

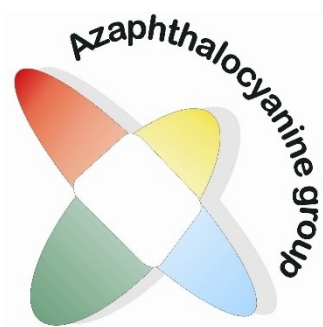
UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV



Syntéza nesymetrických kationických ftalocyaninů pro fotodynamickou terapii

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Filip Kostelanský



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

HRADEC KRÁLOVÉ 2017

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

V Hradci Králové

---

podpis

## **POĎAKOVANIE**

Rád by som sa na tomto mieste poďakoval môjmu školiteľovi doc. PharmDr. Petrovi Zimčíkovi, Ph.D. za odborné vedenie mojej práce. Rovnako by som sa rád poďakoval doc. PharmDr. Veronike Novákovej, Ph.D. za pomoc a odborné rady. Chcel by som sa poďakovať aj ostatným členom AzaPc Group, Mgr. Antonínovi Cidlinovi, Mgr. Lukášovi Lochmanovi, Mgr. Jánovi Kollárovi.

Za zmeranie dát ďakujem pracovníkom: Doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc. (NMR spektrá), Iva Vencovská (IČ spektrá), Věnceslava Hronová (elementárne analýzy), PharmDr. Juraj Lenčo, Ph.D. (MS spektrá), Mgr. Miloslav Macháček, Ph.D. (biologické testy).

Za finančnú podporu chcem poďakovať projektu SVV 260 401 a Grantovej Agentúre UK: číslo grantu 1060216.

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát **Filip Kostelanský**

Školitel **Doc. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.**

Názov diplomovej práce Syntéza nesymetrických kationických ftalocyanínů  
pro fotodynamickou terapii

Fotodynamická terapia je liečebná metóda nádorových aj nenádorových ochorení. Využíva svetlo, kyslík a fotosenzitizér na liečbu týchto ochorení. Fotosenzitizér absorbuje energiu svetla a vyprodukuje singletový kyslík. Singletový kyslík napáda bunkové štruktúry, napr. bunkovú membránu, lyzozómy, mitochondrie atď. a spôsobuje ich poškodenie vedúce k bunkovej smrti. Predchádzajúce štúdie v našej skupine odhalili, že ftalocyaníny s metylovanými 2,6-bis[(1*H*-imidazol-1-yl)metyl]-4-metylfenoxy substituentmi majú excelentnú fotodynamickú aktivitu proti HeLa bunkám a nízku toxicitu. Preto sme sa rozhodli syntetizovať sériu podobných látok nesúcich tento substituent, ale s amfifílnym charakterom. Takéto látky majú zaujímavé priestorové usporiadanie, vďaka ktorému sú potenciálne schopné sa začleniť do lipidovej dvojvrstvy a dvojvláknovej DNA. Syntéza začala kondenzačnou reakciou 2,6-bis(hydroxymetyl)-4-metylfenolu a imidazolu, ktorou sme získali 2,6-bis[(1*H*-imidazol-1-yl)metyl]-4-metylfenol. V nasledujúcej reakcii bol tento fenol podrobený nukleofilnej substitúcii s 4,5-dichlórftalonitrilom, ktorou sme získali príslušný ftalonitrilový prekurzor pre cyklotetramerizáciu. Ko-cyklotetramerizačnou reakciou s ftalonitrilom, alebo 4,5-bis(*tert*-butylsulfanyl)ftalonitrilom a iniciátorom butanolátom horečnatým sme získali príslušné nesymetrické horečnaté komplexy. Horečnaté komplexy boli prevedené na nekovové formy reakciou s kyselinou *para*-toluénsulfónovou a následne bol chelátovaný zinočnatý kation. Nakoniec boli dusíky v imidazolových cykloch alkylované metyljodidom. Potom bola overovaná interakcia kvarternizovaných ftalocyanínov s lipidovou dvojvrstvou na unilamelárnych lipozómoch. Fotodynamická aktivita a toxicita kvarternizovaných ftalocyanínov boli testované na HeLa bunkách.

## ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department	Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control
Candidate	<b>Filip Kostelanský</b>
Supervisor	<b>Doc. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.</b>
Title of Thesis	Synthesis of Unsymmetrical Cationic Phthalocyanines for Photodynamic Therapy

The photodynamic therapy is a curative method of cancerous and non-cancerous diseases. It uses light, oxygen and photosensitizer to destroy the cancer cells. Photosensitizer absorbs energy of light and produces singlet oxygen. Singlet oxygen attacks cellular structures like cellular membrane, lysosomes, mitochondria, etc. causing thus damage leading to cell death. Previous studies revealed that zinc phthalocyanine with methylated 2,6-bis[(1*H*-imidazol-1-yl)methyl]-4-methylphenoxy substituents had excellent photodynamic activity against HeLa cells and low toxicity. That is why we decided to synthesize a series of similar compounds bearing this substituent but with rather amphiphilic character. They bear interesting spatial features to be potentially incorporated into lipid bilayer or a double stranded DNA. The synthesis started by condensation of 2,6-bis(hydroxymethyl)-4-methylphenol and imidazole to obtain 2,6-bis[(imidazol-1-yl)methyl]-4-methylphenol. In the following reaction, this phenol was subjected to nucleophilic substitution with 4,5-dichlorophthalonitrile to obtain the corresponding phthalonitrile precursor for cyclotetramerization. Its co-cyclotetramerization with phthalonitrile or 4,5-bis(*tert*-butylsulfanyl)phthalonitrile initiated by magnesium butoxide resulted in the corresponding magnesium complexes. The magnesium complexes were converted into metal-free phthalocyanines by treatment with *para*-toluenesulfonic acid and subsequently zinc cation was incorporated to the molecule centre by zinc acetate. At the end, imidazole nitrogen was alkylated with methyl iodide. Interaction of quaternized compounds and lipid bilayer was tested at unilamellar liposomes. The quaternized compounds were tested on HeLa cells for their photodynamic activity and inherent dark toxicity.

## OBSAH

1. ZOZNAM SKRATIEK.....	8
2. CIEĽ PRÁCE.....	10
3. TEORETICKÁ ČASŤ .....	12
3.1. Fotodynamická terapia.....	12
3.2. Fotofyzika a fotochémia.....	12
3.3. Mechanizmus fotodynamického účinku.....	15
3.4. Efekt PDT na cievy .....	16
3.5. Imunitná odpoveď vyvolaná PDT.....	16
3.6. Fotosenzitizéry.....	17
3.6.1. Ideálny fotosenzitizér .....	17
3.6.2. Generácie fotosenzitizérov .....	18
3.6.3. Klinicky používané PS .....	19
3.6.4. V súčasnosti skúmané ftalocyanínové PS.....	22
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	31
4.1. Príprava 2,6-bis[(1H-imidazol-1-yl)metyl]-4-metylphenolu (1) .....	31
4.2. Príprava 5,6-bis{2,6-bis[(1H-imidazol-1-yl)metyl]-4-metylphenoxy}pyrazín-2,3-dikarbonitrilu (2) .....	32
4.3. Príprava 4,5-bis{2,6-bis[(1H-imidazol-1-yl)metyl]-4-metylphenoxy}ftalonitrilu (3).....	33
4.4. Príprava 9,10,16,17,23,24-hexakis(terc-butylsulfanyl)-2,3-bis{2,6-bis[(1H-imidazol-1-yl)metyl]-4-metylphenoxy}-1,4-azaftalocyanínu (6) .....	33
4.5. Príprava 9,10,16,17,23,24-hexakis(terc-butylsulfanyl)-2,3-bis{2,6-bis[(1H-imidazol-1-yl)metyl]-4-metylphenoxy}ftalocyanináto horečnatého komplexu (10Mg) ..	34
4.6. Príprava 2,3-bis{2,6-bis[(1H-imidazol-1-yl)metyl]-4-metylphenoxy}ftalocyanináto horečnatého komplexu (11Mg) .....	35
4.7. Príprava 9,10,16,17,23,24-hexakis(terc-butylsulfanyl)-2,3-bis{2,6-bis[(1H-imidazol-1-yl)methyl]-4-metylphenoxy}ftalocyanínu (10H) .....	35
4.8. Príprava 2,3-bis{2,6-bis[(1H-imidazol-1-yl)methyl]-4-metylphenoxy}ftalocyanínu (11H) .....	36
4.9. Príprava 9,10,16,17,23,24-hexakis(terc-butylsulfanyl)-2,3-bis{2,6-bis[(1H-imidazol-1-yl)methyl]-4-metylphenoxy}ftalocyanináto zinočnatého komplexu (10Zn)..	37
4.10. Príprava 2,3-bis{2,6-bis[(1H-imidazol-1-yl)methyl]-4-metylphenoxy}ftalocyanináto zinočnatého komplexu (11Zn) .....	37
4.11. Príprava jodidu 9,10,16,17,23,24-hexakis(terc-butylsulfanyl)-2,3-bis{2,6-bis[(3-metyl-1H-imidazólium-1-yl)metyl]-4-metylphenoxy}ftalocyanináto zinočnatého komplexu (12) .....	38
4.12. Príprava jodidu 2,3-bis{2,6-bis[(3-metyl-1H-imidazólium-1-yl)metyl]-4-metylphenoxy}ftalocyanináto zinočnatého komplexu (13) .....	39
4.13. Reakcia 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(terc-butylsulfanyl)ftalocyanináto zinočnatého komplexu (14) s metylačným činidlom (CH <sub>3</sub> I).....	40
4.14. Príprava bunkovej línie (HeLa) a zásobného roztoku látky 12 a 13 .....	40

4.15. Meranie cytotoxicity .....	40
4.16. Určenie subcelulárnej lokalizácie.....	41
4.17. Príprava lipozómov .....	42
4.18. Meranie absorbných spektier roztoku látky 13 po postupnom pridávaní roztoku lipozómov.....	42
5. DISKUSIA .....	43
5.1. Cyklotetramerizačné reakcie .....	44
5.2. Alkylácia periférne viazaných imidazolových skupín .....	47
5.3. Fotofyzikálne merania – Vis spektrofotometria.....	50
5.4. Interakcia látky 13 s lipozómami .....	51
5.5. Biologické testy.....	51
6. ZÁVER .....	54
7. POUŽITÁ LITERATÚRA .....	55

## 1. ZOZNAM SKRATIEK

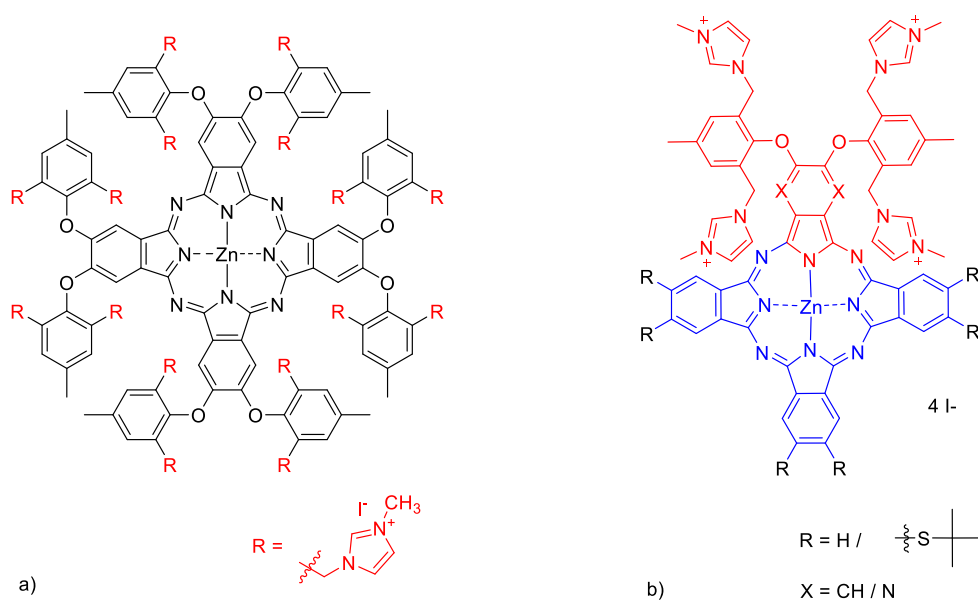
3T3	bunková línia nemalígneho myšieho fibroblastu
5-ALA	kyselina 5-aminolevulová
A431	bunková línia epidermálneho karcinómu
ATF	aminoterminálny fragment
BON	bunková línia karcinómu pankreasu
BuOH	butanol
CHO	bunková línia vaječníku čínskeho škrečka
DAMPs/CDAMPs	molekulové vzory asociované s poškodením / poškodením bunky
DLI	interval medzi podaním PS a ožarovaním (drug-to-light interval)
DMF	dimetylformamid
DMSO	dimetylsulfoxid
EAC	etylacetát
EGF	epiteliálny rastový faktor
EtOH	etanol
HCT-116	bunková línia kolorektálneho karcinómu
HeLa	bunková línia ľudského cervikálneho karcinómu
HELF	bunková línia pľúcneho fibroblastu ľudského embrya
HpD	derivát hematoporfyrínu
HT29	bunková línia ľudského kolorektálneho adenokarcinómu
H1299	bunková línia nemalobunkového karcinómu pľúc
H22	bunková línia hepatocelulárneho karcinómu
IC <sub>50</sub>	stredná inhibičná koncentrácia
IL-6, -12, -13	interleukín-6, -12, -13
ISC	medzisystémový prechod (intersystem crossing)
KB	bunková línia pozitívna na keratín odvodená od HeLa bunkovej línie
Kyse-70/-140	bunková línia skvamózneho karcinómu pažeráku
MCF-7	bunková línia ľudského adenokarcinómu prsníka
MeOH	metanol
NIH-3T3	bunková línia myšieho embryonálneho fibroblastu



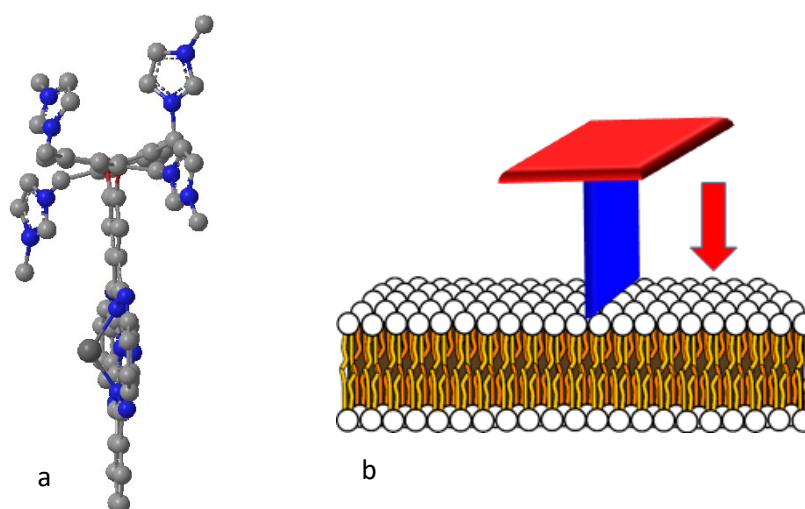
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
NR	neutrálna červeň
$O_2(^1\Delta_g)$	singletový kyslík
$O_2(^1\Sigma_g)$	excitovaný singletový kyslík
OE-33	adenokarcinóm pažeráku
PBS	fosfátový pufor
Pc	ftalocyanín (phthalocyanine)
PDT	fotodynamická terapia (photodynamic therapy)
PpIX	protoporfyrín IX
PS	fotosenzitizér (photosensitizer)
$R_f$	retenčný faktor
ROS	reaktívne formy kyslíka
SiPc	kremičitý ftalocyanín
SK-MEL-28	bunková línia ľudského melanómu
TEA	trietylamín
THF	tetrahydrofurán
TLC	tenkovrstevná chromatografia
U937	bunková línia histiocytického lymfómu
uPAR	receptor aktivátoru plazminogénu urokinázového typu (urokinase-type plasminogen activator receptor)
VEGF	vaskulárny endoteliálny rastový faktor
ZnPc	zinočnatý ftalocyanín

## 2. CIEĽ PRÁCE

Táto práca sa zaoberá syntézou asymetrických amfifilných ftalocyanínov a ich aza-analógov. Pri syntéze sme čerpali z predchádzajúcej práce zaoberajúcej sa hydrofilnými ftalocyanínmi obsahujúcimi na periférii viazané kvarternizované imidazolové skupiny<sup>1</sup> (Obr. 1 a)), ktoré vykázali na bunkách veľmi dobrú fotodynamickú aktivitu. Naším cieľom bolo syntetizovať amfifilné deriváty (Obr. 1 b)), ktoré by boli schopné, vďaka svojmu vhodnému priestorovému usporiadaniu (Obr. 2 a)), interagovať s membránou bunkových organel (Obr. 2 b)), a tak umožniť bližšiu interakciu singletového kyslíka s miestom účinku.

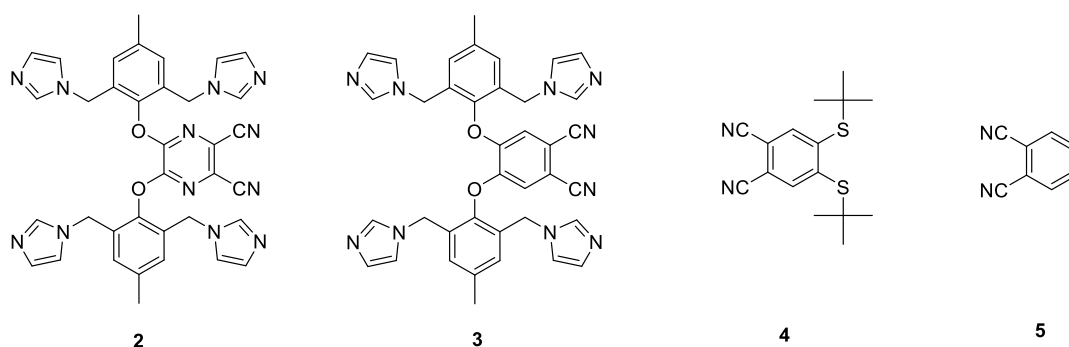


Obr. 1 a) hydrofilný ftalocyanín s kvarternizovanými imidazolovými skupinami b) zamýšľané amfifilné deriváty ftalocyanínov



Obr. 2 a) 3D model finálnej látky, b) interakcia s biomembránou

Súčasne sme očakávali, že by bolo možné využiť lipozómy ako vhodné nosiče pre takéto látky. Na prípravu týchto derivátov sme sa rozhodli použiť dva typy prekursorov vychádzajúcich štruktúrne z vyššie spomenutého úspešného derivátu (Obr. 1 a)). Tieto prekursorzy boli odvodené od 2,6-bis[(1*H*-imidazol-1-yl)metyl]-4-metylfenolu (**1**). Pyrazínový a ftalonitrilový prekursor, látky **2** a **3**, predstavovali hydrofilnú zložku. Do cyklotetramerizačných reakcií sme použili ďalšie dva prekursorzy predstavujúce lipofilnú zložku, konkrétne 4,5-bis(*tert*-butylsulfanyl)ftalonitril (**4**) a ftalonitril (**5**) (Obr. 3).



Obr. 3 Hydrofilné (**2**, **3**) a lipofilné (**4**, **5**) prekursorzy pre cyklotetramerizačné reakcie

### 3. TEORETICKÁ ČASŤ

#### 3.1. *Fotodynamická terapia*

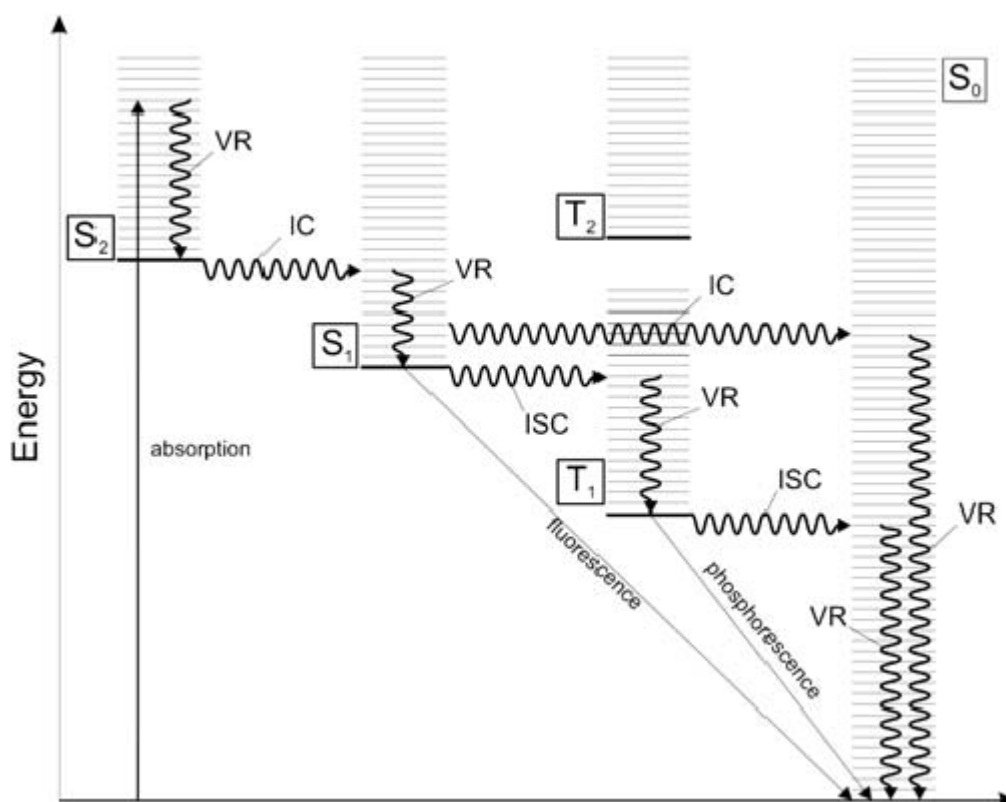
Fotodynamická terapia (photodynamic therapy, PDT) je úspešná, klinicky schválená a minimálne invazívna<sup>2</sup> liečebná metóda, ktorú možno použiť nielen proti malígnym bunkám. Pôsobí selektívne, cytotoxickou aktivitou na nežiaduce bunky. V roku 1993 bol štátnymi autoritami Kanady, Holandska, Nemecka, Francúzska, Japonska a USA schválený prvý fotosenzitizér (photosensitizer, PS) na PDT u pacientov v počiatočnom alebo pokročilom štádiu rakoviny pľúc, tráviaceho a urogenitálneho traktu.<sup>3</sup> Vývoj v oblasti PDT napredoval a dnes je PDT možné využiť aj pri iných typoch rakoviny, napr. v oftalmológii,<sup>4</sup> dermatológii,<sup>5,6</sup> gynekológii,<sup>7,8</sup> gastroenterológii,<sup>9,10,11</sup> neurológii,<sup>12</sup> a v ďalších.<sup>13</sup> V súčasnosti sú predmetom výskumu aj mimo-onkologické aplikácie PDT, napr. liečba mykotických ochorení,<sup>14,15</sup> inaktivácia rezistentných kmeňov baktérií<sup>16</sup> a liečba vírusových ochorení.<sup>17,18</sup>

PDT pozostáva z troch základných komponentov: svetla, PS a kyslíka<sup>3</sup> Sami o sebe sú tieto komponenty netoxické alebo toxické len minimálne. Spoločne však vyvolávajú fotochemickú reakciu, ktorá vedie k produkcii vysoko reaktívneho produktu, singletového kyslíku.<sup>2</sup> Klinicky používané PS je možné aplikovať dvoma spôsobmi, intravenózne alebo topicky. Iba jedna klinicky používaná látka nie je sama o sebe PS. Táto látka je prekursorom PS vznikajúceho *in situ*.<sup>13</sup> PS sa určitú dobu po aplikácii kumuluje v nádorovom tkanive, ktoré má zvýšené anabolické procesy,<sup>19</sup> permeabilitu ciev a produkciu vaskulárneho endoteliálneho rastového faktoru (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF).<sup>20</sup> Následná lokálna aplikácia svetelného žiarenia umožňuje selektívne zasiahnuť len postihnuté tkanivo. Tým je u PDT dosiahnutá vysoká selektivita, nízka prevalencia systémových nežiaducich účinkov a minimálne poškodenie okolitého tkaniva.

#### 3.2. *Fotofyzika a fotochémia*

Molekula PS je v základnom stave charakterizovaná spárovanými elektrónmi tak, ako drvivá väčšina látok.<sup>21</sup> Spárované elektróny majú celkový spin rovný nule a spinovú multiplicitu rovnú jednej (singlet). Spárované elektróny v tejto

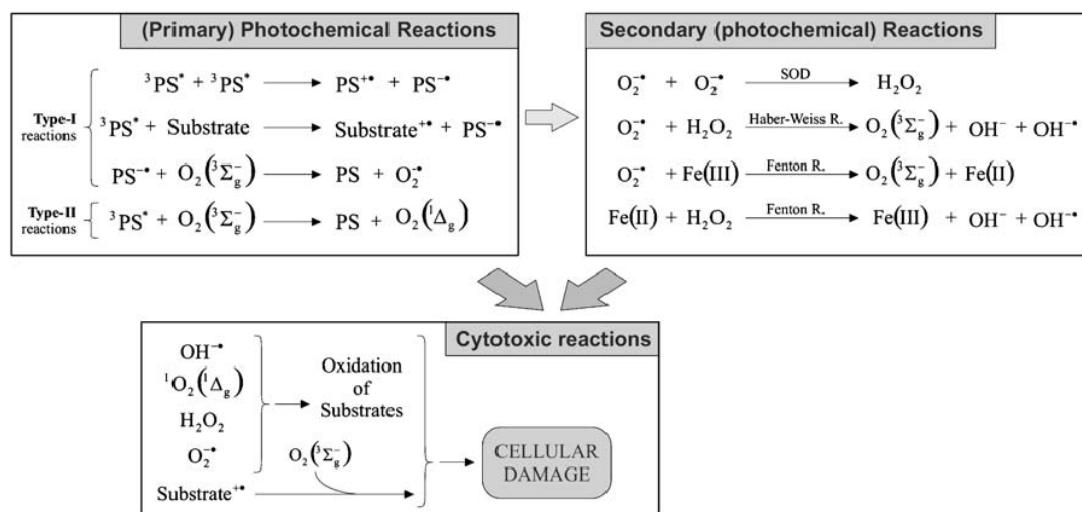
konfigurácii obsadzujú orbitály s najnižšou možnou energiou. Táto konfigurácia sa nazýva základný stav, označovaný ako  $S_0$ . Molekula kyslíka má v základnom, energeticky najnižšom stave, dva nespárované elektróny s paralelnými spinmi a multiplicitu spinu rovnú trom (triplet).<sup>21</sup> Absorpciou svetelného kvanta s vhodnou energiou sa PS dostáva do excitovaného singletového stavu  $S_n$ . Jeden zo spárovaných elektrónov prechádza do voľného, energeticky bohatšieho orbitálu. Každý excitovaný stav je z energetického hľadiska menej preferovaný ako stav základný.<sup>22</sup> Preto molekula excitovaného PS pomerne rýchlo prechádza vibračnou relaxáciou do najnižšieho singletového excitovaného stavu  $S_1$ .



Obr. 4 Jablonského diagram základných fotofyzikálnych procesov. IC internal conversion – vnútorná konverzia, ISC intersystem crossing – medzisystémový prechod,  $S_n$  singlet states – singletové stavy,  $T_n$  triplet states – tripletové stavy. Prevzaté z: Plaetzer, K, et al, *Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects*, *Lasers Med. Sci.*, 2009, 24, 259–268

Tento prechod je sprevádzaný uvoľnením tepla. Excitovaný PS sa potom dostáva do základného stavu  $S_0$  vyžiarovaním sekundárneho fotónu (fluorescencia, Obr. 4) alebo uvoľnením tepla. PS môže zo singletového  $S_1$  stavu prejsť do izoenergetického tripletového stavu  $T_1$ , v ktorom sú dva nespárované elektróny s rovnakými spinmi.<sup>22</sup> Tento proces sa nazýva medzisystémovým prechodom (intersystem crossing, ISC). Pri tomto prechode dochádza k porušeniu pravidla o nemeniacom sa spine pri zmene

elektrónového stavu. Pri prechode PS z  $T_1$  stavu do  $S_0$  stavu môže dôjsť k vyžiareniu elektromagnetického kvanta (fosforescencia). Tripletové stavy sú charakterizované relatívne dlhou dobou života, preto môže dochádzať k bimolekulárnym interakciám ako alternatíve fosforescencie. PS v  $T_1$  stave môže indukovať chemické zmeny okolitých molekúl. To sa deje dvoma kompetitívnymi cestami nazvanými typ I a typ II fotochemickej reakcie.<sup>22</sup> V reakcii prvého typu prenáša excitovaný PS elektrón alebo protón na kyslík, alebo iný akceptor,<sup>23</sup> čo vedie k tvorbe aniónového alebo kationového radikálu<sup>24</sup>. Tieto radikály môžu ďalej reagovať s molekulárnym kyslíkom, a tým tvoriť reaktívne formy kyslíka (reactive oxygen species, ROS). V reakcii druhého typu prenáša excitovaný PS energiu priamo na kyslík. Počas tohto procesu dochádza k tvorbe singletového kyslíka (Obr. 5).



Obr. 5 Prehľad fotochemických reakcií počas PDT. Niekoľko typov primárnych a sekundárnych fotochemických reakcií spôsobuje vznik ROS a na dávke závislé poškodenie bunky.  $H_2O_2$ , peroxid vodíku;  $O_2(^1\Delta_g)$ , singletový kyslík (excitovaný stav);  $O_2(^3\Sigma_g^-)$ , tripletový kyslík (základný stav);  $O_2^{\bullet-}$ , superoxidový anión radikál;  $OH^{\bullet}$ , hydroxylový radikál; SOD, superoxid dismutáza;  $X^{\pm}$ , anión/katión;  $X^{\bullet}$ , radikál. Prevzaté z: Plaetzer, K, et al, *Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects*, *Lasers Med. Sci.*, 2009, 24, 259 – 268

Reakcia prvého typu často vedie k produkcii superoxidového anión radikálu. V biologických systémoch nie je superoxidový anión radikál zvlášť reaktívny a sám o sebe nespôsobuje veľké oxidačné poškodenie.<sup>24</sup> Superoxidový anión radikál môže pomocou enzýmu superoxid dismutázy tvoriť peroxid vodíka. Následnou reakciou s ďalším superoxidovým aniónom za katalýzy  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  katiónov vzniká z peroxidu vodíku hydroxidový radikál ( $OH^{\bullet}$ ) a hydroxidový anión ( $OH^-$ ).  $Fe^{3+}$  katión sa reakciou s  $O_2^{\bullet-}$  redukuje na  $Fe^{2+}$  katión, ktorý katalyzuje štiepenie väzby medzi kyslíkmi v  $H_2O_2$ . Pri prenose energie v druhom type reakcie, v závislosti

na rozpúšťadle a dodanej energii, vzniká singletový kyslík  $O_2(^1\Delta_g)$  a excitovaný singletový kyslík  $O_2(^1\Sigma_g)$ . Energeticky bohatší  $O_2(^1\Sigma_g)$  následne prechádza na  $O_2(^1\Delta_g)$ . Singletový kyslík teda vzniká priamo a nepriamo cez energeticky bohatší medziprodukt.<sup>21</sup>

### ***3.3. Mechanizmus fotodynamického účinku***

Výhodou PDT je, že PS môže byť aplikovaný rôznymi cestami, napr. *i.v.* alebo topicky na kožu.<sup>25</sup> Priamy fotodynamický účinok proti nádorovým bunkám je spôsobený interakciou ROS s rôznymi bunkovými štruktúrami a molekulami náchylnými na poškodenie oxidačnými procesmi, rozvratom homeostázy, zmenami lipidového metabolizmu a transportu iónov.<sup>23,25</sup> Účinok závisí na subcelulárnej lokalizácii PS. Fotodynamické poškodenie sa objavuje veľmi blízko subcelulárnej lokalizácie PS, keďže doba života singletového kyslíku je v biologických systémoch veľmi krátka, menej ako 0,04  $\mu$ s (približne 10 – 320 ns). Preto je rádius účinku singletového kyslíka typicky menší ako 0,02  $\mu$ m (približne 10 – 55 nm).<sup>26,27</sup> Z klinicky používaných PS je miestom účinku lipidová membrána u porfimeru, lyzozómy u talaporfinu, mitochondrie u derivátu benzoporfyrínu, mitochondrie a endoplazmatické retikulum u temoporfínu.<sup>28</sup> Dominujúci mechanizmus bunkovej smrti určuje subcelulárna lokalizácia PS, ale aj iné faktory ako celková dávka PDT a doba medzi podaním PS a ožiarení (drug-to-light interval, DLI).<sup>29</sup> PDT vyvoláva tri hlavné cesty bunkovej smrti: apoptózu, nekrózu a s autofágiou spojenú bunkovú smrť.<sup>2</sup>

Apoptóza (programovaná bunková smrť) je komplexný fyziologický proces, ktorý určuje správne fungovanie tela prostredníctvom eliminácie nežiaducich buniek bez poškodenia ich integrity alebo vyvolania zápalovej odpovede.<sup>30</sup> Apoptóza môže prebiehať rôznymi cestami, v závislosti na organele zahrnutej v tomto procese.

Nekróza je patologický proces vedúci k strate membránovej integrity a kompletnej degradácii bunky. Dochádza k uvoľneniu bunkového obsahu do medzibunkového priestoru, čo vyvolá silnú imunitnú odpoveď a zápal. Nekróza prebieha nad prahom rezistencie buniek ošetrovaných nefyziologickými zásahmi, čo je často viditeľné po PDT s vysokými svetelnými dávkami a vysokými dávkami PS.

Autofágia je proces degradácie makromolekulárnych komponentov cytoplazmy a organel, ktoré sú obklopené dvojitoú membránou tvoriacou autofagozóm. Môže byť stimulovaná rôznymi stresovými signálmi, vrátane oxidačného stresu.<sup>31</sup> Úloha autofágie spustenej PDT, v rezistencii alebo vnímavosti voči protinádorovej terapii, je v súčasnosti skúmaná. Je možné, že autofágia nie je vždy cestou bunkovej smrti, ale jej primárna funkcia je cytoprotekcia a podpora bunkového a telesného zdravia.<sup>32</sup>

### **3.4. Efekt PDT na cievy**

Po prvýkrát bolo fotodynamické porušenie tkanivovej mikrocirkulácie pozorované v roku 1963.<sup>33</sup> Mnoho štúdií označuje endotel ako primárny cieľ PDT *in vivo*.<sup>2</sup> PDT vyvoláva široké rozpätie cievnych odpovedí, napr. narušenie krvného toku v podkožnom uroteliálnom tumore, prerušenie hematoencefalickej bariéry v zdravom mozgu myši a poškodenie endoteliálnych buniek a organel v tumore a normálnom tkanive.<sup>34,35</sup> Poškodenie endoteliálnych buniek spôsobí narušenie stavby endotelu a vytvorenie zrazeniny, ktorá blokuje prietok krvi cieľou. To má za následok inhibíciu alebo významnú redukciu zásobovania buniek tumoru živinami. To vedie k neadekvátnej dodávke živín a kyslíka, čo má za následok bunkovú smrť.<sup>23</sup> Liečba tumoru pomocou PDT závisí na vytvorení zóny bez cirkulácie krvi, ktorá zabráni dodávke živín bunkám tumoru, ktoré prežili ožarovanie.<sup>36</sup>

### **3.5. Imunitná odpoveď vyvolaná PDT**

PDT často vyvoláva silnú akútnu zápalovú reakciu, ktorá sa vyznačuje lokalizovaným edémom v mieste ožarovania.<sup>3</sup> Táto reakcia je dôsledkom oxidačného stresu vyvolaného PDT.<sup>2</sup> Hlavnou úlohou akútnej zápalovej reakcie je obnovenie porušenej homeostázy, odstránenie poškodených buniek, následné lokálne hojenie a obnovenie normálnej funkcie tkaniva. Zápal dramaticky mení cievy v tumore. Tie sa stávajú priepustnejšie pre krvné proteíny a proadhezívne pre zápalové bunky.<sup>37</sup> Zápalové bunky (neutrofily, žirné bunky, monocyty – makrofágy) rýchlo a masívne zaplavujú tumor podstupujúci PDT.<sup>3,38</sup> PDT indukuje proteíny akútnej fázy, aktivuje komplement<sup>39</sup> a zvyšuje expresiu interleukínu 6, 12, 13.<sup>39,40,41</sup> Proteíny tepelného šoku sú tiež vo zvýšenej miere exprimované. PDT je zvlášť efektívna v produkcii



molekulových vzorov asociovaných s poškodením/poškodením bunky (DAMPs/CDAMPs), ktoré môžu byť zachytené vrodenu imunitou.<sup>37</sup> Ich hlavnou úlohou je umožniť stimuláciu dendritických buniek.<sup>42,43</sup> Dendritické bunky sú aktivované v odpovedi na PDT.<sup>41</sup> Sú najsilnejšími známymi antigén prezentujúcimi bunkami a sú efektívnym induktorom získanej imunity.<sup>23</sup> Avšak, pozorovaním sa zistilo, že posilnenie protinádorovej imunitnej odpovede inverzne koreluje s veľkosťou liečenej plochy a použitou dávkou svetla.<sup>44</sup> PDT môže, v závislosti na ožarovanej ploche a použitej dávke svetla, imunitnú odpoveď posilniť alebo aj tlmiť.

### ***3.6. Fotosenzitizéry***

PS sú molekuly schopné absorpcie svetla určitej vlnovej dĺžky. Molekula PS sa po absorpcii dostáva do excitovaného stavu a prijatú energiu prenáša na prítomný kyslík. Kyslík sa po prijatí energie od PS dostáva do excitovaného stavu a vytvára svoje reaktívne formy. ROS poškodzujú okolité biomolekuly alebo orgány. Takéto oxidačné poškodenie bunky vedie k apoptóze alebo nekróze bunky.

#### ***3.6.1. Ideálny fotosenzitizér***

- Chemicky čistá látka
- Silná absorpcia v oblasti 600 – 800 nm (priehľadnosť svetla do tkaniva pri tejto vlnovej dĺžke je maximálna a fotóny majú dostatok energie na produkciu ROS)
- Minimálna alebo žiadna toxicita v tme
- Rýchla eliminácia PS z organizmu
- Rápídna klírens z normálneho tkaniva
- Cieľová akumulácia v tkanive tumoru
- Vysoký kvantový výťažok singletového kyslíka
- Fluorescencia – uľahčí identifikáciu postihnutého tkaniva

V súčasnosti sa skúmané PS len približujú vlastnostiam ideálneho PS. Je vynakladaná snaha zlepšiť oblasť cielenia distribúcie PS do nádorového tkaniva a zníženia fotosenzibilizácie kože.

### 3.6.2. *Generácie fotosenzitizérov*

PS sú rozdelené do generácií podľa toho, kedy boli pripravené a aké majú vlastnosti.

#### 1. Generácia

Do prvej generácie patrí na porfyríne založený derivát hematoporfyrínu (hematoporphyrine derivative, HpD) a porfímér. HpD bol pripravený reakciou hematoporfyrínu s 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> v kyseline octovej. Doughertyho výskumnej skupine sa podarilo HpD prečistiť a získali porfímér. Prvá generácia má niekoľko nevýhod:

- nízka absorpcia pri 630 nm, pri tejto vlnovej dĺžke nie je prienik svetla do tkaniva dostatočný (2 – 5 mm)
- neselektívna akumulácia v tkanive tumoru
- fotosenzibilizácia kože pretrvávajúca 2 – 3 mesiace (vďaka neselektívnej akumulácii v kožnom tkanive)
- HpD i porfímér sú ťažko separovateľné zmesi mono-, di-, a oligomérov

#### 2. Generácia

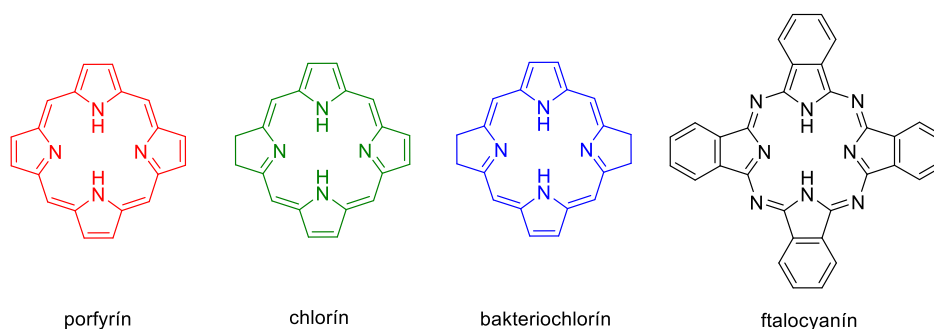
Nevýhody HpD viedli k ďalšiemu výskumu a hľadaniu PS s vhodnejšími vlastnosťami. Hľadali sa najmä PS s absorpčným maximom posunutým k vyšším vlnovým dĺžkam (650 – 850 nm) a vyššou produkciou singletového kyslíka. Do druhej generácie sa radia ftalocyaníny, naftalocyaníny, benzoporfyríny, chloríny, bakteriochloríny, texafyríny, purpuríny, feoforbidy a porfycény. Výhodou týchto PS je možnosť získať ich ako chemicky čisté látky. Fotosenzibilizácia kože je výrazne nižšia ako u prvej generácie.

#### 3. Generácia

Konjugáciou PS druhej generácie s biomolekulami (monoklonálne protilátky, steroidné látky, albumín, transferín, lipoproteíny a i.) vznikli fotosenzitizéry tretej generácie. V súčasnosti sa na cielenie liečiva do tkaniva tumoru využívajú aj špeciálne technologické úpravy, napr. lipozomálna forma alebo nanomateriály. Ich hlavnou výhodou je cielená distribúcia do nádorového tkaniva.

### 3.6.3. *Klinicky používané PS*

V súčasnosti klinicky používané PS patria chemicky do rôznych skupín (porfyríny, chloríny, bakteriochloríny, ftalocyaníny). Všetky sa vyznačujú prítomnosťou tetrapyrolovej štruktúry (Obr. 6).<sup>29</sup>



Obr. 6 Tetrapyrolové štruktúry používaných PS

**Porfimér sodný** (Photofrin<sup>®</sup>) je dobre známy PS prvej generácie. Je to zmes dimérov a oligomérov hematoporfyrínu, v ktorej sú porfyrínové jednotky spojené éterovou, esterovou, alebo C-C väzbou.<sup>45</sup> Prvýkrát bola ohlásená príprava porfiméru Doughertym z hematoporfyrín dihydrochloridu v roku 1983.<sup>46</sup> Absorpčné maximum porfiméru je pri 630 nm. Kvantový výťažok singletového kyslíka vo fosfátovom pufrí (phosphate buffered saline, PBS) je nízky, približne 0,01. Preto sa porfimér podáva v relatívne vysokých dávkach (2 – 5 mg/kg). Podáva sa intravenóznou injekciou. Po nej nasleduje ožarovanie (DLI = 24 – 48 h) v dávke 100 – 200 J.cm<sup>-2</sup>. Prvýkrát bol porfimér schválený štátnou autoritou v Kanade v roku 1993 na profylaktickú liečbu rakoviny močového mechúra. V súčasnosti je porfimér celosvetovo schválený na klinické použitie proti skorému a neskorému štádiu rakoviny pľúc, rakoviny pažeráka, rakoviny močového mechúra, malígnemu, benígnemu a skorému štádiu rakoviny krčka maternice.

**Temoporfín** (Foscan<sup>®</sup>) je PS druhej generácie, ktorý sa kumuluje v nádore vo vysokej koncentrácii a má vynikajúcu fotocytotoxicitu. Temoporfín, ako čistá zlúčenina, bol pripravený v roku 1989 diimidovou redukciou 5,10,15,20-tetrakis(3-hydroxyfenyl)porfyrínu.<sup>47</sup> Absorpčné maximum temoporfínu je pri 652 nm v metanole a kvantový výťažok v prevzdušňovanom metanole je 0,43. Temoporfín sa podáva intravenóznou injekciou, v zmesi vody, polyetylén glykolu 400 a etanolu (5:3:2 – v:v:v). Podávaná dávka je 0,15 mg/kg. DLI je 24 – 96 h a dávka svetla je 5 – 20 J.cm<sup>-2</sup>. Temoporfín je v porovnaní s porfimérom približne 100 × účinnejší pri

použití rovnakej fotodynamickej dávky (dávka liečiva × dávka svetla). Preto je možné používať nižšiu dávku liečiva a kratšie ožarovacie časy na dosiahnutie porovnateľných výsledkov s porfimérom.<sup>48</sup> Temoporfín bol schválený na klinické použitie pri rakovine hlavy a krku.

**Verteporfín** (Visudyne®) má 20 × vyššiu akumuláciu a klírens ako temoporfín. Prvýkrát bol pripravený v roku 1998 Diels-Alderovou reakciou dimetylésteru protoporfyrínu a dimetylésteru acetyléndikarboxylovej kyseliny.<sup>49</sup> Absorpčné maximum verteporfínu v metanole je pri 686 nm a kvantový výťažok v metanole je 0,7. Verteporfín sa podáva intravenóznou injekciou v dávke 0,3 mg/kg. DLI je 3 – 5 h po injekcii a dávka svetla je 50 J.cm<sup>-2</sup> pri 690 nm. Verteporfín sa podáva v lipozomálnej formulácii, ktorá sa akumuluje v neovaskulárnom tkanive oka. Preto bol verteporfín schválený štátnymi autoritami na klinické použitie pri makulárnej degenerácii spojenej s vekom.

**Talaporfín** (Laserphyrin®) je vo vode rozpustný PS druhej generácie s krátkym časom akumulácie v nádorovom tkanive. V porovnaní s porfimérom má rýchlejšiu klírens a lepšiu dostupnosť pre hlbšie položené bunky tkaniva.<sup>45</sup> Bol pripravený amidáciou chlorínu-*e*<sub>6</sub> di-*t*-butylaspartátom pri použití aktivátoru dicyklohexylkarbodiimidu.<sup>50</sup> Absorpčné maximum talaporfínu je pri 654 nm a kvantový výťažok v PBS je 0,77.<sup>51</sup> Talaporfín sa podáva intravenóznou injekciou v nižších dávkach (0,5 – 3,5 mg/kg) ako porfimér. Svetelná dávka je 150 J.cm<sup>-2</sup>. DLI talaporfínu je 4 h po injekcii, a vďaka jeho nízkej kumulácii v kožnom tkanive a rýchlej klírens znižuje riziko kožnej fototoxicity.

**Padeliporfín** (Tookad®) je lipofilný komplex bakteriofeoforbidu s paládiom. Jeho výhodou, v porovnaní s verteporfínom, je rýchla klírens z cirkulácie bez kožnej fototoxicity. Padeliporfín sa vylúči z krvného riečiska za 20 minút, preto je jeho kožná fototoxicita po 1,3 h po podaní injekcie zanedbateľná. Absorpčné maximum padeliporfínu je pri 762 nm. Kvantový výťažok singletového kyslíka je v organickom rozpúšťadle 0,99 vďaka efektu ťažkého atómu (Pd) chelatovaného v centre molekuly. Podávaná dávka (2 – 4 mg/kg) a svetelná dávka sú podobné ako pri porfimére. DLI je 0,5 h po injekcii. Padeliporfín je v súčasnosti registrovaný na klinické použitie pri rakovine prostaty v Mexiku.

**Sulfónovaný hlinitý ftalocyanín** (Photosens<sup>®</sup>) je zmes hlinitých ftalocyanínov nesúcich 2 alebo 3 zvyšky kyseliny sulfónovej. Bol vyvinutý v Rusku (Inštitút všeobecnej fyziky Ruskej akadémie vied). V Rusku je komerčne dostupný od spoločnosti NIOPIC. Absorpčné maximum sulfónovaného hlinitého ftalocyanínu je pri 675 nm. V porovnaní s ostatnými PS druhej generácie má najväčší molárny absorpčný koeficient ( $\epsilon = 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). PDT sulfónovaným hlinitým ftalocyanínom je podobná ako u porfimeru. Použitá dávka PS je nižšia (0,5 – 0,8 mg/kg), použitá svetelná dávka je tiež nižšia (150 J.cm<sup>-2</sup> pri 672 nm). DLI je 24 – 72 h po injekcii. Je vysoko účinný pri liečbe rôznych druhov, histologických typov a štádií rakoviny ako je skvamocelulárny karcinóm kože, rakovina prsníka, orofaryngeálna rakovina, rakovina pľúc, rakovina močového mechúra, krčka maternice, atď. Používa sa aj pri liečbe závažných hnisajúcich rán, trofických vredov, a niektorých ďalších nemalígnych ochorení.

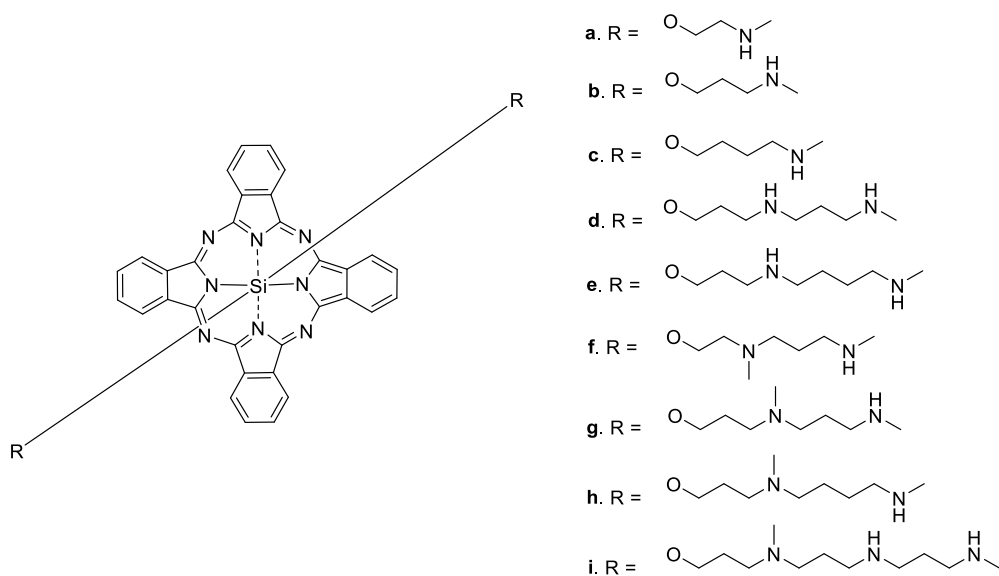
**Kyselina 5-aminolevulová/5-ALA** (Levulan<sup>®</sup> Kerastick<sup>®</sup>, Ameluz<sup>®</sup>) je endogénnym prekursorom v biosyntéze hemu. Biosyntéza 5-ALA je rýchlosť určujúca reakcia v tejto syntetickej ceste. Pri prebytku prekursoru 5-ALA dodaného exogénne dochádza k tvorbe fotodynamicky aktívneho protoporfyrínu IX (PpIX) vo zvýšenej miere. Vychytávanie 5-ALA bunkami nie je plne selektívne, akumulácia PpIX v rakovinových bunkách môže byť selektívna vďaka zmene aktivity enzýmov v biosyntetickej ceste hemu.<sup>52</sup> Prípravok Levulan<sup>®</sup> je 20% roztok hydrochloridu kyseliny 5-aminolevulovej. Podáva sa topicky pri aktinickej keratóze tváre a hlavy. Je registrovaný v USA. Prípravok Ameluz<sup>®</sup> je 7,8% gél hydrochloridu aminolevulovej kyseliny. Používa sa pri liečbe aktinickej keratózy tváre a hlavy a pri plošnej kancerizácii. Je registrovaný v EÚ.

**Metylester kyseliny aminolevulovej** (Metvix<sup>®</sup>) je lipofilnejším prekursorom v biosyntéze PpIX, ktorý do buniek preniká pasívnou difúziou a transportérom pre nepolárne aminokyseliny. Bol vyvinutý pre lepší prienik do tkaniva. Prípravok Metvix<sup>®</sup> je registrovaný v USA a EÚ. Používa sa pri liečbe aktinickej keratózy, povrchového a/alebo nodulárneho bazaliómu a Bowenovej choroby.

### 3.6.4. V súčasnosti skúmané ftalocyanínové PS

Vzhľadom na zameranie našej práce na syntézu potenciálnych, fotodynamicky aktívnych ftalocyanínov by sme radi prezentovali niekoľko štúdií, ktoré sa zaoberajú týmito látkami a popisujú taktiež ich biologické hodnotenie s ohľadom na PDT.

Jiang et al. skúmali deväť SiPc substituovaných rôznymi polyamínovými zvyškami v axiálnych polohách (Obr. 7). Tieto SiPc boli hydrofilné a vo vodnom prostredí neagregované, pretože axiálne aminoskupiny boli protonizované. Všetky látky vykázali relatívne nízke kvantové výťažky singletového kyslíka pri meraní v DMF v porovnaní s nesubstituovaným ZnPc ako dôsledok fotoindukovaného prenosu náboja z nenabitých aminoskupín (v organickom prostredí neboli aminoskupiny protonizované).



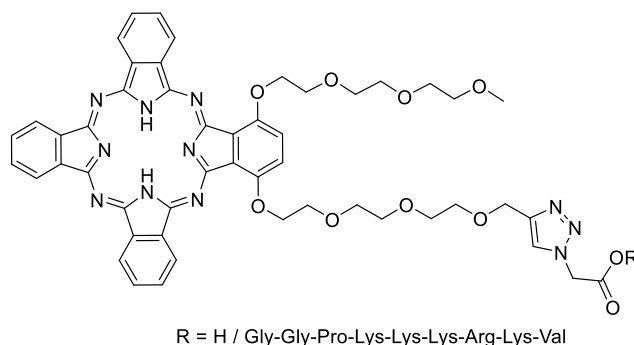
Obr. 7 SiPc s rôznymi polyamínovými substituentmi v axiálnych polohách.

SiPcs boli testované na dvoch bunkových líniah, HT29 a CHO. SiPc so substituentom **b** mal voči HT29 bunkám najnižšie hodnoty IC<sub>50</sub> (Tabuľka 1), konkrétne ~ 1 nM. SiPc so substituentmi **b** a **e** mali v bunkovej línii HT29 vysokú selektivitu k lyzozómom a indukovali vo zvýšenej miere apoptózu. Oba SiPc efektívne inhibovali rast tumoru *in vivo*, u myši nesúcej tumor (HT29). Dávka oboch testovaných látok **b** a **e** bola 1  $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ , svetelná dávka bola 30  $\text{J.cm}^{-2}$ . Myši boli rozdelené do štyroch skupín: bez látky a ožarovania, bez látky a ožarované, s látkou a bez ožarovania (toxicita v tme), s látkou a ožarované.<sup>53</sup>

Tabuľka 1. Hodnoty  $IC_{50}$  pre SiPc so substituentmi **b** a **e**

SiPc	$IC_{50}$ na HT29 (nM)	$IC_{50}$ na CHO (nM)
<b>b</b>	1,1	35,0
<b>e</b>	31,1	25,8

Mei-Rong et al. sa zaoberali dvoma ZnPc, jeden s viazaným peptidovým reťazcom (ZnPc-konjug.), druhý bez peptidového reťazca (ZnPc-nekonjug.). Oba ZnPc mali viazané 2 hydrofilné trietylénglykolové reťazce v polohách 1 a 4 (Obr. 8).



Obr. 8 Štruktúra dvoch skúmaných ZnPc

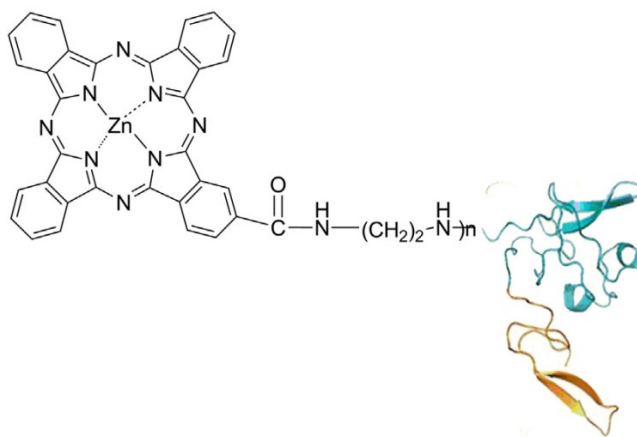
Peptidový reťazec bol viazaný na jeden trietylénglykolový reťazec cez triazolový cyklus. Oba ZnPc vykázali relatívne vysoké kvantové výťažky singletového kyslíka pri meraní v DMF v porovnaní s nesubstituovaným ZnPc. Látky boli testované vo formulácii s Tweenom 80 na bunkovej línii HT29. Oba ZnPc vykázali vysokú *in vitro* fotodynamickú aktivitu s nízkymi hodnotami  $IC_{50}$  (Tabuľka 2). U oboch látok bola pozorovaná subcelulárna lokalizácia. ZnPc-konjug. vykázal určitú selektivitu k bunkovej membráne. *In vivo* bola testovaná distribúcia v tkanivách u bezsrstej myši nesúcej tumor (HT29). ZnPc-konjug. v porovnaní s ZnPc-nekonjug. preukázal nádejnú retenciu v nádorovom tkanive.<sup>54</sup>

Tabuľka 2. Hodnoty  $IC_{50}$  na HT29 bunkách

ZnPc	$IC_{50}$ na HT29 bunkách ( $\mu$ M)
konjug.	0,21
nekonjug.	0,39

Chen et al. skúmali ZnPc konjugovaný s terminálnym fragmentom urokinázy (amino terminal fragment, ATF, ATF-ZnPc, Obr. 9). Fotofyzikálne vlastnosti ATF-

ZnPc boli merané v DMSO. Absorpčné maximum bolo pri 682 nm. Kvantový výťažok singletového kyslíka bol 0,62. Nekonjugovaný ZnPc mal veľmi podobné hodnoty kvantového výťažku (0,63) a absorpčného maxima (678 nm). *In vitro* bola skúmaná selektívna akumulácia ATF-ZnPc na troch bunkových líniách s rôznou expresiou povrchového receptora aktivátoru plazminogénu urokinázového typu (urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR). Boli použité dve bunkové línie so zvýšenou expresiou uPAR (U937, H1299) a jedna bunková línia bez expresie uPAR (HELFL). Vstup ATF-ZnPc do buniek bol závislý na koncentrácii, so zvyšujúcou sa koncentráciou rástol. V bunkových líniách U937 a H1299 bol veľmi podobný, ale výrazne vyšší ako v bunkovej línii HELFL. Fototoxický účinok bol v bunkových líniách U937 a H1299 vyšší ako v kontrolnej bunkovej línii HELFL. Na bunkovej línii H1299 bola zisťovaná subcelulárna lokalizácia. ATF-ZnPc bol lokalizovaný prevažne v cytoplazme, ale aj v lyzozómoch. *In vivo* bola zisťovaná distribúcia v tkanivách na myšom modeli (Kunming mice) s inokulovaným hepatocelulárnym karcinómom (H22). ATF-ZnPc bol distribuovaný prevažne v tkanive tumoru. PDT tohto tumoru pomocou ATF-ZnPc spôsobila výrazné zmeny v tkanive tumoru, zníženie počtu buniek a zvýšenú apoptózu.<sup>55</sup>

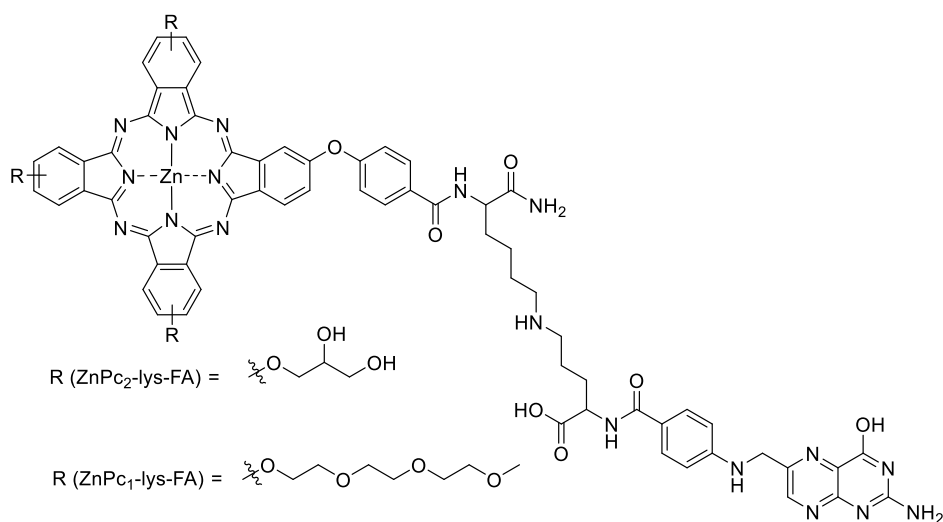


Obr. 9 Predpokladaná štruktúra ATF-ZnPc. Prevzaté z CHEN, Z, et al., Zinc phthalocyanine conjugated with the amino-terminal fragment of urokinase for tumor-targeting photodynamic therapy. *Acta Biomater.*, 2014, 10.10: 4257 – 4268

Li et al. skúmali 6 ZnPc. Dva symetrické boli rôzne substituované trietylénoxidovými alebo 2,3-dihydroxypropoxy skupinami, štyri asymetrické obsahovali navyše cez 4-hydroxybenzoovú kyselinu viazaný amid lyzínu a dva z nich

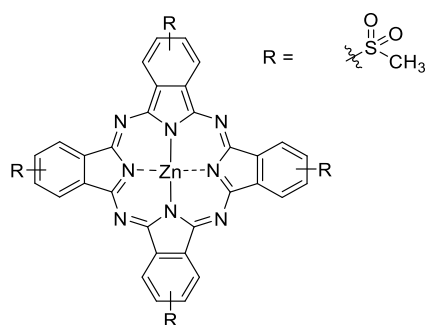


naviac kyselinu listovú na lyzínový zvyšok (Obr. 10). Kvantové výťažky singletového kyslíku boli merané v DMSO a u všetkých šiestich ZnPc boli veľmi podobné (0,45 – 0,55). Absorpčné maximá boli tiež veľmi podobné, v rozsahu 682 – 686 nm. U ZnPc<sub>1</sub>-lys-FA a ZnPc<sub>2</sub>-lys-FA bol *in vitro* testovaný vstup do bunky na dvoch bunkových líniiach, HeLa a NIH-3T3. Folát môže slúžiť ako cieľaca molekula na bunky so zvýšenou expresiou folátového receptora. Obe látky po troch hodinách inkubácie vykázali vysokú distribúciu v bunkách, čo indikovalo efektívny vstup do buniek. *In vivo* bola zisťovaná distribúcia ZnPc<sub>1</sub>-lys-FA a ZnPc<sub>2</sub>-lys-FA v tkanivách myši nesúcej tumor (KB bunky). ZnPc<sub>2</sub>-lys-FA mal vysokú akumuláciu v tkanive tumoru v porovnaní so ZnPc<sub>1</sub>-lys-FA. 2,3-dihydroxypropoxy skupiny pravdepodobne znižujú nešpecifickú afinitu k normálnym tkanivám.<sup>56</sup>



Obr. 10 Štruktúra ZnPc<sub>1</sub>-lys-FA a ZnPc<sub>2</sub>-lys-FA

Íšci et al. sa zaoberali jedným ZnPc s rôzne viazanými metylsulfonylovými skupinami (Obr. 11). Kvantový výťažok singletového kyslíka bol meraný v DMSO. Metylsulfonyl ZnPc mal kvantový výťažok 0,71. Absorpčné maximum tohto ZnPc bolo pri 681 nm. *In vitro* bola testovaná fototoxicita na bunkovej línii A431. Bol pozorovaný na dávke závislý fototoxický efekt. Ďalej bolo zistené zníženie fototoxického účinku v prítomnosti séra.<sup>57</sup>



Obr. 11 Štruktúra metylsulfonyl ZnPc

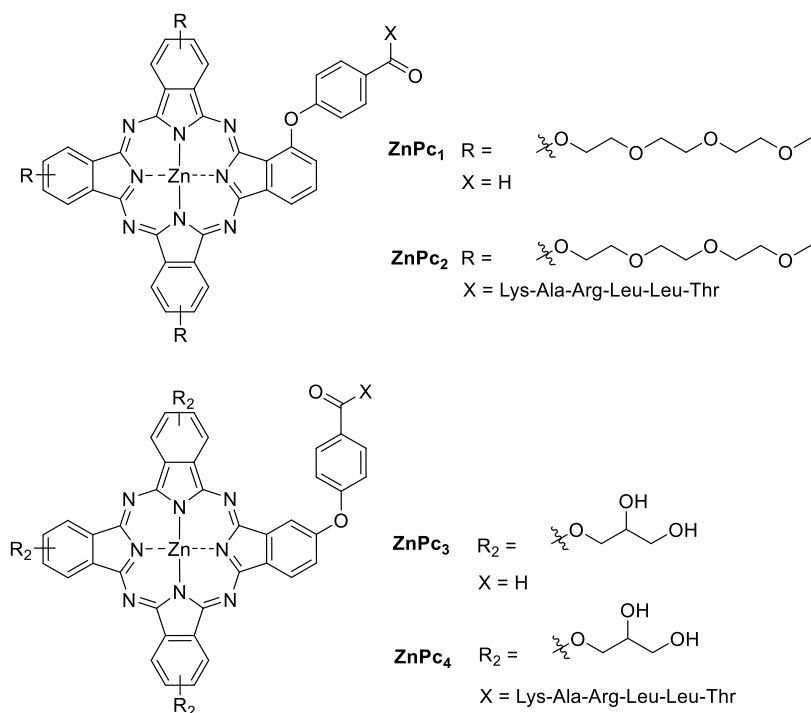
Li et al. sa zaoberali štyrmi asymetrickými ZnPc substituovanými trietylénoxidovými a 2,3-dihydroxypropoxy skupinami. Dva ZnPc mali viazaný D4-konjugát EGF (epithelial growth factor – epiteliálny rastový faktor) receptor-cieliaceho peptidu (EGF receptor-targeting peptide D4-conjugate) cez 4-hydroxybenzoovú kyselinu (Obr. 12). Kvantový výt'azok singletového kyslíka a absorpčné maximum daných ZnPc boli merané v DMSO (Tabuľka 3). Všetky skúmané ZnPc boli veľmi dobre rozpustné vo vode. ZnPc<sub>2</sub> a ZnPc<sub>4</sub> mali vyššiu absorbanciu a fluorescenciu ako nekonjugované ZnPc<sub>1</sub> a ZnPc<sub>3</sub>. *In vitro* fotodynamická aktivita ZnPc<sub>2</sub> a ZnPc<sub>4</sub> bola meraná na dvoch bunkových líniách (A431 s vysokou expresiou EGF a MCF-7 s nízkou expresiou EGF). Nameraná hodnota IC<sub>50</sub> u ZnPc<sub>4</sub> bola na bunkovej línii MCF-7 značne vyššia ako na bunkovej línii A431 (Tabuľka 4). *In vivo* bola zisťovaná distribúcia v tkanivách myši nesúcej tumor (A431). ZnPc<sub>4</sub> vykázal vysokú akumuláciu v nádorovom tkanive v porovnaní so ZnPc<sub>2</sub>. 2,3-dihydroxypropoxy substituenty zvyšujú hydrofilitu, a tým pravdepodobne znižujú nešpecifické interakcie s rakovinnými bunkami.<sup>58</sup>

Tabuľka 3 Absorpčné maximá a kvantové výt'azky daných ZnPc v DMSO

ZnPc	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\Phi_{\Delta}$
ZnPc <sub>1</sub>	686	0,51
ZnPc <sub>2</sub>	686	0,50
ZnPc <sub>3</sub>	683	0,51
ZnPc <sub>4</sub>	682	0,51

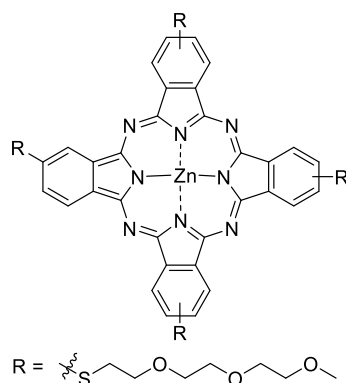
Tabuľka 4 Hodnoty  $IC_{50}$  na A431 a MCF-7 bunkách

ZnPc	$IC_{50}$ na A431 ( $\mu\text{M}$ )	$IC_{50}$ na MCF-7 ( $\mu\text{M}$ )
ZnPc <sub>2</sub>	0,15	0,3
ZnPc <sub>4</sub>	0,65	20



Obr. 12 Štruktúry asymetrických ZnPc<sub>1-4</sub>

Kuzyniak et al. skúmali tetra-trietylénosulfanyl ZnPc (Obr. 13). Tento ZnPc mal absorpčné maximum pri 694 nm. Bol testovaný na fotodynamickú aktivitu na piatich bunkových líniách, BON, Kyse-70, Kyse-140, OE-33, HCT-116. Hodnoty  $IC_{50}$  na týchto bunkových líniách boli nízke, v rozmedzí 1,3 – 3,75  $\mu\text{M}$ . *In vitro* bol na BON a Kyse-70 zisťovaný apoptotický efekt a efekt na bunkový cyklus. Po ožiarení bola v oboch bunkových líniách zistená zvýšená aktivita kaspázy-3 v závislosti na dávke ZnPc. V oboch bunkových líniách bolo pozorované zastavenie bunkového cyklu v G1 fáze, potvrdené zvýšenou koncentráciou cyklínu D1 a zníženým počtom buniek v S alebo G2 fáze. *In vivo* bol testovaný účinok na cievnom riečisku kuracej chríalantoickej membrány. Bola pozorovaná degenerácia ciev a kapilárneho plexu so zníženou perfúziou krvi.<sup>59</sup>

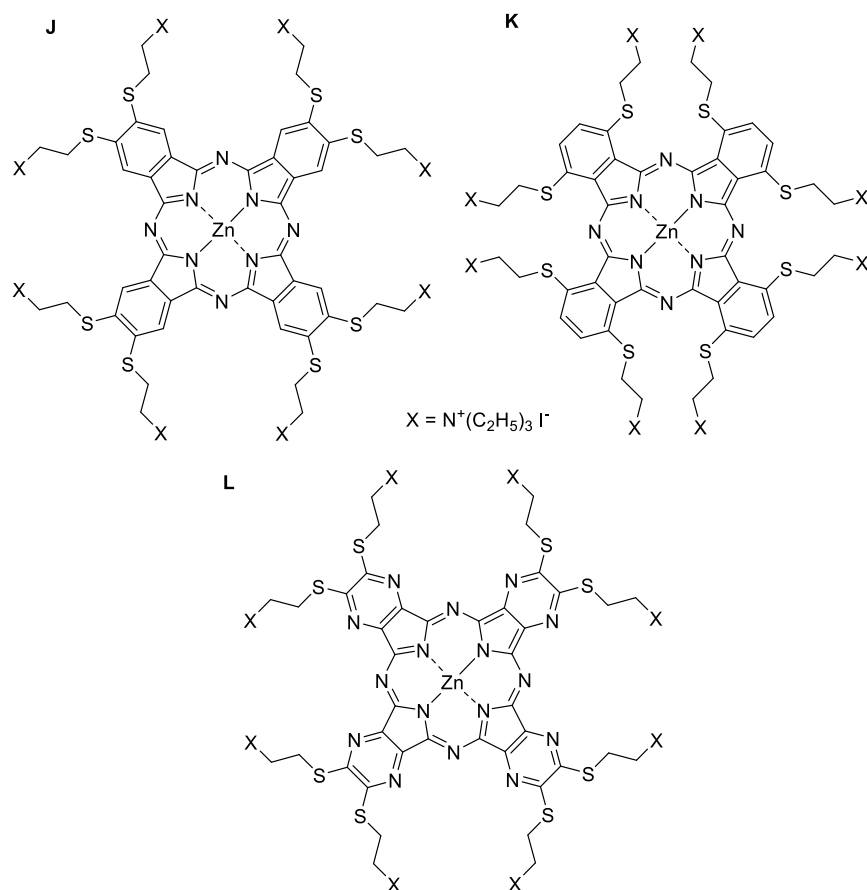


Obr. 13 Štruktúra tetra-trietylénoxysulfonyl ZnPc

Machacek et al. skúmali 3 zinočnaté PS (Obr. 14). Absorpčné maximá týchto zinočnatých PS merané v DMF boli: **J** – 704 nm, **K** – 756 nm, **L** – 656 nm. Meraním absorpčných spektier vo vode sa zistilo, že látka **J** je vo vode agregovaná a látky **K** a **L** sú vo vode neagregované. Bolo zistené, že aza substitúcia makrocyklu a posun substituentov do neperiférnych polôh výrazne napomáha k udržiavaniu neagregovanej formy vo vode. Kvantové výťažky singletového kyslíka merané v DMF boli: **J** – 0,68; **K** – 0,91; **L** – 0,20.  $IC_{50}$  bola zisťovaná na bunkových líniách 3T3, SK-MEL-28, HeLa, HCT 116 (Tabuľka 5).  $TC_{50}$  bola zisťovaná na bunkovej línii 3T3 a HeLa. Látka **J** s periférne viazanými substituentmi mala najnižšiu toxicitu v tme, viac ako 1600  $\mu\text{M}$  (podľa článku jedna z najnižších uvádzaných v literatúre). Najviac citlivá bola bunková línia SK-MEL-28, nasledovaná HeLa bunkami. Prekvapivo, aj napriek agregácii látky **J** vo vode, bola jej fotodynamická aktivita vysoká. Subcelulárna lokalizácia bola zisťovaná na HeLa bunkách. Látky **J** a **K** boli lokalizované v lyzozómoch.<sup>60</sup>

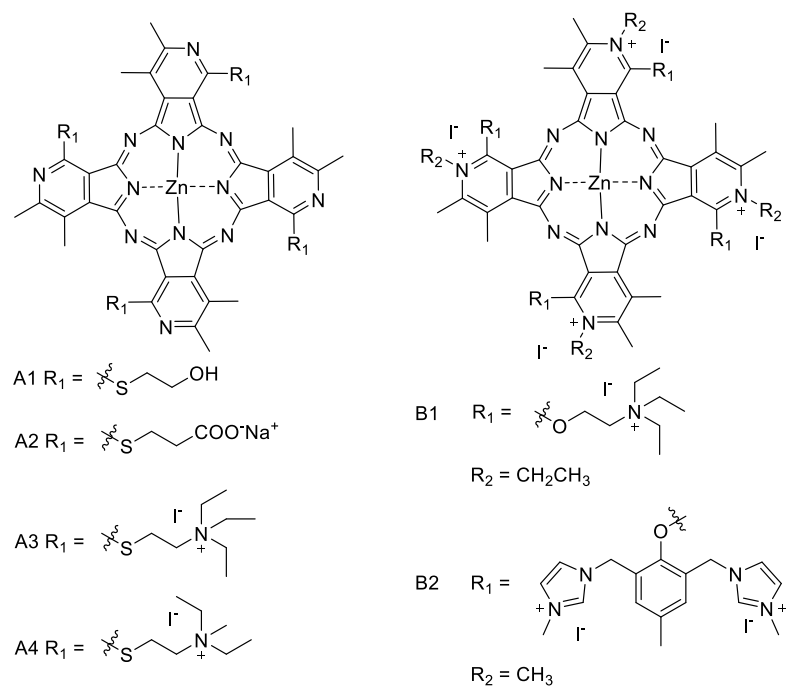
Tabuľka 5 porovnanie hodnôt  $TC_{50}$  a  $IC_{50}$  skúmaných PS **J**, **K**, **L** na rôznych bunkových líniách

látka	$TC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )		$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )				$TC_{50}/IC_{50}$ (HeLa)
	3T3	HeLa	3T3	SK-MEL-28	HeLa	HCT 116	
<b>J</b>	1510 ± 14	1639 ± 110	0,34 ± 0,088	0,32 ± 0,048	0,54 ± 0,090	0,69 ± 0,045	3035
<b>K</b>	147 ± 11	192 ± 14	0,66 ± 0,108	0,22 ± 0,021	0,31 ± 0,121	1,41 ± 0,106	619
<b>L</b>	249 ± 34	226 ± 19	2,46 ± 0,465	2,365 ± 0,339	3,70 ± 0,192	4,09 ± 0,329	61



Obr. 14 Štruktúry skúmaných zinočnatých PS

Machacek et al. sa zaoberali šiestimi aza-analógmi Pc, tetra(3,4-pyrido)porfyrázínmi (Obr. 15). Absorpčné maximá všetkých študovaných porfyrázínov v DMF boli nad 700 nm. Veľmi dobrý kvantový výt'azok singletového kyslíka v porovnaní s klinicky používanými PS mali látky A3, A4 a B2.  $TC_{50}$  a  $EC_{50}$  boli merané na HeLa bunkách. Najnižšiu hodnotu  $EC_{50}$  mala látka B2, rádovo nižšiu aj v porovnaní s klinicky používanými PS (Tabuľka 6). Subcelulárna lokalizácia bola zisťovaná u najúčinnnejšej látky B2 na bunkovej línii HeLa. Látka B2 bola lokalizovaná v lyzozómoch.<sup>61</sup>



Obr. 15 Štruktúry študovaných látok A1 – 4 a B1 – 2

Tabuľka 6 Hodnoty z meraní:  $\lambda_{\max}$ ,  $\Phi_{\Delta}$ ,  $EC_{50}$ ,  $TC_{50}$

látka	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\Phi_{\Delta}$ (DMF)	$EC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$TC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$TC_{50}/EC_{50}$
A1	728	0,42	> 50	> 50	-
A2	718	~ 0,09	> 50	> 50	-
A3	722	0,72	$0,26 \pm 0,089$	$105 \pm 9,5$	400
A4	722	0,72	$0,15 \pm 0,041$	$154 \pm 4,5$	1000
B1	711	0,43	$0,87 \pm 0,068$	$115 \pm 46$	130
B2	710	0,69	$0,0038 \pm 0,0002$	$435 \pm 26$	110000

## 4. EXPERIMENTÁLNA 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. Priebeh reakcií a čistota výsledných produktov boli sledované pomocou tenkovrstvej chromatografie (thin layer chromatography, TLC) na doskách Merck Kieselgel 60 F254, detekcie UV lampou prebiehali pri vlnovej dĺžke 254 nm alebo 366 nm. Čistenie produktov bolo realizované pomocou stĺpcovej chromatografie na stacionárnej fáze Merck Kieselgel 60 (0,040 – 0,063 mm). Mobilné fázy, ktoré boli použité pri čistení, sú uvedené pri jednotlivých reakciách nižšie. IČ spektrá boli merané na IČ spektrofotometri Nicolet 6700 v ATR móde na Katedre anorganické a organické chemie.  $^1\text{H}$  NMR a  $^{13}\text{C}$  NMR spektrá boli merané na prístroji Varian VNMR S500 na Katedre anorganické a organické chemie. Elementárna analýza bola realizovaná pomocou prístroja Vario Micro Cube elemental analyzer (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany). Spektrá UV/Vis boli merané pomocou prístroja Shimadzu UV-2600 spectrophotometer na Katedre farmaceutickej chemie a kontroly liečiv. Hmotnostná spektrometria (MALDI-TOF) bola realizovaná na prístroji AB Sciex 4800 MALDI TOF/TOF spectrometer. Prístroj bol kalibrovaný externe päťbodovou kalibračnou metódou pomocou Peptide Calibration Mix1 (LaserBioLabs, Sophia-Antipolis, France). Roztok meranej vzorky v dichlórmetáne (približne 10  $\mu\text{M}$ , 1,5  $\mu\text{l}$ ) bol zmiešaný s matricou (*trans*-2-[3-(4-*terc*-butylfenyl)-2-metyl-2-propenyliden]-malononitril) v dichlórmetáne, nanesený na doštičku a dôkladne vysušený. Subcelulárna lokalizácia bola určená pomocou Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Japan) fluorescenčného mikroskopu vybaveného Andor Zyla chladeným digitálnym sCMOS monochromatickým fotoaparátom (Andor Technology, United Kingdom) a NIS Elements AR 4.20 software (Laboratory Imaging, Czech Republic).

### 4.1. *Príprava 2,6-bis[(1H-imidazol-1-yl)metyl]-4-metylfenolu (1)*

2,6-bis(hydroxymetyl)-4-metylfenol (8,405 g, 49,97 mmol) bol s 1H-imidazolom (8,873 g, 130,33 mmol) rozpustený v 1,4-dioxáne (20 ml). Po rozpustení látok bola zmes zahrievaná počas 2 h pri teplote varu rozpúšťadla pod spätným chladičom. Dioxán bol následne oddestilovaný pri tlaku 312 mBar a zmes bola ďalej zahrievaná pri 150 °C a tlaku 280 mBar počas 3 h. Po ukončení reakcie bola zmes rozpustená

v etanole (EtOH) a prekryštalizovaná pridaním vody. Kryštály boli následne ešte raz prekryštalizované z nasýteného EtOH roztoku (100 ml). Následne boli odfiltrované, premyté ľadovým EtOH a vysušené. Bolo získaných 8,7 g bielej kryštalickej látky, čo zodpovedá výt'azku 85 %. Látka bola už predtým pripravená a publikovaná.<sup>1</sup> Látka bola neskôr pripravená vo väčšom množstve.

T. t. 183,1 – 186,0 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 9,23 (s, 1H, OH), 7,68 (s, 2H, ImH), 7,12 (s, 2H, ImH), 6,88 (s, 2H, ImH), 6,77 (s, 2H, ArH), 5,15 (s, 4H, CH<sub>2</sub>), 2,11 (s, 6H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 150,0; 137,6; 129,6; 129,1; 128,5; 125,9; 119,8; 45,2; 20,3.

#### **4.2. Príprava 5,6-bis{2,6-bis[(1H-imidazol-1-yl)metyl]-4-metylfenoxy}pyrazín-2,3-dikarbonitrilu (2)**

2,6-bis[(1H-imidazol-1-yl)metyl]-4-metylfenol **1** (5,10 g, 18,85 mmol) bol rozpustený v tetrahydrofuráne (THF – tetrahydrofurán, 15 ml) a bol pridaný vodný 1M hydroxid sodný (18,85 ml, 18,85 mmol). Po premiešaní bol pridaný 5,6-dichlórpyrazín-2,3-dikarbonitril (1,52 g, 7,54 mmol) rozpustený v THF (10 ml). Zmes reagovala pri laboratórnej teplote (25 °C) za stáleho miešania, počas 30 minút. Po ukončení reakcie bol THF z reakčnej zmesi oddestilovaný na rotačnej vákuovej odparke. Po oddestilovaní THF bol pridaný etylester kyseliny octovej (ethyl-acetát, EAC, 90 ml) a voda (50 ml) s rozpusteným hydrogenuhličitanom sodným (0,5 g, 5,95 mmol). Zmes bola vytrepaná trikrát s EAC (90 ml) pričom bola zbieraná organická vrstva. Organické vrstvy boli spojené a zahustené na rotačnej vákuovej odparke za zníženého tlaku. Zo zahustenej zmesi vypadli ružové kryštály. Táto zmes bola ponechaná v mrazničke počas 24 h. Ružový kryštalický produkt bol odsatý. Bolo získaných 2,53 g, čo zodpovedá výt'azku 51 %.

T. t. 179 °C za rozkladu. IČ (ATR):  $\nu_{\max}$  = 3112, 2240, 1551, 1508, 1431, 1397, 1356, 1218, 1107, 1076 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 7,69 (s, 4H, ImH), 7,13 (s, 4H, ImH), 6,96 (s, 4H, ArH), 6,88 (s, 4H, ImH), 5,20 (s, 8H, CH<sub>2</sub>) 2,27 (s, 6H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 150,4; 143,9; 137,9; 137,8; 130,6; 129,8; 129,0; 124,3; 119,9; 113,5; 44,6; 20,8. Elementárna analýza (%)



vypočítané pre C<sub>36</sub>H<sub>30</sub>N<sub>12</sub>O<sub>2</sub>: C 61,88; H 4,9; N 24,06; zistené C 62,40; H 4,8; N 23,93.

#### **4.3. Príprava 4,5-bis{2,6-bis[(1H-imidazol-1-yl)metyl]-4-metylfenoxy}ftalonitrilu (3)**

4,5-dichlórfталонитрил (2,30 g, 11,70 mmol) bol s 2,6-bis[(1H-imidazol-1-yl)metyl]-4-metylfenolom **1** (6,61 g, 24,63 mmol) rozpustený v bezvodom dimetylformamide (DMF, 25 ml). Postupne po častiach bol do roztoku pridávaný bezvodý uhličitan draselný (10 g, 72,36 mmol). Zmes bola zahrievaná (90 °C) pod spätným chladičom v argónovej atmosfére počas 24 h. Po ukončení reakcie zmes voľne vychladla a bola prenesená do destilovanej vody (500 ml). Bola získaná zmes produktov vo forme čiernej amorfnej hmoty, ktorá bola odfiltrovaná. Získaný produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli v sústave acetón/metanol 4:1. Produkt bol rozpustený v acetóne a vyzrážaný *n*-hexánom. Produkt bol následne prekryštalizovaný z EtOH a vody. Bolo pripravených 1,86 g bledo-oranžovej kryštalickej látky, čo zodpovedá výt'azku 24 %.

T. t. 258,2 – 260,0 °C. IČ (ATR):  $\nu_{max}$  = 3115, 2974, 2233 (CN), 1590, 1500, 1472, 1400, 1336, 1284, 1230, 1203, 1132, 1106, 1076 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 7,62 (s, 4H, ImH), 7,12 (t, 4H, *J* = 1,3 Hz, ImH), 6,99 (s, 2H, ArH), 6,95 (s, 4H, ArH), 6,86 (s, 4H, ImH), 5,13 (s, 8H, CH<sub>2</sub>), 2,28 (s, 6H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 149,3; 145,0; 137,8; 137,2; 131,0; 130,1; 129,0; 119,9; 118,5; 115,6; 110,1; 44,6; 20,9. Elementárna analýza (%) vypočítané pre C<sub>38</sub>H<sub>32</sub>N<sub>10</sub>O<sub>2</sub>: C 67,24; H 5,05; N 20,64; zistené C 67,62; H 5,25; N 20,58.

#### **4.4. Príprava 9,10,16,17,23,24-hexakis(terc-butylsulfanyl)-2,3-bis{2,6-bis[(1H-imidazol-1-yl)metyl]-4-metylfenoxy}-1,4-azaftalocyanínu (6)**

Do destilačnej banky bol k bezvodému butanolu (10 ml) pridaný horčík (0,359 g, 15 mmol) a zrnko jódu. Reakcia prebiehala 3 h pri teplote varu rozpúšťadla pod spätným chladičom, pokiaľ všetok horčík nezreagoval na butanolát horečnatý. Po 3 hodinách bol do destilačnej banky pridaný prekurzor **2** (0,35 g, 0,528 mmol), prekurzor **4** (0,482 g, 1,58 mmol) a BuOH (10 ml). Reakcia prebiehala 24 h

za rovnakých podmienok. Po ukončení reakcie bol z reakčnej zmesi oddestilovaný zvyšný butanol na rotačnej vákuovej odparke za zníženého tlaku. Produkt bol extrahovaný do THF, ktorý bol následne oddestilovaný. Zmes horečnatých komplexov bola pre lepšiu separáciu prevedená na nekovovú formu kyselinou *para*-toluénsulfónovou (1 g, 5,28 mmol) v THF (10 ml). Zmes bola 2 h miešaná pri laboratórnej teplote. Zo zmesi bol oddestilovaný THF, produkt bol premytý vodou a odfiltrovaný. Zmes bola čiastočne izolovaná pomocou preparatívnej chromatografie na doskách tenkovrstvej chromatografie (TLC, SiO<sub>2</sub>) a vyvíjaná v sústave 1 toluén/CHCl<sub>3</sub>/THF 30:10:1 alebo sústave 2 CHCl<sub>3</sub>/THF/MeOH 50:3:2. Boli izolované 3 látky ako hlavné produkty reakcie. Škvrna A (R<sub>f</sub> = 0,93) a B (R<sub>f</sub> = 0,8) v sústave 2 a škvrna C (R<sub>f</sub> = 0,15) v sústave 1 (Obr. 17). Látky boli analyzované na MS a jednotlivé škvrnky boli identifikované ako produkty **7** (škvrna A), **8** (škvrna B) a **9** (škvrna C). Zamýšľaný produkt **6** sme nezískali.

#### **4.5. Príprava 9,10,16,17,23,24-hexakis(terc-butylsulfanyl)-2,3-bis{2,6-bis[(1H-imidazol-1-yl)metyl]-4-metylfenoxy}ftalocyanináto horečnatého komplexu (10Mg)**

Do destilačnej banky bol k bezvodému butanolu (80 ml) pridaný horčík (1,08 g, 44 mmol) a zrnko jódu. Reakcia prebiehala 3 h pri teplote varu rozpúšťadla pod spätným chladičom, pokiaľ všetok horčík nezreagoval na butanolát horečnatý. Po 3 hodinách bol do destilačnej banky pridaný prekurzor **3** (1,04 g, 1,6 mmol) a prekurzor **4** (1,44 g, 4,7 mmol). Reakcia prebiehala 24 h za rovnakých podmienok. Po ukončení reakcie bol z reakčnej zmesi oddestilovaný zvyšný butanol na rotačnej vákuovej odparke za zníženého tlaku. Produkt bol extrahovaný do THF (250 ml). Extrakt bol prefiltrovaný a THF bol oddestilovaný na rotačnej vákuovej odparke. Produkt bol prečistený na stĺpcovej chromatografii najskôr sústavou 1. CHCl<sub>3</sub>/THF 4:1 a po elúcii symetrického horečnatého Pc vymytý z kolóny sústavou 2. CHCl<sub>3</sub>/MeOH/TEA 10:2:0,25. Bolo získaných 0,702 g zelenej vločkovitej látky, čo zodpovedá výt'azku 28 %.

MS (MALDI-TOF): *m/z* 1596,5 [M]<sup>+</sup> látka bola charakterizovaná iba MS spektrom a ďalej použitá ako medziprodukt v ďalšej reakcii.

#### 4.6. *Príprava 2,3-bis{2,6-bis[(1H-imidazol-1-yl)metyl]-4-metylfenoxy}ftalocyanináto horečnatého komplexu (11Mg)*

Do destilačnej banky bol k bezvodému butanolu (80 ml) pridaný horčík (1,33 g, 55 mmol) a zrnko jódu. Reakcia prebiehala 3 h pri teplote varu rozpúšťadla pod spätným chladičom, pokiaľ všetok horčík nezreagoval na butanolát horečnatý. Po 3 hodinách bol do destilačnej banky pridaný prekurzor **3** (1,32 g, 2 mmol) a prekurzor **5** (0,776 g, 6 mmol). Reakcia prebiehala 24 h za rovnakých podmienok. Po ukončení reakcie bol z reakčnej zmesi oddestilovaný zvyšný butanol na rotačnej vákuovej odparke za zníženého tlaku. Produkt bol extrahovaný do zmesi THF/CHCl<sub>3</sub> 1:1 a následne do pyridínu. Extrakty boli spojené a na rotačnej vákuovej odparke za zníženého tlaku oddestilované. Produkt bol prečistený 2-krát stĺpcovou chromatografiou v sústave THF/CHCl<sub>3</sub>/pyridín 1:1:1, pyridínom bol z kolóny vymytý čistý produkt po elúcii symetrického kongeneru. Čisté frakcie s produktom boli oddestilované a premyté EAC, THF a hexánom. Bolo získaných 0,712 g zelenej vločkovitej látky, čo zodpovedá výťažku 33 %.

IČ (ATR):  $\nu_{max}$  = 1507, 1481, 1458, 1404, 1336, 1285, 1083, 1057 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/pyridín-d<sub>5</sub>)  $\delta$  (ppm) 9,64 – 9,57 (m, 4H, PcH), 9,36 (d, 2H,  $J$  = 7,3 Hz, PcH), 8,43 (s, 2H, PcH), 8,29 – 8,14 (m, 6H, PcH), 7,07 (s, 4H, ArH), 6,93 (s, 4H, ArH), 6,86 (s, 4H, ArH), 6,46 (s, 4H, ArH), 5,02 (s, 8H, CH<sub>2</sub>), 2,34 (s, 6H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>/pyridín-d<sub>5</sub>)  $\delta$  (ppm) 155,37; 154,90; 153,85; 151,96; 148,00; 147,11; 139,31; 139,25, 139,07, 137,54; 137,12; 134,01; 130,80; 130,31; 129,69; 129,48; 129,25; 123,22; 122,87; 119,25; 107,20; 45,50; 21,16.

#### 4.7. *Príprava 9,10,16,17,23,24-hexakis(terc-butylsulfanyl)-2,3-bis{2,6-bis[(1H-imidazol-1-yl)methyl]-4-metylfenoxy}ftalocyanínu (10H)*

Horečnatý komplex **10Mg** (0,34 g, 0,211 mmol) bol rozpustený v THF (5 ml) a MeOH (1 ml). Kyselina *para*-toluénsulfónová (0,56 g, 2,95 mmol) bola rozpustená v THF (10 ml) a pridaná k rozpustenému komplexu **10Mg**. Reakcia prebiehala 2 h za laboratórnej teploty. THF bol oddestilovaný na rotačnej vákuovej odparke. Produkt bol premytý vodou a odfiltrovaný. Produkt bol rozpustený v CHCl<sub>3</sub>

a vytrepaný vodným roztokom hydrogenuhličitanu sodného. Organická fáza bola vysušená bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a oddestilovaná. Produkt bol prečistený na stĺpcovej chromatografii sústavou CHCl<sub>3</sub>/THF/MeOH 5:5:1 a vymytý z kolóny sústavou CHCl<sub>3</sub>/MeOH/TEA 8:2:0,25. Bolo získaných 0,156 g zelenej vločkovitej látky, čo zodpovedá výťažku 46 %.

IČ (ATR):  $\nu_{max}$  = 3295 (NH), 2960, 2895, 2863, 1600, 1506, 1456, 1417, 1397, 1364, 1270, 1159, 1074, 1017 cm<sup>-1</sup>. MS (MALDI-TOF):  $m/z$  1574,6 [M]<sup>+</sup>; 1597,5 [M + Na]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/pyridín-d<sub>5</sub>)  $\delta$  (ppm) 9,58 (s, 2H, PcH), 9,51 (s, 2H, PcH), 9,43 (s, 2H, PcH), 8,59 (s, 2H, PcH), 7,83 (s, 4H, ArH), 7,30 (s, 4H, ArH), 7,28 (s, 4H, ArH), 7,13 (s, 4H, ArH), 5,54 (s, 8H, CH<sub>2</sub>), 2,59 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 1,76 (s, 18H, CCH<sub>3</sub>), 1,74 (s, 18H, CCH<sub>3</sub>), 1,73 (s, 18H, CCH<sub>3</sub>), -0,89 (bs, 2H, NH). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>/pyridín-d<sub>5</sub>)  $\delta$  (ppm) 147,15; 142,92; 142,47; 142,08; 138,04; 137,84; 134,35; 131,72; 130,92; 130,88; 130,35; 129,60; 119,49; 107,55; 49,03; 48,98; 48,90; 45,98; 31,57; 31,53; 31,48; 21,43.

#### 4.8. *Príprava 2,3-bis{2,6-bis[(1H-imidazol-1-yl)methyl]-4-metylfenoxy}ftalocyanínu (11H)*

Horečnatý komplex **11Mg** (0,512 g, 0,473 mmol) bol rozpustený v THF (2 ml). Kyselina *para*-toluénsulfónová (0,9 g, 4,74 mmol) bola rozpustená v THF (8 ml) a pridaná k rozpustenému komplexu **11Mg**. Reakcia prebiehala 2 h za laboratórnej teploty. THF bol oddestilovaný na rotačnej vákuovej odparke. Do zmesi bola pridaná voda a produkt bol odfiltrovaný. Časť rozpustená vo vode bola zmiešaná s CHCl<sub>3</sub> a roztokom hydroxidu sodného a vytrepaná do chloroformovej vrstvy. Organická fáza bola vysušená bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prefiltrovaná a oddestilovaná. Bolo získaných 0,441 g zelenej vločkovitej látky, čo zodpovedá výťažku 89 %.

MS (MALDI-TOF):  $m/z$  1046,3 [M]<sup>+</sup> látka bola charakterizovaná iba MS spektrom a ďalej použitá ako medziprodukt v ďalšej reakcii.

#### **4.9. Príprava 9,10,16,17,23,24-hexakis(terc-butylsulfanyl)-2,3-bis{2,6-bis[(1H-imidazol-1-yl)methyl]-4-metylfenoxy}ftalocyanináto zinočnatého komplexu (10Zn)**

Ftalocyanín **10H** (0,140 g, 0,089 mmol) bol rozpustený v pyridíne (30 ml). K rozpustenému **10H** bol pridaný octan zinočnatý (0,163 g, 0,89 mmol). Zmes bola počas 2,5 h zahrievaná pri teplote varu rozpúšťadla pod spätným chladičom. Po ukončení reakcie bol zo zmesi oddestilovaný pyridín na rotačnej vákuovej odparke. Následne bola do zmesi pridaná voda a produkt bol odfiltrovaný a premytý vodou. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou v sústave CHCl<sub>3</sub>/THF/MeOH 5:5:1 a vymytý z kolóny pyridínom. Produkt bol rozpustený v malom množstve CHCl<sub>3</sub> a vyzrážaný hexánom. Bolo získaných 0,105 g zelenej vločkovitej látky, čo zodpovedá výťažku 71 %.

IČ (ATR):  $\nu_{max}$  = 2959, 2862, 1597, 1507, 1471, 1458, 1398, 1369, 1267, 1205, 1161, 1108, 1066 cm<sup>-1</sup>. MS (MALDI-TOF):  $m/z$  1636,4 [M]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/pyridín-d<sub>5</sub>)  $\delta$  (ppm) 9,88 (s, 2H, PcH), 9,84 (s, 2H, PcH), 9,58 (s, 2H, PcH), 8,26 (s, 2H, PcH), 7,25 (bs, 4H, ArH), 7,12 – 6,88 (m, 8H, ArH), 6,60 (bs, 4H, ArH), 2,44 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 1,75 (s, 36H, CCH<sub>3</sub>), 1,70 (s, 18H, CCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>/pyridín-d<sub>5</sub>)  $\delta$  (ppm) 165,92; 154,42; 154,06; 153,49; 152,86; 148,26; 147,37; 141,77; 141,36; 137,71; 137,62; 137,53; 137,41; 137,11; 133,72; 131,13; 130,70; 130,50; 130,25; 129,81; 129,04; 119,22; 107,14; 48,81; 48,74; 45,72; 31,57; 31,55; 21,23.

#### **4.10. Príprava 2,3-bis{2,6-bis[(1H-imidazol-1-yl)methyl]-4-metylfenoxy}ftalocyanináto zinočnatého komplexu (11Zn)**

Ftalocyanín **11H** (0,441 g, 0,42 mmol) bol rozpustený v pyridíne (15 ml). K rozpustenému **11H** bol pridaný octan zinočnatý (0,773 g, 4,21 mmol). Zmes bola zahrievaná 2,5 h pri teplote varu rozpúšťadla pod spätným chladičom. Po ukončení reakcie bol zo zmesi oddestilovaný pyridín na rotačnej vákuovej odparke. Následne bola do zmesi pridaná voda a produkt bol odfiltrovaný a premytý vodou. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou v sústave CHCl<sub>3</sub>/MeOH 5:1 a vymytý z kolóny sústavou pyridín/MeOH 10:1. Produkt bol rozpustený v malom množstve

zmesi  $\text{CHCl}_3$  a pyridínu a vyzrážaný hexánom. Bolo získaných 0,22 g zelenej vločkovitej látky, čo odpovedá výťažku 47 %.

IČ (ATR):  $\nu_{\text{max}} = 1610, 1485, 1462, 1406, 1334, 1286, 1230, 1161, 1089, 1058 \text{ cm}^{-1}$ . MS (MALDI-TOF):  $m/z$  1108,2  $[\text{M}]^+$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, pyridín- $d_5$ )  $\delta$  (ppm) 9,74 – 9,65 (m, 4H, PcH), 9,24 (d, 2H,  $J = 7,4$  Hz, PcH), 8,98 (s, 2H, PcH), 8,20 (dd, 2H,  $J = 5,7; 2,8$  Hz, PcH), 8,14 (t, 2H,  $J = 7,3$  Hz, PcH), 7,94 (t, 2H,  $J = 7,3$  Hz, PcH), 7,69 (s, 4H, ArH), 7,31 (s, 4H, ArH), 7,01 (s, 4H, ArH), 6,89 (s, 4H, ArH), 4,96 (s, 8H,  $\text{CH}_2$ ), 2,09 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, pyridín- $d_5$ )  $\delta$  (ppm) 155,0; 154,8; 154,2; 153,0; 147,7; 139,21; 139,12; 138,95; 138,15; 137,69; 134,36; 131,36; 131,17; 130,11; 129,99; 129,87; 129,78; 128,75; 126,86; 119,95; 107,91; 45,80; 20,99; 20,88. Elementárna analýza (%) vypočítané pre  $\text{C}_{62}\text{H}_{44}\text{N}_{16}\text{O}_2\text{Zn}$ : C 63,94; H 4,33; N 19,24; zistené C 64,4; H 4,07; N 18,88.

#### ***4.11. Príprava jodidu 9,10,16,17,23,24-hexakis(terc-butylsulfanyl)-2,3-bis{2,6-bis[(3-metyl-1H-imidazólium-1-yl)metyl]-4-metylfenoxy}ftalocyanináto zinočnatého komplexu (12)***

Komplex **10Zn** (0,093 g, 0,057 mmol) bol rozpustený v bezvodom DMF (2 ml). Roztok bol umiestnený pod spätný chladič a argónovú atmosféru. Následne bol do roztoku pridaný metyljodid (150  $\mu\text{l}$ ; 0,342 g; 2,4 mmol) a reakcia prebiehala pri teplote 80 °C počas 24 h. Zo zmesi bol oddestilovaný DMF a zvyšný  $\text{CH}_3\text{I}$  na rotačnej vákuovej odparke. Produkt bol rozpustený v acetóne s malým množstvom MeOH a naliaty do éteru (200 ml), v ktorom sa produkt vyzrážal. Zrazenina bola odfiltrovaná. Tento postup bol zopakovaný ešte 3-krát. Nakoniec bola zrazenina premytá éterom. Bolo získaných 0,094 g zelenej látky. Bolo zmerané  $^1\text{H}$ -NMR spektrum tejto látky, ktoré ukázalo, že došlo k výmene niektorých *terc*-butylových skupín za metylové skupiny.

IČ (ATR):  $\nu_{\text{max}} = 3079, 2974, 2926, 1592, 1408, 1375, 1336, 1263, 1207, 1160, 1070 \text{ cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 9,32 – 9,01 (m, 8H, PcH), 8,98 (s, 2H, ImH), 8,10 (s, 2H, ImH), 7,80 (s, 4H, ArH), 7,66 (s, 4H, ArH), 7,53 (s, 4H, ArH), 5,70 (s, 8H,  $\text{CH}_2$ ), 3,55 (s, 12H,  $\text{N}^+\text{CH}_3$ ), 3,06 (s, 6H,  $\text{SCH}_3$ ), 3,03 (s, 6H,  $\text{SCH}_3$ ), 2,98 (s, 6H,  $\text{SCH}_3$ ), 2,61 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ). Elementárna analýza (%) vypočítané

pre  $C_{90}H_{80}I_4N_{16}O_2S_6Zn + 10 H_2O$ : C 45,28; H 5,24; N 9,39 (6 × *StBu*);  
pre  $C_{78}H_{104}I_4N_{16}O_2S_6Zn + 4 H_2O$ : C 44,38; H 4,20; N 10,62 (2 × *StBu*, 4 × *SMe*);  
zistené C 44,57; H 3,85; N 9,73.

#### 4.12. *Príprava jodidu 2,3-bis{2,6-bis[(3-metyl-1H-imidazólium-1-yl)metyl]-4-metylfenoxy}ftalocyaninátu zinočnatého komplexu (13)*

Komplex **11Zn** (0,2 g, 0,18 mmol) bol rozpustený v bezvodom DMF (2 ml). Roztok bol umiestnený pod spätný chladič a argónovú atmosféru. Následne bol do roztoku pridaný metyljodid (150  $\mu$ l, 0,342 g, 2,4 mmol) a reakcia prebiehala pri teplote 80 °C počas 24 h. Zo zmesi bol oddestilovaný DMF a zvyšný  $CH_3I$  na rotačnej vákuovej odparke. Produkt bol rozpustený v zmesi acetón/MeOH 1:1 a po kvapkách pridávaný do éteru (200 ml). Vločkovitý produkt bol odfiltrovaný a premytý éterom 4-krát. Produkt bol opatrne premytý vodou, rozpustený v MeOH a MeOH bol oddestilovaný. Bolo získaných 0,237 g zelenej vločkovitej látky, čo zodpovedá výťažku 78 %.

IČ (ATR):  $\nu_{max} = 3145, 3084, 1607, 1512, 1484, 1407, 1333, 1286, 1262, 1160, 1092, 1058 \text{ cm}^{-1}$ . MS (MALDI-TOF):  $m/z$  1548,9  $[M - I]^{+}$ .  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 9,50 – 9,44 (m, 4H, PcH), 9,37 – 9,32 (m, 2H, PcH), 9,26 (s, 4H, PcH), 8,34 – 8,25 (m, 6H, PcH + ArH), 8,11 (s, 2H, ArH), 7,79 (t, 4H,  $J = 1,8$  Hz, ArH), 7,65 (s, 4H, ArH), 7,48 (t, 4H,  $J = 1,8$  Hz, ArH), 5,71 (s, 8H,  $CH_2$ ), 3,56 (s, 12H,  $N^+CH_3$ ), 2,63 (s, 6H,  $CH_3$ ).  $^{13}C$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 154,23; 153,91; 153,10; 151,31; 148,38; 147,40; 138,30; 138,19; 137,95; 137,80; 137,19; 132,86; 132,52; 130,32; 130,12; 128,61; 124,17; 122,94; 122,72; 106,70; 47,51; 36,08; 21,11. Elementárna analýza (%) vypočítané pre  $C_{66}H_{56}I_4N_{16}O_2Zn + 1 H_2O$ : C 46,73; H 3,45; N 13,21; zistené C 46,82; H 3,56; N 12,93.

#### **4.13. Reakcia 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(terc-butylsulfanyl)ftalocyanináto zinočnatého komplexu (14) s metylačným činidlom (CH<sub>3</sub>I)**

Komplex **14** (53,4 mg, 0,042 mmol) bol rozpustený v bezvodom DMF (2 ml). Bol pridaný metyljodid (150 µl, 0,342 g, 2,4 mmol) a reakcia prebiehala pri teplote 80 °C počas 24 h. Zo zmesi bol oddestilovaný DMF a zvyšný CH<sub>3</sub>I na rotačnej vákuovej odparke. Na TLC (v sústave toluén:THF:CHCl<sub>3</sub> 10:10:1) bolo potvrdených viacero produktov. Zmes produktov bola analyzovaná na hmotnostnej spektrometrii (Obr. 20).

#### **4.14. Príprava bunkovej línie (HeLa) a zásobného roztoku látky 12 a 13**

Všetky biologické testy boli realizované na Katedre biochemických vied Mgr. Miloslavom Macháčkom, Ph.D. Fotodynamická aktivita bola testovaná na HeLa bunkovej línii. Bunková línia bola kultivovaná v Dulbecco's Modified Eagle Medium bez fenolovej červene (Lonza, Belgia) doplnenom o 10% teplom inaktivované fetálne bovinné sérum (Sigma), 1% penicilín/streptomycín roztok (Lonza), 10 mM HEPES pufor (Sigma, Nemecko), a 4 mM L-glutamín (Lonza). Bunková línia bola kultivovaná v 75 cm<sup>2</sup> banke na tkanivové kultúry a ponechaná v CO<sub>2</sub> inkubátore pri 37 °C a zvlhčenej atmosfére 5% CO<sub>2</sub>. Bunky boli pasážované každé 3 – 4 dni. Pri testoch cytotoxicity (fototoxicita a toxicita v tme) boli bunky nasadené do 96-jamkovej doštičky v hustote 7,5 × 10<sup>3</sup> buniek na jamku počas 24 h. Zásobný DMSO roztok látky **13** bol pripravený v koncentrácii 10 mM a sterilizovaný bakteriálnou filtráciou cez 0,22 µm filtračnú membránu injekčného filtru.

#### **4.15. Meranie cytotoxicity**

Toxicita v tme (vlastná toxicita študovaného PS bez prítomnosti akéhokoľvek svetla) bola testovaná v širokom koncentračnom rozpätí po 24 h inkubácii s HeLa bunkami. Viabilita buniek bola určená pomocou neutrálnej červene (neutral red, NR), tj. metódy založenej na schopnosti živých buniek kumulovať NR do nepoškodených lyzozómov. Rozpustená NR bola meraná ako absorbancia pri  $\lambda =$



540 nm pomocou Tecan Infinite 200 M plate reader. Viabilita skúšaných buniek bola vyjadrená ako percento neošetrených kontrolných buniek inkubovaných v rovnakých podmienkach (100%). Pri testovaní fotodynamickej aktivity (fototoxicity) boli HeLa bunky inkubované s rôznymi koncentráciami študovaných látok **12** a **13** počas 12 h. Bunky boli potom premyté zahriatym bezsérovým médiom. Nové médium pre bunkové kultúry bolo pridané a bunky boli ožarované počas 15 min 450 W ozone-free Xe lampou (Newport) s intenzitou zníženou na 400 W vybavenou long-pass filtrom (NewportOG570) a 8 cm vodným filtrom na odstránenie nežiaducich vlnových dĺžok a tepelného žiarenia ( $\lambda > 570$  nm, 12,4 mW/cm<sup>2</sup>, 15 min, 11,2 J/cm<sup>2</sup>). Bunková viabilita bola zmeraná po ďalších 24 h s NR ako bolo vyššie uvedené. Koncentrácie testovaných látok indukujúcich 50% pokles viability, po ošetrení pri podmienkach v tme (stredná toxická koncentrácia, TC<sub>50</sub>) alebo po fotodynamickej liečbe (stredná efektívna koncentrácia, EC<sub>50</sub>), boli spočítané použitím GraphPad Prism software (verzia 6.07; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) pre každý nezávislý pokus.

#### *4.16. Určenie subcelulárnej lokalizácie*

Približne  $7.5 \times 10^4$  HeLa buniek bolo nasadených do Petriho misiek vhodných pre konfokálnu mikroskopiu (WillCo Wells, The Netherlands) v bunkovom médiu a inkubovaných počas 12 h s 5  $\mu$ M látky **13** v inkubátore (37 °C, 5% CO<sub>2</sub> atmosfére, konštantnej vlhkosti). Médium bolo odstránené a bunky boli premyté 2-krát zahriatym PBS a čerstvým médiom. LysoTracker Blue DND-22 (Molecular Probes, 0,25  $\mu$ M) a MitoTracker Green FM (Molecular Probes, 0,2  $\mu$ M) boli pridané a bunky boli inkubované ďalších 15 minút. Po inkubácii boli bunky premyté 2-krát zahriatym PBS. Čerstvé bezsérové médium bolo pridané a vzorky boli okamžite umiestnené do CO<sub>2</sub> inkubátora (Okolab, Italy) a vyšetrené pod Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Japan) fluorescenčným mikroskopom vybaveným Andor Zyla chladeným digitálnym sCMOS monochromatickým fotoaparátom (Andor Technology, United Kingdom) a NIS Elements AR 4.20 software (Laboratory Imaging, Czech Republic). DAPI, FITC, a Cy5 filtrové sety boli použité pre vizualizáciu. Nikon A1+ konfokálny systém bol zapojený na vizualizáciu LysoTracker Blue DND-22 a MitoTracker Green FM a **13** v živých bunkách použitím 405 nm, 488 nm a 640 nm laserov. Jedna konfokálna rovina (priemer priezoru = 26,8  $\mu$ m) bola odfotená a NIS

Elements AR 4.20 software bol tiež použitý na vytvorenie profilu fluorescenčnej intenzity.

#### ***4.17. Príprava lipozómov***

Veľké unilamelárne lipozómy boli pripravené extrúziou zo suspenzie multilamelárnych lipozómov. Lipidy (dioleoylfosfatidylcholín 40 mg,  $T_c \approx -18$  °C) boli rozpustené v  $\text{CHCl}_3$  (20 ml) a ten bol oddestilovaný z destilačnej banky (100 ml) za zníženého tlaku na vodnom kúpeli pri teplote 37 °C. Vzniknutý tenký lipidový film bol následne ponechaný na vodnom kúpeli pri tlaku 5 mBar na odstránenie zvyškov  $\text{CHCl}_3$ . Britton-Robinsonov pufor (2,4 ml, pH 7,4) bol pridaný do banky a lipidy boli jemným krúživým pohybom odstránené zo steny banky. Vzniknutá suspenzia bola miešaná 5 min, aby vznikli multilamelárne lipozómy, a ponechaná 4 h pri laboratórnej teplote napúčať. Veľké unilamelárne lipozómy boli pripravené z tejto suspenzie použitím malého ručného extrudéra LiposoFast Basic (Avestin, Canada). Suspenzia bola pretláčaná tam a späť 21-krát cez 2 polykarbonátové filtre (priemer pórov 100 nm) pri laboratórnej teplote. Bol získaný zásobný 25 mM roztok unilamelárnych lipozómov s približným priemerom 130 nm. Príprava prebiehala podľa publikovaného postupu.<sup>62</sup>

#### ***4.18. Meranie absorpčných spektier roztoku látky 13 po postupnom pridávaní roztoku lipozómov***

Zo zásobného roztoku látky **13** (DMSO, 100  $\mu\text{M}$ ) bolo do kyvety s pufrom (2 ml, Britton-Robinsonov, pH 7,4) pridaných 20  $\mu\text{l}$ , tohto roztoku, aby bol získaný 1  $\mu\text{M}$  roztok látky **13**. Do tohto roztoku bolo pridaných 10  $\mu\text{l}$  zásobného roztoku lipozómov (25 mM). Bolo zmerané absorpčné spektrum proti slepej vzorke (pufor + lipozómy). Tento postup bol zopakovaný celkom 10-krát.

## 5. DISKUSIA

Vo všeobecnosti syntéza ftalocyanínových látok vychádza z cyklotetramerizácie vhodných prekurzorov, aromatických *ortho*-dikarbonitrilov. Preto v tejto práci boli hlavnými krokmi príprava vhodných prekurzorov a ich následná cyklotetramerizácia. Prvým krokom pri syntéze bola príprava hydrofilných prekurzorov. Na ich prípravu sme potrebovali 2,6-bis[(1*H*-imidazol-1-yl)metyl]-4-metylphenol (**1**), ktorý bol pripravený kondenzačnou reakciou imidazolu s 2,6-bis(hydroxymetyl)-4-metylphenolom (Schéma 1). Táto reakcia bola realizovaná podľa publikovaného postupu<sup>1</sup> s výtťažkom 85 %.

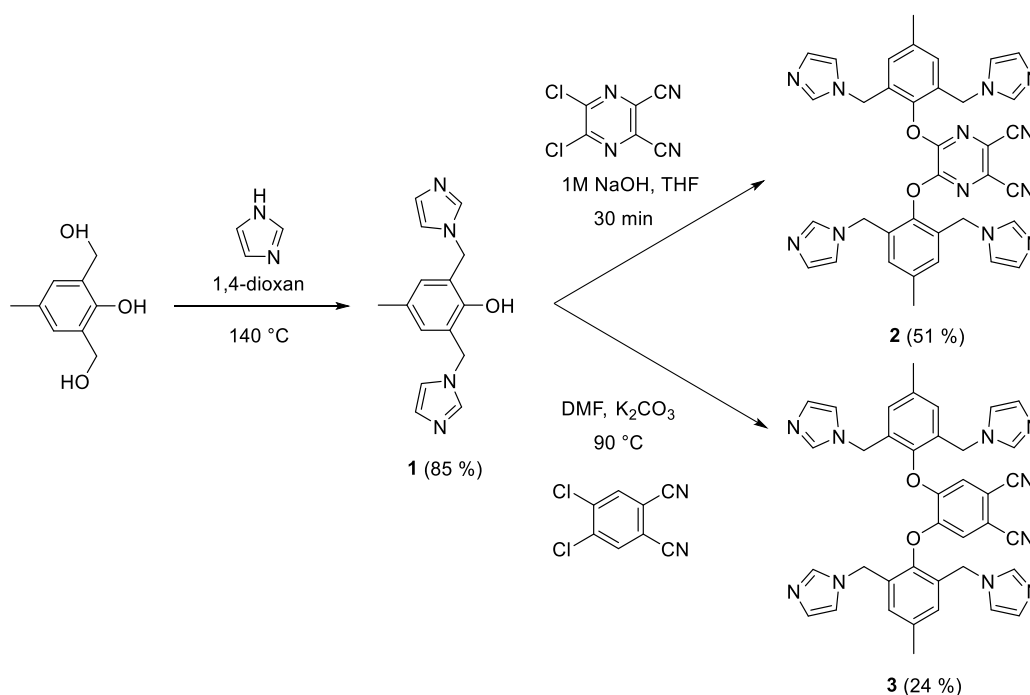


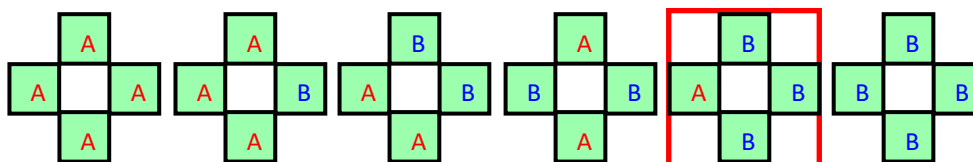
Schéma 1 Príprava prekurzorov **2** a **3**

Hydrofilný pyrazínový prekurzor **2** sme pripravili nukleofilnou substitúciou 5,6-dichlórpyrazín-2,3-dikarbonitrilu s pripraveným fenolom **1** (Schéma 1). Substitúcia prebiehala v polohe 5 a 6 pyrazínového cyklu vďaka silne elektróndeficitným uhlíkom v týchto polohách. V prítomnosti 1M hydroxidu sodného vznikol zo substituovaného fenolu **1** fenolát, ktorý ako silný nukleofil napádal tieto elektróndeficitné uhlíky v polohách 5 a 6 pyrazínového cyklu. Prekurzor **2** bol pripravený vo výtážku 51 %. Ftalonitrilový prekurzor **3** bol pripravený obdobne, nukleofilnou substitúciou 4,5-dichlórfalonitrilu. Substitúcia prebiehala v polohe 4 a 5 benzénového cyklu, opäť vďaka elektróndeficitným

uhlíkom s naviazanými chlórsubstituentmi, i keď v tomto prípade bol parciálny negatívny náboj výrazne menší než v prípade pyrazínového analógu. Reakcia preto prebiehala v bezvodom prostredí za použitia bezvodého uhličitanu draselného ako bázy a výtazky ftalonitrilu **3** boli výrazne nižšie (24 %). Relatívne nižšie výtazky produktov **2** a **3** v porovnaní s inými prípravami aryloxy- substituovaných ftalonitrilov<sup>63</sup> alebo pyrazín-5,6-dikarbonitrilov<sup>64</sup> boli prevažne spôsobené výrazným zachytávaním silne bázického produktu na silikageli v stĺpcovej kolóne.

### 5.1. Cyklotetramerizačné reakcie

Na cyklotetramerizáciu bola použitá metóda štatistickej kondenzácie dvoch prekursorov, keďže naším cieľom bolo syntetizovať asymetrický ftalocyanín alebo jeho aza-analóg. Štatisticky vzniká vždy 6 produktov (Obr. 16). Naším požadovaným produktom bol ftalocyanín alebo jeho aza-analóg typu AB<sub>3</sub>.



Obr. 16 Šesť typov kongenéro

V prvej cyklotetramerizačnej reakcii bol použitý pyrazínový prekursor **2** v kombinácii s 4,5-bis(*terc*-butylsulfanyl)ftalonitrilom (Schéma 2). Ako iniciátor reakcie bol použitý butanolát horečnatý, vďaka ktorému bola získaná zmes produktov vo forme horečnatých komplexov. Pre všeobecne lepšiu separáciu na tenkovrstvej chromatografii (silikagel) boli tieto komplexy prevedené na nekovové deriváty reakciou s kyselinou *para*-toluénsulfónovou. Následne boli na tenkovrstvej chromatografii separované. Na TLC doske sa objavilo viac ako predpokladaných 6 škvŕn, čo značilo väčšie množstvo produktov. Bolo vyskúšaných niekoľko separačných sústav. S dvoma sústavami sa nám podarilo separovať 3 hlavné produkty reakcie ako škvŕny A, B a C (viď. Obr. 17). Rozhodli sme sa izolovať látky z týchto škvŕn.

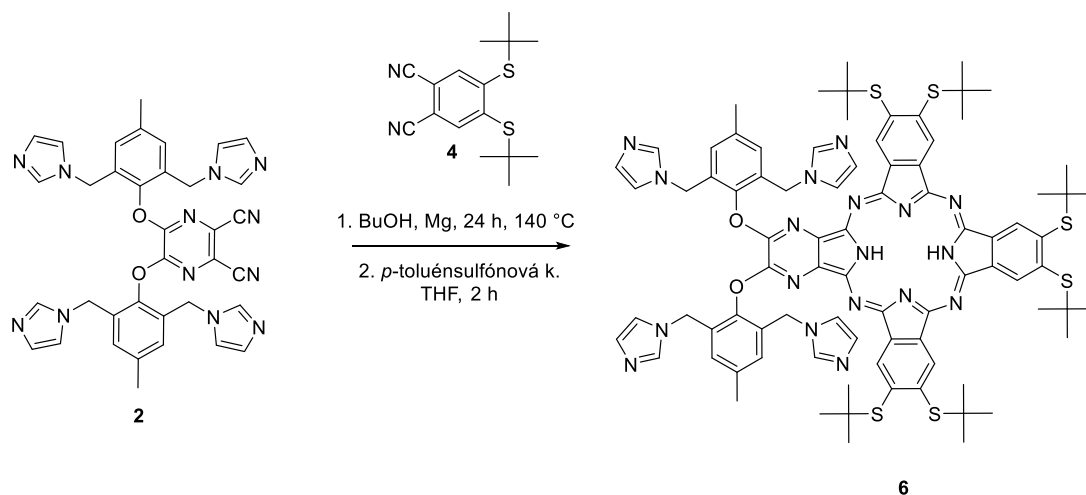
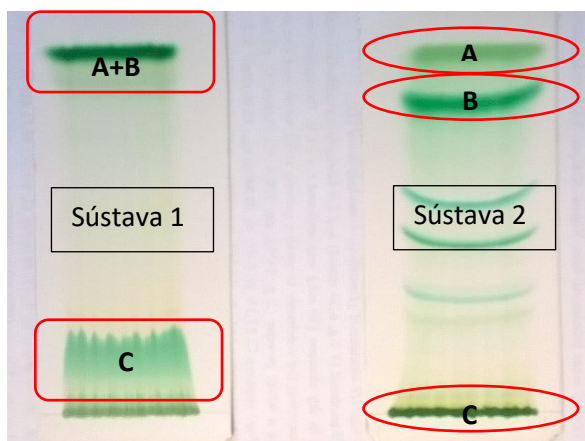


Schéma 2 Syntéza produktu 6



Obr. 17 TLC zmesi produktov reakcie prekursoru 2 a 4 sústava 1:  $\text{CHCl}_3:\text{THF}:\text{MeOH}$  50:3:2, sústava 2: toluen: $\text{CHCl}_3:\text{THF}$  30:10:1

Látky sme následne identifikovali pomocou hmotnostnej spektrometrie. Zistili sme, že pri cyklotetramerizačnej reakcii došlo k výmene substituovaných fenoxyskupín za butoxyskupiny z iniciátora reakcie. Uhlíky v polohách 5 a 6 pyrazínového jadra sú stále silne elektróndeficitné, preto butanolát ako silný nukleofil napadol polohy 5 a 6 a došlo k výmene fenoxysubstituentov za butoxyskupiny (Schéma 3). Látka zo škvry **A** bola identifikovaná ako produkt **7**, látka zo škvry **B** ako produkt **8** a látka zo škvry **C** ako produkt **9**. Preto sme sa rozhodli v ďalšej syntéze pokračovať už len s ftalonitrilovým prekursorom **3**, u ktorého k tejto výmene všeobecne nedochádza.

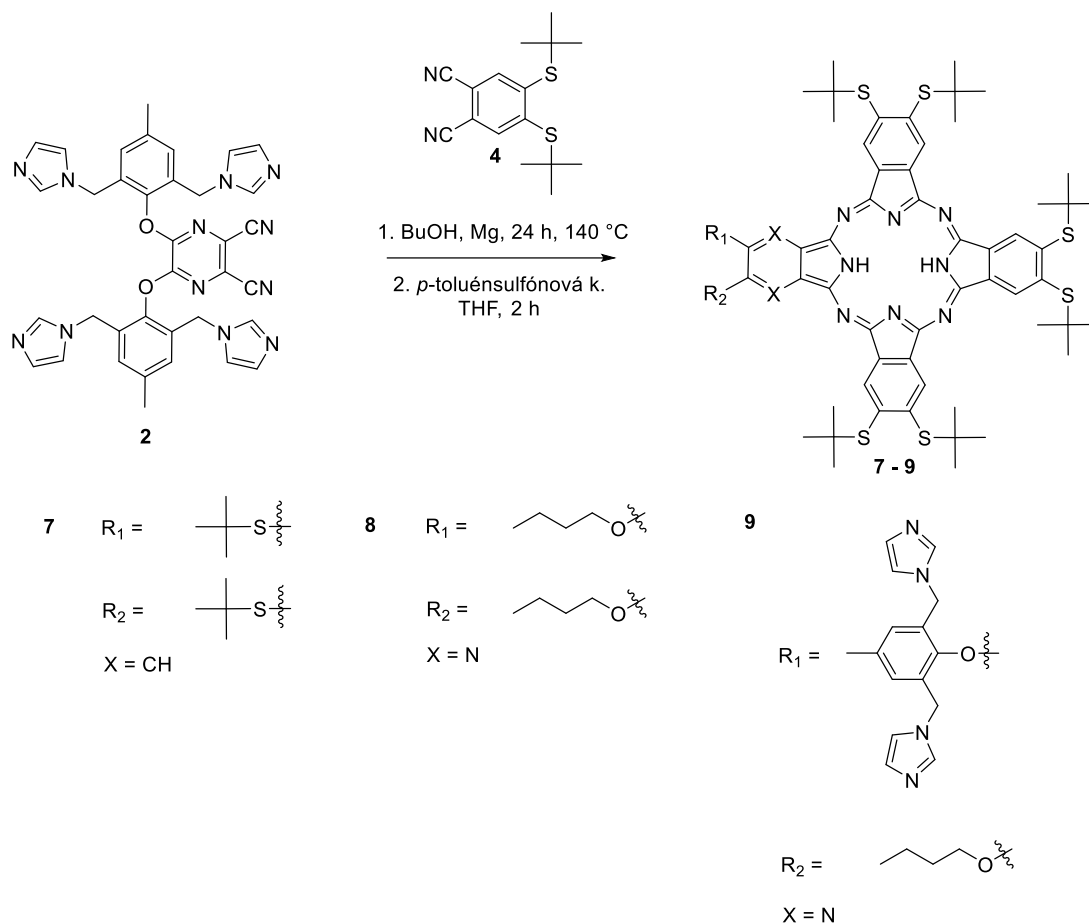


Schéma 3 Produkty reakcie prekursoru 2 a 4

V ďalšej cyklotetramerizačnej reakcii sme vychádzali z ftalonitrilového prekursoru **3** a prekursoru **4** v prípade produktu **10Mg** a prekursoru **5** v prípade produktu **11Mg** (Schéma 4). Iniciátorom reakcie bol opäť butanolát horečnatý. Obdobne ako vo vyššie diskutovanej reakcii sme získali zmes produktov vo forme horečnatých komplexov. V tomto prípade sa horečnaté komplexy na tenkovrstvej chromatografii (silikagel) dali dobre separovať. Následne sme na stĺpcovej chromatografii (silikagel) za použitia dvoch separačných sústav získali požadované frakcie s výtťažkom reakcie 28 % pre ftalocyanín **10Mg** a 33 % pre ftalocyanín **11Mg**. Horečnaté komplexy ftalocyanínov **10Mg** a **11Mg** boli podrobené reakcii s kyselinou *para*-toluénsulfónovou. Horečnaté komplexy ftalocyanínov nie sú v kyslom prostredí stabilné a prechádzajú na nekovové deriváty, ktoré tak boli získané vo výtťažku 46 % pre ftalocyanín **10H** a 89 % pre ftalocyanín **11H** (Schéma 4). Tieto nekovové deriváty boli použité na ďalšiu syntézu zinočnatých komplexov,

ktoré boli pripravené za použitia bezvodého octanu zinočnatého v pyridíne vo výt'azku 71 % pre ftalocyanín **10Zn** a 47 % pre ftalocyanín **11Zn** (Schéma 4).

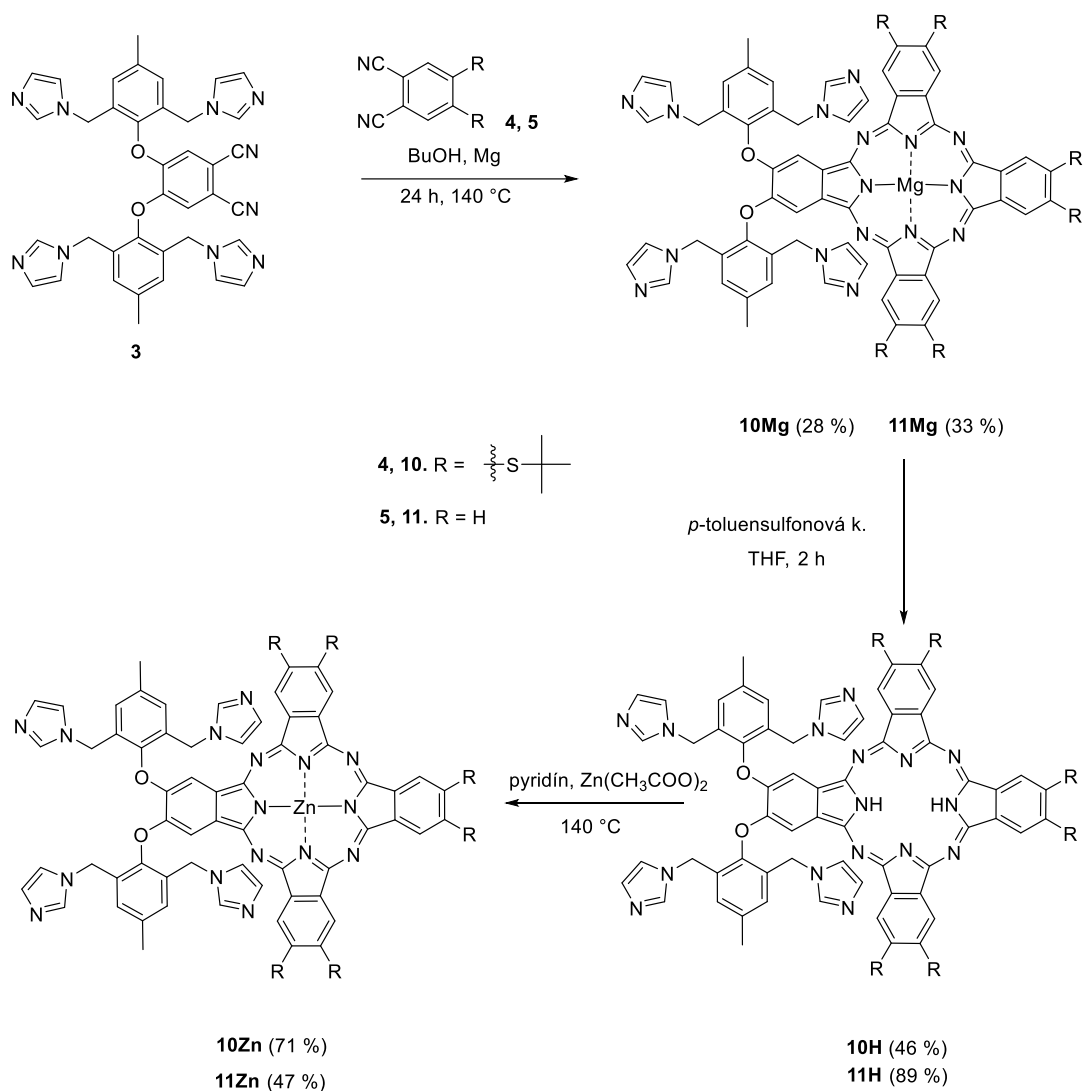


Schéma 4 Cyklotetramerizácia precursorov **3**, **4** a **5**, prevedenie produktov **10Mg** a **11Mg** na nekovové **10H** a **11H** deriváty, chelatácia centrálneho zinočnatého katiónu do komplexov **10Zn** a **11Zn**

## 5.2. Alkylácia periférne viazaných imidazolových skupín

Zinočnaté komplexy **10Zn** a **11Zn** boli použité v ďalšej syntéze. Aby sa zvýšila hydrofilita imidazolových jednotiek, bol metyljodidom alkylovaný dusík v polohe 3 tohto cyklu. Alkylácia prebiehala v prostredí bezvodého DMF, pri 80 °C. Alkylácia ftalocyanínu **11Zn** prebehla bez problémov a s výt'azkom 78 % (Schéma 5). Získali sme finálnu látku **13**. Pri alkylácii ftalocyanínu **10Zn** (Schéma 5) sme sa najprv na základe  $^1\text{H}$  NMR spektra (Obr. 18) domnievali, že nedošlo k úplnej alkylácii

polohy 3 imidazolových skupín, čo sme si vysvetľovali nedostatkom alkylačného činidla.

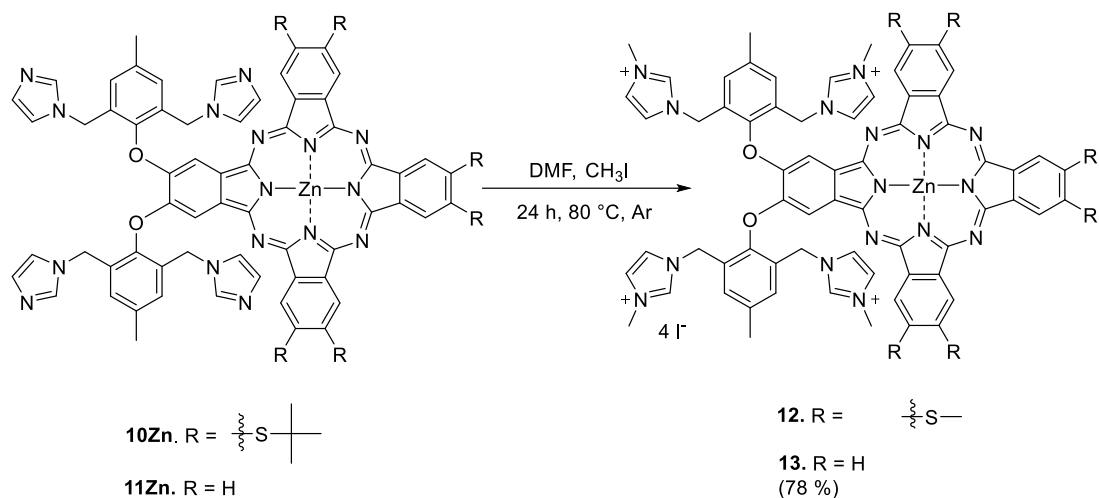
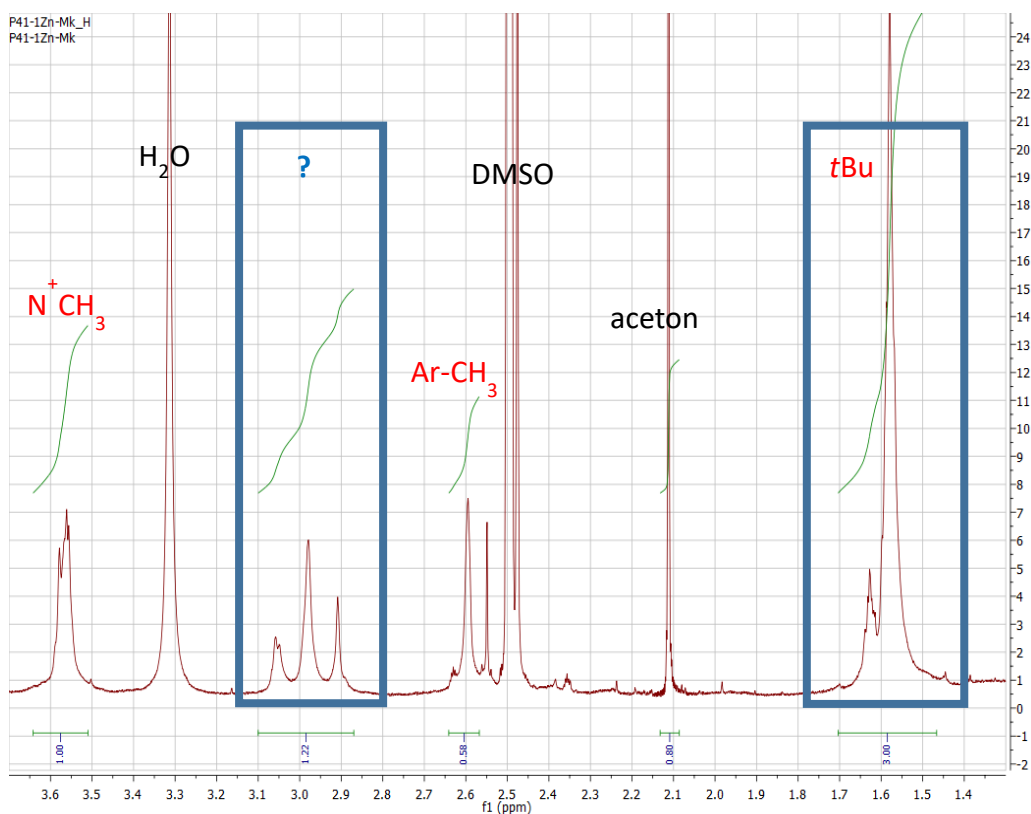


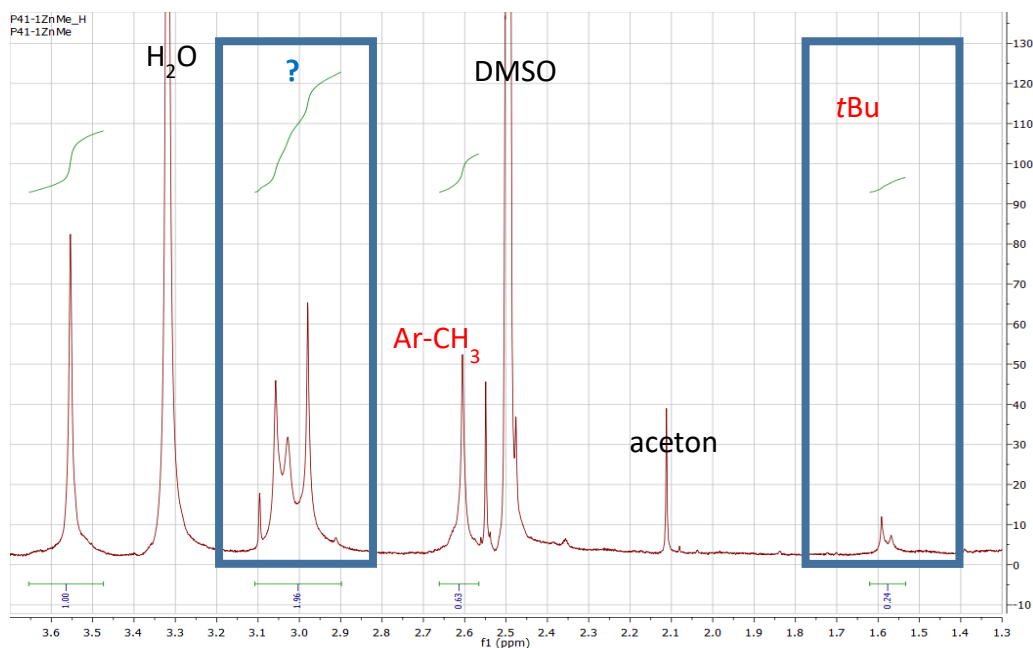
Schéma 5 Alkylácia periférne viazaných imidazolových skupín produktu  $10\text{Zn}$  a  $11\text{Zn}$



Obr. 18  $^1\text{H}$  NMR spektrum v  $\text{DMSO-d}_6$  po prvej alkylácii látky  $10\text{Zn}$ , merané na Varian VNMR S500, 500 MHz



Preto sme sa rozhodli zvýšiť množstvo alkylačného činidla na 40 násobok. Pri analýze  $^1\text{H}$  NMR spektra po alkylácii nadbytkom alkylačného činidla sa ale prakticky úplne stratil signál pre *tert*-butyl pri 1,55 ppm (Obr. 19) a objavili sa nové signály pri 3,00 ppm. Po dôkladnej spätnej analýze  $^1\text{H}$  NMR spektra po prvej alkylácii sme zistili, že počet *tert*-butylových skupín už po prvej alkylácii nezodpovedal počtu šiestich skupín v predpokladanej štruktúre, a že tento nový signál pri 3,0 ppm už bol zreteľný, i keď nie tak intenzívny.



Obr. 19  $^1\text{H}$  NMR spektrum v  $\text{DMSO}-d_6$  po druhej alkylácii látky **10Zn**, merané na Varian VNMR S500, 500 MHz

Na základe tohto zistenia sme sa domnievali, že došlo k výmene *tert*-butylových skupín za metylové skupiny. Túto hypotézu sme overovali na modelovom symetrickom ftalocyaniáne **14** s *tert*-butylovými skupinami (Schéma 6). Pri použití rovnakých reakčných podmienok ako pri alkylácii ftalocyaniínu **10Zn** sme na tenkovrstvej chromatografii pozorovali zmes produktov, ktorú sme analyzovali na hmotnostnej spektrometrii. Ako sa ukázalo, produkty boli rôzne substituované metylsulfanylovou a *tert*-butylsulfanylovou skupinou (Obr. 20). Pri alkylácii ftalocyaniínu **11Zn** k podobnej výmene nedochádzalo, keďže *tert*-butylsulfanylovú skupinu neobsahoval. Látka **13** bola dobre rozpustná v polárnych rozpúšťadlách (DMSO, DMF, metanol, etanol) a veľmi slabo vo vode. Následné fotofyzikálne merania boli realizované s látkou **13**, ktorá bola chemicky definovaná, zatiaľ čo látka **12** nemala definované chemické zloženie.

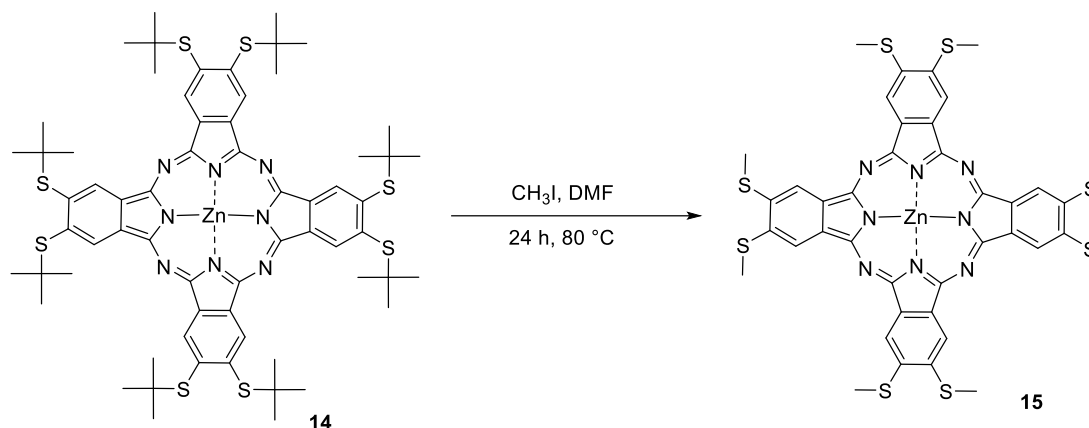
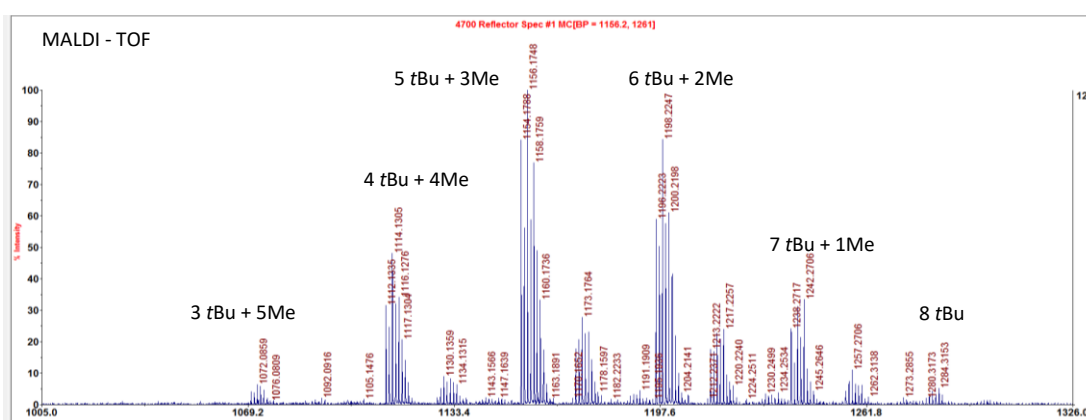
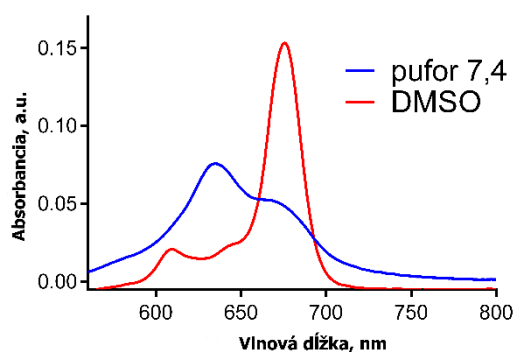


Schéma 6 Reakcia symetrického ftalocyanínu **14** s MeI, produkt **15** je hypotetický



Obr. 20 MS-spektrum ftalocyanínu **14** po reakcii s MeI

### 5.3. Fotofyzikálne merania – Vis spektrofotometria



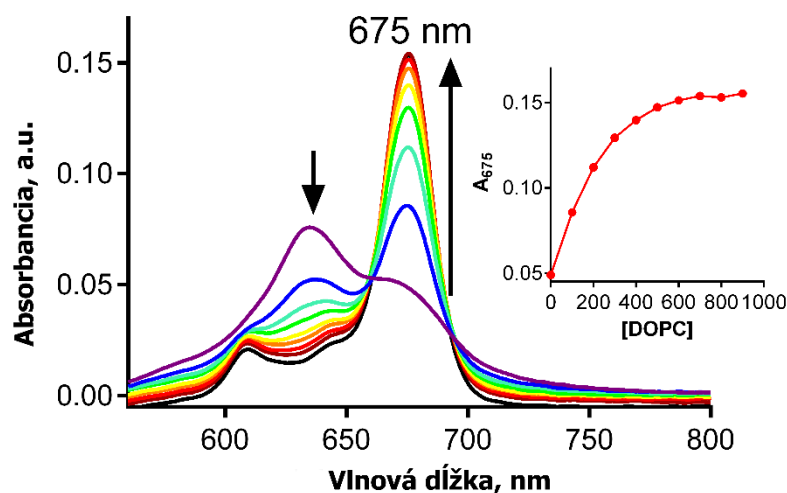
Graf 1 Absorpčné spektrum látky **13** v prostredí Britton-Robinsonovho pufru (pH 7,4) a v DMSO

U látky **13** bolo zmerané absorpčné spektrum v prostredí Britton-Robinsonovho pufru (pH 7,4) a v prostredí DMSO. Zmerané absorpčné spektrá naznačovali agregáciu<sup>61</sup> látky **13** v prostredí pufru. V prostredí DMSO bola podľa absorpčného spektra látka **13** v monomérskej forme (Graf 1). Absorbancia agregovaných molekúl

ftalocyanínov je typicky znížená v oblasti maxima absorpcie monomérskej formy. Maximum absorpcie agregovanej formy sa oproti monomérskej posúva do nižších vlnových dĺžok.

#### 5.4. Interakcia látky 13 s lipozómami

Aby sme overili schopnosť interakcie látky **13** s biomembránami, zvolili sme unilamelárne lipozómy, ktoré môžu byť považované za ich zjednodušený model. Unilamelárne lipozómy boli pripravené extrúziou. Na fotofyzikálne merania bol použitý pufr s hodnotou pH 7,4 (Britton-Robinsonov). Predpokladali sme, že po pridaní vodného roztoku látky **13** k biomembráne dôjde k zmene agregovanej formy na monomérsnu formu, a to začlenením samostatných molekúl do membrány. Túto hypotézu sme overili zmeraním absorpčných spektier. Postupne sme k pufru s látkou **13** pridávali 10  $\mu\text{L}$  25mM roztoku unilamelárnych lipozómov. Absorbancia sa postupne zvyšovala v oblasti maxima absorpcie monomérskej formy pri 675 nm (Graf 2). Pri pomere lipidy : látka **13** približne 800 : 1 bola prítomná už len monomérsna forma.

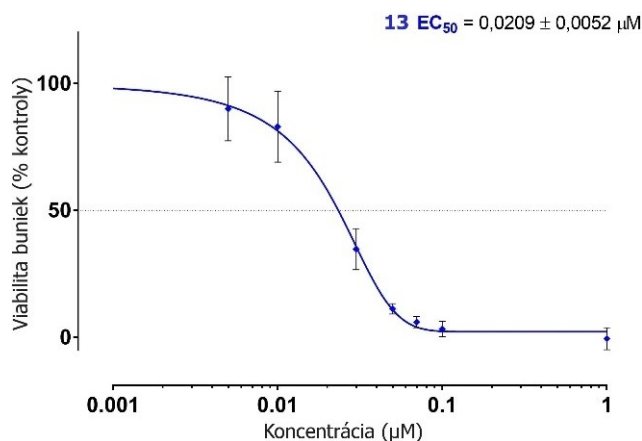


Graf 2 Absorpčné spektrá látky **13** (1  $\mu\text{M}$ ) v pufrí po postupnom pridávaní 25  $\mu\text{M}$  roztoku unilamelárnych lipozómov

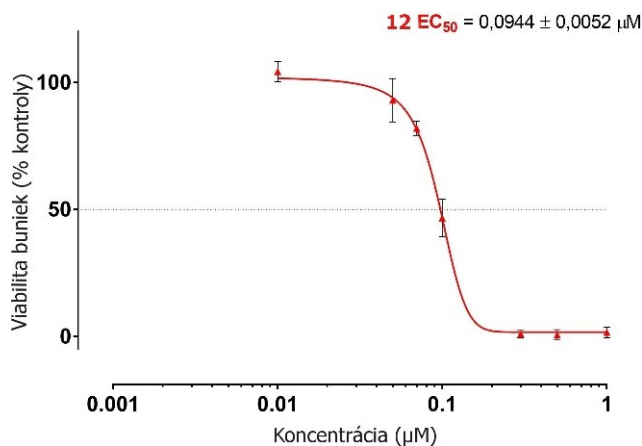
#### 5.5. Biologické testy

Po úspešnej syntéze látky **13** a overení interakcie s biomembránami bola látka **13** testovaná na Katedre biochemických vied na fotodynamickú aktivitu. Testy boli realizované na rakovinových HeLa bunkách. Bunky boli ožarované 15 minút

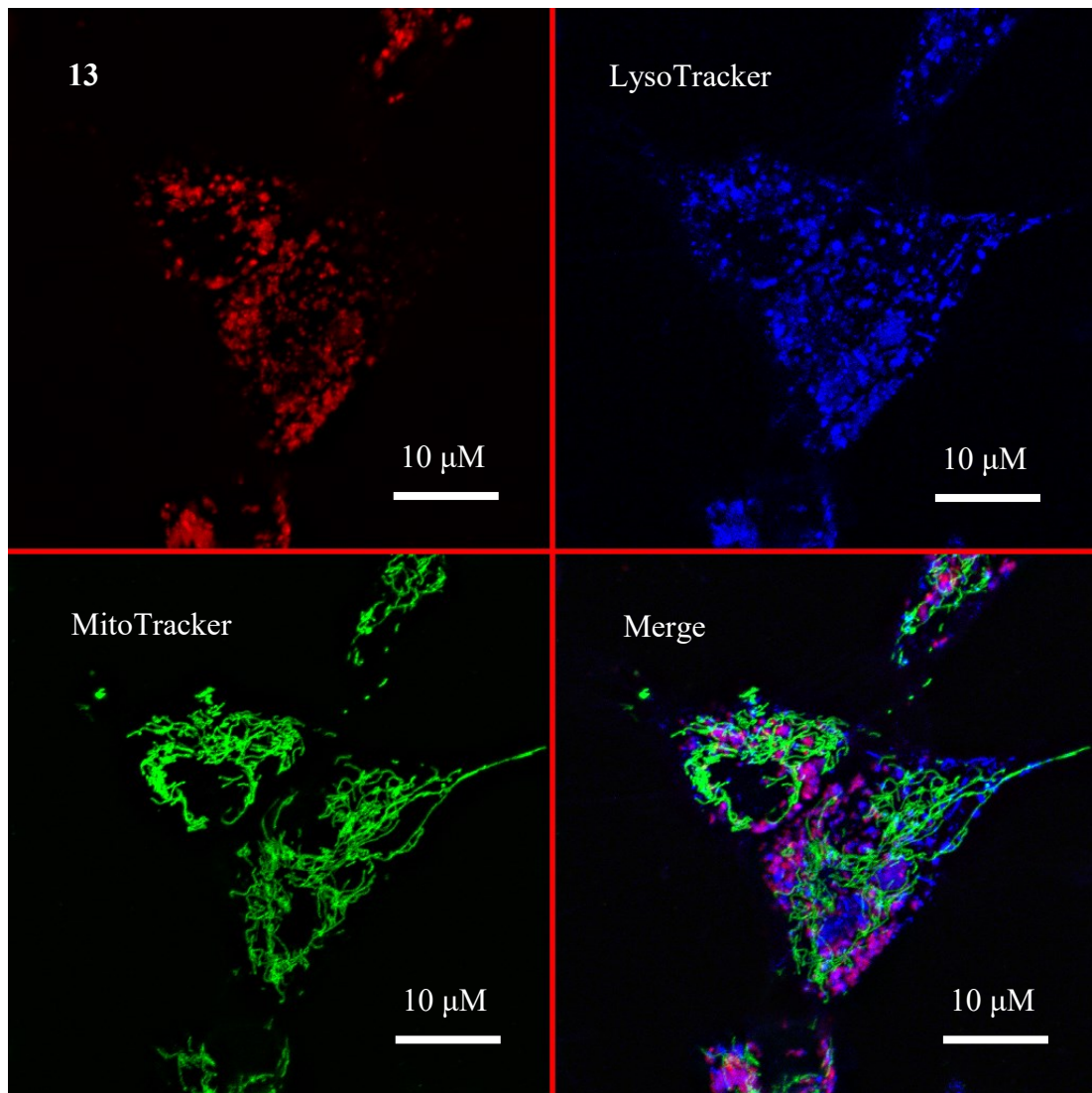
xenónovou lampou s nasledujúcimi parametrami: 450 W  $\lambda > 570$  nm, 12,4 mW cm<sup>-2</sup>, 11,2 J cm<sup>-2</sup>. Látka **13** vykázala výbornú fotodynamickú aktivitu (EC<sub>50</sub> = 20,9 nM; Graf 3). Obdobne bola meraná fotodynamická aktivita látky **12** aj keď nebola chemicky jednotná. Nameraná hodnota EC<sub>50</sub> (94,4 nM; Graf 4) u látky **12** rovnako poukazuje na jej dobrú fotodynamickú aktivitu, ktorá je porovnateľná alebo vyššia ako u klinicky používaných PS testovaných na HeLa bunkách v rovnakých podmienkach (vertepofrín EC<sub>50</sub> = 36 nM, Photosens® EC<sub>50</sub> = 2,07 μM).<sup>61</sup> Následne sme pozorovali subcelulárnu lokalizáciu látky **13** konfokálnym mikroskopom. Zamerali sme sa na dve najočakávanejšie organely, tj. lyzozómy a mitochondrie.<sup>24</sup> Obe organely boli značené príslušnými sondami (LysoTracker a MitoTracker). Látka **13** sa po prieniku do bunky lokalizovala v lyzozómoch (Obr. 21). Lyzozómy sú teda hlavným miestom zásahu singletového kyslíka.



Graf 3 Závislosť viability HeLa buniek na koncentrácii látky **13** po ožiarení svetlom ( $\lambda > 570$  nm, 12,4 mW cm<sup>-2</sup>, 15 min, 11,2 J cm<sup>-2</sup>)



Graf 4 Závislosť viability HeLa buniek na koncentrácii látky **12** po ožiarení svetlom ( $\lambda > 570$  nm, 12,4 mW cm<sup>-2</sup>, 15 min, 11,2 J cm<sup>-2</sup>)



*Obr. 21 Lokalizácia látky 13 v bunke (červená), značené lyzozómy (modrá) a mitochondrie (zelená)*

## 6. ZÁVER

Táto diplomová práca si kládla za cieľ syntetizovať amfifilné ftalocyaníny a ich aza-analógy, ktoré by boli schopné interagovať s biomembránami. Boli syntetizované amfifilné ftalocyaníny vo forme horečnatých komplexov, ktoré boli prevedené cez nekovové deriváty na stabilnejšie zinočnaté komplexy. Aza-analógy amfifilných ftalocyanínov sa nepodarilo syntetizovať z dôvodu nestability fenoxysubstituentov, v polohe 5 a 6 pyrazínového jadra, v prítomnosti iniciátoru butanolátu horečnatého. Následná príprava kvarternizovaných derivátov prebehla úspešne u ftalocyanínu odvodeného od ftalonitrilového prekursoru. U ftalocyanínu odvodeného od 4,5-bis(*tert*-butylsulfanyl)ftalonitrilu došlo počas alkylácie k výmene *tert*-butylových skupín za metylové skupiny. K tejto výmene dochádzalo aj u symetrického ftalocyanínu s periférne viazanými *tert*-butylovými skupinami. Pripravené látky vykázali dobrú fotodynamickú aktivitu, výrazne lepšiu ako látky klinicky používané a porovnateľnú s najúčinnějšími doteraz publikovanými látkami. Derivát odvodený od ftalonitrilového prekursoru bol testovaný na interakciu s biomembránou na unilamelárnych lipozómoch ako zjednodušenom modeli. V prostredí pufru 7,4 sa nachádzal v agregovanej (fotodynamicky neaktívnej) forme, po pridaní lipozómov prešiel na monoméru (fotodynamicky aktívnu) formu. Lipozómy sú teda potenciálne vhodným nosičovým systémom. Ďalšou výhodou lipozómov je, že ich je možné ďalej upraviť pripojením cieľiacich molekúl, čo by ďalej zvýšilo selektivitu terapie.

## 7. POUŽITÁ LITERATÚRA

---

- <sup>1</sup> MAKHSEED, S., et al. Water-soluble non-aggregating zinc phthalocyanine and in vitro studies for photodynamic therapy. *Chem. Commun.*, 2013, 49(95), 11149–11151.
- <sup>2</sup> AGOSTINIS, P., et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *Ca-Cancer J. Clin.*, 2011, 61(4), 250–281.
- <sup>3</sup> DOUGHERTY, T., et al. Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1998, 90(12), 889–905.
- <sup>4</sup> CERMAN, E.; CEKIC, O. Clinical use of photodynamic therapy in ocular tumors. *Surv. Ophthalmol.*, 2015, 60(6), 557–574.
- <sup>5</sup> SEE, J.A., et al. Consensus recommendations on the use of daylight photodynamic therapy with methyl aminolevulinate cream for actinic keratoses in Australia. *Australas. J. Dermatol.*, 2016, 57(3), 167–174.
- <sup>6</sup> LUCENA, S., et al. Combined treatments with photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, 16(10), 25912–25954.
- <sup>7</sup> HILLEMANN, P.; EINSTEIN, M.; IVERSEN, E. Topical hexaminolevulinate photodynamic therapy for the treatment of persistent human papilloma virus infections and cervical intraepithelial neoplasia. *Expert Opin. Invest. Drugs*, 2015, 24(2), 273–281.
- <sup>8</sup> GHANEM, A., et al. Is mechanical curettage with adjunct photodynamic therapy more effective in the treatment of peri-implantitis than mechanical curettage alone?. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2016, 15, 191–196.
- <sup>9</sup> SUBRAMANIAN, C.R.; TRIADAFILOPOULOS, G. Endoscopic treatments for dysplastic barrett's esophagus: resection, ablation, what else?. *World J. Surg.*, 2015 39(3), 597–605.
- <sup>10</sup> OXENBERG, J.; HOCHWALD, S.N.; NURKIN S. Ablative therapies for colorectal polyps and malignancy. *BioMed Res. Int.*, 2014.
- <sup>11</sup> MATULL, W.R., et al. R0 but not R1/R2 resection is associated with better survival than palliative photodynamic therapy in biliary tract cancer. *Liver Int.*, 2011, 31(1), 99–107.
- <sup>12</sup> KOSTRON, H. Photodynamic diagnosis and therapy and the brain. *Methods Mol. Biol.*, 2010, 635, 261–280.

- 
- <sup>13</sup> BOWN, S.G. Photodynamic therapy for photochemists. *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.*, 2013, 371(1995), 20120371.
- <sup>14</sup> KEYAL, U.; BHATTA, A.K.; WANG, X.L. Photodynamic therapy for the treatment of different severity of acne: A systematic review. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2016, 14, 191–199.
- <sup>15</sup> LIANG, Y., et al. Photodynamic therapy as an antifungal treatment (Review). *Exp. Ther. Med.*, 2016, 12(1), 23–27.
- <sup>16</sup> KE, M.R., et al. Photodynamic inactivation of bacteria and viruses using two monosubstituted zinc(II) phthalocyanines. *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, 84, 278–283.
- <sup>17</sup> SHAN, X, et al. An open uncontrolled trial of topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of urethral condylomata acuminata in male patients. *Indian J. Dermatol. Venereol.*, 2016, 82(1), 65–67.
- <sup>18</sup> LATIEF, M.A., et al. Inactivation of acyclovir-sensitive and-resistant strains of herpes simplex virus type 1 in vitro by photodynamic antimicrobial chemotherapy. *Mol. Vision.*, 2015, 21, 532–537.
- <sup>19</sup> SOGA, T. Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming. *Cancer Sci.*, 2013, 104(3), 275–281.
- <sup>20</sup> ROBERTS, W.G.; HASAN, T. Tumor-secreted vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor influences photosensitizer uptake. *Cancer Res.*, 1993, 53(1), 153–157.
- <sup>21</sup> LANG, K.; MOSINGER, J.; WAGNEROVÁ, M. Pokroky ve fotochemii singletového kyslíku, *Chem. Listy*, 2005, 99, 211–221
- <sup>22</sup> PLAETZER, K, et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med. Sci.*, 2009, 24, 259–268.
- <sup>23</sup> DĄBROWSKI, J.M.; LUIS ,G.; ARNAUT, J.L. Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2015, 14(10), 1765–1780.
- <sup>24</sup> CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2004, 1(4), 279–293.
- <sup>25</sup> DOLMANS, D.E.; FUKUMURA, D.; JAIN, R.K. Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2003, 3(5), 380–387.



- 
- <sup>26</sup> DYSART, J.S.; PATTERSON, M.S. Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro. *Phys. Med. Biol.* 2005, 50(11), 2597–2616.
- <sup>27</sup> MOAN, J.; BERG, K. The photodegradation of porphyrines in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* 1991, 53(4), 549–553.
- <sup>28</sup> ALLISON, R.R.; SIBATA, C.H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2010, 7(2), 61–75.
- <sup>29</sup> ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M.R. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem. J.* 2016, 473(4), 347–364.
- <sup>30</sup> EDINGER, A.E.; THOMPSON, C.B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2004, 16(6), 663–669.
- <sup>31</sup> DEWAELE, M.; MAES, H.; AGOSTINIS, P. ROS mediated mechanisms of autophagy stimulation and their relevance in cancer therapy. *Autophagy*, 2010, 6(7), 838–854.
- <sup>32</sup> LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 2008, 132(1), 27–42.
- <sup>33</sup> CASTELLANI, A.; PACE, G.P.; CONCIOLI, M. Photodynamic effect of haematoporphyrin on blood microcirculation. *J. Pathol. Bacteriol.* 1963, 86(1), 99–102.
- <sup>34</sup> BHUVANESWARI, R. et al. The effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2009, 66(14), 2275–2283.
- <sup>35</sup> TSENG, M.T., et al. Photodynamic therapy induced ultrastructural alterations in microvasculature of the rat cremaster muscle. *Photochem. Photobiol.* 1988, 48(5), 675–681.
- <sup>36</sup> FINGAR, V.H.; HENDERSON, B.W. Drug and light dose dependence of photodynamic therapy: a study of tumor and normal tissue response. *Photochem. Photobiol.* 1987, 46(5), 837–847.
- <sup>37</sup> KORBELIK, M. PDT-associated host response and its role in the therapy outcome. *Lasers Surg. Med.* 2006 38(5), 500–508.
- <sup>38</sup> KROSL, G.; KORBELIK, M.; DOUGHERTY, G.J. Induction of immune cell infiltration into murine SCCVII tumour by photofrin-based photodynamic therapy. *Br. J. Cancer.* 1995, 71(3), 549–555.

- 
- <sup>39</sup> CECIC, I., et al. Characteristics of complement activation in mice bearing Lewis lung carcinomas treated by photodynamic therapy. *Cancer Lett.* 2005, 225(2), 215–223.
- <sup>40</sup> WEI, L.H., et al. Interleukin-6 trans signalling enhances photodynamic therapy by modulating cell cycling. *Br. J. Cancer*, 2007, 97(11), 1513–1522.
- <sup>41</sup> GOLLNICK, S.O., et al. Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. *Br. J. Cancer*, 2003, 88(11), 1772–1779.
- <sup>42</sup> RODRIGUEZ, M.E., et al. Structural factors and mechanisms underlying the improved photodynamic cell killing with silicon phthalocyanine photosensitizers directed to lysosomes versus mitochondria. *Photochem. Photobiol.*, 2009, 85(5), 1189–1200.
- <sup>43</sup> GARG, A.D., et al. DAMPs and PDT-mediated photo-oxidative stress: exploring the unknown. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2011, 10(5), 670–680.
- <sup>44</sup> KABINGU, E., et al. Enhanced systemic immune reactivity to a basal cell carcinoma associated antigen following photodynamic therapy. *Clin. Cancer Res.*, 2009, 15(13), 4460–4466.
- <sup>45</sup> YANO, S., et al. Current states and future views in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. C*, 2011, 12(1), 46–67.
- <sup>46</sup> DOUGHERTY, T.J. Hematoporphyrin as a photosensitizer of tumors. *Photochem. Photobiol.*, 1983, 38(3): 377–379.
- <sup>47</sup> BONNETT, R., et al. Hydroporphyrins of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumor photosensitizers. *Biochem. J.* 1989, 261(1), 277–280.
- <sup>48</sup> BALL, D.J.; VERNON, D.I.; BROWN, S.B.G. Research note: the high photoactivity of m-THPC in photodynamic therapy. Unusually strong retention of m-THPC by RIF-1 cells in culture. *Photochem. Photobiol.*, 1999, 69(3), 360–363.
- <sup>49</sup> TOMÚ, A., et al. meso-Arylporphyrins as dienophiles in Diels-Alder reactions: a novel approach to the synthesis of chlorins, bacteriochlorins and naphthoporphyrins. *Chem. Commun.*, 1997, 13, 1199–1200.
- <sup>50</sup> CHEN, Y., et al. Methyl pyropheophorbide-a analogues: potential fluorescent probes for the peripheral-type benzodiazepine receptor. Effect of central metal in photosensitizing efficacy. *J. Med. Chem.* 2005, 48(11): 3692–3695.

- 
- <sup>51</sup> BONNETT, R. *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*. Gordon and Breach Science Publishers. London 2000, 324 s. ISBN 9056992481
- <sup>52</sup> COHEN, D.K.; LEE, P.K. Photodynamic therapy for non-melanoma skin cancers. *Cancers*, 2016, 8(10), 90.
- <sup>53</sup> JIANG, X.J., et al. Phthalocyanine–polyamine conjugates as highly efficient photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Med. Chem.* 2011, 54(1), 320–330.
- <sup>54</sup> MEI-RONG, K.E., et al. A phthalocyanine-peptide conjugate with high in vitro photodynamic activity and enhanced in vivo tumor-retention property. *Chem. - Eur. J.*, 2012, 18(14), 4225–4233.
- <sup>55</sup> CHEN, Z., et al. Zinc phthalocyanine conjugated with the amino-terminal fragment of urokinase for tumor-targeting photodynamic therapy. *Acta Biomater.*, 2014, 10(10), 4257–4268.
- <sup>56</sup> LI, Y., et al. Highly water-soluble and tumor-targeted photosensitizers for photodynamic therapy. *Org. Biomol. Chem.*, 2015, 13(28), 7681–7694.
- <sup>57</sup> İŞCI, Ü., et al. Methylsulfonyl Zn phthalocyanine: a polyvalent and powerful hydrophobic photosensitizer with a wide spectrum of photodynamic applications. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2016, 13, 40–47.
- <sup>58</sup> LI, F., et al. Synthesis and biological evaluation of peptide-conjugated phthalocyanine photosensitizers with highly hydrophilic modifications. *Org. Biomol. Chem.*, 2016, 14(13), 3409–3422.
- <sup>59</sup> KUZYNIAK, W., et al. Tetra-triethyleneoxysulfonyl substituted zinc phthalocyanine for photodynamic cancer therapy. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2016, 13, 148–157.
- <sup>60</sup> MACHACEK, M., et al. Far-red-absorbing cationic phthalocyanine photosensitizers: Synthesis and evaluation of the photodynamic anticancer activity and the mode of cell death induction. *J. Med. Chem.*, 2015, 58(4), 1736–1749.
- <sup>61</sup> MACHACEK, M., et al. Tetra(3,4-pyrido)porphyrazines caught in the cationic cage: toward nanomolar active photosensitizers. *J. Med. Chem.*, 2016, 59(20), 9443–9456.
- <sup>62</sup> ZIMCIK, P., et al. Influence of aggregation on interaction of lipophilic, water-insoluble azaphthalocyanines with DOPC vesicles. *Photochem. Photobiol.*, 2007, 83(6), 1497–1504

---

<sup>63</sup> WÖHRLE, D., et al. A simple synthesis of 4,5-disubstituted 1,2-dicyanobenzenes and 2,3,9,10,16,17,23,24-octasubstituted phthalocyanines. *Synthesis*, 1993, 1993(02), 194–196.

<sup>64</sup> NOVAKOVA, V., et al. The synthesis, photochemical and photophysical properties of zinc aryloxy- and alkyloxy azaphthalocyanines. *Dyes Pigm.*, 2010, 87(2), 173–179.