do tkanív a nazýva sa „fototerapeutické okno“ (Obr. 2). Jeho dolná hranica je daná absorpciou endogénnych chromoforov (hemoglobín, melanín...) a horná hranica minimálnou energiou potrebnou na tvorbu $^1\text{O}_2$ a tiež absorpciou vody.^{9,10}



Obrázok 2 Fototerapeutické okno. Prevzaté z ¹¹

3.4 Mechanizmus účinku

Deje, ktoré môžu prebiehať po ožiarení PS sú zhrnuté v Jablonského diagrame (Obr. 3). PS absorbuje energiu dopadajúceho žiarenia, čím sa dostane zo základného singletového stavu (S_0) do excitovaného singletového stavu (S_1). PS v tomto stave je veľmi nestabilný a nadbytočnú energiu môže uvoľniť vo forme fluorescencie (čo možno s výhodou využiť pri diagnostike¹²), vnútornou konverziou vo forme tepla alebo môže podstúpiť medzisystémový prechod do stabilnejšieho excitovaného tripletového stavu (T_1) s obráteným spinom jedného elektrónu.^{13,14}



Obrázok 3 Jablonského diagram. Prevzaté z ¹³

Je niekoľko možností, ako sa potom môže PS dostať späť do základného stavu a to buď vyžiarovaním energie sprevádzaným fosforescenciou alebo jedným z dvoch typov fotoprocsov:

Fotopoces typu I je preferovaný hlavne pri nedostatku kyslíka v bunke¹² a zahŕňa priamu reakciu tripletového PS s prítomným substrátom, pričom dochádza k prenosu elektrónu alebo odštiepeniu atómu vodíka za tvorby voľných radikálov. Tieto voľné radikály takmer okamžite reagujú s molekulárnym kyslíkom v základnom stave a vedú k tvorbe reaktívnych foriem kyslíka - ROS (napríklad superoxid anión radikál, peroxid vodíka, hydroxylový radikál), ktoré spôsobujú oxidačné poškodenie bunky.^{13,15}

Pri fotoprocese typu II, ktorý je preferovaný, ak je v bunke dostatok kyslíka,¹² dochádza k prenosu energie PS v tripletovom stave na molekulárny kyslík v základnom (tripletovom) stave ($^3\text{O}_2$), pričom dochádza k vzniku singletového kyslíka ($^1\text{O}_2$), ktorý je považovaný za hlavný cytotoxický činiteľ v PDT.^{13,15} Dĺžka života $^1\text{O}_2$ je veľmi krátka a závislá na rozpúšťadle (cca 10 – 320 ns), čo limituje jeho difúziu v bunkách maximálne do vzdialenosti 10 – 55 nm od miesta jeho vzniku, preto fotodynamické poškodenie nastáva v tesnej blízkosti vnútrobunkovej lokalizácie PS.¹³

3.5 Biologická odpoveď na PDT

Odpoveď bunky na PDT môže byť rôzna. Závisí od typu bunky, jej genetického a metabolického potenciálu, od PS a jeho subcelulárnej lokalizácie a celkovej PDT dávky.¹⁶ Môže nastať niektorá z troch typov odpovedí, prípadne ich kombinácia:

a) priama smrť buniek

PDT môže vyvolať priamu smrť bunky tromi cestami – apoptózou, nekrotózou a autofágiou, pričom za hlavnú cestu sa považuje apoptóza.¹³

Apoptóza je vysoko regulovaný proces bunkovej samovraždy kontrolovaný intracelulárnymi aj extracelulárnymi signálmi, pri ktorom dochádza k systematickému rozkladu bunky za tvorby apoptotických teliesok, ktoré sú následne odstránené makrofágmi. Nedochoádza pri tom k úniku vnútrobunkovej hmoty do okolia a teda ani k vyvolaniu zápalu.¹⁶

Nekróza je typ bunkovej smrti, ktorý môže byť stimulovaný rôznymi stresovými faktormi. Hlavnú úlohu v priebehu nekrotickej smrti majú Ca^{2+} a ROS, ktoré vedú k poškodeniu proteínov, lipidov a DNA a následne k poškodeniu organel a narušeniu integrity cytoplazmatickej membrány. Pritom dochádza k vyliatiu obsahu bunky do okolia, čo spolu s uvoľňovaním prezápalových cytokínov vedie k rozvoju zápalového procesu.^{3,12}

Typ bunkovej smrti silne závisí od subcelulárnej lokalizácie PS. U PS lokalizovaných v mitochondriách dochádza k smrti apoptózou (pravdepodobne

kvôli uvoľneniu cytochrómu c do cytoplazmy, kde interaguje s APAF-1 (Apoptosis-activating factor-1) a aktivuje tak apoptotické kaspázy),¹⁶ zatiaľ čo u PS v lyzozómoch môže nastať apoptóza aj nekróza, pričom spôsob smrti závisí od dávky použitého PS.¹² Podmienky ožarovania taktiež vplyvajú na preferovaný spôsob bunkovej smrti. Vysoká intenzita ožarovania prispieva k nekrotickému typu smrti, zatiaľ čo pri dlhšom, ale menej intenzívnom ožarovaní je uprednostňovaná apoptóza.⁸

Tretí spôsob, ako môže dôjsť k priamemu usmrteniu bunky následkom PDT je autofágia. Je to hlavná katabolická cesta v eukaryotickej bunke slúžiaca na degradáciu nevyužívaných a poškodených komponentov, ktorá svojimi recyklačnými mechanizmami prispieva k správne fungovaniu bunky. Primárne je teda autofágia považovaná za cytoprotektívny proces, avšak na základe mnohých *in vitro* štúdií môže PDT navodená autofágia za určitých okolností viesť k bunkovej smrti.¹⁷

b) poškodenie cievneho zásobenia

Ďalším mechanizmom, ktorý prispieva k odumretiu nádorového tkaniva je poškodenie endotelu ciev, ktoré ho zásobujú. To môže vyvolať buď ich konstrikcii vedúcu k hypoxii alebo dilatáciu a zvýšenie priepustnosti, čo vedie k zhoršenému čisteniu od toxických metabolických produktov. Poškodenie cievnej steny tiež aktivuje koagulačnú kaskádu a tvorbu trombu, čo vo výsledku bráni dodávke krvi do príslušného tkaniva.

V prípade rýchleho navodenia hypoxie v nádorovom tkanive, môže jej následkom dôjsť k priamemu odumretiu tkaniva, zatiaľ čo pomalé navodenie hypoxie môže mať na nádorové bunky paradoxne ochranný vplyv a môže im umožniť prežiť PDT, keďže znížené množstvo kyslíka bunkách povedie k zníženej tvorbe cytotoxického $^1\text{O}_2$.⁸

Spôsob, akým dôjde k zničeniu nádora, je ovplyvnený použitým PS - niektoré sa preferenčne hromadia v tkanive, iné zostávajú v cievnom zásobení.¹⁸ Významný vplyv má však aj interval medzi podaním PS a jeho aktiváciou svetlom. Ak je tento interval krátky, PS sa v čase ožarovania nachádza prevažne v krvi, a preto dochádza najmä k poškodeniu cievneho zásobenia, zatiaľ čo pri dlhšom intervale dochádza vo väčšej miere k priamej smrti

nádorových buniek. Dĺžka týchto intervalov je u každého PS iná a závisí od jeho farmakokinetiky.⁸

c) imunitná odpoveď

PDT môže tiež aktivovať imunitný systém a tým podporiť vyvolaný cytotoxický efekt. Smrťou bunky dochádza k stimulácii lymfocytov a makrofágov, ktoré odstraňujú zničené bunky a tiež k tvorbe pamäťových buniek, ktoré pomáhajú predísť recidíve.⁸ Predpokladá sa, že tieto unikátne vlastnosti PDT v kombinácii s adjuvantnou imunoterapiou by mohli byť využité nielen na odstránenie primárneho nádorového ložiska, ale aj na rozpoznanie a zničenie buniek metastázovaných do vzdialených častí tela.³

3.6 Fotosenzitizéry

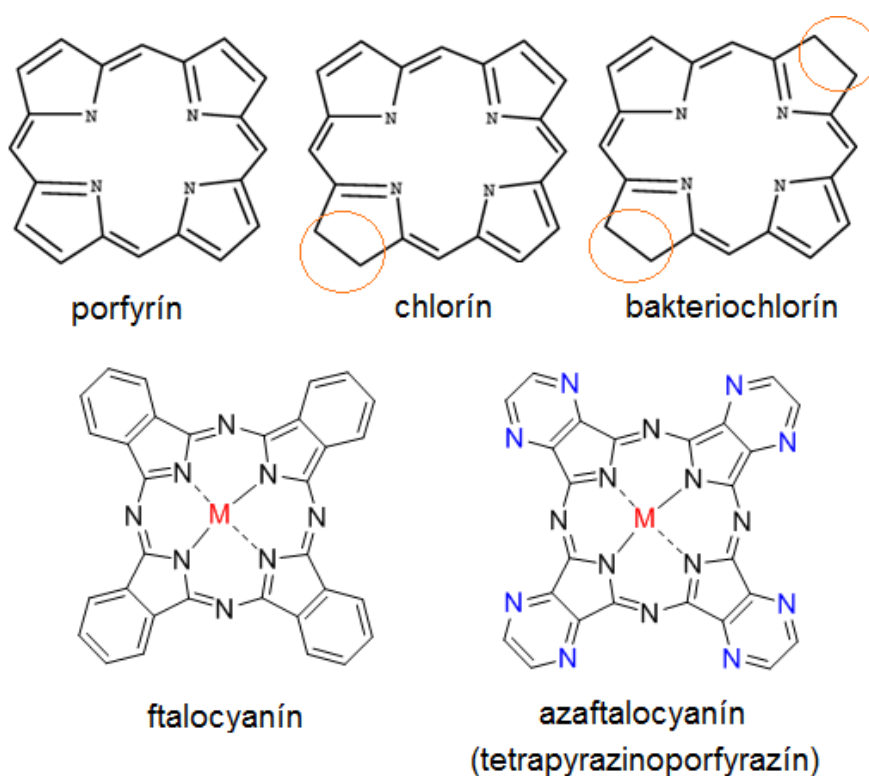
PS je prírodná alebo syntetická látka, ktorá je schopná absorbovať svetelnú energiu a využiť ju na chemickú alebo fyzikálnu modifikáciu inej látky. V PDT je táto energia využívaná na tvorbu cytotoxických pôsobkov ($^1\text{O}_2$ a iných ROS).^{6,9}

Ideálny PS by mal mať tieto vlastnosti:

- chemicky čistá látka známeho zloženia
- rozpustný a stabilný vo fyziologickom prostredí alebo podávaný vo farmaceuticky akceptovateľných formuláciách
- vysoké extinkčné koeficienty v oblasti 650 - 850 nm⁶
- vysoké kvantové výťažky $^1\text{O}_2$
- preferenčne vychytávaný v cieľovom tkanive
- rýchlo vylučovaný z tela s nízkou systémovou toxicitou
- minimálna toxicita v neprítomnosti svetla¹⁹
- fotostabilný
- neagregujúci¹¹

3.6.1 Základné štruktúrne typy PS

Väčšina PS sú tetrapyroly odvodené od porfyrínov, chlorínov, bakteriochlorínov alebo ftalocyanínov (Obr. 4).⁶ V poslednej dobe bolo vyvinutých veľa derivátov týchto základných štruktúr s cieľom vylepšiť vlastnosti PS, avšak mnohé z nich mali príliš vysokú vlastnú toxicitu a vo výsledku sa len málo z nich dostalo do klinickej praxe.¹⁸



Obrázok 4 Základné štruktúrne typy PS

Porfyríny

Porfyríny sú makrocykly zložené zo štyroch pyrolových jednotiek, ktoré môžu obsahovať centrálné viazaný kovový kation. Porfyrínový skelet je súčasťou niektorých endogénnych zlúčenín ako napríklad hemu, ktorý je nevyhnutný pre transport kyslíka v organizme.²⁰ Vďaka rozsiahlemu systému konjugovaných dvojitých väzieb sú tieto štruktúry planárne a vykazujú absorpciu v oblasti okolo 630 nm.^{11,20}

Chloríny

Chloríny sa líšia od porfyrínov redukciovou jednou dvojitou väzbou v pyrolovom kruhu, čo vedie k batochrómnomu posunu absorpčného maxima (640 – 700 nm) s extinkčnými koeficientami okolo $40000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.²¹ Vyznačujú sa nízkou rozpustnosťou vo vode, preto väčšina PS tohto typu je modifikovaná konjugáciou s aminokyselinami, peptidmi alebo sacharidmi za účelom zlepšenia rozpustnosti.²² Chloríny s centrálnou viazanou Mg^{2+} sa nazývajú chlorofyly a sú hlavnými fotosenzitívnymi pigmentmi v chloroplastoch väčšiny rastlín, rias a siníc.²³

Bakteriochloríny

Bakteriochloríny majú na rozdiel od porfyrínov redukovanú dvojitú väzbu až v dvoch pyrolových kruhoch, čo vedie k ďalšiemu posunu absorpčného maxima až do oblasti 730 – 800 nm. Jednou z nežiaducich vedľajších reakcií, ktorej podliehajú, je spätná oxidácia na príslušný chlorínový alebo až porfyrínový derivát. Dá sa tomu však predísť napríklad centrálnym naviazaním Pd^{2+} .¹⁹

Ftalocyaníny (Pc)

Ftalocyaníny sú aromatické makrocykly odvodené od porfyrínu zložené zo 4 izoindolových podjednotiek navzájom pospájaných dusíkatými spojovacími mostíkmi.^{6,18} Vyznačujú sa absorpciou v oblasti $> 670 \text{ nm}$ s vysokými extinkčnými koeficientami ($> 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Okrem silnej absorpcie v oblasti fototerapeutického okna navyše nevykazujú žiadnu alebo len nízku absorpciu v oblasti 400 – 600 nm, kde je intenzita slnečného svetla najvyššia. Spôsobujú preto menšiu kožnú fotosenzitivitu po vystavení dennému svetlu.⁶

Fyzikálne-chemické a farmakokinetické vlastnosti týchto PS môžu byť vylepšené modifikáciou štruktúry vhodnou substitúciou a pridaním určitých kovových kationov do centra makrocyklu.⁶ Napr. Pc s koordinovaným Zn^{2+} alebo Al^{3+} poskytujú vysoké výťažky $^1\text{O}_2$, vyššie ako zodpovedajúce bezkovové Pc, preto tieto metaloftalocyaníny sú vhodnejšie na využitie v PDT ako ich bezkovové analógy.¹¹

Azaftalocyaníny (AzaPc)

Azaftalocyaníny sú analógy Pc, kde niektoré uhlíky benzénového jadra sú nahradené atómami dusíka. Ich hlavnou nevýhodou oproti Pc je absorpcia pri nižších vlnových dĺžkach.²⁴

Silná tendencia planárnych molekúl Pc a AzaPc k agregácii je hlavnou nevýhodou týchto nádejných nových PS. Agregáty významne zhoršujú ich fotodynamické vlastnosti a navyše sú príčinou zlej rozpustnosti v bežných organických rozpúšťadlách a tým spôsobujú problémy pri čistení a charakterizácii.²⁵

Tetrapyrazinoporfyríny (TPyzPz)

Ide o najvýznamnejšiu skupinu AzaPc – heterocyklické azaanalógy Pc, kde prikondenzované benzénové jadrá sú zamenené za pyrazíny.¹ Je pre nich charakteristická silná absorpcia v oblasti nad 650 nm, fluorescencia a vysoké kvantové výťažky $^1\text{O}_2$.²⁶ Sú veľmi málo rozpustné, čo limituje využitie nesubstituovaných TPyzPz v PDT. Vhodnou substitúciou na periférii je však možné nielen zvýšiť ich rozpustnosť, ale aj získať zlúčeniny s vylepšenými fotofyzikálnymi vlastnosťami a vyššou biologickou aktivitou.¹

3.6.2 Delenie PS do generácií

1. generácia – patrí sem hematoporfyrín (Hp), hematoporfyrínový derivát (HpD) a porfimér. Ich nevýhodou je dlhá kožná fotosenzitivita, nie úplne optimálna penetrácia použitého svetla do tkanív a často chemická nejednotnosť.

2. generácia – obsahuje veľké množstvo PS, ktoré boli vyvíjané s cieľom zmierniť nevýhody spájané s PS 1. generácie. Na rozdiel od nich sa väčšinou jedná o chemicky čisté látky s absorpciou svetla pri dlhších vlnových dĺžkach a spôsobujúce podstatne nižšiu fotosenzitivitu kože po terapii. Do 2. generácie patria okrem iných aj všetky PS uvádzané v nasledujúcom prehľade s výnimkou porfiméru (1. generácia).

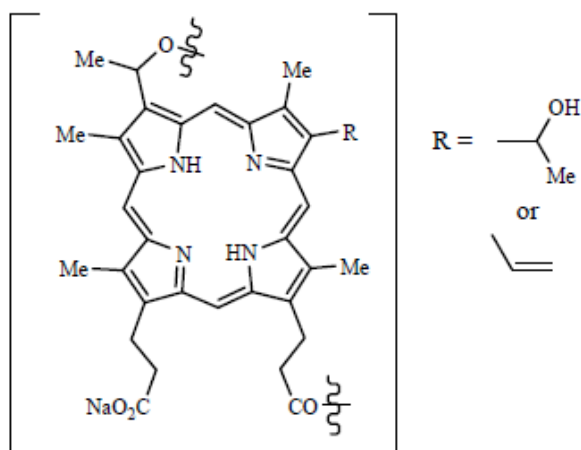
3. generácia – zahŕňa PS 1. a 2. generácie, ktoré sú určitým spôsobom upravené tak, aby sa zvýšila ich selektívna akumulácia v nádorovom tkanive. To môže byť dosiahnuté rôznymi spôsobmi, napríklad pomocou nanočastíc alebo väzbou na monoklonálne protilátky.^{18,20}

3.6.3 Prehľad niektorých najvýznamnejších PS v klinickej praxi

Porfimer sodný (Photofrin®)

Porfimer sodný (Obr. 5) je prečistený HpD registrovaný pod názvom Photofrin®. Ide o zmes dimérov a ďalších oligomérov porfyrínových zlúčenín, celkovo asi 60 rôznych látok, pričom presné zloženie stále nie je úplne objasnené.^{19,20}

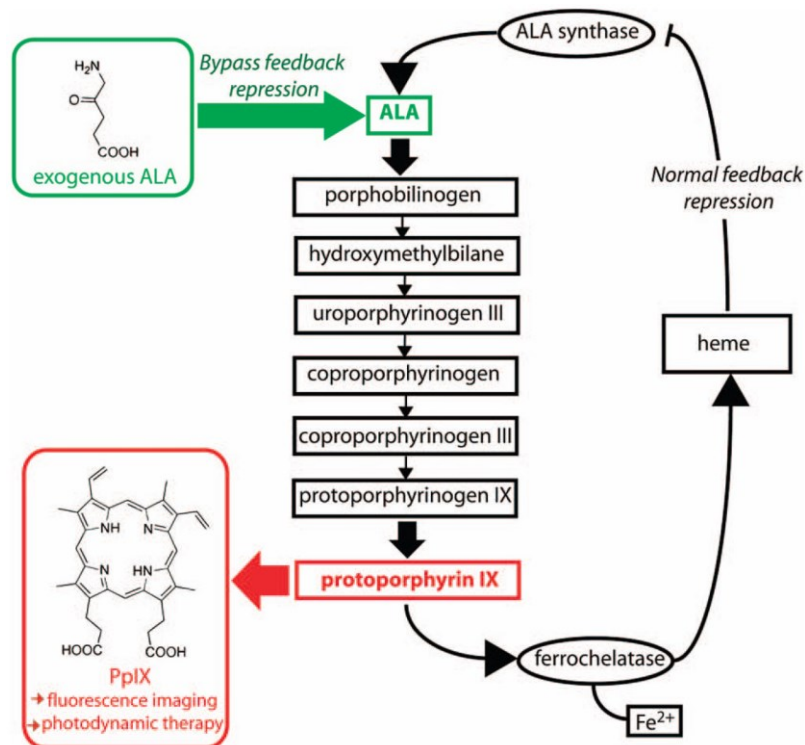
Porfimer je schválený na liečbu rakoviny pľúc, pažeráka, močového mechúra, zhubných aj nezhubných kožných ochorení a skorých štádií rakoviny krčka maternice. Tento PS 1. generácie je v PDT je stále považovaný za zlatý štandard, aj keď od ideálneho PS má veľmi ďaleko. Vyznačuje sa absorpčným maximom pri 630 nm a nízkym molárnym extinkčným koeficientom $1170 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, kvôli čomu sú pre účinné odstránenie nádora potrebné vysoké dávky porfimeru a svetla. Pri PDT je podávaný intravenózne a ožiarenie nasleduje až po 24 – 48 hodinách. Pri bežných terapeutických dávkach 2 mg/kg nie je dostatočne selektívny a má tiež výnimočne dlhý plazmatický polčas až 452 hodín, preto fotosenzitivita po terapii pretrváva ešte dlhú dobu a pacienti sa musia vyhýbať slnečnému žiareniu ešte minimálne 4 týždne po terapii.²⁰



Obrázok 5 Porfimer sodný

Kyselina 5-aminolevulová (ALA, Levulan®)

Kyselina 5-aminolevulová (ALA) je endogénna zlúčenina vznikajúca kondenzáciou sukcinyl CoA s glycínom za účasti ALA-syntázy, ktorá prebieha v mitochondriách buniek. Po následnom transporte do cytosolu sa ALA zúčastňuje niekoľkostupňovej biosyntézy hemu (Obr. 6), ktorý je prostetickou skupinou mnohých životne dôležitých hemoproteínov (napr. hemoglobínu, myoglobínu, cytochrómov...). Z hľadiska uplatnenia v PDT je významný jeden z medziproduktov tejto biosyntetickej dráhy (prebiehajúcej sčasti v cytosole a sčasti v mitochondriách) a to protoporfyrín IX, ktorý má fotosenzitívne vlastnosti. Po inkorporácii železnatého katiónu pomocou enzýmu ferochelatázy z neho vzniká fotodynamicky neúčinný hem, ktorý spätnou väzbou inhibuje produkciu ALA. Táto inhibícia syntézy sa dá obísť exogénnym prívodom ALA a keďže zabudovanie Fe^{2+} je relatívne pomalým krokom, dochádza pritom k hromadeniu protoporfyrínu IX, ktorý môže byť aktivovaný svetlom a spustiť fotodynamickú reakciu navodzujúcu poškodenie tkaniva. ALA je teda prekursorom endogénneho PS.²⁷ Po jej podaní zvonku je výsledkom vyššia koncentrácia protoporfyrínu IX v nádorovom tkanive oproti normálnemu tkanivu. Táto selektivita je daná pravdepodobne rozdielnou enzymatickou aktivitou a tiež menšími zásobami železa v nádorových bunkách, čo spomaľuje inaktiváciu PS premenou na hem.^{20,27} Protoporfyrín IX je metabolizovaný v priebehu 48 hodín a vďaka tomu má výrazne redukovanú nežiaducu postterapeutickú kožnú fotosenzitivitu v porovnaní s porfimerom.²¹



Obrázok 6 Schéma biosyntézy protoporfyrínu IX. Prevzaté z 5

ALA bola v roku 1999 schválená FDA (Úrad pre kontrolu potravín a liečiv) na neonkologickú liečbu aktinickej keratózy. V súčasnosti je jej hlavnou onkologickou indikáciou liečba karcinómu bazálnych buniek, kde je podávaná lokálne, uplatnenie však nachádza aj v liečbe mnohých ďalších typov nádorov. Okrem toho možno ALA využiť aj na detekciu nádorov kože, pľúc, gastrointestinálneho traktu a močového mechúra či určenie presných hraníc nádora pri jeho chirurgickom odstraňovaní.^{21,27}

Na zlepšenie prieniku ALA do buniek a na zvýšenie účinnosti boli vyvinuté jej lipofilnejšie deriváty – estery, z ktorých v cieľových bunkách vzniká po štiepení intracelulárnymi esterázami ALA.^{20,27} Metylester ALA (Metvix®) má po lokálnej aplikácii lepší prienik do tkanív (až 2 mm) v porovnaní s ALA, ktorá preniká len 1 mm. V Európe je schválený na liečbu aktinickej keratózy a karcinómu bazálnych buniek.²⁰ Hexylester ALA (Hexvix®) je premieňaný na protoporfyrín IX 50 – 100 krát účinnejšie ako ALA. V roku 2010 ho FDA schválila na diagnostiku nádorov močového mechúra.²¹

Pri terapii rôznymi formami ALA boli okrem onkologických efektov pozorované aj pozitívne kozmetické účinky (odstránenie vrások, omladenie pleti), pre ktoré sa celosvetovo táto forma terapie používa čím ďalej, tým viac.¹⁸

Deriváty chlorínu e6 (Photolon[®], Photodithazine[®], Radachlorín[®], talaporfín)

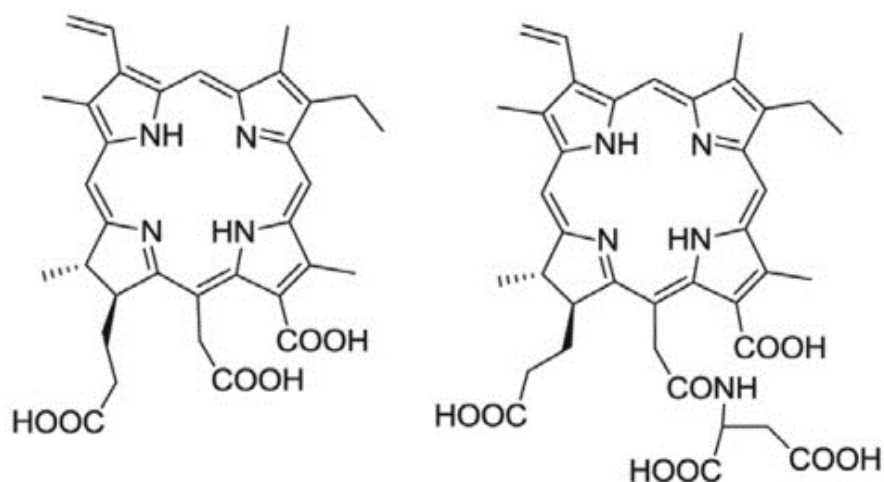
Chlorín e6 (Ce6, Obr. 7) je prírodná látka vznikajúca oxidáciou chlorofylu *a*.¹⁹ Získava sa zo *Spirulina platensis* a je hlavnou účinnou látkou u Photolonu[®], Photodithazinu[®] a Radachlorínu[®].

Photolon[®] (Ce6-PVP) je komplex chlorínu e6 a polyvinylpyrolidónu (PVP) v pomere 1:1. PVP je syntetický polymér pridávaný kvôli zlepšeniu rozpustnosti vo vode a prevencii agregácie. Photodithazine[®] je zmes Ce6 (60 %), chlorínu p6 a purpurínov 7 a 18 s prídavkom *N,N*-dimetyl-D-glukozamínu ako desagregačného činidla. Radachlorín[®] obsahuje sodnú soľ Ce6 (90 – 95 %) a ďalšie chloríny.

Absorpčné maximá týchto PS sú v rozmedzí 650 – 670 nm, čo umožňuje prienik svetla nepigmentovaným tkanivom až do hĺbky 7 mm. Majú vysokú fototoxicitu, nízku vlastnú toxicitu a navyše silnú fluorescenciu, vďaka čomu môžu byť využité nielen v PDT, ale aj vo fotodiagnostike nádorov. Dosahujú vysokú nádorovú selektivitu (v priebehu 0,5 – 5 hodín) a sú rýchlo vylučované z tela (cca 2 dni).

Photolon[®] bol schválený v Bielorusku a Rusku na fotodiagnostiku a PDT zhubných nádorov kože a dutých orgánov. Photodithazine[®] a Radachlorín[®] sú testované v rámci klinických štúdií v Rusku.²³

Talaporfín sodný (známy tiež ako mono-L-aspartyl chlorín e6, MACE, NPe6, Laserphyrin[®])²³ je chemicky čistý hydrofilný derivát chlorínu e6. Po podaní ostáva prednostne v plazme, vďaka čomu po ožiarení vedie k tvorbe trombu v nádorových cievach, čím zefektívňuje odstraňovanie nádora. V Japonsku je schválený na liečbu rakoviny pľúc a na základe preklinických a klinických hodnotení je nádejným PS v liečbe mnohých ďalších druhov nádorov. Je účinný a bezpečný s minimálnou kožnou fotosenzitivitou vďaka rýchlemu vylučovaniu z cirkulácie.²⁰

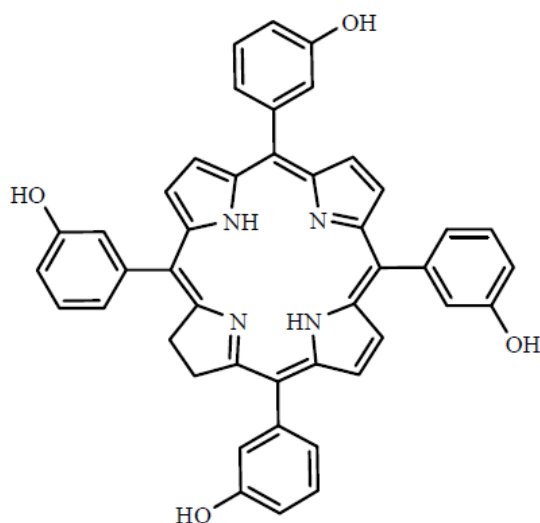


Obrázok 7 Chlorín e6 (vľavo), talaporfín (vpravo)

Temoporfín (Foscan®)

Temoporfín (*m*-tetra(hydroxyfenyl)chlorín, *m*-THPC, Foscan®; Obr. 8) je syntetický derivát chlorínu, ktorý bol v roku 2001 schválený v Európe na paliatívnu terapiu nádorov hlavy a krku.²⁰

Ide o veľmi účinný PS, ktorý sa vyznačuje vysokou produkciou $^1\text{O}_2$ pri 652 nm, vďaka čomu sú pre účinnú PDT v porovnaní s väčšinou iných PS potrebné omnoho nižšie dávky PS (0,1 – 0,2 mg/kg) a svetla (20 J/cm²) a iba niekoľkominútové ožarovanie. Nevýhodami sú dlhý interval medzi podaním PS a ožiarení (4 dni) z dôvodu pomalej akumulácie v nádorovom tkanive, bolesť počas terapie a závažná kožná fotosenzitivita pretrvávajúca niekoľko týždňov.¹⁸



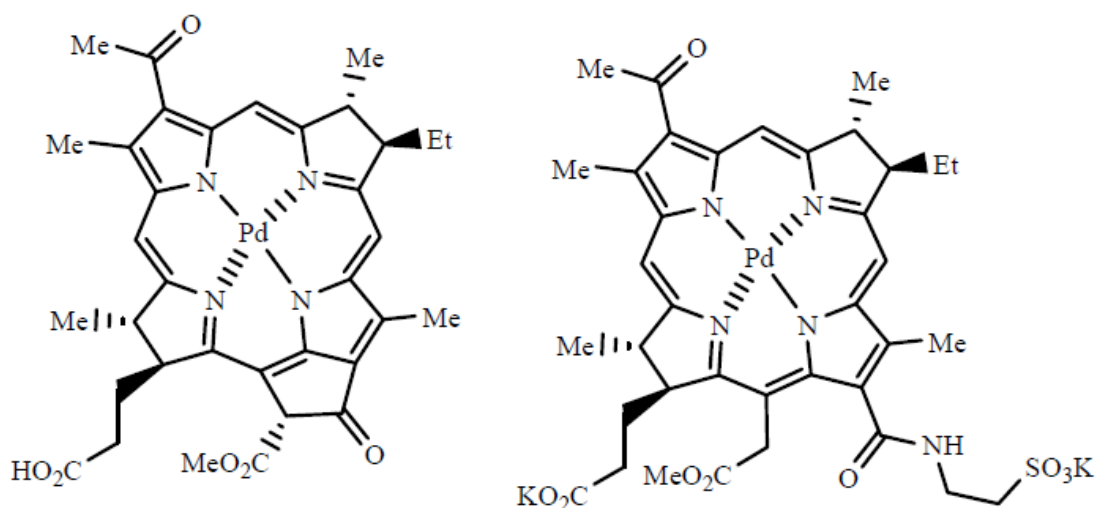
Obrázok 8 Temoporfín

Padoporfín, Padeliporfín

Oba PS (Obr. 9) sú bakteriochloríny odvodené od bakteriochlorofylu *a* (bakteriálneho ekvivalentu chlorofylu) obsahujúce centrálne viazaný Pd²⁺.^{11,18}

Padoporfín (WST09, Tookad®) je hydrofóbny PS a vyžaduje nosič.¹⁸ Jeho silná absorpcia v oblasti 763 nm umožňuje hlbší prienik žiarenia do tkanív - až 4 mm (pre porovnanie u porfimeru iba 1,6 mm pri 630 nm). Vyznačuje sa rýchlou farmakokinetikou, vďaka čomu môže ožiarenie prebiehať už 15 minút po podaní PS a kožná fotosenzitivita pretrváva iba necelé tri hodiny. Cieľovým miestom jeho pôsobenia je cievne zásobenie nádora, po jeho poškodení nasleduje rozvoj zápalu, hypoxia a nekróza nádorového tkaniva. Bol testovaný u pacientov s nádorom prostaty, kde preukázal sľubné terapeutické účinky bez závažných nežiaducich účinkov.^{20,28}

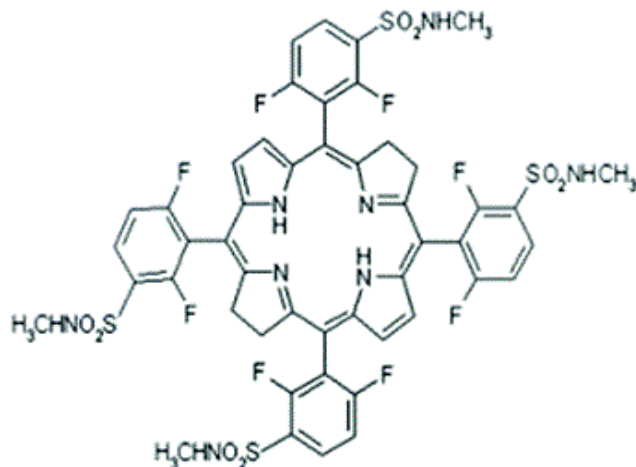
Padeliporfín (WST11, Tookad Soluble®, Stake®) je hydrofilný, jednoducho aplikovateľný derivát padoporfínu. Podobne ako padoporfín má rýchlu farmakokinetiku a účinok zameraný hlavne na cievy. Koncom minulého roka bol schválený v EÚ na liečbu nádora prostaty.^{11,21,29}



Obrázok 9 Padoporfín (vľavo) a padeliporfín (vpravo)

Redaporfín

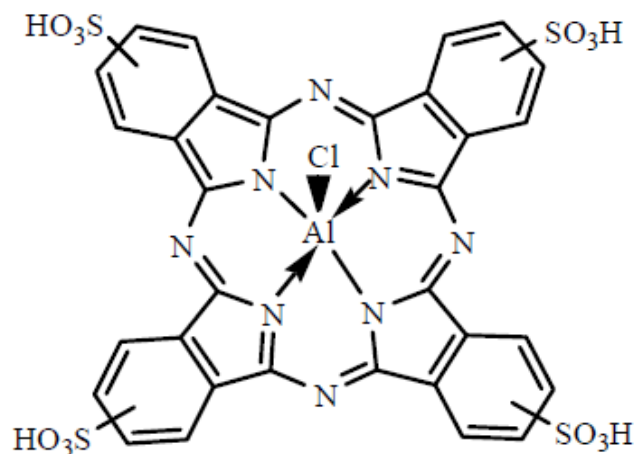
Redaporfín (LUZ11; Obr. 10) je fluorovaný sulfonamidový bakteriochlorín vyvíjaný v Portugalsku. Vyznačuje sa lepšou schopnosťou absorbovať svetlo a produkovať $^1\text{O}_2$, hlbšiou penetráciou do tkanív a vyššou účinnosťou. Samotný redaporfín je nerozpustný vo vode a podlieha agregácii. Na odstránenie tohto nedostatku býva aplikovaný v špeciálnej formulácii s prídavkom malého množstva Cremophor EL[®]. Na základe toxicitných testov vykonaných na hlodavcoch má redaporfín a jeho formulácie nízku toxicitu a je dobre tolerovaný. Nebola pozorovaná žiadna kožná fototoxicita aj napriek tomu, že zvieratá boli držané pri normálnom laboratórnom osvetlení. Teoreticky je aplikovateľný na všetky solídne nádory prístupné laserom spojeným s optickým vláknom. Preukázal sľubné výsledky klinických testov fázy I/IIa pokročilých štádií rakoviny hlavy a krku a Európska lieková agentúra (EMA) mu nedávno udelila status sirotského liečiva pre PDT nádora žlčovodu.^{30,31}



Obrázok 10 Redaporfín

Photosens[®]

Photosens[®] (Obr. 11) je zmes hlinitých sulfonovaných Pc s rôznym stupňom sulfonácie a maximom absorpcie pri 675 nm.⁶ V Rusku je používaný na liečbu nádorov žalúdka, prsníka, kože, pier a úst. Okrem nejednotného zloženia je jeho nevýhodou až niekoľkotýždňová kožná fotosenzitivita.²¹



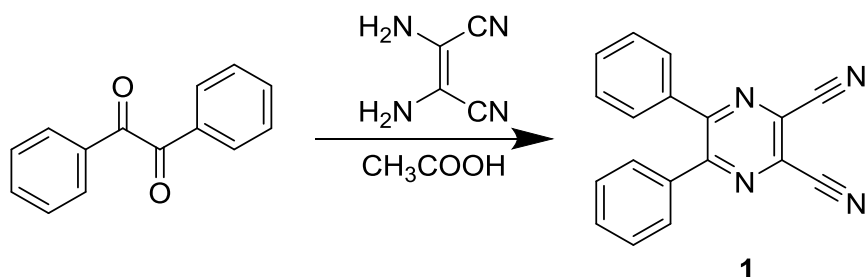
Obrázok 11 Photosens[®]

4 Experimentálna časť

4.1 Vybavenie pre syntetickú časť

Východiskové látky a rozpúšťadlá pre reakcie boli zakúpené od firiem Lach-Ner, Penta, Sigma-Aldrich alebo Acros. Teplota topenia zlúčenín bola meraná pomocou digitálneho prístroja ELECTROTHERMAL IA9200. Detekcie UV lampou prebiehali pri vlnovej dĺžke 254 nm alebo 366 nm. ^1H NMR a ^{13}C NMR spektrá boli merané na prístroji VNMR S500. Elementárna analýza bola vykonaná pomocou prístroja Vario Micro Cube Elemental Analyzer. Spektrá UV/VIS boli merané prístrojom Shimadzu UV-2600PC spectrophotometer. Fluorescenčné spektrá boli získané na FS5 Spectrofluorometer (Edinburg Instruments). Gélová filtrácia bola vykonaná na Amersham Pharmacia AKTA Fast Protein Liquid Chromatography System s použitím kolóny XK 16/70, ako stacionárna fáza bol použitý Superdex 30.

4.2 Syntéza 5,6-difenyropyrazín-2,3-dikarbonitrilu (1)



Diaminomaleonitril (1,04 g, 9,59 mmol), benzil (1,98 g, 9,44 mmol) a 99% kyselina octová (50 – 60 ml) sa v 100ml varnej banke zahriali k varu a potom nechali reagovať pri tejto teplote asi dve hodiny. Následne sa zmes dve hodiny nechala chladnúť v studenej vode a vyzrážaný produkt sa odfiltroval na frite. Produkt sa potom rozpustil vo väčšom množstve vriaceho etanolu (> 300 ml) a po pridaní malého množstva aktívneho uhlia sa prefiltraval za horúca. Vzniknutý filtrát sa nechal cez noc ochladiť v chladničke a potom bol odsatý na frite za vzniku jemných svetložltých kryštálov.

Zbytky produktu, ktoré ostali po filtrácii etanolom s aktívnym uhlím na filtračnom papieri, boli premyté acetónom a vzniknutý filtrát bol odparený na vákuovej rotačnej odparke, potom opäť rozpustený vo vriacom etanole, prefiltrovaný a ochladený v chladničke (asi 3 hodiny). Následne boli na frite odsaté ďalšie svetložlté kryštály, ktoré sa spojili s už skôr získanou frakciou produktu.

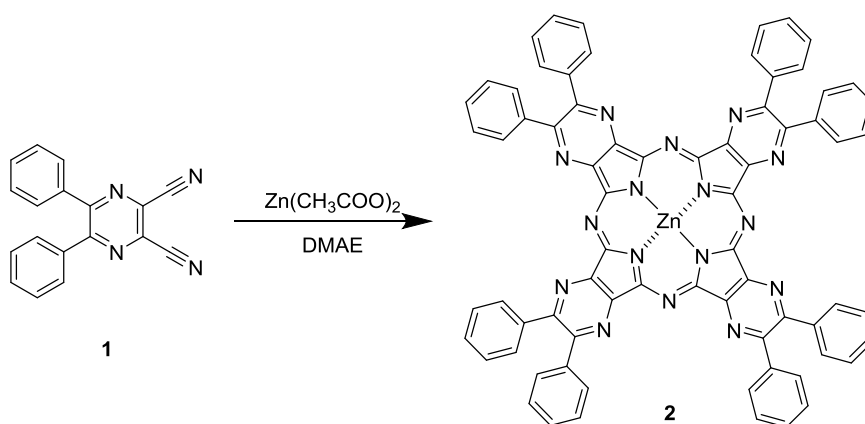
Výťažok: 1,69 g (63 % teoretického výťažku)

T.t. : 248,1 – 249,3 °C (v literatúre je udávaná teplota 247 °C).³²

NMR: ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7,36 (t, *J* = 8,0 Hz, 4H), 7,46 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,53 (d, *J* = 8,0 Hz, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 155,35, 135,21, 131,15, 129,81, 128,84, 113,13

Syntéza prebiehala podľa publikovaného postupu.³³

4.3 Syntéza 2,3,9,10,16,17,23,24- oktafenyltetrapyrazinoporfyrinátu zinočnatého komplexu (2)



Svetložlté kryštály látky **1** (1,98 g, 7,03 mmol) boli spolu s octanom zinočnatým (1,32 g, 7,19 mmol) rozpustené v 2-(dimetylamo)etanole (DMAE, 20 – 25 ml) a následne zahrievané asi 45 minút pri teplote 150 °C. Už po pár minútach varu sa farba reakčnej zmesi zmenila na tmavofialovú. Po ukončení reakcie bola do tejto zmesi pridaná destilovaná voda (asi 500 ml), vzniknuté kryštály boli odfiltrované za zníženého tlaku na Büchnerovom lieviku a následne ešte postupne premyté na filtri organickými rozpúšťadlami (etanol, metanol, acetón).

Potom boli kryštály ďalej prečistené povarením s etanolom a odsatím na frite, kde boli ešte premyté acetónom. Produkt z frity bol potom rozpustený v zmesi pyridínu a chloroformu (1:1 resp. 2:1) a po zahriatí prefiltrovaný na skladanom filtri. Získaný filtrát bol odparený na vákuovej odparke a opäť sa zopakoval celý tento postup čistenia kryštálov produktu počínajúc povarením s etanolom.

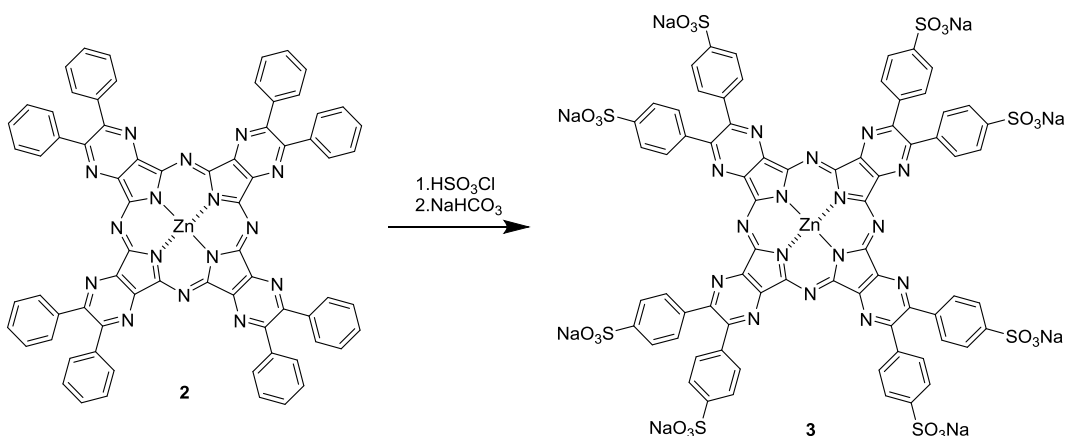
Na záver bol produkt ešte raz zahriaty s etanolom, odsatý na frite a postupne premytý veľkými množstvami organických rozpúšťadiel (etanol, acetón, n-hexán, dietyléter). Po vysušení boli pozbierané tmavosivofialové kryštály zinočnatého TPyzPz **2**.

Výťažok: 0,74 g (35 % teoretického výťažku)

UV/VIS (pyridín): λ_{\max} (1 μM) (ϵ) = 657 nm (192930 mol⁻¹ dm³ cm⁻¹), 595 (30560), 376 (107860).

Syntéza prebiehala podľa publikovaného postupu.³⁴

4.4 Syntéza sodnej soli 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(sulfonátofenyl)tetrapyrzazinoporfyrzínato zinočnatého komplexu (3)



Zinočnatý TPyzPz **2** z predchádzajúcej reakcie (0,48 g, 0,40 mmol) bol spolu s kyselinou chlórsoľfónovou (2,5 ml, 37,54 mmol) zahrievaný k varu pod spätným chladičom po dobu približne 1 hodiny. Obsah varnej banky bol následne preliaty do nasýteného vodného roztoku chloridu sodného (cca 50 ml). Došlo k búrlivej reakcii, pri ktorej vznikli zelené kryštály, tie boli odsaté na frite, premyté roztokom chloridu sodného a potom veľkým množstvom destilovanej vody.

K získaným kryštálom bol pridaný 5% NaHCO₃ (10 ml) a malé množstvo pevného NaHCO₃. Zmes bola potom dlhšiu dobu suspendovaná v ultrazvuku a následne miešaná pri laboratórnej teplote cez noc, potom odparená, zmiešaná s etanolom, prefiltrovaná na frite a nakoniec premytá veľkým množstvom etanolu.

Získaná látka **3** (cca 1,15 g) bola prečistená gélovou chromatografiou na Superdexe 30 za nasledovných podmienok: objem kolóny: 130 ml, rýchlosť elúcie: 0,5 ml/min, veľkosť frakcií: 1 ml. Zbieranie frakcií bolo automatizované pomocou prístroja ÄKTA a ich čistota sa hodnotila meraním absorbancie a konduktivity. Keďže látka vytekala z kolóny príliš koncentrovaná, boli absorpčné spektrá u vybraných frakcií merané manuálne po 50, 75 alebo 100-násobnom nariadení v rozsahu 200 - 800 nm. Čistota frakcií bola hodnotená hlavne tvarom spektra v oblasti 250 - 400 nm. Čisté frakcie boli odparené a špinavé frakcie boli opätovne prečistené pomocou gélovej chromatografie.

Výtťažok: 77 mg (10 % teoretického výtťažku).

Elementárna analýza: vypočítané pre $C_{72}H_{32}N_{16}Na_8O_{24}S_8Zn \cdot 8H_2O$: C 40,13; H 2,25; N, 10,40; S 11,90; zistené : C 40,36; N 10,615; H 2,845; S 12,26

UV/VIS (voda): λ_{max} (1 μM) (ϵ) 649 nm (89 530 $dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$), 615 (32 020), 366 (82 970), (voda + pyridín (4,8 %)): λ_{max} (1 μM) (ϵ) 654 nm (133 700 $dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$), 592 (19 210), 373 (80 910)

4.5 Vybavenie pre prácu s bunkovou líniou

1. Pracovné pomôcky

- automatické pipety rôzneho rozsahu (Eppendorf, Nemecko)
- 8-kanálová elektronická pipeta e-PET BioHit 50 - 1200 µl (BioHit, Fínsko)
- sterilné plastové špičky rôzneho rozsahu (Eppendorf, Nemecko)
- sterilné plastové sérologické pipety rôzneho objemu (TPP, Švajčiarsko)
- pipetovacie nástavce Biohit Midi Plus (Biohit, Fínsko)
- sterilné Pasteurove pipety (Brand, Nemecko)
- sterilné plastové inkubačné nádoby T75 (TPP, Švajčiarsko)
- 96-jamkové mikrotitračné doštičky s plochým dnom (TPP, Švajčiarsko)
- sterilné Petriho misky pre konfokálnu mikroskopiu so skleneným dnom (hrúbka 140 µm; WillCo Wells, Holandsko)
- sterilné mikroskopické sklíčka s kultivačným nástavcom (Eppendorf, Nemecko)
- sterilné mikroskúmvavky rôzneho objemu (Eppendorf, Nemecko)
- sterilné laboratórne sklo (Thermo Fisher Scientific, Česká republika)
- sterilné plastové vaničky
- podložné a krycie sklíčka (Thermo Fisher Scientific, Česká republika)
- Bürkerova komôrka (Brand, Nemecko)

2. Pracovné prístroje

- bunkové inkubátory s termostatom a reguláciou koncentrácie CO₂ (Sanyo, Esco)
- box s laminárnym prúdením Bio Air TopSafe 1.2 (EuroClone, Taliansko)
- vodný kúpeľ (Mettler, Nemecko)
- epifluorescenčný mikroskop Nikon Eclipse TS100 a Nikon Ti E (Nikon, Japonsko)

- 450 W xenónová lampa Newport s 9 cm vodným a long-pass filtrom Newport OG570 (Newport Corporation, USA)
- stolová trepačka Heidolph Titramax 100 (Heidolph Instruments, Nemecko)
- čítačka mikrotitračných doštičiek Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Švajčiarsko)

3. Reagencie a chemikálie

- kultivačné médium DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Lonza, Belgicko)
- fetálne bovinné sérum, 10% (FBS; Lonza, Belgicko)
- pufer HEPES, 1M (Sigma, Nemecko)
- roztok penicilín/streptomycín (Lonza, Belgicko)
- roztok L-glutamínu (Lonza, Belgicko)
- roztok trypsín/EDTA (Lonza, Belgicko)
- fosfátový pufer, tablety (Sigma, Nemecko alebo MP Biomedicals, USA)
- roztok peroxidu vodíka, 3% (Fluka, Sigma, Nemecko)
- trypanová modrá, 0,4% (Sigma-Aldrich, USA)
- roztok neutrálnej červene, 3,3 mg/ml (Sigma-Aldrich, USA)
- fixačný roztok pre neutrálnu červeň – 1% roztok CaCl_2 v 0,5% formaldehyde
- lyzačný roztok pre neutrálnu červeň – 1% roztok ľadovej kyseliny octovej v 50% etanole
- ADS pufer obsahujúci vápnik (116 mM NaCl, 5,3 mM KCl, 1,2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,13 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM HEPES, 1 mM CaCl_2)
- fluorescenčná sonda LysoTracker Blue DND-22 (Molecular Probes, USA)
- fluorescenčná sonda MitoTracker Green FM (Molecular Probes, USA)

4.6 Príprava bunkovej línie HeLa na testovanie

Všetky bunkové testy prebiehali na ľudskej línii HeLa buniek, ktorá pochádza z karcinómu krčka maternice. Bunky boli kultivované v sérovom médiu (SCM), ktoré bolo pripravené za sterilných podmienok v laminárnom boxe pridaním HEPES pufru (1 objem. %), roztoku penicilínu so streptomycínom (1 objem. %), L-glutamínu (2 objem. %) a fetálneho bovinného séra (10 objem. %) k médiu DMEM. Kultivácia prebiehala v sterilných plastových inkubačných nádobách s plochou 75 cm² (T75) v bunkovom inkubátore pri teplote 37 °C, 5% CO₂ a konštantnej vlhkosti.

4.6.1 Pasážovanie

Pasážovanie je prenos buniek do novej kultivačnej nádoby s čerstvým médiom, ktorý je nutné pravidelne opakovať, jednak z dôvodu vyčerpania živného média a jednak, aby nedochádzalo k nežiaducim zmenám vlastností, morfológie a životaschopnosti buniek.

HeLa bunky boli kultivované po dobu 3 – 4 dní, až kým nebola dosiahnutá ich 80 – 90% konfluencia (t.j. miera nárastu na dne kultivačnej nádoby), ktorá bola vždy pred samotným pasážovaním mikroskopicky skontrolovaná.

Manipulácia s bunkami počas pasážovania prebiehala v laminárnom boxe a všetky použité roztoky boli tesne pred pasážou vytemperované vo vodnom kúpeli na 37 °C.

Na začiatku bolo odobraté staré médium a bunky na dne kultivačnej nádoby boli dvakrát premyté sterilným PBS. Potom k nim bol pridaný 1 ml roztoku trypsínu a rozprestretý po celom povrchu kultivačnej fľaše. Následne prebiehala v uzavretej fľaši trypsinizácia v inkubátore pri 37 °C po dobu maximálne 5 minút a pod mikroskopom bolo skontrolované odlúčenie všetkých buniek od dna nádoby a ich rozsuspendovanie. Do fľaše bolo potom pridaných 9 ml SCM a celý obsah bol niekoľkokrát nasatý a opätovne vypustený pipetou, aby bola zaistená resuspendácia buniek a rozbitie ich zhlukov. Do novej

kultivačnej fľaše bolo napipetovaných 15 ml SCM a k nim prenesená časť bunkovej suspenzie. Po premiešaní bola vzniknutá suspenzia rozprestretá na dne kultivačnej fľaše a do ďalšej pasáže uchovávaná za vyššie uvedených podmienok v inkubátore. Zvyšok bunkovej suspenzie bol využitý pri nasadzovaní buniek na experimenty.

4.6.2 Stanovenie počtu životaschopných buniek

Zisťovanie počtu živých buniek prebiehalo pod mikroskopom v Bürkerovej komôrke s použitím trypanovej modrej. Ide o farbivo, ktoré farbí mŕtve bunky, zatiaľ čo živé bunky toto farbivo aktívne transportujú von, preto zostávajú nezafarbené.

Do mikroskúmavky bolo napipetovaných 100 µl 0,4% roztoku trypanovej modrej a 100 µl suspenzie HeLa buniek. Po premiešaní a 5-minútovej inkubácii pri laboratórnej teplote bolo na obidve strany Bürkerovej komôrky napipetovaných 10 µl farebnej suspenzie a boli spočítané živé bunky. Výsledný počet bol prepočítaný na počet živých buniek v 1 ml suspenzie.

4.7 Fotodynamická aktivita

4.7.1 Nasadzovanie buniek na experimenty

Zmiešaním predhriateho SCM s adekvátnym množstvom bunkovej suspenzie v sterilnej plastovej vaničke bola pripravená suspenzia buniek pre nasadzovanie na experimenty s koncentráciou 75000 buniek/ml. Táto suspenzia bola následne napipetovaná multikanálovou elektronickou pipetou do 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky v množstve 100 µl do každej jamky a ponechaná v inkubátore po dobu 24 hodín. Po uplynutí tejto doby boli bunky použité pri testoch na fototoxicitu (t.j. toxicita PS po aktivácii svetlom) alebo tzv. „dark toxicitu“ (t.j. vlastná toxicita PS bez aktivácie svetlom).

4.7.2 Stanovenie fototoxicity

K bunkám bola pridaná syntetizovaná látka **3** v rôznych koncentráciách (0,1 – 10 μM), pričom roztoky testovanej látky boli pripravené sterilne v mikroskúmavkách nariadením zásobného roztoku látky **3** s koncentráciou 750 μM predhriatym bezsérovým médiom (SFM).

Bunky, ktoré slúžili ako negatívna kontrola, boli usmrtené pridaním letálnej dávky H_2O_2 , ostatným bunkám bolo odobraté staré médium. K bunkám, ktoré slúžili ako pozitívna kontrola, bolo pridaných 100 μl čerstvého SFM a k ostatným bunkám boli pridané pripravené roztoky študovaného fotosenzitizéru **3**, pričom každá testovaná koncentrácia bola pipetovaná do troch jamiek mikrotitračnej doštičky, vždy v množstve 100 μl . Práca prebiehala v sterilnom prostredí laminárneho boxu a manipulácia s látkou **3** prebiehala za tmy, aby nedošlo k nežiaducej predčasnej aktivácii fotosenzitizéru.

Nasledovala 12-hodinová inkubácia a po nej kompletná sterilná výmena média za čerstvé SFM u všetkých buniek vrátane kontrol. Potom boli bunky po dobu 15 minút ožarované červenou časťou viditeľného spektra pomocou 450 W xenónovej výbojky ($\lambda > 570 \text{ nm}$; 12,4 mW cm^{-2} ; 11,2 J cm^{-2}). Po ožiarení boli bunky vložené do inkubátora na 24 hodín a potom bola hodnotená ich životaschopnosť testom vychytávania neutrálnej červene (neutral red uptake assay; NRU).

4.7.3 Stanovenie toxicity v tme

Stanovenie vlastnej toxicity látky **3** prebiehalo obdobným spôsobom ako stanovenie fototoxicity, ale s tým rozdielom, že boli použité omnoho vyššie koncentrácie testovaného PS (10 – 1000 μM), ktoré boli pripravené nariadením zásobného roztoku s koncentráciou 1000 μM v SCM a 24-hodinovej inkubácii nepredchádzala aktivácia svetlom.

4.7.4 Vyhodnotenie cytotoxicitných experimentov

Vyhodnotenie oboch vyššie uvedených experimentov prebiehalo stanovením životaschopnosti buniek pomocou NRU.

Neutrálna červeň (neutral red, NR) je farbivo, ktoré sa vďaka ion-trappingu hromadí v lyzozómoch živých buniek, zatiaľ čo u mŕtvych buniek s poškodenými membránami k tomuto vychytávaniu nedochádza. Množstvo zadržaného farbiva je teda priamo úmerné počtu živých buniek a to je využívané pri kvantitatívnom spektrofotometrickom stanovení životaschopnosti buniek.

Po ukončení inkubácie bolo k bunkám do každej jamky mikrotitračnej doštičky pridaných 100 μ l roztoku NR s koncentráciou 80 μ g/ml (pripraveného zo zásobného roztoku NR s koncentráciou 3,3 g/l). Výsledná koncentrácia NR v jamkách teda bola 40 μ g/ml. Bunky sa nechali inkubovať 2 hodiny, potom bolo odstránené médium a do každej jamky bolo napipetovaných 100 μ l fixačného roztoku (1% roztok CaCl_2 v 0,5% formaldehyde). Pri laboratórnej teplote došlo v priebehu 15 minút k fixácii buniek na dno jamiek doštičky. Fixačný roztok bol potom odstránený a bunky dvakrát premyté 100 μ l PBS. Následne bolo k bunkám pridaných 200 μ l lyzačného roztoku (1% roztok ľadovej kyseliny octovej v 50% etanole) a po dobu 30 minút boli bunky lyzované na stolovej trepačke pri laboratórnej teplote.

Experimenty boli vyhodnocované spektrofotometricky pomocou multifunkčnej čítačky mikrotitračných doštičiek Tecan Infinite M200, pričom v každej jamke doštičky bola meraná absorbanca pri vlnovej dĺžke 540 nm. Životaschopnosť buniek bola vyjadrená percentuálne vzhľadom na pozitívnu kontrolu.

Grafické spracovanie výsledkov, výpočet hodnôt EC_{50} a TC_{50} a štatistická analýza boli vykonané pomocou programu GraphPad Prism verzia 7.04 (GraphPad Software, USA). Získané dáta boli spracované jednofaktorovou analýzou rozptylu s Bonferroniho *post hoc* metódou viacnásobného porovnávania. Výsledky boli porovnané s kontrolou a priemery boli považované za štatisticky významné, ak * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$. Údaje v grafoch sú

uvedené ako priemerné hodnoty so smerodajnou odchýlkou. Všetky experimenty boli vykonané minimálne v troch opakovaníach ($n \geq 3$).

4.8 Fotografická dokumentácia

Pre fotografickú dokumentáciu bola línia HeLa buniek nasadzovaná na sterilné Petriho misky vhodné pre konfokálnu mikroskopiu (priemer 3 cm, sklenené dno). Príprava bunkovej suspenzie prebiehala obdobným spôsobom ako pri cytotoxicitných experimentoch. Pipetované boli 2 ml suspenzie s koncentráciou 50000 buniek/ml a potom nasledovala 24-hodinová inkubácia.

4.8.1 Subcelulárna lokalizácia

Po inkubácii bola k bunkám pridaná látka **3** (10 μM) a bunky boli vložené do inkubátora na ďalších 12 hodín. Potom boli bunky opláchnuté a boli k nim pridané fluorescenčné sondy MitoTracker Green FM (2 μM) a LysoTracker Blue DND-22 (2 μM) v čerstvom médiu (SFM). Bunky sa ponechali 15 minút inkubovať a potom boli dvakrát premyté predhriatym ADS pufrom obsahujúcim vápnik (116 mM NaCl, 5,3 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄·7H₂O, 1,13 mM NaH₂PO₄·2H₂O, 20 mM HEPES, 1 mM CaCl₂). Následne k nim bolo pridané čerstvé SFM a boli vyhotovené mikrofotografie pomocou epifluorescenčného mikroskopu Nikon Ti E s využitím filter setov DAPI (LysoTracker), FITC (MitoTracker) a Cy5 (látka **3**) a diferenciálneho interferenčného kontrastu (DIC; celková morfológia bunky).

4.8.2 Morfologické zmeny

Ožiareníím buniek fluorescenčným kanálom Cy5 dochádza k aktivácii látky **3** a jej fotodynamickému pôsobeniu. S využitím rovnakej techniky ako pri

stanovení subcelulárnej lokalizácie je možné sledovať morfológické zmeny na celej bunke, membráne, mitochondriách a lyzozómoch.

4.9 Meranie závislosti fotofyzikálnych vlastností na zmene pH

Bola pripravená sada roztokov kyselín s rôznymi hodnotami pH v rozmedzí 0,22 – 5,17. Meranie pH prebiehalo na pH metri HANNA pH 209, ktorý bol pred meraním kalibrovaný na pH = 7,00 a 4,00. Následne bol vytvorený zásobný roztok látky **3** s koncentráciou 100 μM , ktorý bol pridaný k roztoku kyseliny s daným pH za vzniku 1 μM roztoku a boli merané absorpčné spektrá.

4.10 Meranie závislosti fotofyzikálnych vlastností na väzbe na hovädzí albumín

Bol pripravený zásobný roztok hovädzieho albumínu (BSA) s koncentráciou 30 mg/ml (455 μM) a z neho nariedením ďalší zásobný roztok s koncentráciou 0,3 mg/ml (5 μM). Zo zásobného roztoku látky **3** s koncentráciou 100 μM bol do kyvety pripravený roztok s koncentráciou 1 μM a postupne bol pridávaný roztok BSA, najprv menej koncentrovaný až po celkový prídavok 1 ml a potom koncentrovanejší roztok až po celkový prídavok 0,2 ml. Po každom prídavku BSA bolo merané absorpčné a fluorescenčné spektrum.

Obdobným spôsobom boli merané absorpčné spektrá a fluorescencia aj s fosfátovým pufrom (PBS) namiesto superčistej vody.

5 Výsledky a diskusia

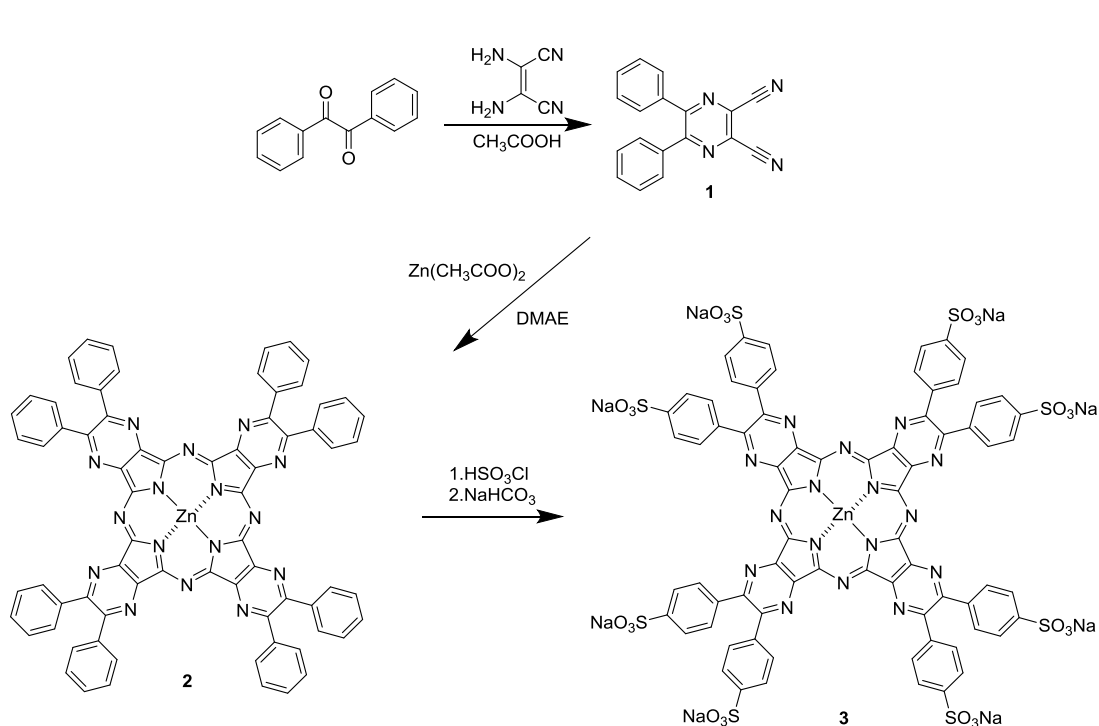
AzaPc predstavujú nádejnú skupinu fotosenzitizérov pre fotodynamickú terapiu. Medzi ich pozitívne vlastnosti patrí absorpcia v oblasti 650 - 750 nm a schopnosť produkovať singletový kyslík. Ich nevýhodou je nízka rozpustnosť vo vode a tendencia k agregácii spôsobená ich planárnou štruktúrou, čo znižuje ich fotodynamickú účinnosť. Túto nevýhodu je možné odstrániť vhodnou substitúciou na periférii buď objemnými substituentami alebo skupinami s kladnými alebo zápornými nábojmi, ktoré sa budú svojimi elektrostatickými silami navzájom odpudzovať.

Cieľom mojej diplomovej práce bolo nasyntetizovať sulfónovaný derivát AzaPc s centrálne viazaným zinočnatým kationom a s 8 sulfónovými skupinami na periférii so záporným nábojom, ktorý by mal byť vo vode dobre rozpustný a málo agregovaný, čo sú dobré predpoklady pre jeho vysokú fotodynamickú účinnosť. Ďalšími cieľmi bolo meranie fotofyzikálnych vlastností nasyntetizovanej látky, otestovanie jej fotodynamickkej aktivity a určenie jej lokalizácie v bunkách.

5.1 Syntéza

Syntéza pozostávala z troch krokov (Obr. 12). V prvom kroku prebehla kondenzačná reakcia diaminomaleonitrilu s benzilom za použitia kyseliny octovej ako rozpúšťadla. Vznikol 5,6-difenylpyrazín-2,3-dikarbonitril (**1**) vo výťažku 63 %. V druhom kroku nasledovala cyklotetramerizácia a tvorba zinočnatého komplexu reakciou s nadbytkom octanu zinočnatého v DMAE. Vznikol produkt **2** vo výťažku 35 %. Posledným krokom bola sulfonácia s použitím nadbytku kyseliny chlór-sulfónovej, pričom z popísaných postupov³⁵ je známe, že prebieha selektívne do *para* polohy. Najprv vzniká chlorid kyseliny sulfónovej, ktorý sa ďalej hydrolyzuje na sulfónovú kyselinu.

Táto záverečná hydrolýza predstavovala najproblematickejšiu časť celej syntézy. Ako prvé som vyskúšala obvyklý postup, ktorý sa používa pri hydrolýze a to zahrievanie vo vode cez noc. Dopadlo to však neúspešne. Postupne došlo k rozpadu celého makrocyklu, pravdepodobne z dôvodu vznikajúcej HCl, ktorá tento rozpad podporovala. Pri druhom pokuse o hydrolýzu som preto použila NaOH (v nadbytku), aby reagoval so vznikajúcou HCl a zmes som ponechala pri laboratórnej teplote. Týmto postupom sa mi podarilo získať výsledný produkt **3**, ale iba vo veľmi nízkom výťažku (2 %). Možným dôvodom je fakt, že tentokrát bol rozpad makrocyklu podporovaný prebytkom NaOH, čo je silná zásada. Preto som pri treťom vykonávaní hydrolýzy použila slabšiu zásadu a to NaHCO₃ (taktiež v miernom nadbytku), ktorý reagoval so vznikajúcou HCl za vzniku NaCl, CO₂ a vody. Takto som zvýšila výťažnosť poslednej reakcie na 10 %. Aby som sa zbavila soli a nízkomolekulárnych látok vzniknutých pri hydrolýze, produkt som prečistila gélovou chromatografiou na Superdexe 30.



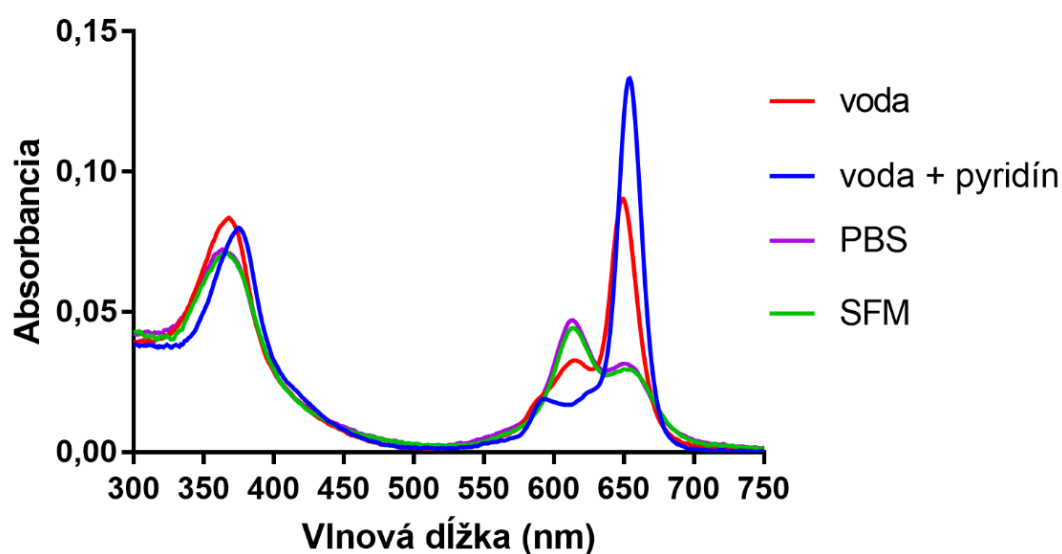
Obrázok 12 Schéma syntézy látky **3**

5.2 UV/VIS spektrá

Aby bol fotosenzitizér využiteľný vo fotodynamickej terapii, musí byť schopný produkovať singletový kyslík a na to je nevyhnutné, aby bol v mieste účinku prítomný v monomérskej forme.

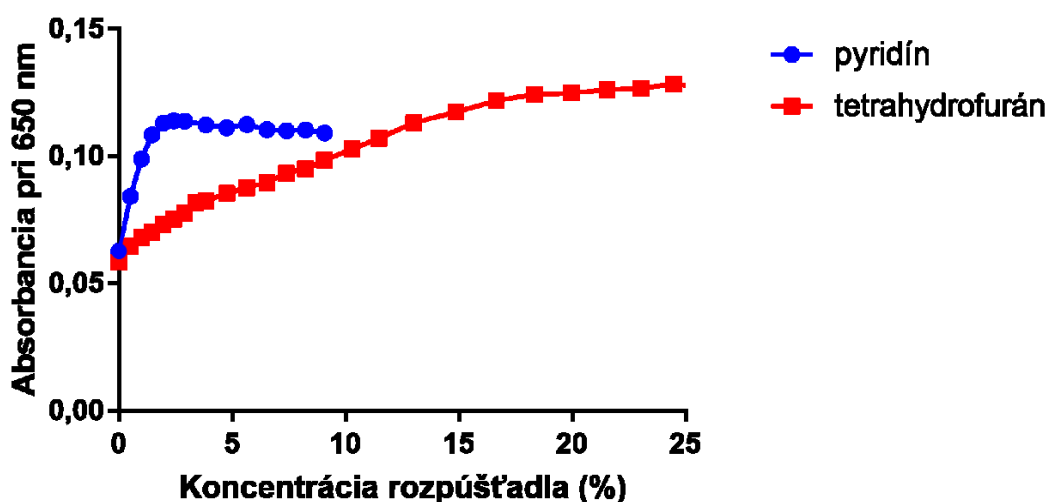
Po zmeraní absorpčného spektra vo vode som však zistila, že látka **3** je čiastočne agregovaná, čo znižuje jej fotodynamickú účinnosť. Agregácia sa prejavuje poklesom absorbancie v Q-páse (650 nm), jeho rozšírením a nárastom absorbancie pri o niečo nižších vlnových dĺžkach. Jej dôvodom je pravdepodobne to, že záporné náboje sú príliš ďaleko od seba a táto látka je stále planárna, čo podporuje jej agregáciu.

Ďalej som merala absorpčné spektrá látky **3** v PBS, ktorý reálnejšie napodobňuje prostredie ľudského tela a tiež v SFM, čo predstavuje kultivačné prostredie pre HeLa bunky, na ktorých bola látka testovaná na fotodynamickú aktivitu. V oboch prípadoch boli spektrá veľmi podobné a síce značne agregované, pravdepodobne kvôli zvýšeniu iónovej sily rozpúšťadla a tým pádom i vyššej snahy hydrofóbneho jadra eliminovať kontakt so silne hydrofilným prostredím (Obr. 13).



Obrázok 13 Absorpčné spektrum látky **3** (1 μ M) v závislosti na rozpúšťadle

V snahe nájsť rozpúšťadlo, v ktorom by bola látka **3** monoména, som postupne vyskúšala rôzne prídavky koordinačných rozpúšťadiel (pyridín a THF) a merala som absorbanciu pri vlnovej dĺžke maxima (650 nm). U oboch látok absorbanca v hlavnom Q-páse s prídavkom koordinačného rozpúšťadla rástla (Obr. 14). Je to dané tým, že koordinačné rozpúšťadlo sa viaže na zinočnatý kation, kolmo na planárnu štruktúru makrocyklu a oddeľuje tak od seba jednotlivé molekuly. Absorpčné spektrum látky **3** vo vode s pyridínom (4,8 %) je úplne monoméne, čo sa prejavuje úzkym Q-pásom s vysokou absorbanciou (Obr. 13). Nevýhodou týchto rozpúšťadiel je však ich vysoká toxicita, ktorá prakticky znemožňuje ich podanie ľuďom v takejto forme.



Obrázok 14 Závislosť absorpcie na koncentrácii rozpúšťadla

5.3 Fotofyzikálne vlastnosti

Látka **3** bola ďalej charakterizovaná fotofyzikálne a boli získané dôležité údaje pre fotodynamickú účinnosť v rôznych rozpúšťadlách (Tab. 1). Aj tu sa odrážajú už vyššie zmienené fakty ohľadom agregácie, kde je ľahko pozorovateľné, že vo vode alebo v prítomnosti solí dochádza k výraznému poklesu kvantového výťažku fluorescencie (Φ_F).

Tabuľka 1 Prehľad fotofyzikálnych vlastností látky 3

Rozpúšťadlo	λ_{\max} (nm)	Φ_{Δ}	Φ_F
voda	649	0,30 ^a	0,12
voda + pyridín	654		0,31
PBS	650		0,006
SFM	650		0,003

^aÚdaj zmeraný RNDr. Pavlom Kubátom, CSc. na Ústavu fyzikálnej chémie J. Heyrovského, Akadémie vied ČR.

5.4 Fotodynamická aktivita

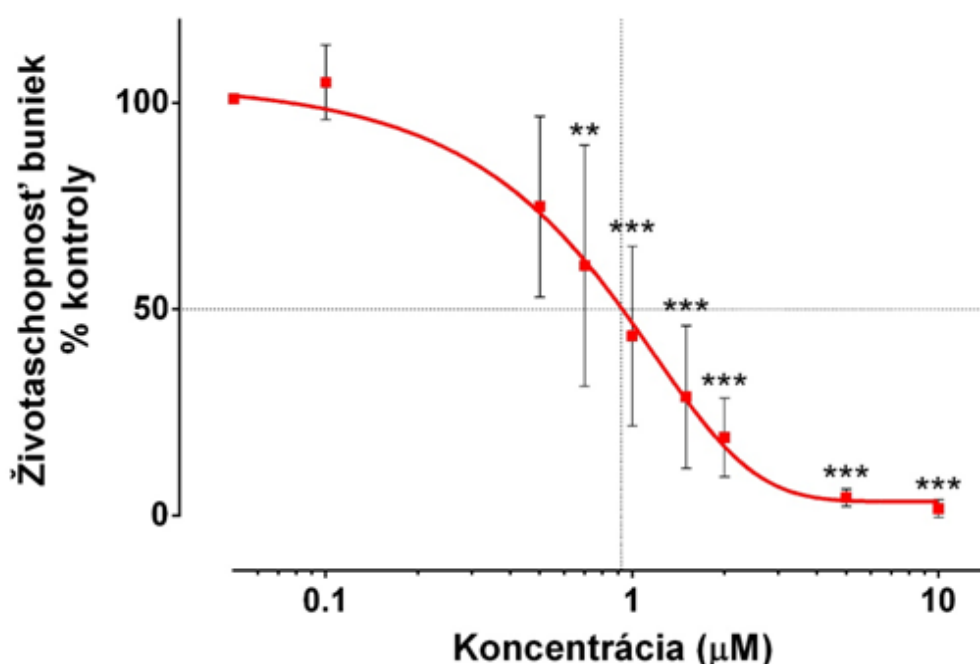
Syntetizovanú látku **3** som otestovala na fotodynamickú aktivitu na nádorových HeLa bunkách za vyššie popísaných podmienok. Boli stanovené hodnoty EC_{50} (t.j. stredná efektívna koncentrácia), ktorá zodpovedá koncentrácii PS, pri ktorej počet životaschopných buniek po aktivácii svetlom poklesol na polovicu pôvodného počtu a TC_{50} (t.j. stredná toxická koncentrácia), ktorá zodpovedá koncentrácii PS, pri ktorej počet životaschopných buniek poklesol na polovicu pôvodného počtu bez predchádzajúcej aktivácie svetlom. Z týchto hodnôt bol ďalej určený pomer TC_{50}/EC_{50} ako obdoba terapeutického indexu. Z hľadiska účinnosti a bezpečnosti fotodynamickej terapie je teda žiaduce, aby bol tento pomer čo najvyšší.

Všetky experimenty pre stanovenie fotodynamickej aktivity prebiehali v bezsérovom médiu (SFM), pretože pri testoch s použitím média so sérom (SCM) bola látka prakticky neúčinná – ani pri najvyššej testovateľnej koncentrácii fotosenzitizéru 50 μM nedošlo k poklesu počtu živých buniek na 50 %.

SCM na rozdiel od SFM obsahuje navyše aj FBS (10 %), ktorého hlavnou zložkou je hovädzí albumín (BSA), preto je vysoko pravdepodobné, že práve interakcie PS s albumínom (respektíve aj s inými bielkovinami obsiahnutými vo FBS) prispievajú k výrazne nižšej fotodynamickej aktivite PS v SCM ($EC_{50} > 50 \mu\text{M}$) oproti aktivite v SFM ($EC_{50} = 0,938 \mu\text{M}$). Navyše interakcie so sérovými proteínmi boli popísané aj u iných anionických PS. Vplyv BSA som preto skúmala podrobnejšie (viď ďalej).

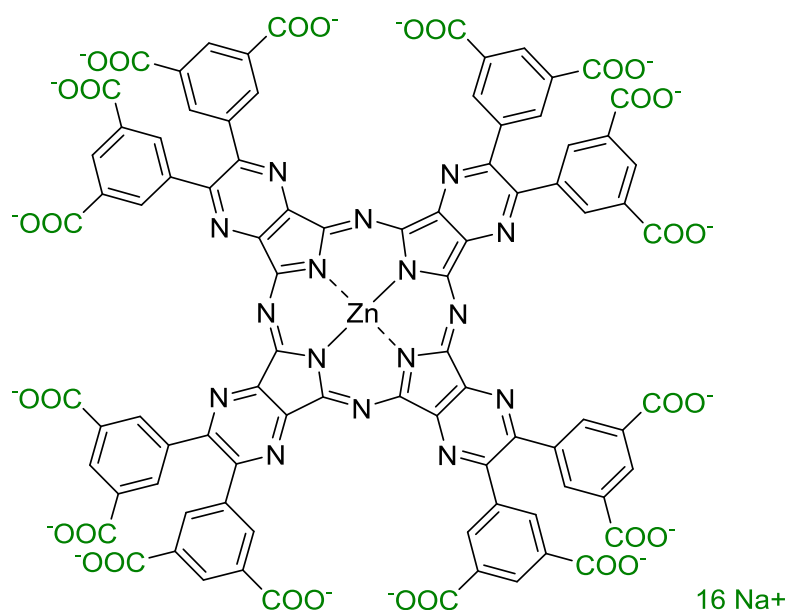
5.4.1 Fototoxicita

Experimentálne získané hodnoty udávajúce životaschopnosť buniek po ožiarení v závislosti na koncentrácii PS sú zobrazené v grafe (Obr. 15). V bezsérovom médiu bola u látky **3** stanovená hodnota $EC_{50} = 0,938 \pm 0,388 \mu\text{M}$.



Obrázok 15 Závislosť životaschopnosti buniek na koncentrácii fotosenzitizéru 3 po aktivácii svetlom, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

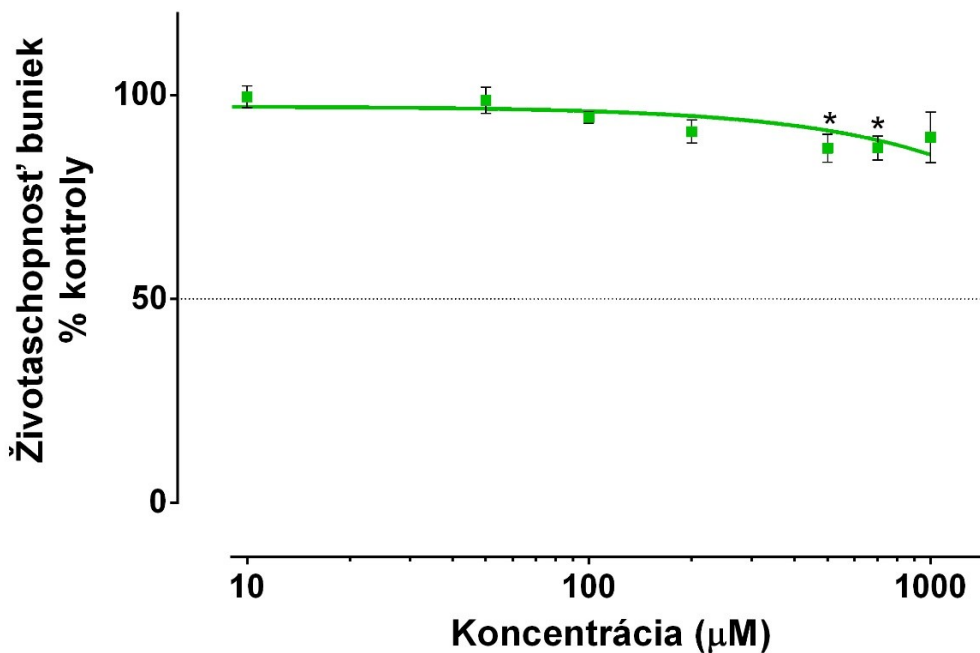
V porovnaní so štruktúrne podobným anionickým TPyzPz s centrálne viazaným zinočnatým kationom a periférne substituovaným 16 karboxylovými skupinami (Obr. 16) s $EC_{50} = 0,55 \pm 0,09 \mu\text{M}$ v SFM vykazuje látka **3** len mierne nižšiu aktivitu. Pri porovnaní výsledkov fototoxických testov u oboch látok v SCM bola však porovnávaná látka omnoho účinnejšia ($EC_{50} = 5,7 \pm 1,1 \mu\text{M}$).³⁶ Jedným z dôvodov nižšej fototoxicity látky **3** je pravdepodobne fakt, že látka je v kultivačnom médiu prítomná v agregovanej forme a to vedie k nižšej produkcii singletového kyslíka, ktorý je hlavným činiteľom sprostredkujúcim fototoxickú reakciu.



Obrázok 16 Anionický TPyzPz s karboxylovými skupinami

5.4.2 Toxicita v tme

Namerané hodnoty životaschopnosti buniek v závislosti na koncentrácii PS sú zobrazené v nasledujúcom grafe (Obr. 17). Stredná toxická koncentrácia látky **3** v tme bola $TC_{50} > 1000 \mu\text{M}$, teda omnoho vyššia než najvyššia použitá koncentrácia. V porovnaní s inými PS udávanými v literatúre je vlastná toxicita látky **3** výnimočne nízka.³⁷



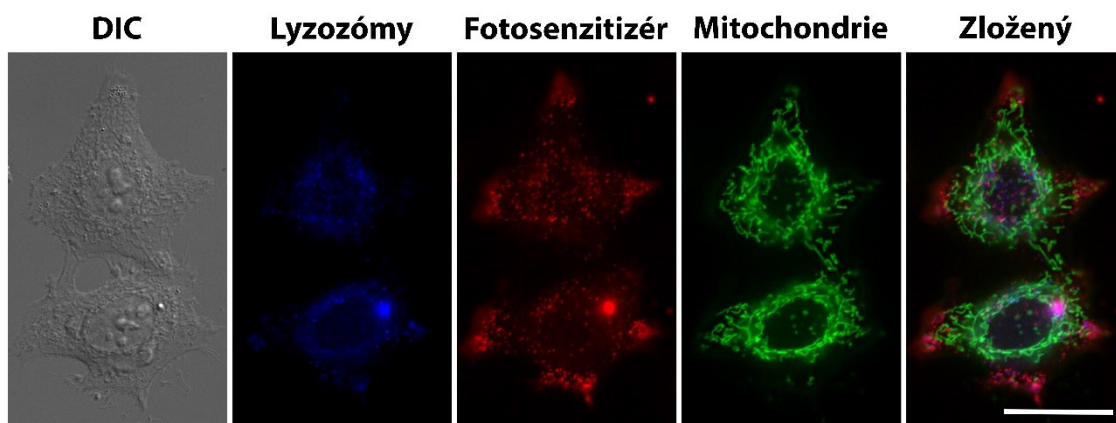
Obrázok 17 Závislosť životaschopnosti buniek na koncentrácii fotosenzitizéru 3 bez aktivácie svetlom, *p<0,05

Aj keď látka **3** nevyniká vysokou aktivitou po ožiarení, na druhej strane je relatívne málo toxická, vďaka čomu má veľmi priaznivý pomer $TC_{50}/EC_{50} > 1066$, ktorý je o niekoľko rádov vyšší ako u spomínaného AzaPc s karboxylovými skupinami, ktorý dosahuje hodnotu $TC_{50}/EC_{50} = 27$.³⁶ Látka **3** má teda určite potenciál pre využitie ako PS vo fotodynamickej terapii. V porovnaní s kationickými AzaPc je však tento pomer stále o niekoľko rádov nižší.³⁷

5.5 Pozorovanie subcelulárnej lokalizácie a morfológických zmien po ožiarení

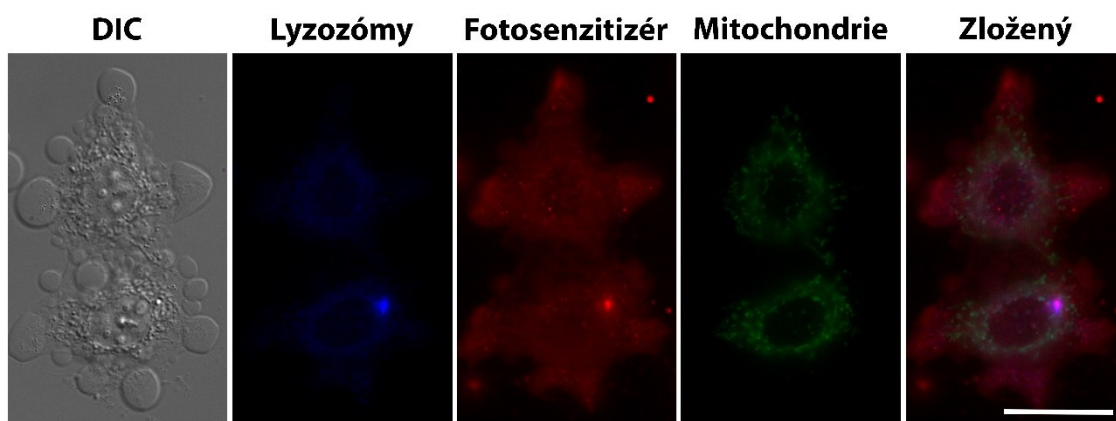
Pozorovaním pod fluorescenčným mikroskopom za použitia vhodných filtrov (Cy5, DAPI a FITC) som zisťovala, v ktorých bunkových štruktúrach sa hromadí látka **3** po 1 h inkubácii. Pomocou farebných fluorescenčných sond boli zviditeľnené lyzozómy a mitochondrie, PS má vlastnú červenú fluorescenciu.

V zloženom obrázku vidno fialové stopy, ktoré vznikli prekrytím červenej stopy PS a modrej stopy lyzozómov, v ktorých sa akumuluje (Obr. 18). Experimentálne zistená lokalizácia PS 3 v lyzozómoch je podľa literatúry v súlade s lokalizáciou iných anionických PS.⁸



Obrázok 18 Subcelulárna lokalizácia látky 3 a morfológia buniek pred ožiarením, mierka zodpovedá 50 μm

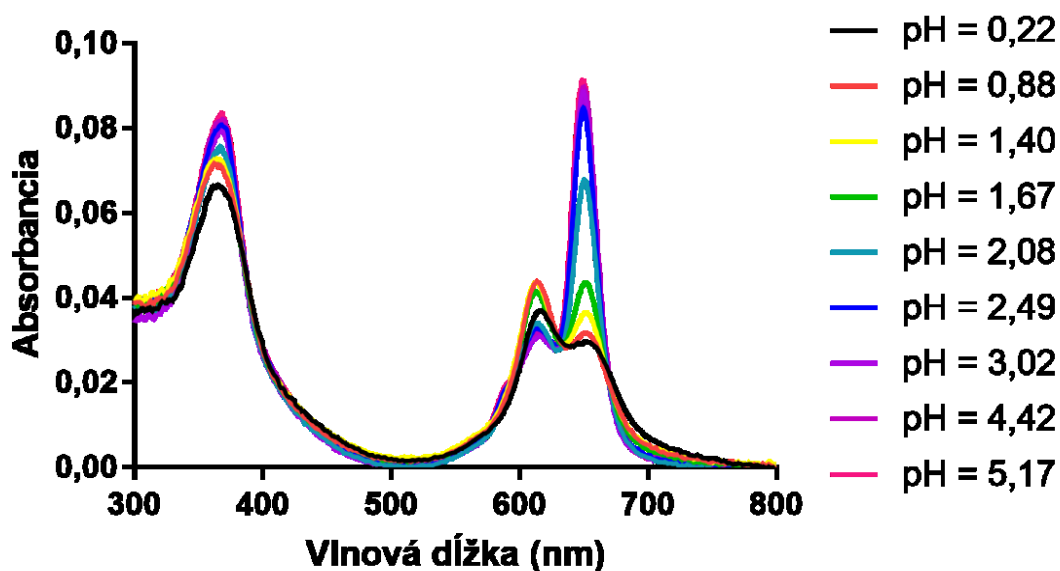
Po ožiarení došlo k usmrteniu buniek, pri ktorom došlo k prasknutiu lyzozómov a vyliatiu ich obsahu vrátane PS do cytoplazmy, čo sa prejavilo objavením jeho farebnej stopy v celej cytoplazme (Obr. 19). Na prvom obrázku zľava je vidieť morfológické zmeny, ktoré nastali po ožiarení buniek – došlo k tvorbe rozsiahlych pľuzgierovitých štruktúr membrány (tzv. nekrotické bleby), strate vláknitej štruktúry mitochondrií a vymiznutiu signálu z lyzozómov.



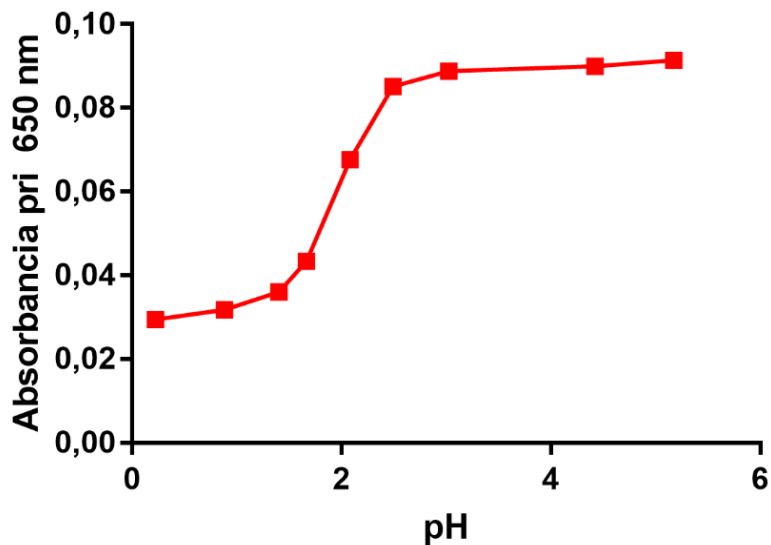
Obrázok 19 Subcelulárna lokalizácia látky 3 a morfológické zmeny po ožiarení, mierka zodpovedá 50 μm

5.6 Vplyv pH

Dôvodom syntézy látky **3** bolo získanie derivátu AzaPc so zápornými nábojmi na periférii, vďaka ktorým by sa jednotlivé molekuly mali odpudzovať a látka by mala byť vo vode monoména. Preto je z hľadiska fotodynamickej aktivity dôležité, aby látka bola na mieste účinku prednostne v ionizovanej forme a to, či je látka v ionizovanej alebo neionizovanej forme, je silne závislé od pH. Keďže látka **3** sa hromadí a teda aj pôsobí hlavne v lyzozómoch, kde je kyslé pH, zaujímala som sa o vplyv pH v rozmedzí 0,22 – 5,17 na ionizáciu a teda aj monomerizáciu látky vo vode. V silne kyslom pH = 0,22 bola podľa absorpčných spektier látka prakticky úplne agregovaná. Z absorpčných spektier taktiež vyplynulo, že s rastúcim pH rastie absorbancia pri 650 nm a teda dochádza k monomerizácii látky (Obr. 20, 21). Pri pH = 2 je 50 % látky **3** v agregovanej a 50 % v monoménej forme. Pri pH lyzozómov (4,5 – 5,0) je látka z väčšej časti monoména (Obr. 21). Kyslé prostredie lyzozómov by teda nemalo výrazne negatívne ovplyvňovať jej fotodynamickú účinnosť.



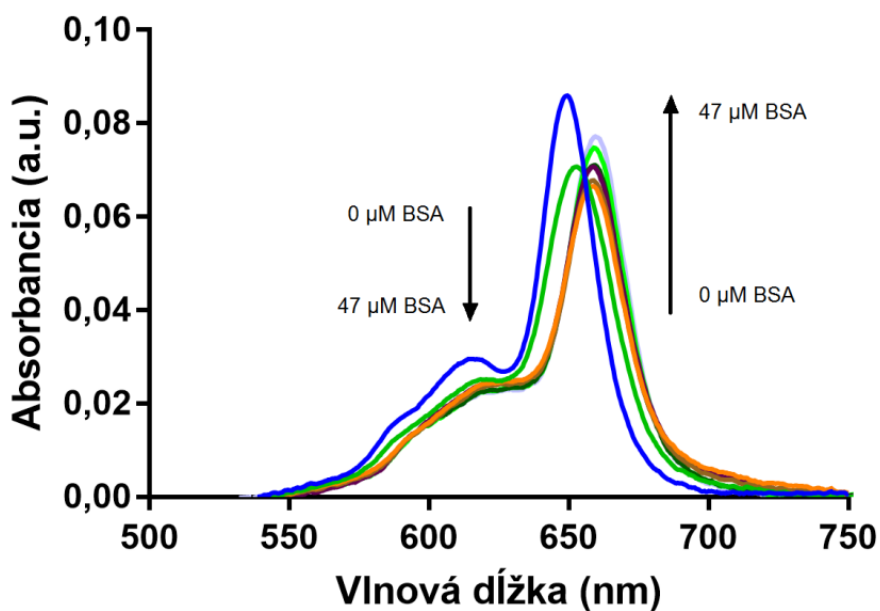
Obrázok 20 Závislosť absorbancie na pH



Obrázok 21 Absorbancia v Q-páse v závislosti na pH

5.7 Vplyv bielkovín

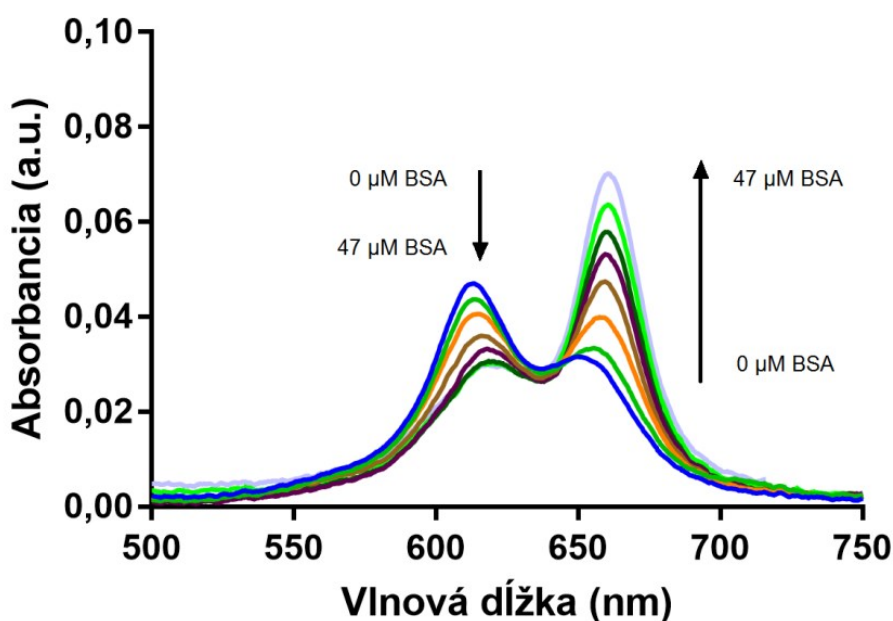
Keďže testy na bunkách naznačili, že interakcie PS s albumínom (BSA) by mohli byť príčinou jeho nízkej fotodynamickej účinnosti v SCM, zisťovala som vplyv BSA na absorpčné a fluorescenčné spektrá.



Obrázok 22 Zmeny v absorpčnom spektre látky 3 vo vode po prídavku BSA

Absorpčné spektrum látky **3** je vo vode iba čiastočne agregované. Pri postupnom pridávaní BSA dochádza k väzbe molekúl fotosenzitizéru na albumín, čo sa prejavuje posunom spektra k vyšším vlnovým dĺžkam (Obr. 22).

Oproti tomu absorpčné spektrum látky **3** v PBS je na začiatku značne agregované a s rastúcou koncentráciou BSA dochádza k monomerizácii, ale ani pri najvyššej koncentrácii BSA ($47 \mu\text{M}$) nie je spektrum úplne monomérmé (Obr.23). Porovnaním týchto dvoch spektier (Obr. 22, 23) je vidieť značný vplyv solí z PBS.

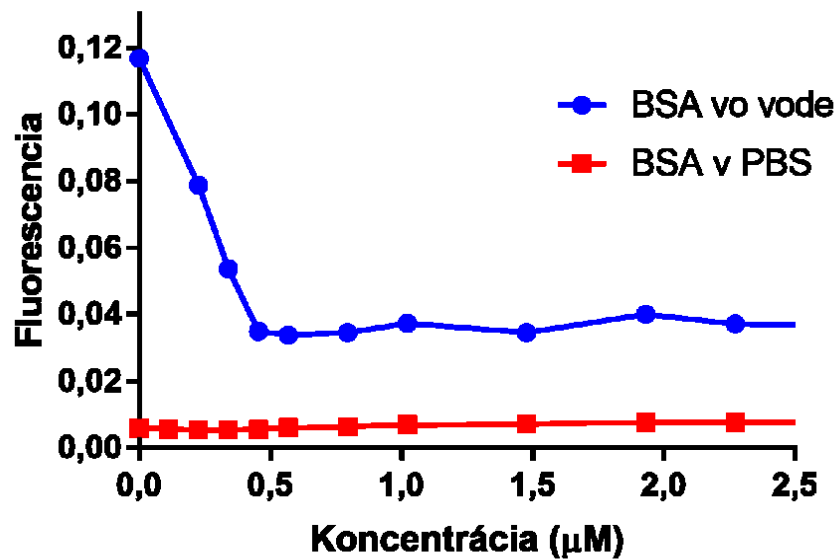


Obrázok 23 Zmeny v absorpčnom spektre látky **3** v PBS po prídavku BSA

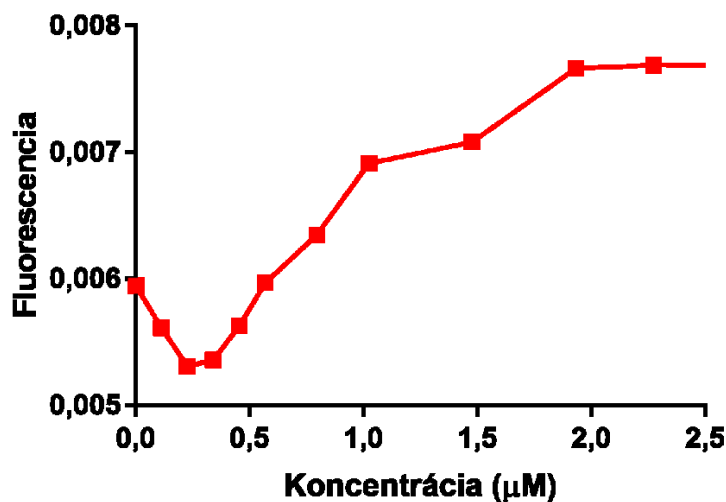
Okrem vplyvu prídavku BSA na absorpčné spektrum roztoku látky **3** s koncentráciou $1 \mu\text{M}$ som zisťovala aj jeho vplyv na kvantové výťažky fluorescence. Z grafov (Obr. 24) závislosti fluorescence na prídavku BSA je zrejmé, že v prípade vody došlo k interakcii v pomere 2:1 a že dochádza k silnému zhášaniu excitovaných stavov. V prípade PBS došlo taktiež k naviazaniu približne dvoch molekúl látky **3** na 1 molekulu albumínu, ale navyše dochádza k dvom rôznym javom s protichodným vplyvom na produkciu fluorescence. Jednak dochádza k monomerizácii fotosenzitizéru (viď absorpčné spektrá, Obr. 23), v dôsledku čoho možno očakávať vyššiu produkciu fluorescence a jednak dochádza u fotosenzitizéru, ktorý je naviazaný

na albumíne, k zhášaniu fluorescence. Výsledná produkcia fluorescence je daná sčítaním oboch týchto efektov a to, či s prídavkom BSA rastie alebo klesá, závisí od toho, ktorý z efektov preváži.

Počiatočná fluorescencia látky **3** v PBS je podstatne nižšia než vo vode, keďže látka je kvôli vzájomným interakciám s PBS značne agregovaná. Pri prvých prídavkoch BSA preváži efekt zhášania fluorescence, po ďalších prídavkoch však prevládne efekt monomerizácie a s tým spojený nárast fluorescence (Obr. 24, 25).



Obrázok 24 Závislosť fluorescence na koncentrácii BSA vo vode a v PBS



Obrázok 25 Závislosť fluorescence na koncentrácii BSA v PBS

6 Záver

- Bol nasyntetizovaný anionický PS (**3**), ktorý je vďaka elektostatickým odpudivým silám sulfonátových skupín rozpustný vo vode. Na základe absorpčných spektier však vo vode čiastočne agreguje.
- V bezsérovom médiu (SFM) bola otestovaná jeho fotodynamická aktivita (fototoxicita $EC_{50} = 0,938 \pm 0,388 \mu\text{M}$ a toxicita v tme $TC_{50} > 1000 \mu\text{M}$), ktorá je porovnateľná s inými anionickými PS uvádzanými v literatúre.
- V médiu obsahujúcom sérum (SCM) je kvôli väzbe na plazmatické bielkoviny prakticky neúčinný ($EC_{50} > 100 \mu\text{M}$).
- Ako hlavné bunkové štruktúry, v ktorých sa daný PS akumuluje, boli určené lyzozómy. Tie po ožiarení praskajú a ich obsah sa vylieva do cytoplazmy.
- Väzbou PS na albumín dochádza k zhášaniu excitovaných stavov, ale u agregovaného PS zároveň dochádza aj k monomerizácii a tým k zvýšeniu fluorescencie.

7 Zoznam citovanej literatúry

- ¹ DONZELLO, M. P. et al. Tetrapyrizinoporphyrazines and their metal derivatives. Part I: Synthesis and basic structural information. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *309*, 107-179.
- ² JUARRANZ, Á. et al. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin. Transl. Oncol.* **2008**, *10*, 148-154.
- ³ KUBIAK, M. et al. Cell reactions and immune responses to photodynamic therapy in oncology. *Postepy. Hig. Med. Dosw.* **2016**, *70*, 735-742.
- ⁴ ACKROYD, R. et al. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74*, 656-669.
- ⁵ CELLI, J. P. et al. Imaging and Photodynamic Therapy: Mechanisms, Monitoring and Optimization. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2795-2838.
- ⁶ LI, X. et al. Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years. *Coord. Chem. Rev.* **2017**, in press.
- ⁷ ALLISON, R. R.; MOGHISSI, K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin. Endosc.* **2013**, *46*, 24-29.
- ⁸ ALLISON, R. R.; MOGHISSI, K. Oncologic photodynamic therapy: Clinical strategies that modulate mechanisms of action. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2013**, *10*, 331-341.
- ⁹ BERG, K. et al. Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications. *J. Microsc.* **2005**, *218*, 133-147.
- ¹⁰ YOON, I. et al. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clin. Endosc.* **2013**, *46*, 7-23.
- ¹¹ DĄBROWSKI, J. M. et al. Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *325*, 67-101.
- ¹² ONISZCZUK, A. et al. The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *83*, 912-929.
- ¹³ AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *Ca-Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 250-281.
- ¹⁴ BRODIN, N. P. et al. Photodynamic Therapy and Its Role in Combined Modality Anticancer Treatment. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2015**, *14*, 355-368.

-
- ¹⁵ OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem. Photobiol., B* **1997**, *39*, 1-18.
- ¹⁶ OLEINICK, N. L. et al. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 1-21.
- ¹⁷ GARG, A. D. et al. Autophagy, a major adaptation pathway shaping cancer cell death and anticancer immunity responses following photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14*, 1410-1424.
- ¹⁸ ALLISON, R. R.; SIBATA, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2010**, *7*, 61-75.
- ¹⁹ DETTY, M. R. et al. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3897-3915.
- ²⁰ O'CONNOR, A. E. et al. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85*, 1053-1074.
- ²¹ ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *J. Mater. Sci.* **2013**, *6*, 817-840.
- ²² ZHANG, J. et al. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharm. Sin. B* **2018**, *8*, 137-146.
- ²³ JUZENIENE, A. Chlorin e6-based photosensitizers for photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2009**, *6*, 94-96.
- ²⁴ KOSTKA, M. et al. Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol., A* **2006**, *178*, 16-25.
- ²⁵ MUSIL, Z. et al. Synthesis and singlet oxygen production of azaphthalocyanines bearing functional derivatives of carboxylic acid. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2006**, *10*, 122-131.
- ²⁶ NOVAKOVA, V. et al. Ultrafast intramolecular charge transfer in tetrapyrrolineporphyrins controls the quantum yields of fluorescence and singlet oxygen. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 2555-2563.
- ²⁷ FUKUDA, H. et al. Aminolevulinic acid: From its unique biological function to its star role in photodynamic therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2005**, *37*, 272-276.
- ²⁸ TRACHTENBERG, J. et al. Vascular Targeted Photodynamic Therapy With Palladium-Bacteriopheophorbide Photosensitizer for Recurrent Prostate Cancer Following Definitive Radiation Therapy: Assessment of Safety and Treatment Response. *J. Urol.* **2007**, *178*, 1974-1979.

-
- ²⁹ <https://newdrugapprovals.org/?s=padeliporfin&submit> [stiahnuté 2.5.2018]
- ³⁰ ROCHA, L. B. et al. Intravenous Single-Dose Toxicity of Redaporfin-Based Photodynamic Therapy in Rodents. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 29236-29249.
- ³¹ <https://www.luzitin.pt/luz11.php> [stiahnuté 25.4.2018]
- ³² ROTHKOPF, H. W. et al. Di- und Tetracyanpyrazine. *Chem. Ber.* **1975**, *108*, 875–886.
- ³³ ZHAO, Y. et al. Dicyanopyrazine-derived push–pull chromophores for highly efficient photoredox catalysis. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 30062-30067.
- ³⁴ MØRKVED, E. H. et al. Azaphthalocyanines with extended conjugation through heteroaryl and aryl substituents. Photochemical and photophysical properties. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2007**, *11*, 130-138.
- ³⁵ SHISHKIN, V. N. et al. Synthesis and Some Properties of Transition Metal Complexes with Octa(sulfofenyl)tetrapyrazinoporphyrazine. *Russ. J. Coord. Chem.* **2005**, *31*, 516-520.
- ³⁶ MACHACEK, M. et al. Anionic hexadeca-carboxylate tetrapyrazinoporphyrazine: synthesis and in vitro photodynamic studies of a water-soluble, non-aggregating photosensitizer. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 10064-10077.
- ³⁷ MACHACEK, M. et al. Tetra(3,4-pyrido)porphyrazines Caught in the Cationic Cage: Toward Nanomolar Active Photosensitizers. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 9443-9456.