

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY



Syntéza derivátů BODIPY pro fotodynamickou terapii

Diplomová práce

Milan Rydrych



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

Hradec Králové 2021

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne

.....

Milan Rydrych

Poděkování patří především prof. PharmDr. Petru Zimčíkovi, PhD. za cenné a velmi trpělivé vedení mé absolventské práce v průběhu posledních tří let. Ke konečné podobě práce výrazně přispěla i doc. PharmDr. Veronika Nováková, PhD. a v neposlední řadě i celá, velmi nápomocná a kolegiální skupina Azaphtalocyanine group.

Za přípravu vzorků a testy na in vitro kulturách nádorových buněk vděčím RNDr. Miloslavu Macháčkovi, PhD., doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za provedení NMR měření syntetizovaných látek a paní Ivě Venclovské za měření infračervených spekter.

Výzkum byl financován z prostředků Grantové agentury Univerzity Karlovy, projekt číslo 1606119.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Autor: **Milan Rydrych**

Školitel: **Prof. PharmDr. Petr Zimčík, PhD.**

Název diplomové práce: Syntéza derivátů BODIPY pro fotodynamickou terapii

Komplexy boritých dipyromethenových barviv (BODIPY) jsou již od devadesátých let využívány pro svou fotostabilitu, vysoké absorpční koeficienty a kvantové výtěžky fluorescence. Relativně nedávno došlo k objevu modifikace struktury za použití efektu těžkého atomu, kdy se dosáhlo i vysokých kvantových výtěžků singletového kyslíku a tedy vznikla rodina sloučenin s potenciálem pro využití ve fotodynamické terapii (PDT). Dosavadní BODIPY preparáty pro PDT jsou limitovány špatnou rozpustností v polárních prostředích. Tato studie poskytuje přehled současných syntetických možností a základní vztahy struktury a účinku. V experimentální části práce byly připraveny tři styryl-disubstituované látky s λ_{\max} (absorpční maximum) při vlnových délkách v blízkosti infračerveného spektra s dobrými kvantovými výtěžky singletového kyslíku a velmi dobrou fotostabilitou. Kromě cílových látek byly připraveny a charakterizovány tři dosud nepopsané 3,5-dialkoxy- substituované deriváty benzaldehydu jako prekurzory finálních látek. V neposlední řadě došlo k optimalizaci již publikovaných syntetických postupů pro účely přípravy distyryl-BODIPY.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Author: **Milan Rydrych**

Supervisor: **Prof. PharmDr. Petr Zimčík, PhD.**

Name of the thesis: Synthesis of BODIPY dyes for photodynamic therapy

Borrón-dipyromethene dyes (BODIPYs) have been used since the 1990s for their photostability, high absorption coefficients and fluorescence quantum yields. Recently, a modification of the structure using the heavy atom effect was discovered, where high quantum yields of singlet oxygen were also achieved. This fact helped creating a family of compounds with the potential for use in photodynamic therapy (PDT). Previously described BODIPY preparations for PDT are limited by poor solubility in polar environments. This study provides an overview of current synthetic options and basic structure-effect relationships. In the experimental part of the work, three styryl disubstituted substances were prepared with λ_{\max} (absorption maximum) at wavelengths in near infrared region with good quantum yields of singlet oxygen and very good photostability. In addition to the target compounds, three 3,5-dialkoxy substituted benzaldehyde derivatives were prepared and characterized as precursors for the final compounds. Finally, the already published synthetic processes were optimized for the preparation of distyryl-BODIPY.

Obsah

1	Seznam zkratk	9
2	Cíl práce	10
3	Teoretická část	11
3.1	Historie fotodynamické terapie	11
3.2	Mechanismus účinku	12
3.2.1	Fotofyzikální princip PDT	12
3.2.2	Zdroj světelného záření	13
3.2.3	Absorpce energie	15
3.3	Poškození tkáně	15
3.3.1	Mutace buňky	16
3.3.2	Rozeznání a reparace poškozené části nukleové kyseliny	17
3.3.3	Peroxidace nenasycených mastných kyselin	17
3.4	Fotosenzitizéry	18
3.4.1	1. generace fotosenzitizérů	18
3.4.2	2. generace fotosenzitizérů	18
3.5	BODIPY	21
3.5.1	Historie BODIPY	22
3.5.2	Nomenklatura BODIPY	22
3.5.3	Ovlivnění absorpčních a emisních spekter	23
3.5.4	Fluorescence a singletový kyslík	28
3.6	Použití BODIPY	32
3.6.1	Fluorofory	32
3.6.2	Senzory	32
3.6.3	BODIPY jako sondy v chemoterapii	34
3.6.4	Fotodynamická terapie	35
4	Metodická část	37
4.1.1	Kondenzační reakce aromatického aldehydu a pyrolu	37
4.1.2	Kondenzační reakce halogenidu aromatické kyseliny s pyrolem	38
4.1.3	Uzavření třetího kruhu za tvorby bora-diaza-indacenu	38
4.1.4	Halogenace základního skeletu BODIPY	39
4.1.5	Knoevenagelova reakce	40
5	Experimentální část	42
5.1	Vybavení laboratoří	42

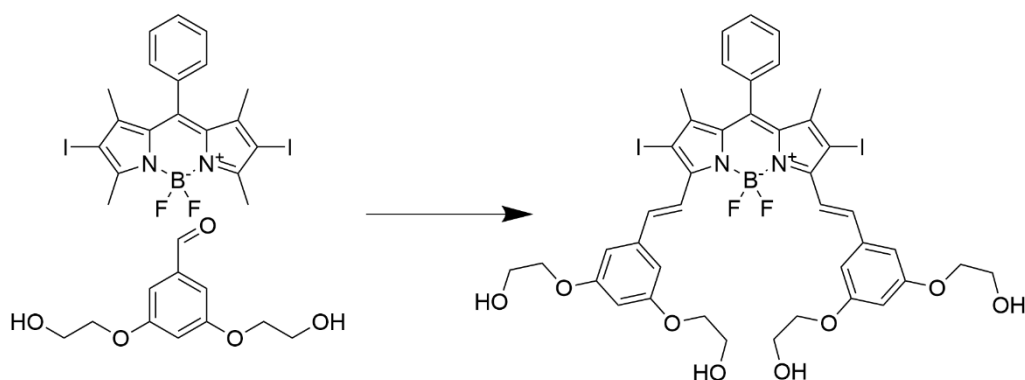
5.2	Testy in vitro	42
5.3	Studie fotostability	43
5.4	Syntéza 3a,4a-diaza-4-bora-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-8-fenyl-s-indacenu (1)..	44
5.5	Syntéza 3a,4a-diaza-4-bora-4,4-difluor-2,6-dijod-1,3,5,7-tetramethyl-8-fenyl-s-indacenu (2).....	46
5.6	Syntéza 3a,4a-diaza-4-bora-4,4-difluor-2,6-dijod-8-fenyl-3,5-bis(4-methoxystyryl)-1,7-dimethyl-s-indacenu (3).....	47
5.7	Syntéza 3a,4a-diaza-4-bora-4,4-difluor-2,6-dijod-8-fenyl-3,5-bis(3,5-dimethoxystyryl)-1,7-dimethyl-s-indacenu (4).....	48
5.8	Syntéza 3a,4a-diaza-4-bora-4,4-difluor-2,6-dijod-8-fenyl-3,5-bis(3,5-bishydroxyethoxystyryl)-1,7-dimethyl-s-indacenu (5)	49
5.9	Syntéza (3a,4a-diaza-4-bora-4,4-difluor-2,6-dijod-8-fenyl-1,7-dimethyl-s-indacenu-3,5-bis(ethen-2,1-diyl))diisoftalové kyseliny	50
5.10	Syntéza 3,5-bis(2-hydroxyethoxy)benzaldehydu (Pre-5).....	51
5.11	Syntéza 3,5-bis(2-bromethoxy)benzaldehydu (pre-6a).....	52
5.12	Syntéza 3,5-bis[2-(<i>N,N</i> -dimethylamino)ethoxy]benzaldehyd-dihydrochloridu (Pre-6) 53	
5.13	Syntéza dimethyl 2,2'-((5-formyl-1,3-fenyl)en)bis(oxy))diacetátu (Pre-7).....	54
6	Diskuze a výsledky	55
6.1	Zhodnocení provedených syntéz.....	56
6.2	Příprava substituovaných benzaldehydů Williamsonovou reakcí.....	58
6.3	Knoevenagelova kondenzace	59
6.4	Nerealizované syntézy	60
6.5	Fotofyzikální měření	61
6.5.1	Testy stability	62
6.5.2	Molární absorpční koeficient	63
6.6	Návrh struktur pro další výzkum.....	64
7	Závěr	65
8	Citovaná literatura.....	66

1 SEZNAM ZKRATEK

^0PS	Základní energetický stav molekuly
$^1\text{O}_2$	Singletový kyslík
$^1\text{PS}^*$	Excitovaný energetický stav molekuly
ACN	Acetonitril
APCI	angl. Atmospheric pressure chemical ionization
ATCC	American Type Culture Collection
ATR	angl. Attenuated total reflection
AzaPc	AzaftalocyaninBODIPY, méně často BoDiPy
Boron dipyrrometheny	
^{13}C NMR	Nukleární magnetická rezonance - uhlík
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dikyanbenzochinon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNEM	z angl. Dulbecco's modified Eagle's medium
FaF	Farmaceutická fakulta
FDA	z angl. Food and Drug Administration
FRET	z angl. Förster resonance energy transfer
HEPES kyselina	4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová
^1H NMR	Nukleární magnetická rezonance - vodík
IR	Infračervené
ISC	Intersystem crossing
<i>m</i> -THPC	<i>meta</i> -tetra(hydroxyfenyl)chlorin
PDT	z angl. photodynamic therapy
<i>p</i> TsOH	Kyselina paratoluensulfonová
ROS	z angl. Reactive oxygen species
TLC	z angl. Thin-layer chromatography
TPPS4	5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyl)-21 <i>H</i> ,23 <i>H</i> -
porfyrin	
UK	Univerzita Karlova
UV/VIS	Ultrafialové a viditelné spektrum
WHO	z angl. World Health Organisation

2 CÍL PRÁCE

Toto dílo si dává za úkol vytvořit praktické základy pro další výzkum boritých dipyrromethenových barviv (z angl. „boron-dipyrromethen“, BODIPY) v rámci výzkumné skupiny Azaphthalocyanine group prof. Zimčíka na FaF UK a tedy poskytnout a objasnit zákonitosti týkající se teoretického designu, reaktivity, syntetických možností a v neposlední řadě i vztahy struktury a účinku těchto látek. Tyto látky dosud nebyly v naší skupině zkoumány, a proto je tato práce pilotní s cílem získat základní zkušenosti zejména s jejich přípravou. Získané poznatky mají najít uplatnění v oborech jako syntéza fotodynamicky aktivních látek, pH dependentních i metalodependentních indikátorů, cytologických pigmentů a v obdobných aplikacích.



Obrázek 1: Ilustrační schéma jedné z provedených syntéz.

Kostrou výzkumu se stala syntéza série osově souměrných derivátů nesoucích periferně vázané substituenty, které mají za úkol zvýšení hydrofility na distálních částech molekuly (Obr. 1). Součástí studie je i evaluace získaných struktur v kontextu detailních fotofyzikálních pozorování.

3 TEORETICKÁ ČÁST

Cílem všech farmakoterapií nádorových onemocnění je vystavení cílové tkáně toxickému vlivu podaného léku. Vyšší kumulaci v cílové tkáni a vyšší toxicitou pro cílovou tkáň je v ideálním případě dosaženo selektivního účinku v rámci celého organismu a zamezení nežádoucích účinků (Obr. 2).



Obrázek 2: Vennův diagram demonstrující výběr vhodného léčiva pro daný nádor.

Profil nežádoucích účinků je závislý na koncentraci léčiva v nepatologických tkáních, popřípadě na jejich vnímavosti k toxickému efektu látky. Roli v distribuci léčiva má i způsob podání cytostatika. V praxi využívané preparáty jako hydroxykarbamid nebo cyklofosfamid jsou účinná, avšak neselektivní terapeutika s typickým profilem nežádoucích účinků.^{1,2} Podstatou fotodynamické terapie (PDT) je kombinace dvou netoxických nebo jen nepatrně toxických vlivů: přítomnosti fotosenzitující látky (fotosenzitizéru) a fyzikálního jevu, typicky viditelného záření nebo záření v pásmu blízkého červeného spektra. Při kombinaci obou faktorů dojde ke zvýšení lokální toxicity až o několik řádů.

3.1 HISTORIE FOTODYNAMICKÉ TERAPIE

Eberský papyrus, egyptský dokument z šestnáctého století před naším letopočtem zmiňuje použití semen z rostliny *Psoralea corylifolia* v kombinaci se slunečním zářením pro léčbu vitiliga. Tato semena obsahují fototoxický psoralen a některé další furanokumariny.³ V roce 1900 student medicíny Oscar Raab a jeho učitel profesor von Tappeiner zkoumali pokles aktivity nálevníků rodu *Paramecia* v závislosti na denní době. Postupem času zjistili, že pokles aktivity nezávisí přímo na denní době ale na množství denního světla a na přítomnosti akridinu coby barviva. Původní význam pojmu „Fotodynamický efekt“ tedy reflektoval snížený pohyb nálevníků pod mikroskopem.⁴ V roce 1903 dostal za své úspěchy v léčbě kožních nemocí světlem, především za

adjuvantní terapii kožních projevů tuberkulózy, Nobelovu cenu dánský vědec Niels R. Finsen.⁵ Databáze PubMed uvádí na dotaz „photodynamic therapy“ jako nejstarší studii německou práci z roku 1956 zaobírající se fototoxicitou jako možnou komplikací při léčbě chlorpromazinem.⁶ Toto naznačuje původní význam jevu ve farmakoterapii – nežádoucí účinek způsobený souběžnou expozicí tkáně fotosenzitizeru a energie ve formě slunečního záření. Druhá, o jedenáct let mladší studie již cíleně zkoumá metabolickou aktivitu buněčných suspenzí v koncentracích 10^{-4} M a slabších roztocích fenothiazinových barviv ve tmě a na světle. Abstrakt této práce přímo zmiňuje potenciál v léčbě onkologických onemocnění za použití nízkých koncentrací barviv v kombinaci se světelným zdrojem.⁷ T.J. Dougherty v roce 1978 pravděpodobně jako první publikoval výsledky léčby sto třinácti onkologických pacientů léčených kombinací hematoporfyrinu a červeného světla.⁸ Dobré výsledky a šetrnost metody si získaly pozornost akademických pracovníků a medicínského průmyslu. V roce 1995 americké úřady schválily porfyrinový senzitizer porfimer sodný společnosti QLT Photo-Therapeutics.⁹ Od tohoto okamžiku bylo již jen otázkou času, kdy se na trhu začnou objevovat nové a efektivnější preparáty.

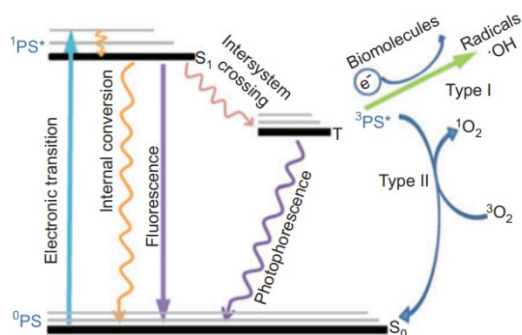
3.2 MECHANIZMUS ÚČINKU

Jak bylo řečeno výše, metoda PDT je založena na konverzi energie světelného záření do excitované formy kyslíku a následném poškození biologických pletiv.

3.2.1 Fotofyzikální princip PDT

Podstatou PDT je excitace senzitizeru ze základního stavu (^0PS) do excitovaného stavu ($^1\text{PS}^*$) za pomoci absorpce energie fotonu oscilujícího na frekvenci blízké absorpčnímu maximu fotosenzitizeru. Molekula ve stavu $^1\text{PS}^*$ se může vrátit do svého základního stavu za vyzáření přebytečné energie v podobě světla na vlnové délce závislé na konkrétní molekule chromoforu, tento jev je nazýván fluorescence. Takový způsob uvolnění energie je častý, avšak pro PDT ne zcela žádoucí, protože tak dochází ke ztrátám energie dodané za účelem poškození tumoru. Druhou možností je jev zvaný mezisystémový přechod (angl. intersystem crossing), kde dochází k inverzi spinu jednoho z vnějších elektronů a přechodu do tripletového stavu T. Tato relativně stálá forma

molekuly fotosenzitizéru může relaxovat zpět do stavu ^0PS vyzářením fotonu (fosforescencí) nebo jednou ze dvou cest definovaných jako fotoprocес typu I a typu II. Typ I zahrnuje interakci molekuly s elektronem vodíku nebo elektronový transfer mezi tripletovým stavem molekuly a náhodným substrátem za produkce volných radikálů. Tyto radikály v prostředí podstupují propagační reakci za vzniku dalších radikálů. Mechanismus poškození tkáně tímto způsobem bude vysvětlen v další kapitole.



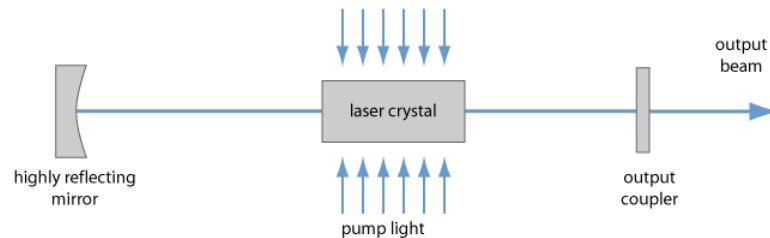
Obrázek 3: Jablonského diagram demonstrující excitaci fotosenzitizéru a jeho následnou relaxaci. Převzato z ¹⁰.

Typ II spočívá v reakci molekuly v T stavu s tripletovým kyslíkem (tripletový stav je u kyslíku nejstabilnější formou) za produkce singletového kyslíku (Obr. 3). Vliv singletového kyslíku na buněčnou tkáň je nastíněn ve vlastní kapitole. Stěžejním ukazatelem efektivity fotosenzitizéru je jeho schopnost produkce singletového kyslíku fotoprocесem typu II. Tento ukazatel se vyjadřuje jako kvantový výtěžek singletového kyslíku (Φ_{Δ}) a je definován jako relativní poměr vyprodukovaného singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$) a celkově využitelné světelné energie dodané do systému, tzn. počtu absorbovaných fotonů. Tato veličina je bezrozměrná a je vyjadřována jako desetinné číslo nabývající hodnot mezi 0 a 1.¹⁰

3.2.2 Zdroj světelného záření

Z principu metody vyplývá, že lze použít prakticky jakýkoliv zdroj o vhodné vlnové délce, žádoucí je však co nejužší emisní spektrum a nevýznamná produkce tepelné energie. Z těchto důvodů jsou preferovány lasery a světlo emitující diody. LASER, tedy Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation je technologie výrazně mladší než poznatky o fototoxicitě (první funkční prototyp 1960). Hlavní výhodou je možnost přesné definice vlnové délky a celkového výkonu. Principiálně se jedná o soustavu dvou přesně nastavených zrcadel, z nichž jedno je částečně propustné. Mezi nimi je homogenní prostor naplněný plynem, směsí plynů, roztokem organického barviva nebo krystalem.

Tento prostor je nazýván aktivní prostředí. Povrch aktivního prostředí je obklopen zdrojem energie, kterým může být chemická reakce, zdroj může emitovat světlo, případně může být tvořen dvěma elektrodami a procházejícím elektrickým proudem (proces přenosu energie do aktivního prostředí je v literatuře označován jako laser pumping, Obr. 4).¹¹



Obrázek 4: Obecné schéma laseru. Převzato z ¹¹.

Atomy prostředí na zvýšení energie systému reagují přechodem valenčního elektronu do orbitálu s vyšší energií (excitují se). Ve chvíli, kdy počet excitovaných molekul přecíslní počet molekul v základním stavu, dojde k jevu nazývanému „inverze populace“. Po dosažení inverze nastane fáze popisovaná jako stimulovaná emise, kdy procházející foton koliduje s excitovanou molekulou a katalyzuje její relaxaci do stavu s nižší energií za emise fotonu se stejným směrem pohybu jako původní foton. Nově vzniklá částice může katalyzovat relaxaci dalších molekul a počet identických fotonů v systému exponenciálně roste. Část světla se odrazí mimo aktivní prostředí, zbytek se odráží mezi dvěma zrcadly a postupně prochází skrz polopropustné zrcadlo ve formě paprsku. S paprskem lze manipulovat systémem odrazných ploch, průchodem přes krystaly nebo lze s výhodou použít optická vlákna.¹¹

3.2.2.1 Argonový a argonem pumpovaný laser

Tento typ laseru patří ve fotodynamické terapii k těm nejpoužívanějším. Barviva jako Rhodamin B, Rhodamin 101 a Sulphorhodamin 640 mohou být s výhodou využity díky vysoké absorbanci v rozmezí 488–514 nm a emisní vlnové délce 600–650 nm, což je vlnová délka absorpce většiny porfyrinů. Manipulace s těmito lasery vyžaduje neustálou technickou podporu a dodatečnou kalibraci optických prvků. Správně nastavený přístroj může poskytnout paprsek o výkonu až 500 mW/cm² a o rozmezí vlnových délek 5–10 nm.

3.2.2.2 Diodové lasery

Polovodičové lasery jsou velmi pravěpodobně budoucností tohoto oboru. Jsou jednoduché na obsluhu a poskytují vysoký výkon. Mohou být nastaveny na pulzní i kontinuální režim. Jejich emisní pásmo má typicky 6 nm šířku (velký rozdíl oproti

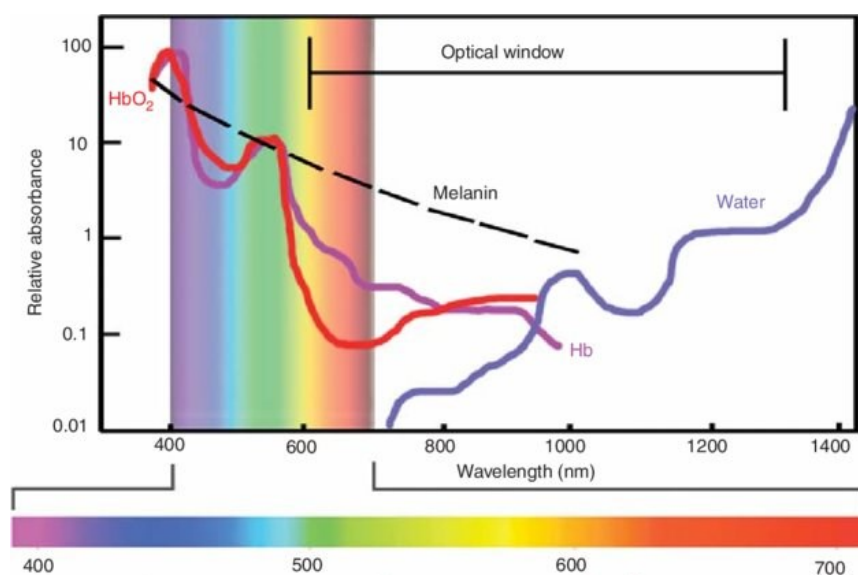
konvenčním LED). Časté je jejich propojení s optickým vláknem a užití například v endoskopii.

3.2.2.3 *Lampy*

Poněkud zastaralé, byť stále relevantní jsou vysokovýkonné lampy se světelným filtrem. Jejich výhodou je snadná obsluha a relativně nízká cena. Dle volby filtru může procházet jen paprsek o šířce 10 nm, případně lze odstranit ultrafialové spektrum světla. Mohou být založeny na principu halogenových výbojek, xenonových obloukových lamp a metal-halidových lamp.¹²

3.2.3 **Absorpce energie**

Pro zajištění absorpce světla o ideální vlnové délce je v organických molekulách nutno rozšířit π -konjugovaný systém rozšířením aromatického skeletu, případně zavedením funkčních skupin a atomů nesoucích volné elektronové páry.¹³ Pro terapeutické účely v PDT je důležitý pojem optické okno biologických tkání. Jde o oblast záření mezi 650 nm, při kterém klesá pohlcování energie krevními barvivy, a 1350 nm, kdy se začíná projevovat absorpce vodou ve tkáních. Zhruba mezi 600 a 700 nm má své absorpční minimum i tuková tkáň, hojně zastoupena v plicích a v nervových strukturách (Obr. 5).

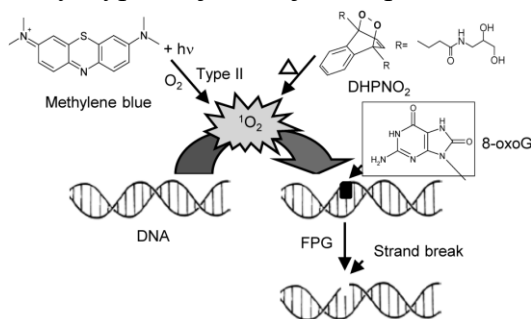


Obrázek 5: Graf znázorňující absorpční spektra některých fyziologických barviv a spektrum viditelného světla v kontextu ideální vlnové délky pro penetraci při vyznačených vlnových délkách. Převzato z¹⁴.

3.3 **POŠKOZENÍ TKÁNĚ**

Reaktivní formy kyslíku (ROS) mohou mít povahu radikálů i molekul se sudým počtem elektronů. Jejich role v buňce není jen negativní. ROS jsou nepostradatelné pro funkci mitochondrií, peroxisomů a v menší míře i pro ostatní orgány. Po konverzi

fotosenzitizéru do tripletového stavu může relaxace nastat fotoprocesy typu I a II. Zatímco u reakcí prvního typu je dominantní produkce superoxidu ($\cdot\text{O}_2^-$), hydroxylového radikálu ($\text{HO}\cdot$), peroxyků ($\text{ROO}\cdot$) a hydroperoxyku ($\text{HOO}\cdot$) a jejich následná, velmi těžko předvídatelná propagace s fyziologickými molekulami, druhý typ poskytuje dominantně $^1\text{O}_2$.¹⁵ Expozicí $^1\text{O}_2$ dochází k celé řadě oxidačních reakcí s biologickým materiálem a tím k narušení fyziologických funkcí biomolekul. Důležitou vlastností senzitizeru je jeho schopnost pronikat do jednotlivých tkání a především schopnost kumulovat se v některých částech buňky. Teoreticky nejlepším scénářem by byla kumulace v mitochondriích a jádře,⁵ velmi často však lze terapeutika nalézt ve fagolizozomech. To však nebrání terapeutickému efektu. Bylo již popsáno mnoho reakcí $^1\text{O}_2$ s endocelulárními substráty, typické jsou zejména peroxidace nenasycených mastných



Obrázek 6: Mechanismus poškození DNA za pomoci $^1\text{O}_2$.
Podle 16.

kyselin a oxidace aromatických cyklů, modelovým příkladem je oxidace guaninové baze, kdy po reakci se singletovým kyslíkem dochází ke vzniku 8-oxo-7,8-dihydroguaninu (8-oxoG), což vyústí ve zlom DNA řetězce (Obr. 6). 8-oxoG může podléhat další oxidaci.^{16,17}

Výše popsané reakce tvoří nefunkční úseky nukleových kyselin, na které buňka reaguje níže popsanými postupy.

3.3.1 Mutace buňky

V prvním případě se buňka k úseku genetické informace chová jako kdyby změněn nebyl, produkuje mutantní proteiny, které mohou dále plnit svou fyziologickou funkci, pokud změna nepostihne aktivní místo enzymu nebo pokud se aktivita výrazně nezmění ani po mutaci aktivního místa. Druhou možností je rozeznání mutantního proteinu nebo úseku DNA jako cizího prvku a jeho degradace, vyloučen není ani vznik imunitní reakce. Třetí možností je rozvrat homeostázy buňky vinou neschopností degradace těchto proteinů, případně alterací fyziologických pochodů v cytosolu a následná apoptóza. Konečně

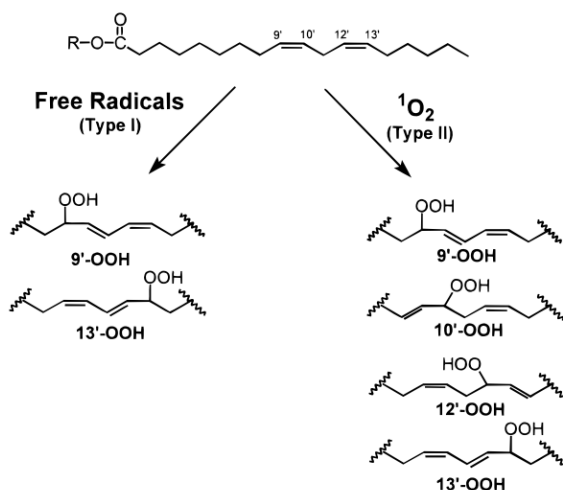
čtvrtou možností je zablokování buněčné mitózy v jednom z kontrolních uzlů a následné stárnutí až smrt buňky, popřípadě zvrát v nádorové bujení.¹⁸

3.3.2 Rozeznání a reparace poškozené části nukleové kyseliny

Živočišná buňka disponuje rozsáhlým enzymatickým aparátem schopným opravovat vzniklé škody. Tyto mohou opravit některé mutace na ribonukleotidovém řetězci a zachovat tak přirozený chod buňky. U poškození DNA pomocí $^1\text{O}_2$ dominují tři mechanismy účinku: nucleotide excision repair (NER), base excision repair (BER) a mismatch repair (MMR). Z mechanismu účinku $^1\text{O}_2$ na guanin je zřejmé, že hlavní roli bude mít excise pozměněných bází. Dobře je zmapován i účinek některých DNA glykosyláz, které jsou schopny rozeznat širokou paletu deformací, včetně těch způsobených singletovým kyslíkem a vyjmout defektní bázi za vzniku tzv. abazického místa.^{17,19}

3.3.3 Peroxidace nenasycených mastných kyselin

Při průběhu reakce prvního typu vzniká směs produktů mechanismem radikálové reakce, následuje rychlá adice molekulárního kyslíku a vznik peroxylových radikálů ROO \cdot . Tyto radikály mohou iniciovat řetězovou peroxidaci lipidů. Při druhém typu reakce dojde ke tvorbě singletového kyslíku, který je sice reaktivní, avšak sám o sobě není radikálem. Tento fakt je důvodem, proč $^1\text{O}_2$ není přímým iniciátorem řetězové reakce, může však reagovat s nenasycenými fosfolipidy za tvorby lipidových hydroperoxidů, které mohou iniciovat řetězovou reakci v přítomnosti přechodných kovů.



Obrázek 7: Rozdílné produkty oxidace mastných kyselin v závislosti na typu oxidační reakce. Převzato z ²⁰.

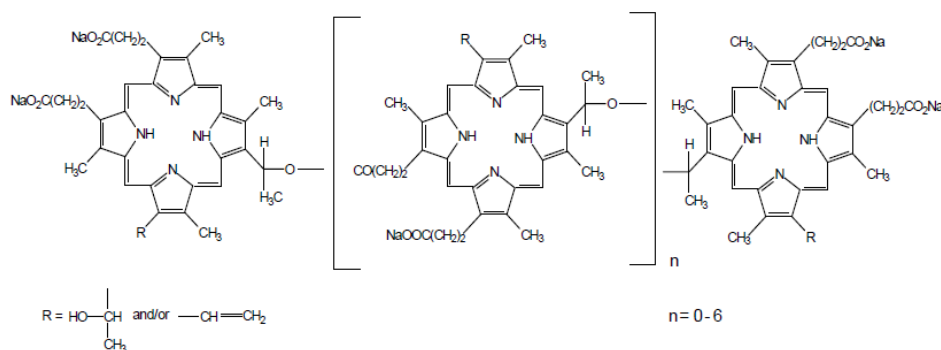
Povahou produktů peroxidace (respektive jejich poměrným zastoupením) lze teoreticky rozlišit mezi typem I a typem II předání energie. Typ I vytváří hydroperoxydy

v molekulách fosfolipidů diesterovaných kyselinou linoleovou na pozicích 9- a 13- v ekvimolárním poměru 1:1, zatímco druhý typ vytváří 9-, 10-, 12- a 13- hydroperoxydy opět v ekvimolárních množstvích (Obr. 7).²⁰ Ačkoliv lipidické peroxidy jsou dostatečně stabilní pro inkorporaci do lipidových dvouvrstev buněk, stále mají velký reakční potenciál. Mezi vysoce toxické, konečné metabolity lze zařadit hydroxykyseliny a aldehydy. Tyto sloučeniny reagují s dusíkem v aminokyselinách, popřípadě tvoří můstky mezi úseky DNA (cross linking). Radikálová alterace lipidů má efekt na jejich fyzikální vlastnosti. Dochází k narušení slabých interakcí a expozici nově vznikajících hydrofilních skupin vodnému prostředí. Toto má za následek změnu rigidity buněčných membrán a jejich zúžení. Významná je i změna permeability těchto soustav.²¹

3.4 FOTOSENSITIZÉRY

3.4.1 1. generace fotosenzitizérů

Americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) v roce 1995 registrovaný porfimer sodný je směs O-propojených porfyrinových dimerů, trimerů a dalších oligomerů získaných jednoduchou úpravou lidského hemu (Obr. 8). I přes svou chemickou nejednotnost se stal do určité míry zlatým standardem pro hodnocení vlastností dalších látek ať už ve fázi testování, nebo již v klinické praxi.²³



Obrázek 8: Struktura porfimeru sodného. Převzato z²².

Tato látka, ačkoliv se prosadila v klinické praxi, v některých ohledech nesplňovala ideální vlastnosti pro PDT. Jmenovitě jde o nižší absorpci při maximální vlnové délce, která je zároveň relativně nízká. Samotné odbourávání po aplikaci trvá několik měsíců, což nese komplikace v podobě protrahovaných nežádoucích účinků.²²

3.4.2 2. generace fotosenzitizérů

Po jednoduše upravených přírodních strukturách následovala skupina již čistě syntetických látek, konkrétně *meta*-tetra(hydroxyfenyl)chlorin (*m*-THPC, temoporfin) a

5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyl)-21*H*,23*H*-porfyrin (TPPS4). Z chemického hlediska se deriváty druhé generace liší především definovanou chemickou strukturou a přednostní kumulací v onkologických tkáních. Tato skupina je však stále vzdálená ideálním vlastnostem pro PDT. Lze sem zařadit příbuzné struktury na bázi chlorinů, které se od porfyrinů liší absencí jedné dvojně vazby. Mezi tyto látky patří mj. verteporfin a temoporfin, z nichž oba jsou registrovány pro použití i v České republice.²³ Obě generace jsou kontraindikovány u pacientů s poruchou syntézy a odbourávání hemoglobinu - porfyrií. Potíže spojené s touto nemocí vycházejí ze stejné skutečnosti jako nežádoucí účinky většiny fotosenzitizérů - fototoxicitou po vystavení porfyrinů v kůži slunečnímu záření. Další komplikací je nemožnost metabolizovat podané léčivo tak, jako by se stalo u pacientů s nedefektním metabolismem.²⁴

3.4.2.1 *Methyl aminolevulinát*

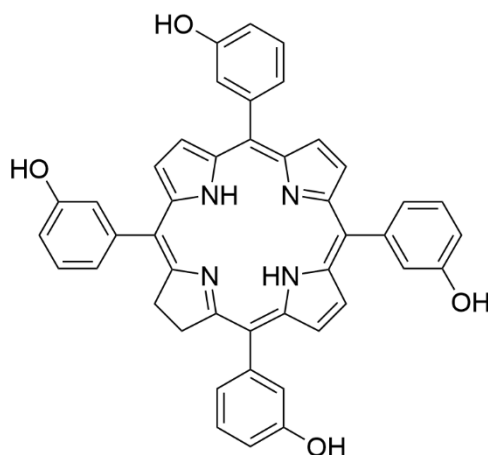
Přípravek Metvix[®] je ve formě krému indikován k fotodynamické terapii prekancerózních kožních lézí na obličeji a na kůži pokrývající lebeční kosti (aktinické keratózy), dále k léčbě bazocelulárního karcinomu a Bowenovy choroby. Ve všech případech by se mělo k léčbě fotodynamickou terapií přistoupit až po vyčerpání postupů první volby. Přípravek by se měl kumulovat přednostně v poškozených buňkách a zdravá tkáň by neměla být dotčena. Jedná se o proléčivo, které se metabolizuje na fotoaktivní porfyriny s $\lambda_{\max} \approx 630$ nm.²⁵

3.4.2.2 *Kyselina aminolevulinová*

Tato struktura se od předchozí liší jen tím, že má neesterovanou karboxylovou kyselinu. Registrovaný přípravek Gliolan[®] je distribuován ve formě prášku pro perorální roztok (narozdíl od methylesteru v topické formě) a je indikován k vizualizaci neoplastické tkáně během operace maligního gliomu stupeň III a IV podle klasifikace WHO (Světové zdravotnická organizace). Mechanismus účinku je obdobný jako u methylesteru.²⁶

3.4.2.3 Temoporfin

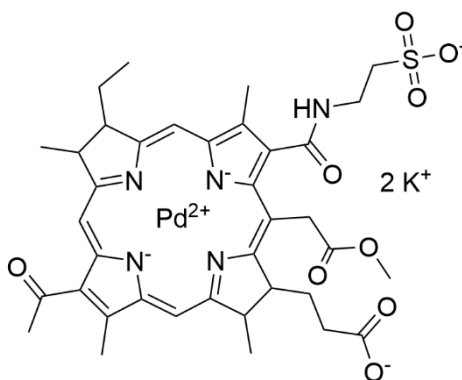
Přípravek Foscan[®] je určený pro fotodynamickou terapii nádorových onemocnění v pravém smyslu. I zde se však nejedná o první volbu. Schválenou indikací je skvamózní karcinom v oblasti hlavy a krku, při jehož léčbě selhaly předchozí způsoby léčby a který je nevhodný pro radioterapii, chirurgický zákrok, či systémovou chemoterapii. Přípravek se podává intravenózně a má dva absorpční pásy, terapeuticky významný je ten v červené oblasti spektra $\lambda_{\max} \approx 650 \text{ nm}$ (Obr. 9).²⁷



Obrázek 9: Struktura temoporfinu.
Podle ⁹⁰.

3.4.2.4 Padeliporfin

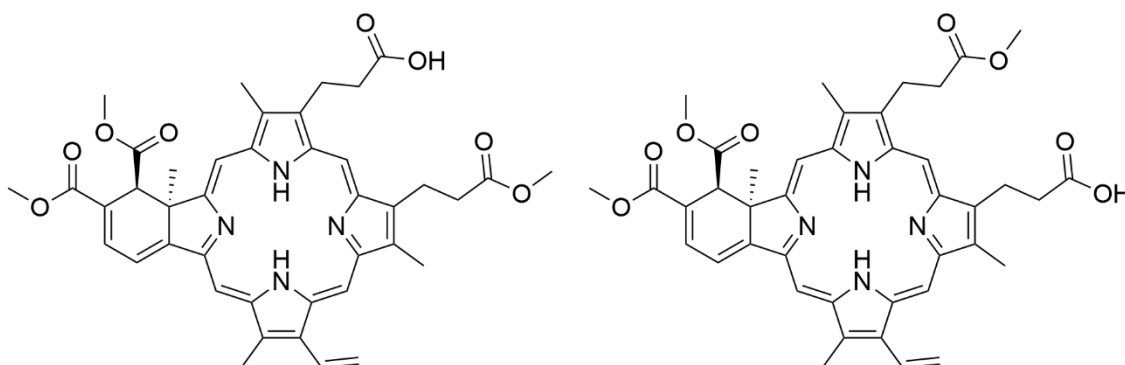
Padeliporfin (Tookad[®], Obr. 10) byl schválen k použití v evropské unii v roce 2017. Je indikován k léčbě pacientů s adenokarcinomem prostaty v klinickém stadiu T1c nebo T2a. Přípravek je specifický například v tom, že k ozáření prostaty laserem o vlnové délce 753 nm lze přistoupit okamžitě po intravenózní aplikaci roztoku. Padeliporfin je strukturně příbuzný s bakteriochlorofyly, do jeho centra je inkorporován palladnatý kation a jeho plazmatický poločas je pouhých 70 minut.²⁸



Obrázek 10: Struktura padeliporfinu.
Podle ⁹¹.

3.4.2.5 Verteporfin

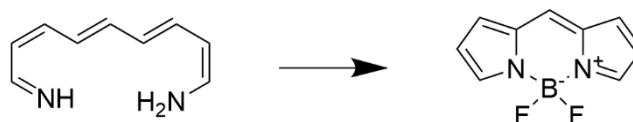
Přípravek Visudyne[®] (Obr. 11) je distribuován v České republice pro léčbu senilní makulární degenerace s převládající klasickou subfoveální chorioidální neovaskularizací a pro léčbu pacientů s sekundární subfoveolární chorioidální neovaskularizací u patologické myopie. Lékovou formou je prášek pro intravenózní infuzi. Aktivace probíhá diodovým laserem o vlnové délce 689 nm ± 3 nm. Přípravek je opět kontraindikován u pacientů s porfyrií. Strukturně se jedná o benzoporfyrin.²⁹



Obrázek 11: Struktura verteporfinu.
Podle ⁹².

3.5 BODIPY

BODIPY, též BoDiPy (boritá dipyrromethenová barviva), je rodina fluorescenčních barviv objevená v 70. letech 20. století, velkého zájmu se však tyto látky dočkaly až po roce 1990 a zájem o ně trvá dodnes. Lze na ně nahlížet jako na odvozeninu jednoduchých barviv cyaninů, založených na alifatickém řetězci s konjugovanými dvojnými vazbami a se substituovanými aminy na obou pólech tohoto řetězce (Obr. 12).



Obrázek 12: Vztah cyaninů a BODIPY.

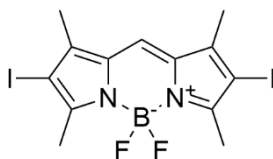
Pomyslným svázáním tohoto cyaninového řetězce do dvou pyrrolových jader spojených methinovým můstkem a následným dalším „svázáním“ dusíkových atomů v pyrrolech bórem do podoby izosterního analogu *s*-indacenu bylo dosaženo rigidní struktury, která díky nemožnosti uvolnit přijatou energii rotací σ vazeb disponuje vlastnostmi vhodnými pro vývoj nové generace fluorescenčních barviv se zajímavými fotofyzikálními

vlastnostmi. Své dosavadní využití našly BODIPY jako aktivní prostředí pro lasery, v cytologickém značení, ale byly patentovány i pro využití v tiskařství.³⁰

3.5.1 Historie BODIPY

V roce 1968 publikovali Alfred Treibs a Franz-Heinrich Kreuzer práci „Difluorboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen“ kde popsali dodnes relevantní syntézu základního skeletu a vyjádřili i obecnou reaktivitu těchto sloučenin.³¹ Tyto látky se, coby stabilní preparáty s úzkým absorpčním i emisním spektrem, vysokým kvantovým výtěžkem fluorescence a velmi snadnou modifikací těchto fotofyzikálních vlastností staly populární v chemii barviv.³² Nic ale nenasvědčovalo tomu, že by se mohly stát kandidátem pro fotodynamickou terapii.

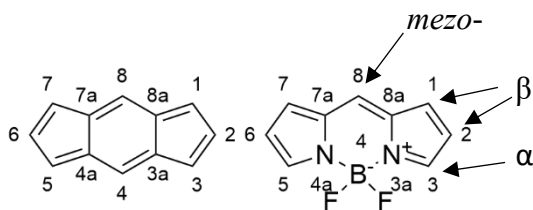
S významným časovým odstupem v roce 2005 profesor Yogo publikoval zjištění, že dijordovaná struktura vykazuje několik cenných vlastností, jmenovitě dobrý kvantový výtěžek singletového kyslíku, dobrou fotostabilitu a vysoký absorpční koeficient. Je tedy potenciálně vhodná pro fotodynamickou terapii a příbuzné metody (Obr. 13).³³



Obrázek 13: První molekula BODIPY, na které byla prokázána produkce 1O_2 .
Podle ³³.

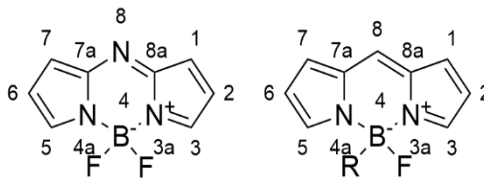
3.5.2 Nomenklatura BODIPY

Názvosloví dle IUPAC vychází z molekuly *s*-indacenu, kdy se substitučními předponami nahradí atom uhlíku dusíkem, případně borem. Číslování je taktéž odvozeno od původního skeletu. Při označování pozic 3- a 5- lze použít předpony α -, polohy 1-, 2-, 6- a 7- lze označit β -. Poloha 8- je někdy označována *mezo*- (Obr. 14).



Obrázek 14: Struktura *s*-indacenu a BODIPY jádra s vyznačeným číslováním.
Podle ³².

Je-li jeden z fluorů nahrazen alkylem), výsledná molekula se označuje alkyl-fluor-BODIPY.³⁴ Termín *aza*-BODIPY obvykle označuje strukturu s dusíkem v *mezo*- poloze (Obr. 15).

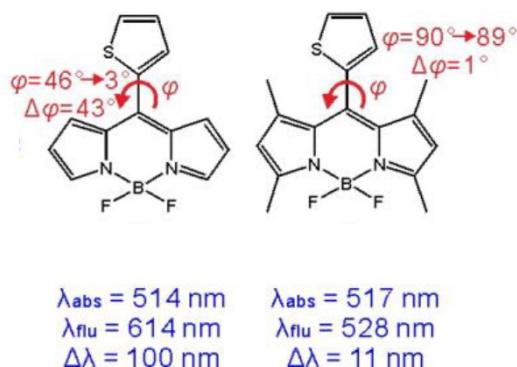


Obrázek 15: Základní struktura *aza*-BODIPY a alkyl-fluor-BODIPY. Podle ³⁴.

3.5.3 Ovlivnění absorpčních a emisních spekter

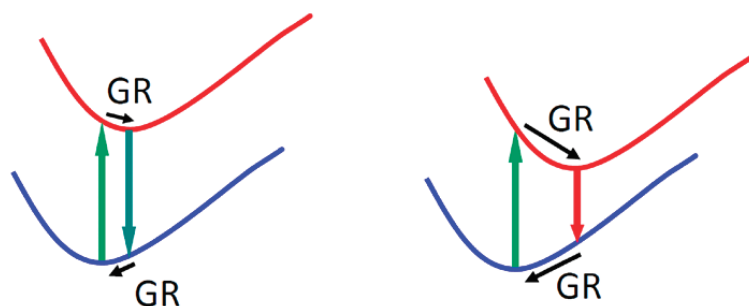
Jak již bylo zmíněno, pro fotosenzitizéry v PDT je vhodné absorpční maximum mezi 650 a 1300 nm pro zajištění dostatečné penetrace světla do tkání. Současně by tento pás měl být úzký a jediný, což zajistí méně závažnou manifestaci nežádoucích fototoxických účinků. Vztah struktury a aktivity zde není objasněn tak dokonale, jako například u odhadu změny rozpustnosti po zavedení funkčních skupin do molekuly. Například posun substituentu v molekule kumarinu o jednu polohu může změnit λ_{\max} řádově o desítky nanometrů. V zásadě lze říci, že rozšířením konjugovaného systému dvojných vazeb dochází k posunu k IR oblasti a k růstu absorpčního koeficientu.¹³ Jev posunu λ_{\max} k delším vlnovým délkám je nazýván bathochromní, případně červený posun. Dalším způsobem je využití „push-pull efektu“, kdy je na jeden pól molekuly zaveden donor elektronového páru a na druhý pól, který je s prvním spojený systémem konjugovaných π -vazeb, akceptor. Vzniklá stabilizovaná mezomerní struktura opět posouvá absorbanci k delším vlnovým délkám, tento jev lze kvantifikovat pomocí BLA (bond length alteration). Velmi zjednodušeně lze říct, že čím je rozdíl mezi délkou σ a π vazeb menší, tím je výskyt rezonanční struktury pravděpodobnější. Dalším fotofyzikálním aspektem, relevantním pro zde syntetizované BODIPY, je Stokesův posun, který se dá definovat jako rozdíl mezi vlnovou délkou v maximu absorpce a vlnovou délkou v maximu emise. Tento posun je u BODIPY obecně malý (≈ 20 nm), lze však dosáhnout jeho výrazného zvýšení geometrickou relaxací v excitované molekule, toto se zajistí substitucí skeletu objemnou skupinou, která je připojena vazbou s volnou otáčivostí. Níže (Obr. 16) je

porovnání dvou molekul, z nichž jedna má rotaci thienylu znesnadněnou sterickou kolizí s metyly v polohách 1- a 7-.¹³



Obrázek 16: Volná rotace thienylu zvyšuje Stokesův posun.
Převzato z¹³.

Stokesův posun je dán rozdílnou geometrií molekuly v základním a excitovaném stavu. Pokud má substituent s volnou otáčivostí možnost relaxovat část energie změnou torzního úhlu, pro následnou relaxaci do stavu ^0PS je nutné uvolnění menšího množství energie a tato energie ve formě světelného záření bude mít vlnovou délku závislou na rozdílu energie nutné k excitaci a energie nutné pro relaxaci. Roli hrají i molekuly rozpouštědla a jejich přeskupení v okolí molekuly excitovaného fotosenzitizéru (Obr. 17).³⁵



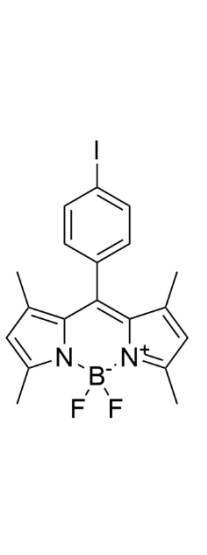
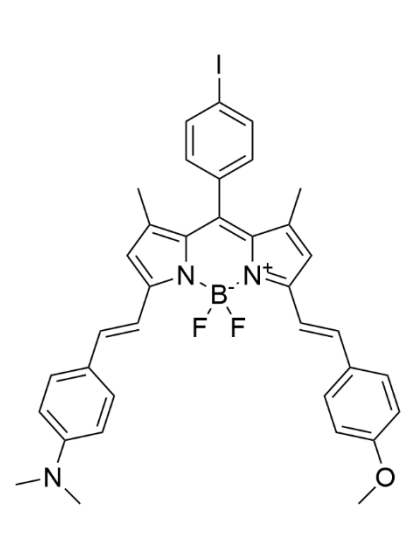
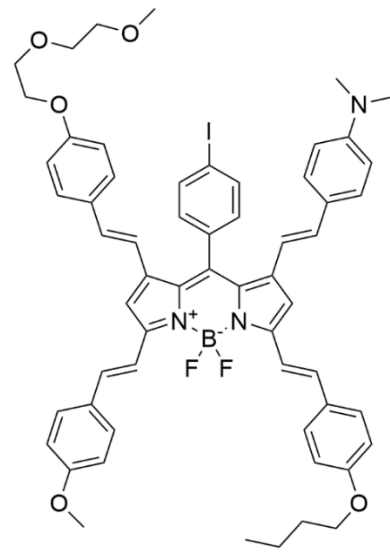
Obrázek 17: Zjednodušený Jablonského diagram. Spodní linie znázorňuje základní stav ^0PS , horní linie znázorňuje excitovaný stav $^1\text{PS}^*$. GR je označena geometrická relaxace. Upraveno podle³⁵.

3.5.3.1 Ovlivnění spektrálních vlastností zavedením styrylu

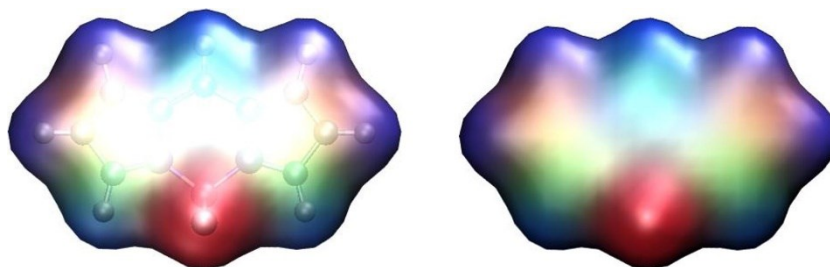
Methyl v polohách 1, 3, 5 a 7 u BODIPY barviv lze vhodně synteticky modifikovat zavedením styrylu a tím rozšířit systém konjugovaných vazeb. Vliv augmentace konjugovaného systému dvojných vazeb na absorpční spektrum lze dobře demonstrovat

na publikaci³⁶. Zde autoři dosáhli posunu od cca 505 nm u nestyrylovaného BODIPY jádra přes 650-670 nm u distyrylovaného jádra v závislosti na substituci až po 700 nm u tetrastyrylovaného jádra (tzv. motýlí tvar, Tab. 1).^{36, 37} Posun absorpčního maxima není v jednotlivých stupních lineární, jak by se dalo logicky předpokládat.

Tabulka 1: Vliv rozšíření konjugovaného systému dvojných vazeb na absorpční maximum V prvním řádku strukturní vzorec, ve druhém λ_{max} , ve třetím použité rozpouštědlo. První sloupec podle³⁷, druhý a třetí podle³⁶.

		
505 nm	676 nm	700 nm
Ethanol	Ethanol	Dioxan

Styrylace do prvního a druhého stupně poskytuje předvídatelné výtěžky, přírůstek do třetího a čtvrtého stupně je výrazně menší.³⁶ Toto lze snad vysvětlit rezonančními strukturami BODIPY skeletu, publikovanými již v první studii o těchto látkách. Zde svou roli hraje parciální kladný náboj na α - pozicích.³¹ Modernější metoda, mapování elektrostatického potenciálu pomocí počítačových simulací tento rozdíl v elektronových hustotách potvrzuje (Obr. 18).³⁸



Obrázek 18: Simulace elektronové hustoty v molekule BODIPY. Převzato z³⁸.

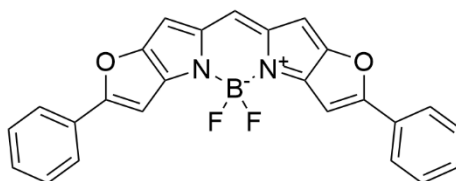
Výsledkem tohoto jevu je snazší zapojení do konjugace u styrylů přikondenzovaných na 3- a 5- pozicích. Vlastnosti styrylované molekuly v UV/VIS (ultrafialovém a viditelném) spektru lze snadno ovlivnit substituentem, který rozšiřuje π -systém.³⁶

3.5.3.2 Ovlivnění spektrálních vlastností halogenací

Vliv halogenu je důležitý především pro kvantový výtěžek singletového kyslíku, toto bude probráno dále v textu. Halogenace se však podílí i na bathochromním posunu absorpčního pásu. Tato modifikace může být výhodná pro svou acidobazickou neutralitu a zvýšení lipofility. Je nutné mít na paměti, že tento typ úprav snižuje fluorescenci barviva.³³ Stejně jako v případě styrylů zde hraje velkou roli poloha substituce. Díky parciálnímu zápornému náboji v polohách 2- a 6- probíhá substituce přednostně na těchto pozicích. Jedna z publikovaných studií demonstruje, že substituce brómem do prvního a druhého stupně (na elektrofilem preferovaných polohách) posune absorpční maximum o 20 nm za každý atom brómu. Následně třetí a čtvrtý stupeň substituce v polohách 3- a 5- posune spektrum již jen o 10 nm na atom a barvivo se skeletem bromovaným do všech šesti poloh absorpční dokonce posune mírně zpět (zhruba o 3 nm) k původním hodnotám.³⁹ Co do povahy substituentu, dvě identické molekuly, jedna dibromovaná a jedna diiodovaná, se liší o pouhých 6 nm ve prospěch jódu. Molární absorpční koeficienty se neliší vůbec.⁴⁰

3.5.3.3 Ovlivnění spektrálních vlastností ortho- kondenzací dalších aromatických jader

Použitím *ortho*- kondenzovaných látek jako prekurzorů místo obvyklých pyrrolů lze docílit výrazného posunu absorpčních pásů. Umezawa dosáhl *ortho*- kondenzací substituovaných furanů s výchozím pyrrolem výrazného rozšíření konjugovaného π -systému a došlo tak k výraznému posunu absorbance až za hranici 750 nm. Naměřené extinkční koeficienty připravených látek přesahovaly $300\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Obr. 19),^{41,42} což jsou v chemii barviv jen zřídka vídané údaje (pro porovnání ϵ (molární absorpční koeficient) methylenové modři je $81\,600\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).⁴³ Jsou popsány též látky, na které lze pohlížet jako na deriváty isoindolu nebo jako na dibenzo-BODIPY.

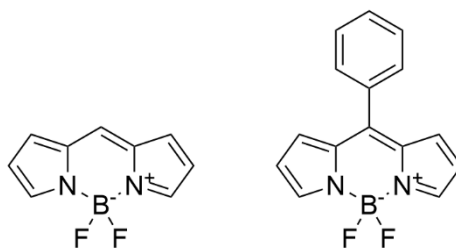


Obrázek 19: Látka publikovaná v ⁴¹,
 $\lambda_{max} = 652\text{ nm}$ a $\epsilon = 314\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Zde se opět znatelně posune absorpční maximum a díky široké škále možných prekurzorů dojde i k dalšímu rozšíření syntetických možností.⁴⁴

3.5.3.4 Ovlivnění spektrálních vlastností zavedením arylové substituce

Nejčastější polohou, kam lze aryl zavést je *mezo*- poloha (Obr. 20), především kvůli nestabilitě molekul bez těchto substitucí. Díky vazbě s volnou otáčivostí se aryly zapojují do konjugace jen omezeně a to má za následek minimální vliv na λ_{\max} .

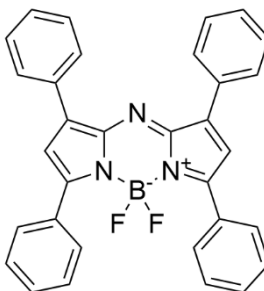


Obrázek 20: λ_{\max} sloučeniny vlevo je 503 nm, sloučeniny vpravo 500 nm, obě byly měřeny v DCM. Podle 45, 46.

Zajímavou vlastnost vykazují 2-, 6- aromaticky disubstituované deriváty, které poskytují několik emisních pásů (tzv. domino-like emise). Tato emise je způsobená několika různými úhly, které mohou aromáty svírat s centrálním skeletem.⁴⁷ Dva thienyly v polohách 3- a 5- posunou absorpční pás velmi výrazně, zhruba o 100 nm. Zde se pravděpodobně uplatňuje podobný princip, jako u rozdílů v poloze styrylu a tedy při snaze navrhovat barviva absorbující v blízkosti infračerveného spektra je vhodné připojovat aromáty v těchto polohách.⁴⁸

3.5.3.5 Ovlivnění spektrálních vlastností izosterní záměnou methenylového můstku

Záměnou spojovacího atomu uhlíku obou heterocyklických jader za atomu dusíku dochází k bathochromnímu posunu absorpčního i emisního spektra.

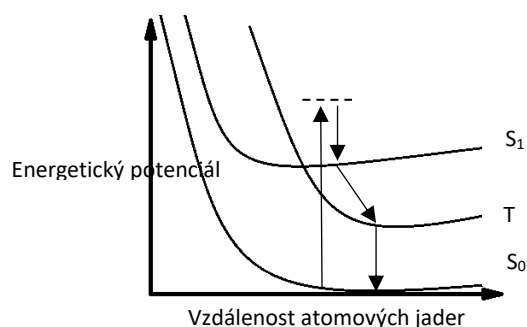


Obrázek 21: aza-BODIPY
 $\lambda_{\max} = 654$ nm v toluenu.
Podle 49.

Tyto sloučeniny jsou takřka vždy substituovány čtyřmi aromáty na polohách 1-, 3-, 5- a 7- z důvodu zvýšení stability, usnadnění syntézy a v neposlední řadě kvůli možnosti zavedení dalších substitucí na arylech (Obr. 21).³⁰

3.5.4 Fluorescence a singletový kyslík

Jak již bylo uvedeno, BODIPY si získaly oblibu především jako snadno modifikovatelná barviva s dobrými kvantovými výtěžky fluorescence, které jsou způsobeny rigidní strukturou a tedy zamezením neradiční ztráty energie. Kvantový výtěžek fluorescence může být snadno snížen na úkor jiného mechanismu ztráty energie, například na úkor tzv. Försterova přenosu energie (FRET) kde se molekula vrátí do základního stavu excitací jiné molekuly v prostředí. Může také dojít k uvolnění energie změnou prostorové konformace, to opět odkazuje na nutnou rigiditu chromoforu schopného fluorescence.³⁰ Týmu profesora Yogo se jodací v polohách 2- a 6- podařilo snížit kvantový výtěžek fluorescence BODIPY a zároveň zvýšit pravděpodobnost mezisystémového přechodu do tripletového stavu.³³ Mezisystémový přechod je pravděpodobnější, pokud se vibrační energie dvou elektronových stavů překrývají a tedy není potřeba dodat energii pro tento přechod. Vzhledem k častému výskytu spin-orbitalových interakcí u molekul obsahujících těžké atomy (jód, bróm,...) je tento efekt nazýván efekt těžkého atomu. Mnohé zdroje empiricky potvrdily, že zavedení halogenu do struktury molekuly BODIPY má analogický efekt jako tvorba komplexu kationtu d-prvku a porfyrinů nebo ftalocyaninů. Zde však musí nejprve dojít k přenosu náboje mechanismem nazývaným metal-to-ligand charge transfer. Mechanismus ISC (intersystem crossing) lze demonstrovat na modifikovaném Jablonského diagramu (Obr. 22). Zde však nejsou energetické hladiny konstantní, jsou v závislosti na poloze reagujících atomových jader.

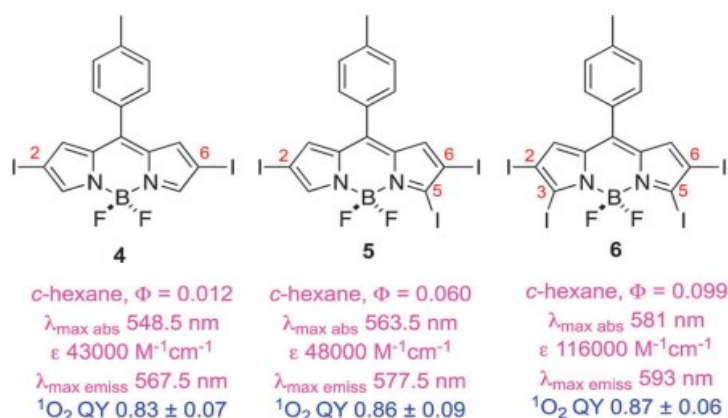


Obrázek 22: Zjednodušený Jablonského diagram znázorňující ISC ve fotodynamické terapii.

Výše uvedený Jablonského diagram znázorňuje vývoj energetického stavu sensitizéru ze základního stavu S_0 do nestabilního stavu naznačeného přerušovanou čarou, přechod do stabilnějšího singletového stavu S_1 , mezisystémový přechod do tripletového stavu T a konečně přechod zpět do stavu S_0 za excitace molekuly kyslíku (zde neznázorněno). Míra překryvu ploch obou vybuzených stavů určuje pravděpodobnost ISC, rozdíl energetických hladin určí pravděpodobnost, že molekula v tripletovém stavu zůstane a nepřejde zpět do energeticky nevýhodného S_1 stavu.⁵⁰ Studie Komatsu et al. odhalila silnou závislost mezi elektronovou hustotou látky a kvantovými výtěžky i její stabilitou vůči degradaci. Tento výzkum byl proveden na sérii 2,6-disubstituovaných BODIPY. Zmíněné pozice 2- a 6- byly symetricky obsazeny skupinami jako alkyl karboxyl, karboxyl, ester, amid, nitril a jedna testovaná látka zůstala bez substituce jako -H. Výzkum velmi dobře doložil, že vyšší elektronová hustota zvyšuje produkci singletového kyslíku fotoreakcí typu II, bohužel však struktury bez elektron-akceptorových substitucí rychleji podléhaly degradaci.⁵¹

3.5.4.1 Halogenace

Jako nejefektivnější z pohledu zvýšení Φ_{Δ} se jeví substituce aromatického jádra dvěma atomy jódu.⁵² Bohužel, takovýto zásah výrazně snižuje rozpustnost ve vodném prostředí, z pohledu celkového designu je však tento kompromis nutný. Zavedení třetí halogenové skupiny by pravděpodobně nebylo přínosné, jelikož rozdíl mezi monohalogenovaným a dihalogenovaným derivátem není dvojnásobný, jak by se dalo předpokládat, ale mnohem nižší.⁵³ Zavedením třetího a čtvrtého atomu jódu přímo na jádro vede již jen k nepatrnému zvýšení Φ_{Δ} a k výraznému zvýšení lipofility (Obr. 23).

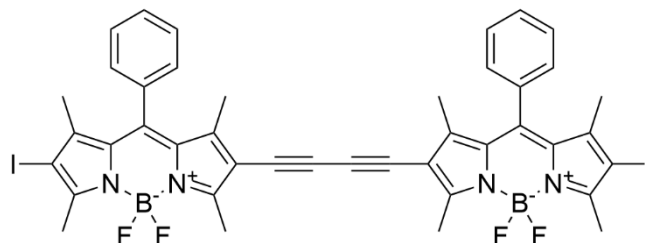


Obrázek 23: Porovnání stupně substituce a základních fotofyzikálních charakteristik polyjodovaných BODIPY.

Převzato z⁵³.

3.5.4.2 Dimerizace BODIPY

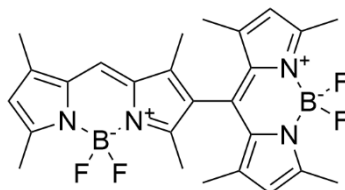
Po objevu efektu jódu a dalších halogenů se podařilo vyvinout další způsoby, jak dosáhnout vysokých kvantových výtěžků tripletového stavu. Zajímavou skupinou 1O_2 produkujících látek jsou molekuly, kde je atom jódu nahrazen druhým BODIPY jádrem, spojeným krátkým alkyňlovým řetězcem. Tato modifikace se příznivě projeví též na absorpčních a emisních spektrech a na molárním absorpčním koeficientu.



Obrázek 24: BODIPY dimer⁵⁴.

Výše uvedená látka (Obr. 24) má $\lambda_{\max} = 576 \text{ nm}$, $\epsilon = 180\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\Phi_{\Delta} = 0,895$. Výtěžek singletového kyslíku byl odhadnut jako rozdíl $1 - \Phi_F = \Phi_{\Delta}$.⁵³ Tento vzorec ignoruje ostatní přenosy energie a tedy ho lze brát jen jako velmi orientační.⁵⁴ Přítomnost

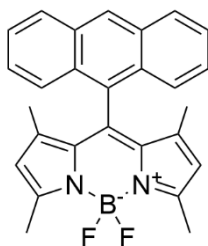
trojně vazby není podmínkou, i přímo spojené deriváty (Obr. 25) mají relativně dobrou účinnost produkce singletového kyslíku ($\Phi_{\Delta} = 0,51$).⁵⁵



Obrázek 25: BODIPY dimer bez spojovacího článku.
Podle ⁵⁵.

3.5.4.3 Polycyklické aromatické substituenty

Jako jistou analogii látek v předchozí kapitole lze využít planární aromáty, zejména anthracen (Obr. 26). Opět je velmi důležitá poloha substituentu a, narozdíl od ostatních substitucí, také povaha rozpouštědla.



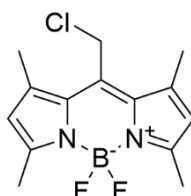
Obrázek 26: Zástupce anthracenových derivátů.
Podle ⁵⁶.

Deriváty anthracen-9-ylu v *mezo*- poloze vykazovaly Φ_{Δ} přes 0,8 v DCM a v acetonitrilu (ACN), oproti tomu v toluenu 0,1 a méně. Deriváty anthracen-2-ylu a anthracen-9-ylu v poloze 2- skeletu BODIPY (tj. tam, kde je jodace velmi efektivní) měly Φ_{Δ} jen 0,24 a méně, zde se navíc neprojevil rozdíl toluenu jako rozpouštědla.⁵⁶ Další publikace, která se věnovala aromatickým substitucím v *mezo*- poloze dospěla k závěrům, že využití pyrenu a perylenu jako substituentu téměř neposkytuje singletový kyslík v prostředí hexanu, v ethanolu měl jeden derivát Φ_{Δ} 0,75, další dva jen 0,34 a 0,25. Celkově byly mezi jednotlivými sloučeninami velké rozdíly a jen složitě lze vytvořit obecně platné pravidlo o tomto typu substituce.⁵⁷

3.6 Použití BODIPY

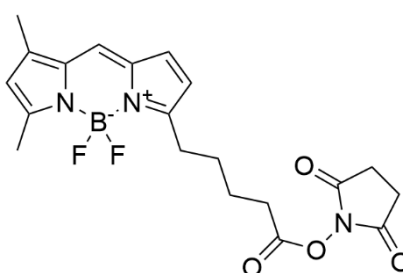
3.6.1 Fluorofory

Výrazná schopnost emitovat světlo byla popsána již v pilotní studii v 70. letech.³¹ Aplikací syntetických postupů z předchozích kapitol lze dosáhnout látek s velmi dobře zacílenými vlastnostmi pro využití v fluorescenční mikroskopii a příbuzných oborech. Ze široké škály lze zmínit „CellTracker™ Green BODIPY™“ Dye od společnosti Thermo Fisher (Obr. 27). Jedná se o jednoduchou molekulu s reaktivní chlormethylovou skupinou v *mezo*- poloze. Ta vytvoří kovalentní vazby s aminoskupinami proteinů a zobrazí strukturu buňky pod fluorescenčním mikroskopem. Toto barvivo má podle výrobce nízkou toxicitu pro buněčné kultury a je dobře patrné i po několika buněčných cyklech.⁵⁸



Obrázek 27:
CellTracker™ Green
BODIPY™ Dye.
Podle ⁵⁸.

Komerčně dostupné jsou též reaktivní prekurzory určené k navázání na libovolný tracker, typicky na protilátku nebo na protein. Zde uvedený sukcinimidyl ester „BODIPY™ FL-C5 NHS Ester“ taktéž od společnosti Thermo Fisher (Obr. 28).⁵⁹



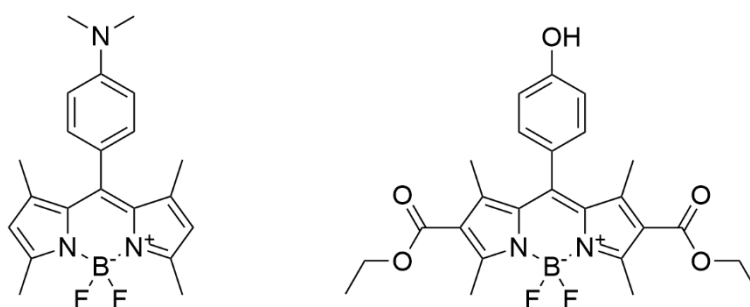
Obrázek 28: BODIPY™ FL-C5 NHS Ester.
Podle ⁵⁹.

3.6.2 Senzory

Zavedením určitých funkčních skupin lze dosáhnout struktur, které mohou výrazně změnit fotofyzikální vlastnosti v závislosti na prostředí – typicky na pH nebo na přítomnosti kationtů některých kovů.³⁰

3.6.2.1 pH dependentní senzory

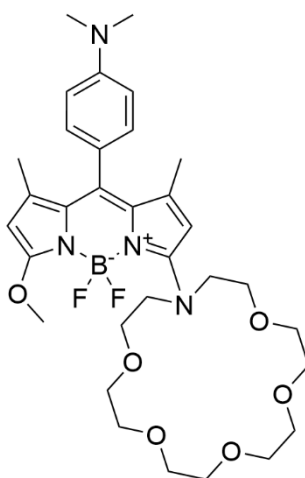
Lze využít obou možností ionizace, tedy lze zavést kyselé i bazické funkční skupiny. Například dostupnost silného donoru elektronů blízko základního chromoforu zajišťuje efektivní intramolekulární přenos náboje z dimethylamino skupiny do BODIPY jádra v excitovaném stavu. Pokud je však volný elektronový pár v dimethylamino- skupině ionizován, dojde k tvorbě nového emisního pásu (Obr. 29).⁶⁰ Velmi podobný mechanismus lze očekávat i v případě, kdy se ionizovatelnou skupinou stane skupina fenolická namísto substituovaného anilinu, zde však intenzita fluorescence se zvyšováním pH klesá.⁶¹ Modifikací pK_a senzoru lze docílit žádaných vlastností pro konkrétní aplikaci.³⁰



Obrázek 29: Příklad pH-dependentních senzorů.
Podle ^{60, 61}.

3.6.2.2 Metalodependentní senzory

Zde lze využít zejména větší cyklické ethery – „crown ethery“ a jejich thia- nebo aza-analogy. Mechanismus spočívá ve vyvázání kationtu volnými elektronovými páry kyslíku, dusíku nebo síry a změnou elektronové hustoty na připojeném fluoroforu. Selektivita pro jednotlivé kationty je dána atomovým poloměrem atomu a průměrem crown etheru.

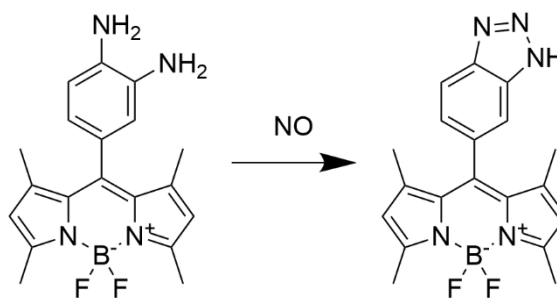


Obrázek 30: Crown BODIPY.
Podle ⁶².

S výhodou lze využít atom dusíku jako spojovací atom, který díky své trojvaznosti může tvořit jednu vazbu s fluoroforem, dvě vazby může zapojit do tvorby cyklu a elektronový pár interakcí s kationtem ovlivní onu zmiňovanou elektronovou hustotu jádra, tedy i emisní spektrum. Na přiloženém obrázku (Obr. 30) je příklad crown BODIPY, selektivního pro draselný kationt.⁶² Metalodependentní část molekuly samozřejmě nemusí tvořit samostatný kruh, samotný BODIPY skelet může být součástí tohoto kruhu,⁶³ případně může být kruh otevřený.⁶⁴ Obdobně lze využít stericky vhodně umístěné skupiny anilinu a pyridinu.⁶⁵

3.6.2.3 Chemosenzory

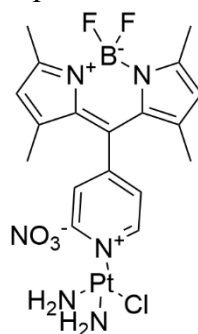
Zde je opět mnoho možností. Kupříkladu estery dinitrobenzesulfonové kyseliny jsou poměrně selektivně štěpeny sulfanem, toho lze využít pro detekci sulfanu v buněčných organelách i v jiných prostředích.⁶⁶ Uzavřením triazolového kruhu v aromatických *ortho* diaminech lze velmi efektivně detekovat oxid dusnatý (Obr. 31).⁶⁷



Obrázek 31: Mechanismus detekce oxidu dusnatého.
Podle ⁶⁷.

3.6.3 BODIPY jako sondy v chemoterapii

V tak proměnlivém oboru, jako je onkologie je často vhodné získat přesná data o lokalizaci chemoterapeutika v konkrétním nádoru. Zejména sloučeniny platiny jsou poměrně obtížně lokalizovatelné metodami jako synchrotronní radiací navozená Roentgenova emise nebo hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem.

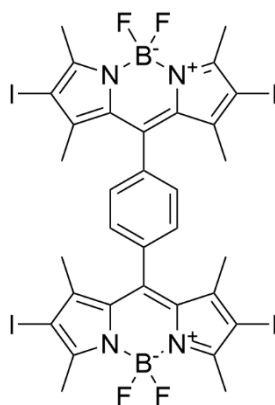


Obrázek 32: Zástupce derivátů Pt-BODIPY teranostika. Podle ⁶⁸.

V těchto případech je vhodné sledovat intracelulární distribuci léčiva navázaného na fluorescentní marker, typicky na fluorescein nebo na BODIPY (Obr. 32). Významný vliv na efektivitu má charakter připojeného BODIPY chromoforu. Taktéž byly provedeny studie s deriváty auranofinu.⁶⁸

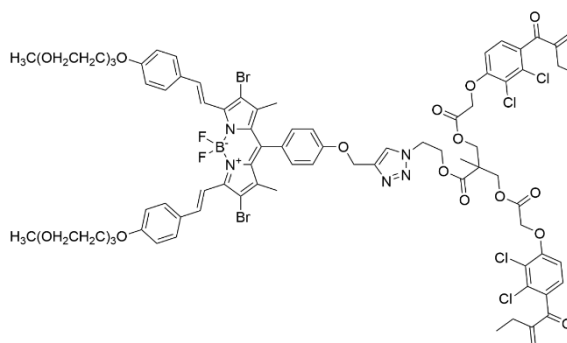
3.6.4 Fotodynamická terapie

Klinické studie využití BODIPY v PDT na lidech dosud provedeny nebyly. Dostupné práce by se daly rozdělit na ty, kde byly na buněčných modelech testovány substituované BODIPY a na ty, kde byly testovány duální látky, tedy BODIPY konjugované například s alkylačním cytostatikem. Nedávná studie, provedená s jodovanými dimery (Obr. 33) na pokusných hlodavcích s kontrolní skupinou poskytla velmi optimistické výsledky pro další výzkum.



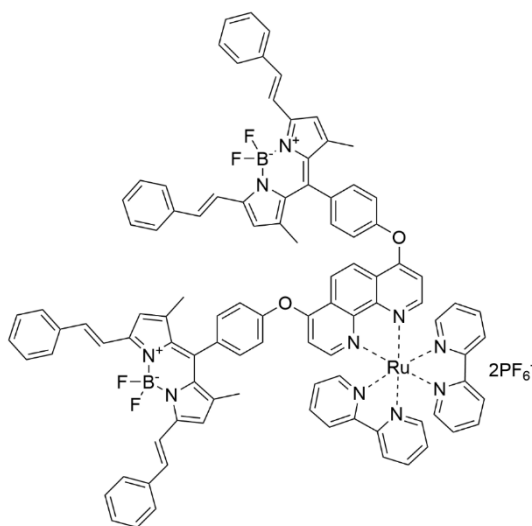
Obrázek 33: Jedna z testovaných sloučenin. Podle ⁶⁹.

Po systémovém podání nedošlo k výrazným projevům toxicity v plicích, slezině, játrech, ledvinách ani v srdci, oproti tomu došlo k signifikantnímu zmenšení tumorů pod detekovatelnou mez, zatímco nádory v kontrolní skupině dále rostly. Dimerizací však došlo ke zvýšení toxicity ve tmě.⁶⁹



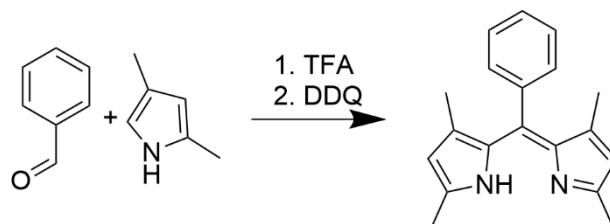
Obrázek 34: Sloučenina s duální aktivitou. Podle ⁷⁰.

Další nedávnou studií je práce z The University of Texas in Austin, kde autoři testovali fotosenzitizér konjugovaný s kyselinou ethakrynovou (Obr. 34). Tento preparát má dva mechanismy účinku. Kromě obvyklého PDT mechanismu látka též inhibuje enzym, který odstraňuje ROS z buňky a tím nepřímo zastavuje ROS-indukovanou apoptózu buňky. Tato modifikace zvyšovala účinnost PDT v hypoxickém i normooxickém buněčném prostředí.⁷⁰ Jinou, častou modifikací je inkorporace kationtů ruthenia nebo iridia (Obr. 35). V této studii z roku 2019 v kombinaci s distyryl-derivátem. Preparáty se mohou pyšnit vysokými molárními absorpčními koeficienty, nízkou toxicitou ve tmě a dobrým průnikem do tkání. Sloučenina ruthenia oproti iridiu byla účinnější při nižších koncentracích.⁷¹



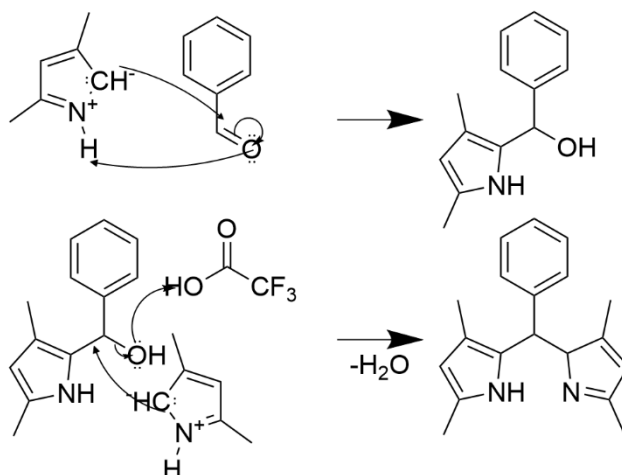
Obrázek 35: Studovaná komplexní sloučenina Ru-BODIPY.
Podle ⁷¹.

4.1.1 Kondenzační reakce aromatického aldehydu a pyrrolu

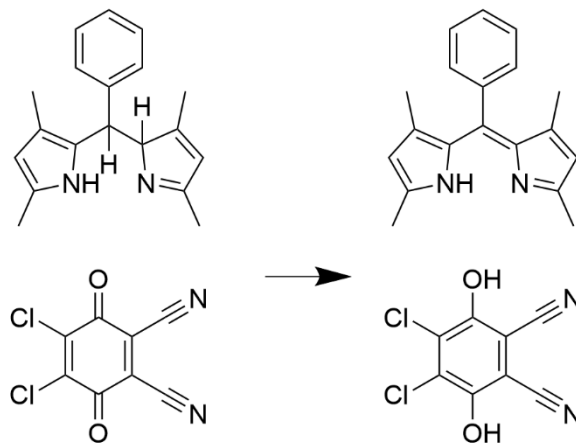


Obrázek 36: Schéma prvního kroku syntézy 1.

Tento stěžejní krok mé práce je reakcí podobnou syntéze porfyrinů⁷² a zároveň důkazovým reakcím s Ehrlichovým činidlem. Z čistě chemického pohledu se jedná o kyselinou trifluoroctovou (TFA) katalyzovaný atak elektrondeficitního karbaldehydu částečným záporným nábojem na aktivovaném aromatickém jádře za tvorby bis(3,5-dimethylpyrrol-2-yl)fenylmethanu. V prvním kroku pravděpodobně dojde k tvorbě fenyl(3,5-dimethyl-1*H*-pyrrol-2-yl)methanolu.



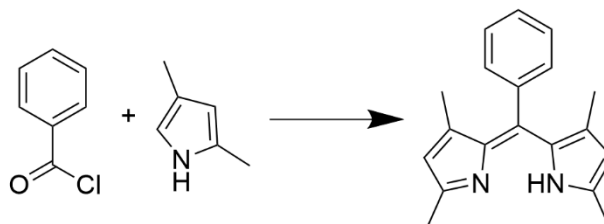
Obrázek 35: Kondenzace pyrrolových jader.



Obrázek 36: Oxidace pomocí DDQ.

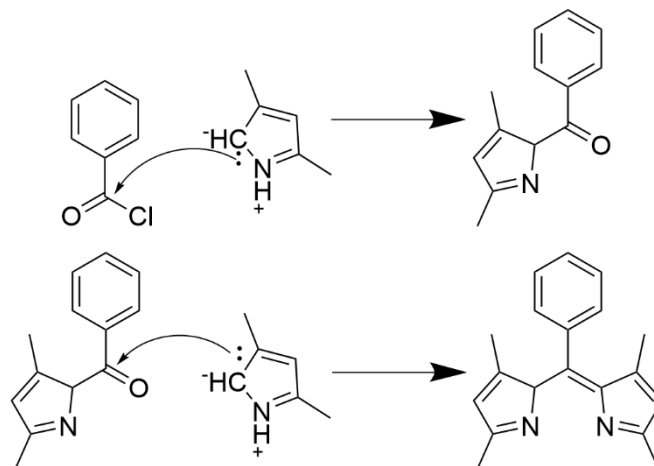
V druhém kroku kyselina trifluorctvová ionizuje hydroxyl a tím usnadňuje nukleofilní atak druhého pyrrolu.³¹ Produktem druhého ataku je již zmíněný bis(2,4-dimethylpyrrol-5-yl)fenylmethan (Obr. 34, 35). Ten musí být následně oxidován 2,3-dichlor-5,6-dikyan-1,4-benzochinonem (DDQ) nebo *p*-chloranilem na konjugovaný produkt (Obr. 36).^{72, 73} Syntéza probíhá pod ochrannou atmosférou argonu.

4.1.2 Kondenzační reakce halogenidu aromatické kyseliny s pyrrolem



Obrázek 37: Schéma prvního kroku syntézy s benzoylchloridem.

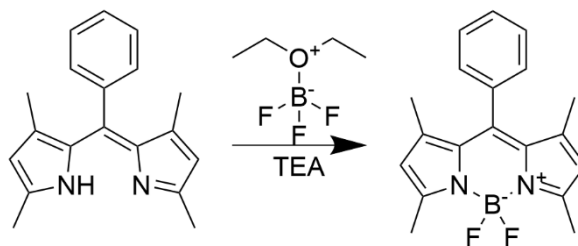
Tato reakce, která je alternativní cestou k přípravě substituovaných dipyrrolylmethenů, se liší výchozí látkou. Místo benzaldehydu je zde jako výchozí molekula použit chlorid kyseliny benzoové (Obr. 37). Místo TFA zde funkci kyseliny plní vznikající halogenovodík. Velmi pravděpodobně zde mechanismem Friedel-Craftsovy acylace vzniká fenyl(3,5-dimethylpyrrol-2-yl)methenon místo odpovídajícího alkoholu v předchozí reakci. Tento meziprodukt je patrně důvodem, proč v následujícím kroku vzniká již oxidovaný výsledný produkt (Obr. 38).⁷²



Obrázek 38: Kondenzace pyrrolových jader s benzoylchloridem.

4.1.3 Uzavření třetího kruhu za tvorby bora-diaza-indacenu

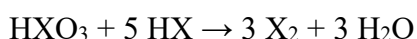
Tento krok je postupem, kdy se do nezpracované směsi z předchozí reakce přidá $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ a mechanismem elektrofilní substituce dojde k začlenění atomu boru do finální molekuly. Vznikající fluorovodík je z reakce odstraňován triethylaminem (Obr. 39).⁷⁴



Obrázek 39: Schéma reakce uzavření prostředního kruhu.

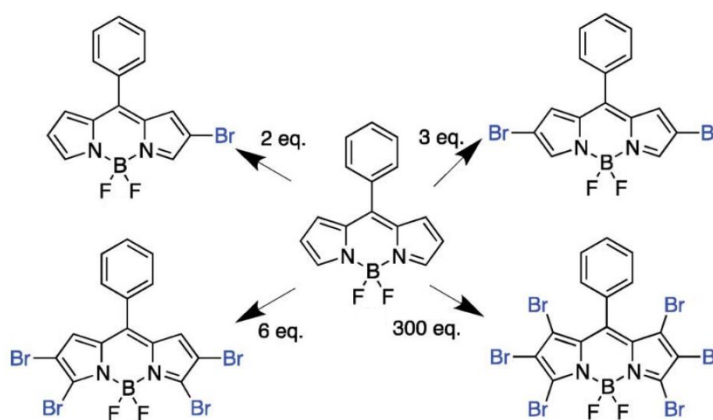
4.1.4 Halogenace základního skeletu BODIPY

Zde se nabízí více možností, téměř všechny jsou však založené na elektrofilní aromatické substituci. Nejjednodušší je přímé použití elementárního halogenu katalyzované Lewisovou kyselinou, lze využít radikálový iniciátor azobisisobutyronitril. Alternativně lze využít *N*-halogenidy odpovídajících sukcinimidů. Tato možnost poskytuje stabilní výtěžky a například *N*-chlorsukcinimid je mnohem bezpečnější pro manipulaci než elementární chlor. Nevýhodou je relativně vyšší cena. Další, množstvím publikací ověřenou, metodou je substituce reakční směsí elementárního halogenu a korespondující kyseliny HXO_3 , především I_2/HIO_3 . Úloha elementárního halogenu je stejná, jako u první vzpomínané halogenace. Kyselina s centrálním halogenem s vysokým oxidačním číslem hraje roli při regeneraci halogenovodíku na elementární halogen a zároveň brání korozivním účinkům HX ($\text{p}K_a \text{ HI} \approx -9,3$, $\text{p}K_a \text{ HIO}_3 \approx 0,77$) podle reakce



Není vyloučeno, že tato regenerační reakce posouvá rovnováhu reakce díky odstraňování jednoho z produktů. Základní skelet BODIPY by se mohl substituovat až do šesti poloh, což by mohlo způsobovat velkou syntetickou překážku, nicméně rezonance skeletu koordinuje halogenaci primárně do poloh 2- a 6-, častá je však modifikace jádra s několika polohami již obsazenými nereaktivními skupinami (hlavně alkany), které koordinují substituci do neobsazených poloh. Dalším důležitým faktem je skutečnost, že stupeň substituce je závislý na molárním ekvivalentu halogenačního činidla a lze tedy syntézu modifikovat podle zamýšleného produktu (Obr. 40).⁷⁵ Vyhledávání v databázích

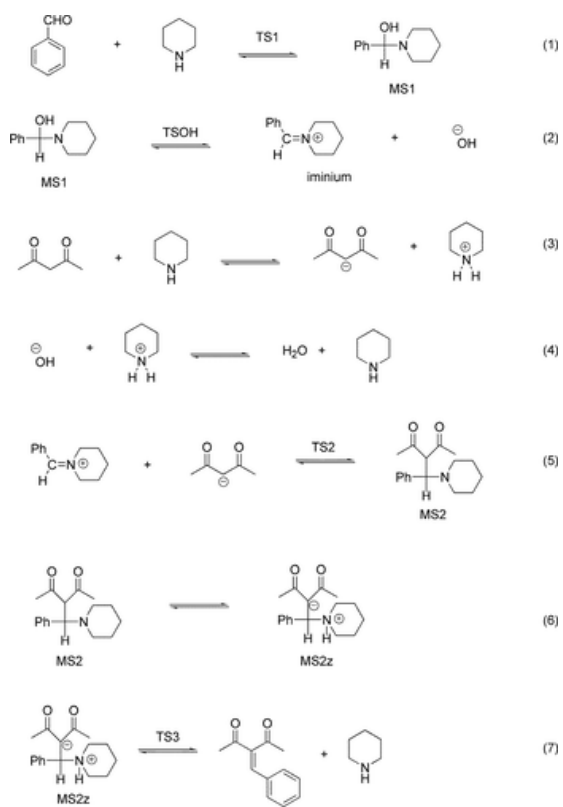
Reaxys a Google Scholar neposkytlo žádný výsledek se syntetickou procedurou poskytující fluorované bór-dipyrromethenové jádro.



Obrázek 40: Demonstrace selektivity halogenačních reakcí.
Převzato a upraveno podle ⁷⁵.

4.1.5 Knoevenagelova reakce

Tato klasická reakce aldehydů a ketonů s karbanionty má mnoho modifikací, vždy se však jedná o děj probíhající v bazickém prostředí, jehož produktem je alken. Pravděpodobně první, kdo využil tuto reakci k rozšíření konjugovaného π -systému BODIPY byl Akkaya a jeho skupina. V průběhu roku 2008 vydal dokonce několik publikací pojednávajících o vlastnostech tohoto nového strukturního motivu pro BODIPY.^{76, 77, 78} Ačkoliv je tato reakce obvykle poměrně univerzální a poskytuje vyhovující výtěžky ve velkém spektru rozpouštědel, drtivá většina dostupných postupů pro syntézu styrylovaných BODIPY využívá prostředí toluenu nebo benzenu za katalýzy piperidinem a kyselinou octovou nebo *para*-toluensulfonovou. Výčet těchto látek je nutný pro specifický průběh reakce, kde musí z piperidinu a aromatického aldehydu nejdříve vzniknout reaktivní meziproduct iminium-tosylát (případně acetát), který je následně napaden samotným karbaniontem methylu BODIPY (Obr. 41).^{79, 80} Pokud je k dispozici více reaktivních methylových skupin, reakce probíhá poměrně selektivně ve prospěch nejkyselější skupiny, což poskytuje dobrou předvídatelnost této reakce. Vedlejším produktem reakce je voda, vzhledem k vratnému charakteru některých mezikroků je žádoucí ji odstraňovat z reakce, obvykle pomocí Dean-Starkova aparátu.³⁶



Obrázek 41: Mechanismus piperidinem katalyzované Knoevenagelovy reakce.
Převzato z ⁷⁹

5.1 VYBAVENÍ LABORATOŘÍ

Výchozí látky a rozpouštědla pro syntézy byly dodány firmami Penta, Lach-Ner, Merck a Fluorochem a byly použity bez dalšího čištění. Průběh reakcí a čistota výsledných produktů byly monitorovány tenkovrstvou chromatografií na deskách Merck Kieselgel 60 F254, detekce pod UV lampou probíhala při vlnových délkách 254 nm a 366 nm. Jako stacionární fáze pro sloupcovou chromatografii byl využit silica gel Merck Kieselgel 60 (0,040 – 0,063 nm). Použité mobilní fáze jsou uvedené u jednotlivých popisů reakcí. ^1H NMR a ^{13}C NMR spektra byla měřena na Katedře organické a bioorganické chemie na přístrojích Varian VNMR S500 (Varian, USA) nebo Jeol JNM-ECZ600R (Jeol, USA), ^1H : 500 MHz a 600 MHz; ^{13}C : 126 MHz a 151 MHz) spektrometrech, na stejné katedře proběhlo měření IR spekter v módu ATR na přístroji Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA). Hmotnostní spektra byla měřena na přístroji ExpressionL CMS v propojení s ASAP® (ionizace pomocí APCI – ionizace za atmosférického tlaku) (Advion, Inc., USA). Měření absorpčních spekter probíhalo na Shimadzu UV-2600, měření emisních spekter na spektrofluorimetru FS5 (Edinburgh Instruments, UK) osazeném TSCPC (Time-Correlated Single Photon Counting) modulem a s rozšířením pro NIR (blízké infračervené) spektrum (fotonásobič R2658P), teploty tání byly měřeny na přístroji Stuart SMP20 (Stuart Equipment, UK).

5.2 TESTY IN VITRO

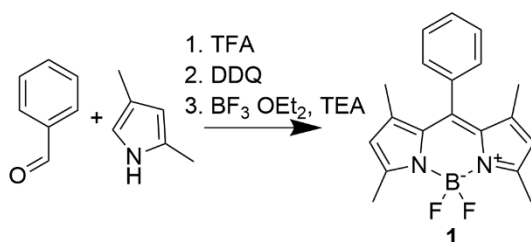
Biologická aktivita byla testována na Katedře biochemických věd RNDr. Miloslavem Macháčkem, Ph.D. Testovanou kulturou byla kultura lidského karcinomu děložního čípku (HeLa) zakoupená z American Type Cell Culture Collection (ATCC, USA). Buňky byly kultivovány v Dulbeccem upraveném Eagle médiu (DNEM) bez fenolové červeně (Lonza, Belgie) a vyživovány 10% roztokem fetálního bovinního séra inaktivovaného teplem, 1% roztokem penicilin/streptomycin (Lonza), 10mM tlumivým roztokem HEPES (4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina) a 4mM ultraglutaminem I (alanyl-L-glutamin, Lonza). Kultury byly v 75 cm² láhvích pro buněčné kultury (TPP, Švýcarsko), skladovány v CO₂ inkubátoru při 37 °C ve zvlhčované atmosféře 5% CO₂. Pasážovány každé tři až čtyři dny. Buňky byly kultivovány v roztoku testované látky po dobu dvanácti hodin a následně patnáct minut ozařovány xenonovou lampou o výkonu 450 W (Newport), s výkonem redukováným na 400 W a s long-pass filtrem o propustnosti $\lambda > 570$ nm (Newport OG570) spolu s vodním filtrem o mocnosti

8 cm. Strukturální vzorce byly vytvořeny v programu ChemDraw 19.0, případně byly převzaty z citovaných zdrojů.

5.3 STUDIE FOTOSTABILITY

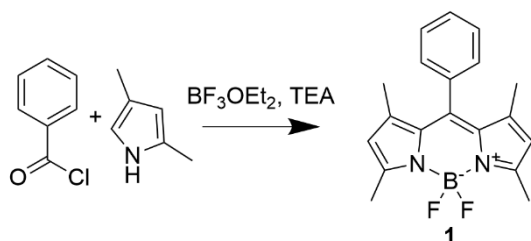
Po změření základní absorbance kyvety z křemičitého skla o vnitřních rozměrech 10 mm × 10 mm s magnetickým míchadélkem a s 2,5 ml chloroformu (pro látku **5** byl použit methanol) byl přidán roztok testované látky tak, aby v absorpčním maximu dosahovala hodnot v rozmezí 0,1-0,15. Po změření byly látky umístěny na magnetickou míchačku a ozařovány halogenovou výbojkou o výkonu 500 W (Osram, Německo), opatřenou vodním filtrem o mocnosti 8 cm. Vzdálenost výbojky a vodního filtru byla 10 cm, stejně tak vzdálenost kyvet od vodního filtru. V postupně se prodlužujících intervalech bylo měřeno absorpční spektrum vzorků, vždy se slepým vzorkem pro porovnání.

5.4 SYNTÉZA 3A,4A-DIAZA-4-BORA-4,4-DIFLUOR-1,3,5,7-TETRAMETHYL-8-FENYL-S-INDACENU (1)



Obrázek 42: Schéma syntézy 1.

- 2,4-dimethylpyrrol (0,942 g, 10 mmol), benzaldehyd (0,525 g, 5 mmol) a katalytické množství kyseliny trifluoroctové (TFA, 1-2 kapky) bylo rozpuštěno v dichlormethanu (DCM, 25 ml) pod ochrannou atmosférou argonu. Výsledná směs byla míchána za pokojové teploty po dobu šestnácti hodin. Následně byla přidána suspenze 2,3-dichlor-5,6-dikyan-1,4-benzochinonu (0,994 g, 4,4 mmol) v DCM. Výsledná suspenze byla míchána dalších patnáct minut a poté ochlazena na 0 °C. Jako poslední byl přidán triethylamin (TEA, 8,76 ml, 62,8 mmol) a diethyl-etherát fluoridu boritého (BF₃·OEt₂, 8,76 ml, 71 mmol) a směs byla míchána další tři hodiny. Surová směs byla naředěna DCM a přefiltrována přes dvoucentimetrovou vrstvu SiO₂ v Büchnerově nálevce. Získaný filtrát byl několikrát promyt destilovanou vodou v děličce. Organická fáze byla posléze extrahována nasyceným roztokem NaCl a dosušena bezvodým Na₂SO₄, přefiltrována a odpařena na vakuové odparce. Sloupcová chromatografie s mobilní fází hexan:DCM 1:1 poskytla hnědooranžové krystalky s metalickými odlesky o hmotnosti 340 mg (21 %). V dalších fázích mé práce se jako časově výhodné ukázalo produkt zbavit jen nejhrubší kontaminace a s výhodou izolovat až jako dihydrid derivát.



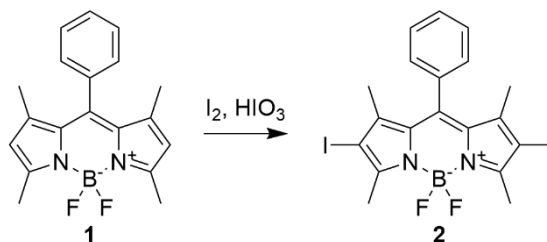
Obrázek 43: Alternativní syntéza 1.

- Do dvouhrdlé baňky s ochrannou atmosférou argonu byl přidán suchý DCM (40 ml), 2,4-dimethylpyrrol (1 g, 11 mmol) a benzoylchlorid (0,61 g, 4,3 mmol). Směs byla ponechána za pokojové teploty a intenzivně míchána po dobu šestnácti hodin. Následně

byla směs ochlazena na 0 °C a do směsi postupně přikapáván triethylamin (6,5 ml, 46,6 mmol) a diethyl-etherát fluoridu boritého (6,5 ml, 52,7 mmol). Směs byla míchána další tři hodiny, následně byla směs extrahována destilovanou vodou v děličce. Organická fáze byla poté zbavena vody nasyceným roztokem NaCl a dosušena pomocí Na₂SO₄. Roztok byl přefiltrován a odpařen na vakuové odparce. Sloupcová chromatografie s mobilní fází hexan:DCM 1:1 poskytla hnědooranžové krystalky s metalickými odlesky o hmotnosti 267 mg (19 %). Jako časově výhodné se ukázalo produkt zbavit jen nejhrubší kontaminace a s výhodou izolovat až jako diiod-derivát.

UV-vis (chloroform) $\lambda_{\max} = 500 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 512 \text{ nm}$. ¹H NMR (500 MHz, CD₃COCD₃) δ 7,64 – 7,54 (m, 3H), 7,43 – 7,37 (m, 2H), 6,12 (s, 2H), 2,51 (s, 6H), 1,41 (s, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, CD₃COCD₃) δ 156,04, 143,92, 143,14, 135,71, 132,09, 130,12, 129,97, 128,85, 122,03, 14,53, 14,43 ppm. IR (ATR) ν 2924, 2854, 1539, 1508, 1464, 1408, 1304, 1182, 1153, 1120, 1076, 1054 cm⁻¹. MS (ESI) (*m/z*) vypočteno pro C₁₉H₁₉BF₂N₂: 324,16, naměřeno 325,20 [M+H]⁺. Experimentální data odpovídala těm uváděným v literatuře.⁷⁴

5.5 SYNTÉZA 3A,4A-DIAZA-4-BORA-4,4-DIFLUOR-2,6-DIJÓD-1,3,5,7-TETRAMETHYL-8-FENYL-S-INDACENU (2)

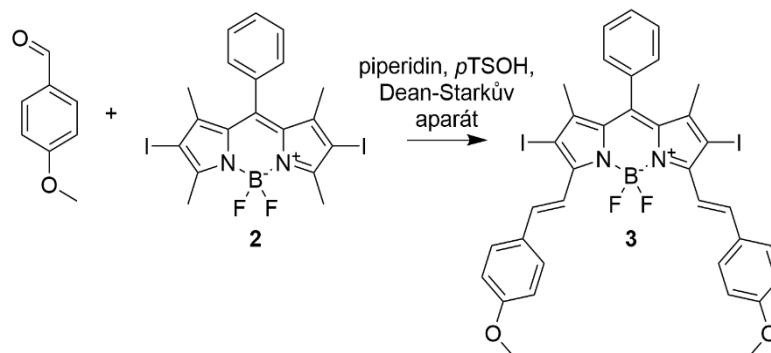


Obrázek 44: Schéma syntézy 2.

Látka **1** (100 mg, 0,3 mmol) byla přidána do baňky s kulatým dnem a rozpuštěna v DCM (50 ml). K roztoku byl následně přidán roztok elementárního jódu (0,2 g, 0,8 mmol) rozpuštěného v 96% ethanolu (10 ml) a nakonec postupně přikapáván roztok kyseliny jodičné (0,1 g, 0,6 mmol) ve vodě (7,5 ml). K baňce byl připevněn Liebigův chladič a směs byla udržována za varu po dobu následujících dvou hodin. Surová směs byla několikrát promyta destilovanou vodou, organická fáze byla poté zbavena vody nasyceným roztokem NaCl a dosušena pomocí Na₂SO₄. Roztok byl přefiltrován a odpařen na vakuové odparce. Sloupcová chromatografie s mobilní fází hexan:DCM 1:1 poskytla tmavý olej přecházející na červené krystalky s metalickými odlesky o hmotnosti 151 mg (85 %).

Teplota tání: 200-210 °C (sublimuje). UV-vis (chloroform) $\lambda_{\text{max}} = 535 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550 \text{ nm}$. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,57 – 7,49 (m, 3H), 7,30 – 7,23 (m, 2H), 2,66 (s, 6H), 1,39 (s, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 156,76, 145,35, 141,36, 134,73, 131,28, 129,51, 129,44, 127,77, 85,63, 16,92, 16,02 ppm. IR (ATR) ν 2925, 2853, 1538, 1481, 1444, 1347, 1308, 1181, 1119, 1099, 1080, 1053, 988 cm⁻¹. MS (ESI) (*m/z*) vypočteno pro C₁₉H₁₇BF₂I₂N₂: 575,95, naměřeno 576,10 [M+H]⁺. Experimentální data odpovídala těm uváděným v literatuře.⁴⁰

5.6 SYNTÉZA 3A,4A-DIAZA-4-BORA-4,4-DIFLUOR-2,6-DIJOD-8-FENYL-3,5-BIS(4-METHOXYSTYRYL)-1,7-DIMETHYL-S-INDACENU (3)

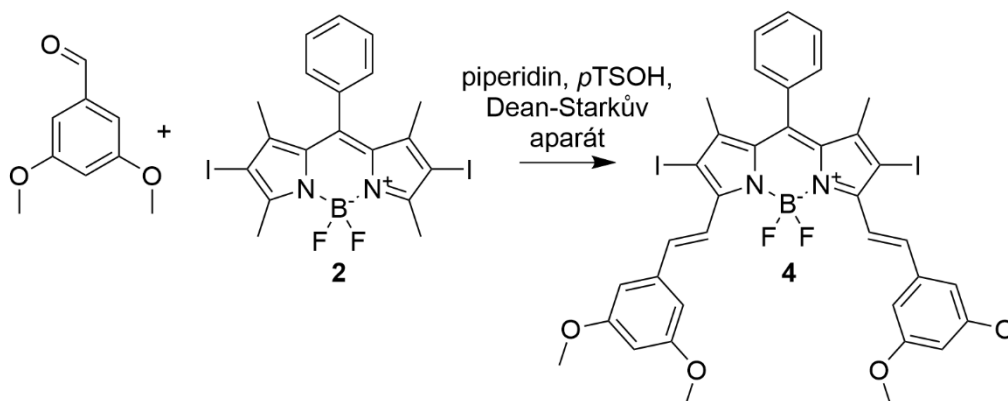


Obrázek 45: Schéma syntézy 3.

Do baňky s kulatým dnem byl postupně přidán suchý toluen (50 ml), látka 2 (100 mg, 0,17 mmol), *p*-anisaldehyd (100 mg, 0,73 mmol), piperidin (1,5 ml) a kyselina *p*-toluensulfonová (10 mg, 0,05 mmol). Baňka se opatřila Dean-Starkovým aparát a směs se udržovala za varu po dobu osmi hodin. Surová směs byla třikrát promyta destilovanou vodou. Organická fáze byla zbavena vody nasyceným roztokem NaCl a dosušena pomocí Na₂SO₄. Roztok byl přefiltrován a odpařen na vakuové odparce. Sloupcová chromatografie v soustavě hexan:DCM 1:2 poskytla tmavě zelené krystalky s metalickými odlesky o hmotnosti 37 mg (27 %).

UV-vis (chloroform) $\lambda_{\max} = 663$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 684$ nm, $\Phi_{\Delta} = 0,55$. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8,15 (d, *J* = 16,6 Hz, 2H), 7,63 (d, *J* = 7,9 Hz, 4H), 7,61 – 7,48 (m, 5H), 7,34 – 7,28 (m, 2H), 7,00 – 6,94 (m, 4H), 3,88 (s, 6H), 1,46 (s, 6H). ¹³C NMR se nepodařilo změřit. IR (ATR) ν 1622, 1600, 1572, 1511, 1435, 1418, 1356, 1309, 1250, 1170, 1097, 1072, 1026, 1009 cm⁻¹. MS (ESI) (*m/z*) vypočteno pro C₃₅H₂₉BF₂I₂N₂: 812,04, naměřeno 810,90 [M+H]⁺.

5.7 SYNTÉZA 3A,4A-DIAZA-4-BORA-4,4-DIFLUOR-2,6-DIJOD-8-FENYL-3,5-DIMETHOXYSTYRYL)-1,7-DIMETHYL-S-INDACENU (4)

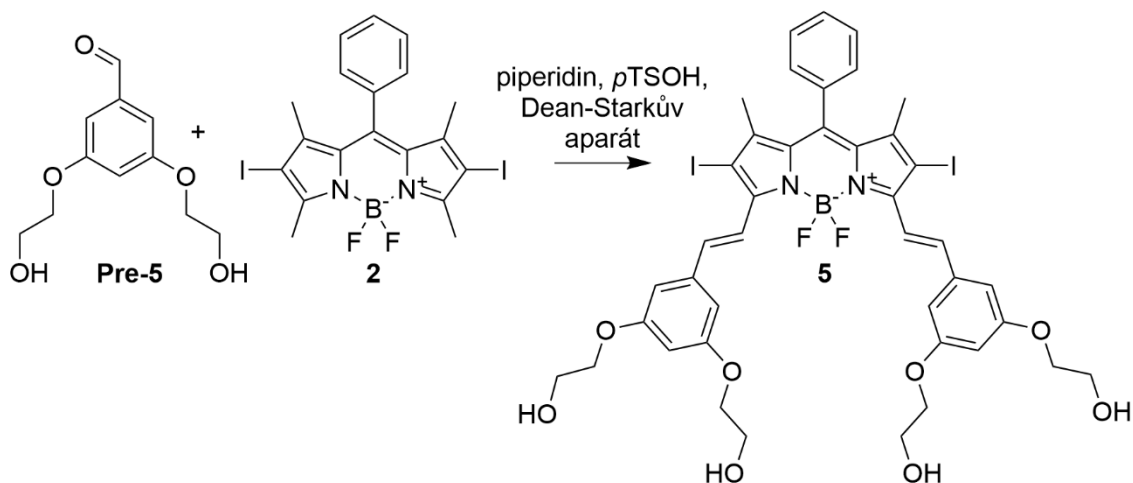


Obrázek 46: Schéma syntézy 4.

Do baňky s kulatým dnem byl postupně přidán bezvodý toluen (50 ml), **2** (100 mg, 0,17 mmol), 3,5-dimethoxybenzaldehyd (75 mg, 0,85 mmol), piperidin (1,5 ml) a kyselina *p*-toluensulfonová (10 mg, 0,05 mmol). Baňka se opatřila Dean-Starkovým aparátem a směs se udržovala za varu po dobu osmi hodin. Surová směs byla třikrát promyta destilovanou vodou. Organická fáze byla zbavena vody nasyceným roztokem NaCl a dosušena pomocí Na₂SO₄. Roztok byl přefiltrován a odpařen na vakuové odparce. Sloupcová chromatografie v soustavě hexan:DCM 1:5 poskytla tmavě zelené krystalky s metalickými odlesky o hmotnosti 32 mg (21 %).

UV-vis (chloroform) λ_{\max} (ϵ) = 644,5 nm (97 680 M⁻¹cm⁻¹), λ_{em} = 662 nm. ¹H NMR (500 MHz, DCM – D₂) δ 8,11 (d, *J* = 16,7 Hz, 2H), 7,69 (d, *J* = 16,7 Hz, 2H), 7,62 – 7,57 (m, 3H), 7,39 – 7,33 (m, 2H), 6,82 (d, *J* = 2.3 Hz, 4H), 6,52 (t, *J* = 2.2 Hz, 2H), 3,90 – 3,86 (m, 12H), 1,50 (s, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, DCM – D₂) δ 170,20, 164,21, 161,76, 150,85, 147,08, 139,88, 139,08, 135,50, 130,21, 130,14, 128,80, 119,81, 105,99, 102,20, 55,99, 17,90. IR (ATR) ν 2939, 2837, 1628, 1589, 1527, 1460, 1422, 1399, 1343, 1299, 1207, 1155, 1123, 1056, 1017 cm⁻¹.

5.8 SYNTÉZA 3A,4A-DIAZA-4-BORA-4,4-DIFLUOR-2,6-DIJOD-8-FENYL-3,5-BIS(3,5-BISHYDROXYETHOXYSTYRYL)-1,7-DIMETHYL-S-INDACENU (5)

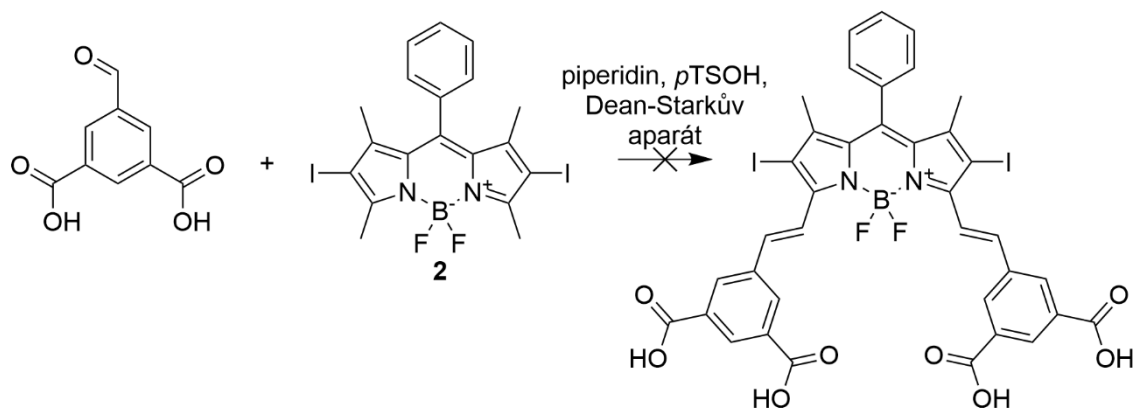


Obrázek 47: Schéma syntézy 5.

Do baňky s kulatým dnem byl přidán bezvodý toluen (50 ml), **2** (100 mg, 0,17 mmol), 3,5-bis(2-hydroxyethoxy)benzaldehyd (100 mg, 0,5 mmol), piperidin (1,5 ml) a kyselina *p*-toluensulfonová (10 mg, 0,05 mmol). Baňka se opatřila Dean-Starkovým aparátem a směs se udržovala za varu po dobu osmi hodin. Surová směs byla třikrát promyta destilovanou vodou. Organická fáze byla zbavena vody nasyceným roztokem NaCl a dosušena pomocí Na₂SO₄. Roztok byl přefiltrován a odpařen na vakuové odparce. Sloupcová chromatografie s mobilní fází čistý aceton, po eluci lipofilních červených a fialových látek aceton:methanol 5:1 poskytla tmavě zelené krystalky s metalickými odlesky o hmotnosti 33 mg (19 %).

UV-vis (ethanol) $\lambda_{\max} = 636$ nm. ¹H NMR (600 MHz, DMSO – D₆) δ 7,94 (d, *J* = 16,8 Hz, 2H), 7,61 – 7,57 (m, 3H), 7,48 – 7,41 (m, 4H), 6,73 (d, *J* = 2.2 Hz, 4H), 6,56 (t, *J* = 2,3 Hz, 1H), 4,84 (t, *J* = 5,6 Hz, 4H), 4,03 – 3,96 (m, 8H), 3,69 (q, *J* = 5.2 Hz, 8H), 1,38 (s, 6H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO – D₆) δ 160,89, 150,51, 146,65, 141,04, 139,81, 138,33, 134,63, 133,29, 130,43, 130,14, 128,63, 119,23, 106,38, 103,12, 85,54, 69,85, 60,08, 17,63.

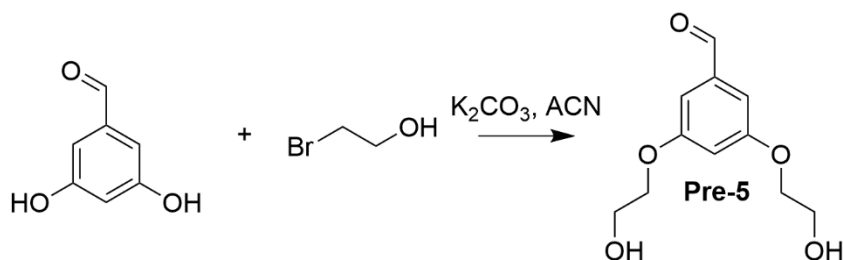
5.9 SYNTÉZA (3A,4A-DIAZA-4-BORA-4,4-DIFLUOR-2,6-DIJOD-8-FENYL-1,7-DIMETHYL-S-INDACEN-3,5-BIS(ETHEN-2,1-DIYL))DIISOFTALOVÉ KYSELINY



Obrázek 48: Schéma nezdařené syntézy.

Do baňky s kulatým dnem byl postupně přidán suchý toluen (50 ml), **2** (100 mg, 0,17 mmol), kyseliny 5-formylizoftalová kyselina (140 mg, 0,73 mmol), piperidin (1,5 ml) a kyselina *p*-toluensulfonová (10 mg, 0,05 mmol). Baňka se opatřila Dean Starkovým aparátem a směs se udržovala za varu po dobu osmi hodin. Barva reakční směsi spolu s orientační tenkovrstvou chromatografií (TLC) s acetonem jako mobilní fází svědčila o nepřítomnosti žádaného produktu.

5.10 SYNTÉZA 3,5-BIS(2-HYDROXYETHOXY)BENZALDEHYDU (PRE-5)

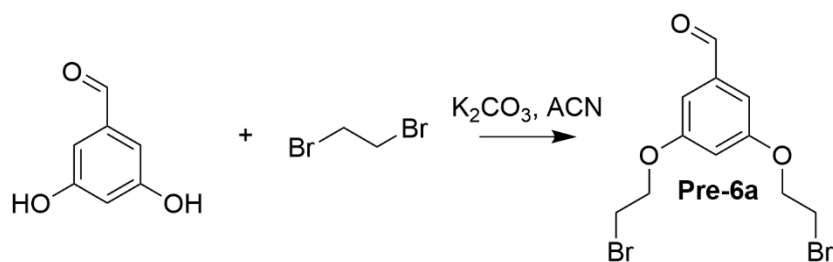


Obrázek 49: Schéma syntézy Pre-5.

3,5-dihydroxybenzaldehyd (1 g, 7 mmol) byl rozpuštěn v baňce s acetonitrilem (ACN, 50 ml) opatřené zpětným chladičem, následně byl přidán K₂CO₃ (2,5 g, 0,2 mol) a nakonec byl postupně přidáván 2-bromethanol (5,5 g, 0,03 mol). Směs byla zahřívána k varu pod ochrannou atmosférou argonu po dobu následujících šestnácti hodin. Po uplynutí času byla reakční směs přefiltrována přes skládaný filtr, filtr několikrát promyt malým množstvím ACN a takto získaný roztok byl odpařen na rotační vakuové odparce. Sloupcová chromatografie s mobilní fází hexan:diethylether 1:1 poskytla bezbarvý olej pomalu přecházející na průsvitné, světle žluté krystalky o hmotnosti 300 mg (19 %).

Teplota tání 89-93 °C. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 9,88 (s, 1H), 7,10 (d, J = 2,3 Hz, 2H), 6,87 (t, J = 2,3 Hz, 1H), 4,13 – 4,07 (m, 4H), 3,89 (dd, J = 5,3, 4,1 Hz, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 193,76, 162,17, 140,03, 109,15, 108,79, 71,03, 61,53. IR (ATR) ν 3292, 2936, 2872, 2808, 2723, 1698, 1661, 1590, 1482, 1443, 1387, 1314, 1234, 1179, 1074, 1025 cm⁻¹. MS (ESI) (*m/z*) vypočteno pro C₁₁H₁₄O₅: 226,08, naměřeno 227,00 [M+H]⁺.

5.11 SYNTÉZA 3,5-BIS(2-BROMETHOXY)BENZALDEHYDU (PRE-6A)

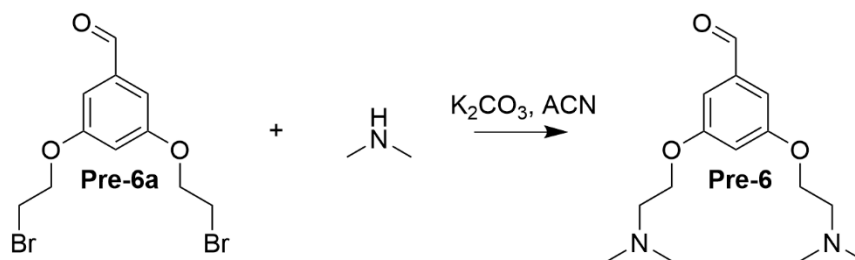


Obrázek 50: Schéma syntézy *Pre-6a*.

3,5-dihydroxybenzaldehyd (1 g, 7 mmol) byl rozpuštěn v baňce s ACN (50 ml) opatřené zpětným chladičem, následně byl přidán K₂CO₃ (2,5 g, 0,2 mol) a nakonec byl postupně přidáván 1,2-dibromethan (5,5 g, 0,03 mol). Směs byla zahřívána k varu pod ochrannou atmosférou argonu po dobu následujících šestnácti hodin. Po uplynutí času byla směs přefiltrována přes skládaný filtr, filtr několikrát promyt malým množstvím ACN a takto získaný roztok byl odpařen na rotační vakuové odparce. Sloupcová chromatografie s mobilní fází hexan:diethylether 1:1 poskytla bílé krystalky o hmotnosti 460 mg (18 %).

Teplota tání 95-98 °C. ¹H NMR (500 MHz, CD₃Cl) δ 9,91 (s, 1H), 7,08 – 7,03 (m, 2H), 6,77 (t, J = 2,3 Hz, 1H), 4,35 (t, J = 6,1 Hz, 4H), 3,67 (t, J = 6,1 Hz, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, CD₃Cl) δ 191,41, 159,80, 138,56, 108,43, 108,33, 77,25, 77,00, 76,74, 68,18, 28,67. IR (ATR) ν 2805, 2722, 1706, 1588, 1480, 1448, 1419, 1398, 1324, 1278, 1175, 1079, 1041 cm⁻¹. MS (ESI) (*m/z*) vypočteno pro C₁₁H₁₂Br₂O₃: 349,92, naměřeno 351,20 [M+H]⁺. Experimentální data odpovídala těm uváděným v literatuře s výjimkou MS, teplota tání v původní studii neměřena.⁸¹

5.12 SYNTÉZA 3,5-BIS[2-(*N,N*-DIMETHYLAMINO)ETHOXY]BENZALDEHYD-DIHYDROCHLORIDU (PRE-6)

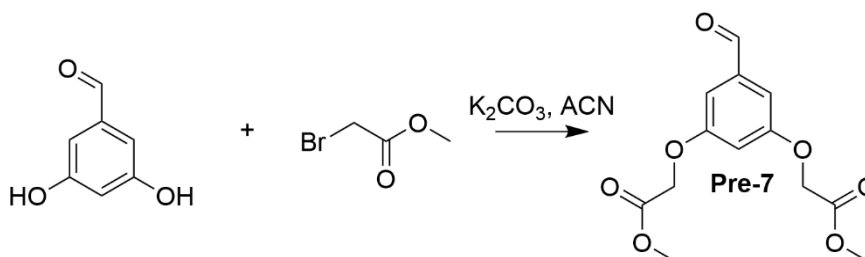


Obrázek 51: Schéma syntézy Pre-6.

Do 2M roztoku dimethylaminu v THF (17 ml, 34 mmol) chlazeného ledem byl postupně přikapáván roztok **Pre-6a** (400 mg, 1 mmol) v 15 ml THF. Směs byla pečlivě uzavřena pod ochrannou atmosférou argonu a míchána za pokojové teploty po dobu třiceti hodin. Po uplynutí reakce byla směs přefiltrována přes filtrační papír, odpařena na rotační vakuové odparce, krystalický materiál byl rozpuštěn ve vodě, pH vodné fáze bylo kontrolováno lakmusovým papírkem a zvýšeno 5% vodným roztokem NaHCO₃ do bazické reakce. Směs byla třikrát extrahována diethyletherem. Spojené organické fáze byly probublávány plynným chlorovodíkem. Vysrážená hmota byla oddělena filtrací přes filtrační papír a rozpuštěna v methanolu. Koncentrovaný methanolický roztok byl nakapán do diethyletheru o teplotě -10 °C. Vysrážená hmota byla opět odfiltrována. Vzniklá sraženina je hnědobílá amorfnní hmota o hmotnosti 240 mg (60%).

¹H NMR (500 MHz, CD₃Cl) δ 9,88 (s, 1H), 7,06 – 7,00 (m, 2H), 6,79 (t, J = 2,3 Hz, 1H), 4,09 (t, J = 5,6 Hz, 4H), 2,74 (t, J = 5,6 Hz, 4H), 2,34 (s, 12H). ¹³C NMR (126 MHz, CD₃Cl) δ 191,93, 160,39, 138,21, 108,14, 107,84, 66,27, 58,12, 45,83. IR (ATR) ν 2942, 2819, 2770, 1697, 1593, 1455, 1387, 1345, 1296, 1170, 1055 cm⁻¹. MS (ESI) (*m/z*) vypočteno pro C₁₅H₂₈N₂O₃Cl₂: 352,13, naměřeno 350,90 [M-H]⁻.

5.13 SYNTÉZA DIMETHYL 2,2'-((5-FORMYL-1,3-FENYLEN)BIS(OXY))DIACETÁTU (PRE-7)



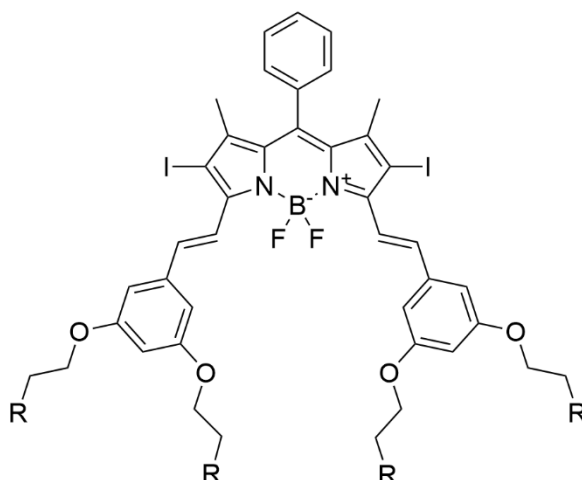
Obrázek 52: Schéma syntézy Pre-7.

3,5-dihydroxybenzaldehyd (1 g, 7 mmol) byl rozpuštěn v baňce s ACN opatřené zpětným chladičem, následně byl přidán K₂CO₃ (2,5 g, 0,2 mol) a konečně byl postupně přidáván methylester kyseliny bromoctové (2,77 g, 0,2 mol). Směs byla zahřívána pod ochrannou atmosférou argonu k varu po dobu následujících pěti hodin. Po uplynutí času byla směs přefiltrována přes skládaný filtr, filtr byl několikrát promyt malým množstvím ACN a takto získaný roztok byl odpařen na rotační vakuové odparce. Sloupcová chromatografie s mobilní fází hexan:ethyl-acetát 1:1 poskytla bílé krystalky s charakteristickou vůní o hmotnosti 340 mg (17%).

Teplota tání 108-110 °C. ¹H NMR (500 MHz, CD₃Cl) δ 9,89 (s, 1H), 7,06 – 7,01 (m, 2H), 6,78 (t, J = 2,4 Hz, 1H), 4,68 (s, 4H), 3,82 (s, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, CD₃Cl) δ 191,18, 168,59, 159,40, 138,50, 108,52, 108,41, 65,25, 52,36. IR (ATR) ν 3052, 2926, 1755, 1685, 1609, 1471, 1434, 1397, 1340, 1326, 1231, 1169, 1098 cm⁻¹. MS (ESI) (m/z) vypočteno pro C₁₃H₁₄O₇: 282,07, naměřeno 282,90 [M+H]⁺.

6 DISKUZE A VÝSLEDKY

Tato studie se stala první prací zabírající se syntetickými a fotofyzikálními aspekty barviv typu BODIPY v laboratořích výzkumné skupiny prof. Zimčička. Pilotní povaha výzkumu zajistila mnoho praktických znalostí, které budou využity v dalším výzkumu a při designu nových struktur. Při teoretickém designu molekul bylo postupováno tak, aby se zajistil optimální profil vlastností vyplývající z předchozích kapitol - jmenovitě alespoň omezenou rozpustnost ve vodě, dobré kvantové výtěžky singletového kyslíku a hlavní absorpční pás okolo 650 nm. Již první cílová látka, látka **3**, měla absorpční maximum v přijatelné vlnové délce a rovněž poskytovala dobré kvantové výtěžky singletového kyslíku ($\Phi_{\Delta} = 0,55$). Nevýhodou byla špatná rozpustnost v polárních prostředích, což znemožnilo otestování na buněčných kulturách HeLa. Na tento fakt jsme zareagovali změnou výchozích aromatických aldehydů použitých pro Knoevenagelovu kondenzaci a zavedli jsme substituce v polohách 3- a 5-. První zamýšlená látka měla nést karboxylové skupiny napojené přímo na aromatický skelet. Reakce však neprobíhala, kvůli lepším syntetickým možnostem a kvůli dalšímu zvýšení hydrofility byl syntetický plán upraven do finální podoby a to do podoby 3-, 5- disubstituce alkoxy skupinami. První látka s novou strukturou byla označena jako **4** a díky uniformitě fotofyzikálních vlastností napříč všemi připravenými deriváty s 3-, 5- disubstitucí ji lze považovat za modelovou látku pro účely orientačního stanovení fotofyzikálních vlastností. Po látce **4** byla syntetizována látka **5** s 2-hydroxyethoxy skupinami. Tento preparát si zachoval dobré fotofyzikální vlastnosti svých předchůdců a díky alkoholickým skupinám jde o relativně hydrofilní látku rozpustnou v methanolu.

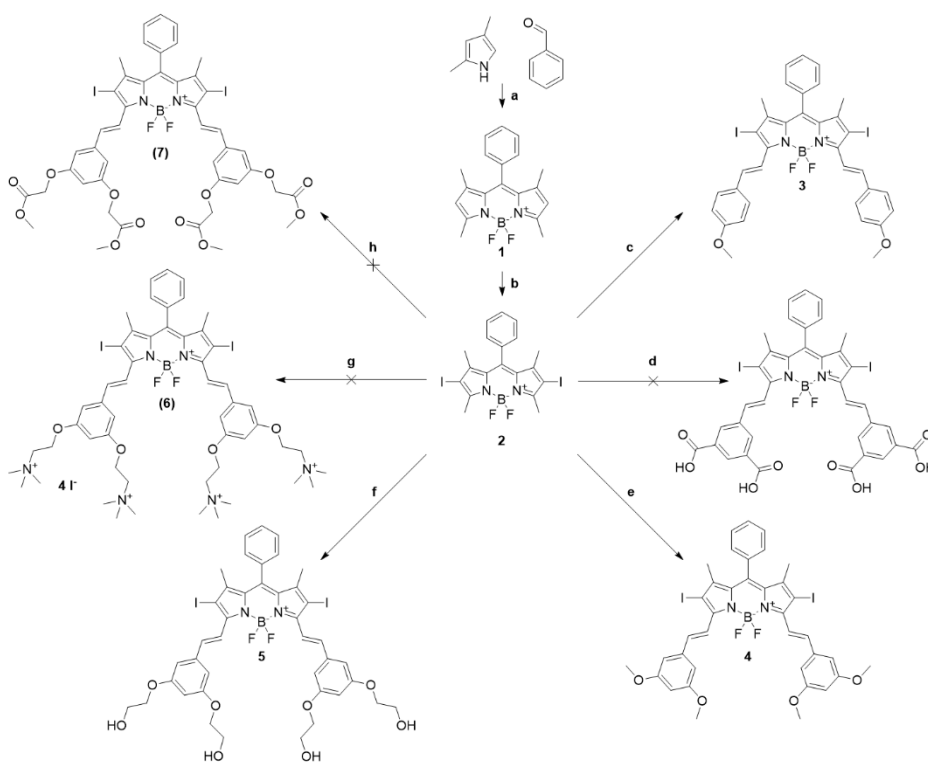


Obrázek 53: Obecná struktura látky **5** a dalších plánovaných derivátů.

Na výše uvedené obecné struktúre (Obr. 53) zamýšlených látok po zmenách v poloze a povaze hydrofilních substituentů lze ukázat jednotlivé části molekul a jejich funkci. Nesubstituovaný fenyl v poloze 8- zvyšuje lipofilitu a penetraci do nitrobuňčného prostředí mechanismem pasivní difuze. Taktéž dvojitá substituce jódem zvýší lipofilitu, nezanedbatelně posouvá pás absorpčního spektra směrem k vyšším vlnovým délkám a především zvyšuje kvantové výtěžky singletového kyslíku. Dvě styrylová jádra v polohách 3- a 5- rozšířením konjugovaného systému dvojných vazeb zajišťují vyhovující absorpci při vlnových délkách blízkých infračervenému spektru. Na styrylech připojené alkoxy skupiny s hydrofilními prvky zvyšují rozpustnost v polárních prostředích.

6.1 ZHDNOCENÍ PROVEDENÝCH SYNTÉZ

Souhrn syntéz konečných látek znázorněn níže (Obr. 54). Reakční podmínky a souhrn syntézy prekurzorů lze nalézt na dalších stranách (Tab. 2 a Obr. 55). Látky **1** a **2** byly připraveny podle postupů publikovaných v recenzovaných časopisech. Již od prvních dnů bylo zřejmé, že dostupná literatura je značně nesourodá a lze nalézt téměř identické postupy s velmi rozdílnými (od 16,1 %⁸² po 80 %⁸³) výtěžky pro reakci **a**. Oproti tomu reakce **b** probíhala velmi selektivně a za vysokých výtěžků.



Obrázek 54: Syntetická cesta k finálním sloučeninám, uskutečněným, plánovaným i neskutečněným z důvodu změny syntetických cílů.

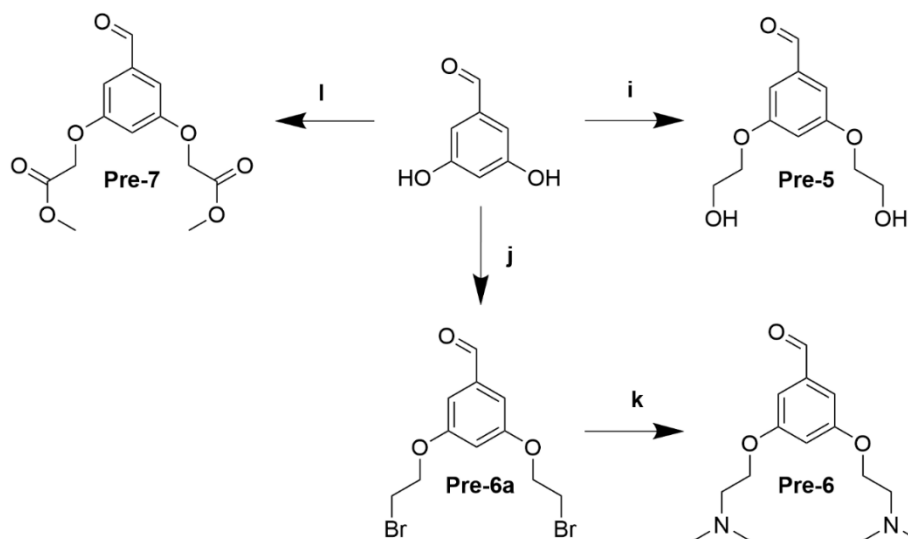
Ačkoliv látka **2** byla již několikrát připravena v minulosti, v dostupných materiálech jsem nenalezl zmínku o její schopnosti sublimovat. Tento poznatek byl při první syntéze získán po ponechání již vykrystalizované látky za sníženého tlaku na vakuové odparce za účelem odstranění zbytkových rozpouštědel. Následná Knoevenagelova reakce probíhala za poměrně drastických podmínek, což se podepsalo na množství vedlejších produktů a posléze na náročnosti separace. Ačkoliv je popsáno mnoho modifikací této reakce, kondenzace BODIPY je velmi choulostivá na reakční prostředí a jiné, než aromatické rozpouštědlo neposkytuje ani stopové množství požadovaného produktu. Toto představuje seriózní problém pro budoucí syntézy hydrofilních preparátů, které pravděpodobně nebudou rozpustné v toluenu a v benzenu, rozpouštědlech, které jsou v literatuře uváděny nejčastěji. Již produkt **5** se částečně srážel na povrchu baňky v průběhu reakce. U hydrofilnějších preparátů tedy lze očekávat obdobný problém. Jistou nadějí do budoucna je fakt, že pokusná reakce v pyridinu, případně ve směsi pyridinu a toluenu poskytovala modrozelený produkt na TLC, produkt však izolován nebyl. Po všech stránkách úspěšné syntéze látky **5** byla naplánována syntéza látek **6** a **7**. Připraveny byly však jen výchozí deriváty benzaldehydu pro tuto reakci, samotné syntéze zabránila pandemická situace v České republice.

Tabulka 2: Přehled reakčních podmínek jednotlivých reakcí.

Reakce	Reakční podmínky
a	a) TFA, DDQ, BF ₃ OEt ₂ , TEA, Ochranná atmosféra argonu, 19 hodin (21 %) b) místo benzaldehydu benzoylchlorid, BF ₃ Ot ₂ , TEA, Ochranná atmosféra argonu, 19 hodin (19 %)
b	I ₂ , HIO ₃ , 2 h za varu pod zpětným chladičem (85 %)
c	2 , <i>p</i> -anisaldehyd, piperidin, <i>p</i> TSOH (kyselina <i>p</i> -toluensulfonová), 8 hodin za varu pod Dean-Stark aparátem (27 %)
d	2 , 5-formylizoftalová kyselina, piperidin, <i>p</i> TSOH (neprobíhá)
e	2 , 3,5-dimethoxybenzaldehyd, piperidin, <i>p</i> TSOH, 8 hodin za varu pod Dean-Stark aparátem (21 %)
f	2 , 3,5-bis(2-hydroxyethoxy)benzaldehyd, piperidin, <i>p</i> TSOH, 8 hodin za varu pod Dean-Stark aparátem (19 %)
g	neprovedeno
h	neprovedeno
i	3,5-dihydroxybenzaldehyd, K ₂ CO ₃ , 2-bromethanol, 16 hodin za varu pod zpětným chladičem, Ochranná atmosféra argonu (19 %)
j	3,5-dihydroxybenzaldehyd, K ₂ CO ₃ , 1,2-dibromethan, 16 hodin za varu pod zpětným chladičem, Ochranná atmosféra argonu (18 %)
k	Pre-6a , 2M roztok dimethylaminu v THF, 30 hodin za pokojové teploty, Ochranná atmosféra argonu (60 %)

I	3,5-dihydroxybenzaldehyd, K ₂ CO ₃ , methylester kyseliny bromoctové, 5 hodin za varu pod zpětným chladičem, Ochranná atmosféra argonu (17 %)
----------	---

6.2 PŘÍPRAVA SUBSTITUOVANÝCH BENZALDEHYDŮ WILLIAMSONOVOU REAKCÍ

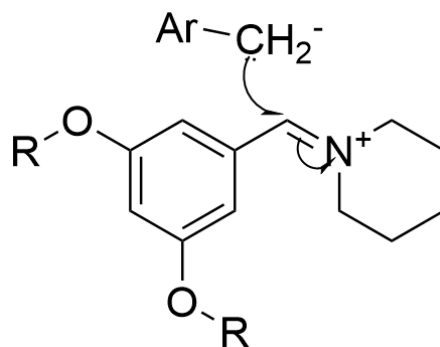


Obrázek 55: Schéma přípravy prekurzorů finálních látek.

Jedna z reakcí, kterým jsem se ve své práci věnoval, byla také příprava substituovaných benzaldehydů Williamsonovou syntézou. Jako zásada byl původně zvolen hydroxid sodný. Bohužel, pro pravděpodobnou degradaci produktů musela být později použita mírnější báze K₂CO₃. Díky obecně známým požadavkům na prostředí pro reakci typu S_N2 (84) bylo rozpouštědlo vybíráno tak, aby bylo aprotické a polární. Proto byly pro první experiment zvoleny dvě paralelně probíhající reakce v prostředí acetonitrilu (ACN) a dimethylsulfoxidu (DMSO). Tyto reakce poskytly srovnatelné výsledky co do výtěžku, tak do doby nutné k provedení. Z pohledu následné izolace bylo velmi složité zbavit se reziduálního DMSO, proto jsme jako rozpouštědlo volby zvolili ACN. Výtěžkem se obě rozpouštědla lišila jen minimálně. Obvyklou procedurou se stala reakce po dobu 18-24 hodin v prostředí ACN s odpovídajícím bromalkanem v poměru dva až dva a půl ekvivalentu bromalkanu na jednu fenolickou skupinu. Množství vedlejších produktů se snížilo po použití Schlenkovy techniky práce pod ochrannou atmosférou, patrně díky zamezení oxidace výchozí látky. Výtěžky u reakcí probíhajících pod ochrannou atmosférou a bez ní se signifikantně nelišily.

6.3 KNOEVENAGELOVA KONDENZACE

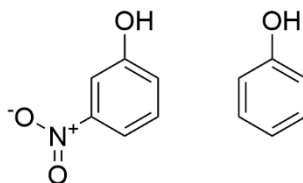
Pro rozšíření konjugovaného systému BODPY o styrylové substituenty se využívá Knoevenagelova kondenzace. Pro průběh je důležité bazické prostředí, které zde bylo zajištěno piperidinem, který je výhodný tím, že coby sekundární amin plní i funkci katalyzátoru (Obr. 57). Jistým specifickým modifikací pro styrylaci BODIPY je přítomnost kyselého katalyzátoru kyseliny octové nebo kyseliny para-toluensulfonové (*p*TsOH). Vysoké teploty a alkalické prostředí bohužel způsobují degradaci výchozích látek a vysoké nároky na množství výchozí látky. Jednotlivé kroky neprobíhají pouze směrem k zamýšleným produktům, jsou vratné a tedy je žádoucí odstraňovat některý z meziproductů. Zde je voda odstraňována azeotropní destilací v Dean-Starkově aparátu, který musí být vybrán pečlivě tak, aby k azeotropní destilaci skutečně docházelo a voda nekondensovala již v ascendentní části zařízení. V průběhu optimalizace této reakce bylo vyzkoušeno velké množství rozpouštědel a vzhledem k tomu, že probíhala jen v toluenu, benzenu a pyridinu se dá usuzovat, že pro průběh reakce je důležitá aromaticita prostředí. Ve směsi toluen 10:1 1,4-dioxan reakce již neprobíhala. Podstatou katalýzy je tvorba karbinolaminu a posléze 1-benzylidenpiperidinium tosylátu (acetátu)⁷⁹, který je dle studie⁸⁰ o deset řádů reaktivnější než odpovídající aldehyd. Nutno zmínit, že ještě lepších výsledků dosahovaly podle studie komplexy karbonylu s chloridem boritým. Tyto experimenty však dle literatury probíhaly v ACN, ve kterém je jodovaná výchozí molekula nerozpustná i za zvýšené teploty. Vzniklý reaktivní imin je atakován karbaniontem na methylovaném BODIPY. Díky parciálnímu kladnému náboji v polohách 3- a 5- je tato reakce opět dobře koordinována a styrylace poloh 1- a 7- probíhá až po obsazení prvních dvou.³⁶ Pro styrylaci do třetího a čtvrtého stupně je nutné zvýšit molární poměr reaktantů ve prospěch benzaldehydu. Tato reakce poskytovala výtěžky nižší než 20 %. V rámci naší výzkumné skupiny se posléze podařilo optimalizovat postup přidáním Lewisovy kyseliny Mg(ClO₄)₂ podle.⁸⁵ Bohužel extenzivnímu využití tohoto poznatku zabránila epidemiologická situace v ČR.



Obrázek 57: Klíčový krok styrylace
Knoevenagelovou reakcí.
Podle ⁷⁹.

6.4 NEREALIZOVANÉ SYNTÉZY

První neúspěch byla reakce s diethyl 5-formylbenzen-1,3-dikarboxylátem, kdy se nepovedlo kondenzovat karbaldehyd s molekulou **2**. Důvod není jednoznačně objasněn, jako první vysvětlení se nabízí elektron-odtahující efekt dvou esterových skupin a jejich vliv na rezonanci karbaldehydu, tyto skupiny jsou však lokalizovány v poloze *meta*- a tedy by neměly stabilizovat pro reakci nevhodnou mezomerní podobu molekuly. Kromě mezomerního efektu se zde pravděpodobně uplatňuje posun elektronové hustoty pomocí záporného indukčního efektu obdobně, jako nitro- skupina snižuje pK_a u *m*-nitrofenolu oproti nesubstituovanému fenolu, ačkoliv nitroskupina v této poloze by čistě teoreticky neměla mít na kyselost fenolické skupiny vliv (pK_a *m*-nitrofenolu = 8,35; pK_a nesubstituovaného fenolu = 9,98, Obr. 58).^{86, 87}



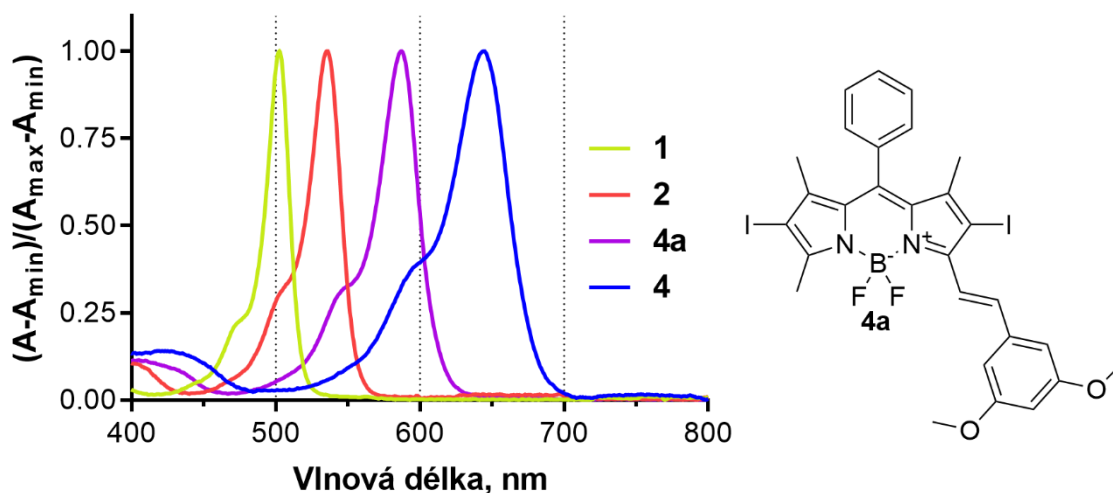
Obrázek 58: Vliv nitro- skupiny na aciditu fenolu.
 pK_a *m*-nitrofenolu = 8,35; pK_a nesubstituovaného
fenolu = 9,98.
Data z ^{86, 87}.

Dalším možným důvodem neúspěchu je konverze esteru na amid díky přítomnosti piperidinu jako bazického katalyzátoru pro Knoevenagelovu reakci. Pro úplné vyloučení elektron-odtahujícího efektu těchto skupin byl syntetický plán upraven tak, aby elektron-akceptorové skupiny byly spojené s π -systémem aromátu přes krátký alkan, eventuálně aby byly přednostně zaváděny elektron-donorové funkční skupiny. Na základě této zkušenosti jsme navrhli látky **5**, **6** a **7**, které nesou hydrofilní funkční skupiny vázané přes etherový můstek. Součástí seznamu připravených látek měly být i další dvě látky, pro

syntézu byly již připraveny prekurzory **Pre-6** a **Pre-7**. Z důvodu časové tísně, ke které výrazně přispěla epidemiologická situace v České republice však k syntézám nedošlo.

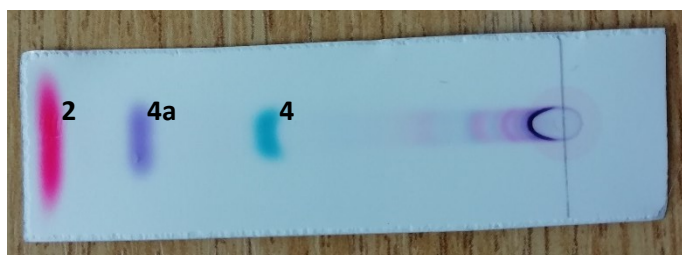
6.5 FOTOFYZIKÁLNÍ MĚŘENÍ

Základní vlastností fotosenzitizérů je jejich schopnost absorbovat světlo o vlnové délce, které je schopné penetrovat co nehlouběji do tkáně (tkáňové okno v blízkosti IR spektra). Na zde prezentovaném grafu (Obr. 59) je patrný efekt postupné substituce výchozího skeletu **1** přes jodovaný derivát **2** a přes monostyrylovaný meziprodukt **4a** (byl izolován pouze v malém množství při syntéze látky **4**) až po finální molekulu **4**. Patrný je rozdíl mezi posunem absorbance u disubstituce jódem a u styrylace již do prvního stupně (Obr. 49).



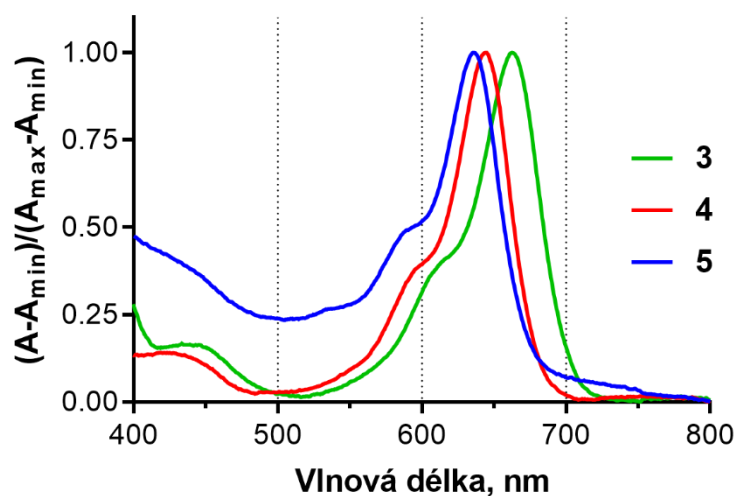
Obrázek 59: Vlevo normalizovaný graf vyjadřující bathochromní posun zástupců připravovaných látek, vpravo struktura látky **4a**.

Na níže uvedené fotografii lze nalézt chromatogram ilustrující změnu absorpčních vlastností v průběhu Knoevenagelovy kondenzace. Barvy křivek látek **2**, **4a** a **4** z Obr. 57 odpovídají reálným barvám sloučenin na Obr. 60.



Obrázek 60: TLC z průběhu Knoevenagelovy reakce.

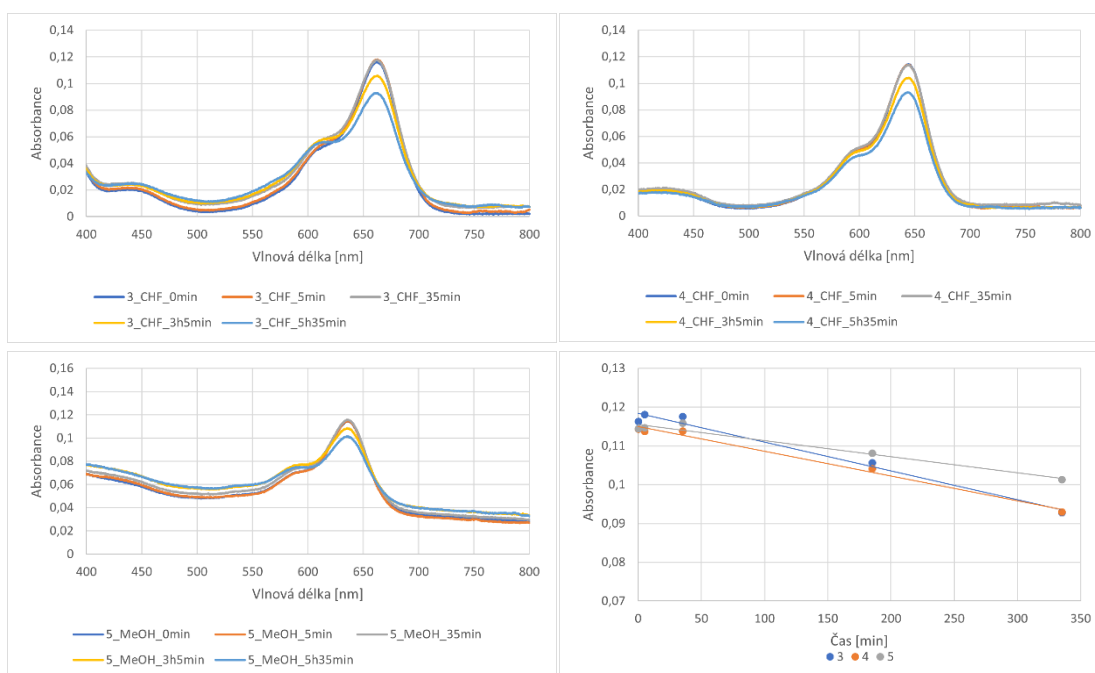
Následující graf (Obr. 61) porovnává absorpční spektra dvou sloučenin s alkoxy-substitucí v polohách 3- a 5- a jedné sloučeniny s 4-alkoxy- substitucí.



Obrázek 61: Normalizované porovnání absorpčních spekter finálních látek.

Z pohledu dalších návrhů látek je vhodné vědět, že *para*- substituce je výhodnější díky konjugaci volných elektronových páru na atomu kyslíku s π -systémem v centrální části skeletu. Zde popsaná rozdílnost substituce měla za následek posun maxima absorpance o 18 nm (rozdíl λ_{\max} látky **3** a **4**) ve prospěch 4-methoxy- derivátu **3**.

6.5.1 Testy stability

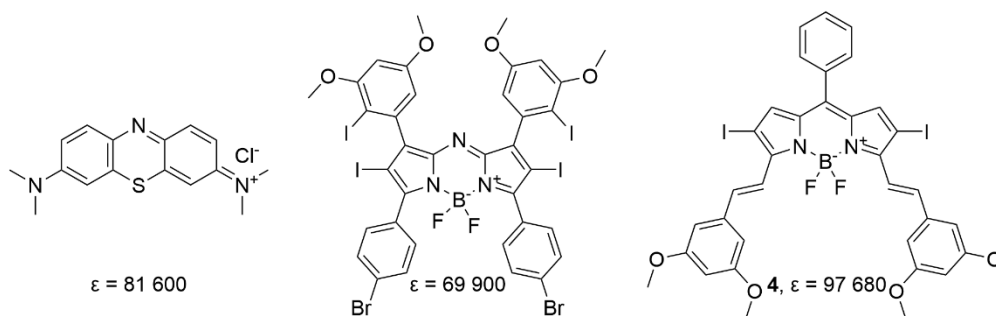


Obrázek 62: Grafické vyhodnocení stabilitního experimentu.

Účelem testů bylo získat orientační představu o odolnosti připravených látek při ozáření bílým světlem. Tato vlastnost je výhodná například pro zamezení nežádoucí fototoxicity po ozáření pacienta, případně lze vysoce fotostabilní látky využít jako fotokatalyzátory pro oxidační reakce. Jednotlivé experimenty se porovnávají jen obtížně kvůli rozdílným světelným zdrojům. Pro ilustraci uvádím alespoň studii García-Díaz, et al., kde absorbance klinicky využívaného temoporfinu klesla na polovinu dříve, než za třicet minut.⁸⁸ Na výše uvedených grafech (Obr. 62) jsou postupně znázorněny poklesy absorbance tří ozařovaných roztoků, na ose x je vlnová délka v nm, na ose y je absorbance. Poslední graf obsahuje přímky lineární regrese látek, na ose x posledního grafu je znázorněn čas v minutách. Z grafů je patrné, že degradace látky **5** probíhala o poznání pomaleji, než u dalších dvou látek. Důležitým poznatkem je, že v průběhu degradace fotosenzitizeru nedocházelo ke vzniku nových absorpčních pásů. Z toho lze usoudit, že dochází k výrazným změnám ve struktuře a přerušuje se π -konjugovaný systém, nedochází ke vzniku jen mírně odlišných látek.

6.5.2 Molární absorpční koeficient

Vzhledem k nutnosti velmi přesného určení koncentrace, maximální čistoty a nemožnosti využít barvivo adsorbované na silikagel byla ze tří produktů pro stanovení molárního absorpčního koeficientu vybrána látka **4**. Tato látka byla změřena v prostředí chloroformu a poskytla $\epsilon = 97\,680\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Tato hodnota je vysoká i na poměry chemie pigmentů. Pro porovnání ϵ methylenové modři = $81\,600\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.⁴³ Některé řešerše považují BODIPY s $\epsilon < 50\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ za úspěšné preparáty a hodnoty $\epsilon > 100\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ dosahují BODIPY jen výjimečně, obvykle jde o struktury s mnohem vyšší molární atomovou hmotností oproti distyryl-derivátům.⁵³ Vysoký molární absorpční koeficient je u PDT vhodný kvůli možnosti podání látky při nižší koncentraci. Na Obr. 63 je vlevo struktura

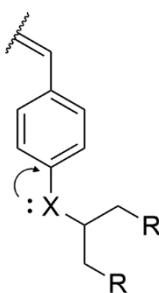


Obrázek 63: Molární abs. koeficient látky **4** v kontextu publikovaných látek, hodnoty ϵ vždy v jednotkách $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

methylenové modři, uprostřed aza-BODIPY s $\epsilon = 69\,900\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ publikované v ⁸⁹ a vpravo testovaná struktura 4.

6.6 NÁVRH STRUKTUR PRO DALŠÍ VÝZKUM

V průběhu syntéz prekurzorů jsme opakovaně naráželi na problém nízkých výtěžků reakcí, způsobených nutností substituovat aromát do dvou poloh. Zavedením složitějšího, ale jediného substituentu v poloze para- (Obr. 64, R značí libovolnou hydrofilní substituci) by zřejmě došlo ke zlepšení výtěžků, také ale k výraznému usnadnění separace a k mírnému bathochromnímu posunu (jak dokazuje tato studie v kapitole Fotofyzikální měření).



Obrázek 64: Návrh struktury pro další výzkum na základě získaných zkušeností.

7 ZÁVĚR

Podnětem pro mou práci byl rychle rostoucí obor barviv založených na BODIPY skeletu. Po evaluaci dostupné literatury byla vypracována syntetická cesta k vhodným látkám BODIPY s hydrofilně disubstituovanými styryly v polohách 3- a 5- základního skeletu. V rámci experimentální práce bylo poprvé syntetizováno a popsáno sedm látek. Tři z těchto látek umožnily porovnání základních strukturních modifikací a zároveň vliv těchto modifikací na fotofyzikální odezvu. Další tři látky odvozené od benzaldehydu mohou díky bohaté chemii aromatických aldehydů nalézt uplatnění při funkcionalizaci celé škály strukturních motivů. V práci sepsané poznatky byly využity při vytyčování syntetických cílů pro postdoktorandský výzkum Rahula Kaushika, Ph.D. v rámci výzkumné skupiny AzaPc group.

- ¹ Gwilt, P. R.; Tracewell, W. G.; Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Hydroxyurea, *Clin. Pharmacokinet.*, **1998**, *34* (5), 347-358.
- ² Moore, M. J.; Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide, *Clin. Pharmacokinet.*, **1991**, *20* (3), 194-208.
- ³ Gupta, A. K.; Anderson, T. F.; Psoralen photochemotherapy, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **1987**, *17* (5), 703-734.
- ⁴ Spikes, J. D.; The origin and meaning of the term "photodynamic" (as used in "photodynamic therapy", for example), *J. Photochem. Photobiol. B.*, **1991**, *9* (3-4), 369-371.
- ⁵ Allison, R. R.; et al.; Photosensitizers in clinical PDT, *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2004**, *1* (1), 27-42.
- ⁶ Schulz, K. H.; et al.; Clinical and experimental studies on photodynamic efficacy of phenothiazine derivatives with special reference to megaphen, *Arch. Klin. Exp. Dermatol.*, **1956**, *202* (3), 285-298.
- ⁷ Hunter, J. C.; et al.; Influence of diphosphopyridine nucleotide (DPN) on photodynamic effects of low concentrations of methylene blue in ascites tumor cells, *J. Natl. Cancer Inst.*, **1967**, *39* (4), 587-593.
- ⁸ Dougherty, T. J.; et al.; Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors, *Cancer. Res.*, **1978**, *38* (8), 2628-2635.
- ⁹ Reynolds, T.; Photodynamic therapy expands its horizons, *J. Natl. Cancer Inst.*, **1997**, *89* (2), 112-114.
- ¹⁰ Huang, Y.-Y.; et al.; Can nanotechnology potentiate photodynamic therapy?, *Nanotechnol. Rev.*, **2015**, *1* (2), 111-146.
- ¹¹ www.rp-photonics.com/lasers.html [staženo 13. 1. 2021].
- ¹² Brancalion, L., et al.; Laser and Non-laser Light Sources for Photodynamic Therapy, *Lasers Med. Sci.*, **2002**, *17* (3), 173-186.
- ¹³ Liu, X.; et al.; Molecular Design of UV-vis Absorption and Emission Properties in Organic Fluorophores: towards Larger Bathochromic Shifts, Enhanced Molar Extinction Coefficients and Greater Stokes Shifts, *J. Phys. Chem.*, **2013**, *117* (32), 16584-16595.
- ¹⁴ Lyons, S. K.; et al.; Imaging mouse cancer models in vivo using reporter transgenes, *Cold Spring Harb. Protoc.*, **2013**, *8*, 685-699.

- ¹⁵ Zhou, Z.; et al.; Reactive Oxygen Species Generating Systems Meeting Challenges of Photodynamic Cancer Therapy, *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, *45* (23), 6597-6626.
- ¹⁶ Berra, C. M.; et al.; Plasmid DNA damage induced by singlet molecular oxygen released from the naphthalene endoperoxide DHPNO₂ and photoactivated methylene blue, *Quim. Nova*, **2010**, *33* (2), 279-283.
- ¹⁷ Agnez-Lima, L. F.; et al.; DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms, *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.*, **2012**, *751* (1), 15-28.
- ¹⁸ Jakubczyk, K.; et al.; Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage, *Pol. Merkur. Lekarski*, **2020**, *48* (284), 124-127.
- ¹⁹ Kuper, J.; Kisker, C.; DNA Helicases in NER, BER, and MMR, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2013**, *767*, 203-224.
- ²⁰ Stratton, S. P.; Liebler, D. C.; Determination of singlet oxygen-specific versus radical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of lipid bilayers: effect of beta-carotene and alpha-tocopherol, *Biochemistry*, **1997**, *36* (42), 12911-12920.
- ²¹ Gaschler, M. M.; Stockwell, B. R.; Lipid peroxidation in cell death, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2017**, *482* (3), 419-425.
- ²² https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/020451s020lbl.pdf [staženo 14. 1. 2021].
- ²³ Baskaran, R.; et al.; Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications, *Biomater. Res.*, **2018**, *22* (25).
- ²⁴ Battle, A. M.; Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy--a model for carcinogenesis, *J. Photochem. Photobiol. B.*, **1993**, *20* (1), 5-22.
- ²⁵ <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0015770&tab=texts> [staženo 14. 1. 2021].
- ²⁶ https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/gliolan-epar-product-information_cs.pdf [staženo 14. 1. 2021].
- ²⁷ https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/foscan-epar-product-information_cs.pdf [staženo 14. 1. 2021].
- ²⁸ https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tookad-epar-product-information_cs.pdf [staženo 14. 1. 2021].
- ²⁹ https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/visudyne-epar-product-information_cs.pdf [staženo 14. 1. 2021].

- ³⁰ Ulrich, G.; et al.; The Chemistry of Fluorescent Bodipy Dyes: Versatility Unsurpassed, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47* (7), 1184-1201.
- ³¹ Treibs, A.; Kreuzer, F.-H.; Difluorboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1968**, *718* (1), 208-223.
- ³² Loudet, A.; Burgess, K.; BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties, *Chem. Rev.*, **2007**, *107* (11), 4891-4932.
- ³³ Yogo, T.; et al.; Highly Efficient and Photostable Photosensitizer Based on BODIPY Chromophore, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127* (35), 12162-12163.
- ³⁴ Curtis, A. M.; et al.; Monoalkoxy BODIPYs—A Fluorophore Class for Bioimaging, *Bioconjugate Chem.*, **2014**, *25* (6), 1043-1051.
- ³⁵ Chen, Y.; et al.; Geometry Relaxation-Induced Large Stokes Shift in Red-Emitting Borondipyrromethenes (BODIPY) and Applications in Fluorescent Thiol Probes, *J. Org. Chem.*, **2012**, *77* (5), 2192-2206.
- ³⁶ Bura, T.; et al.; Highly Substituted Bodipy Dyes with Spectroscopic Features Sensitive to the Environment, *J. Org. Chem.*, **2011**, *76* (4), 1109-1117.
- ³⁷ Lim, S. H.; et al.; In Vitro and In Vivo Photocytotoxicity of Boron Dipyrromethene Derivatives for Photodynamic Therapy, *J. Med. Chem.*, **2010**, *53* (7), 2865-2874.
- ³⁸ Boens, N.; et al.; Synthesis of BODIPY dyes through postfunctionalization of the boron dipyrromethene core, *Coord. Chem. Rev.*, **2019**, *399*, 213024.
- ³⁹ Zhang, X.-F., Yang, X.; Singlet Oxygen Generation and Triplet Excited-State Spectra of Brominated BODIPY, *J. Phys. Chem. B*, **2013**, *117* (18), 5533-5539.
- ⁴⁰ Wang, J.; et al.; DNA Photocleavage by a Cationic BODIPY Dye through Both Singlet Oxygen and Hydroxyl Radical: New Insight into the Photodynamic Mechanism of BODIPYs, *ChemPhysChem*, **2012**, *13* (11), 2739-2747.
- ⁴¹ Umezawa, K.; et al.; Bright, Color-Tunable Fluorescent Dyes in the Visible–Near-Infrared Region, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130* (5), 1550-1551.
- ⁴² Umezawa, K.; et al.; Bright, color-tunable fluorescent dyes in the Vis/NIR region: establishment of new "tailor-made" multicolor fluorophores based on borondipyrromethene, *Chemistry*, **2009**, *15* (5), 1096-1106.
- ⁴³ Tuite, E. M.; Kelly, J. M.; Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates, *J. Photochem. Photobiol., B*, **1993**, *2* (2-3), 103-124.

- ⁴⁴ Higashino, Y.; et al.; π -Expanded dibenzo-BODIPY with near-infrared light absorption: Investigation of photosensitizing properties of NiO-based p-type dye-sensitized solar cells, *Dyes Pigm.*, **2019**, *170*, 107613.
- ⁴⁵ Zhang, X.-F.; et al.; Methylated Unsymmetric BODIPY Compounds: Synthesis, High Fluorescence Quantum Yield and Long Fluorescence Time, *J. Fluoresc.*, **2019**, *29*, 407-416.
- ⁴⁶ Wang, D.; et al.; A Photochemical Dehydrogenative Strategy for Direct and Regioselective Dimerization of BODIPY Dyes, *Org. Lett.*, **2020**, *22* (19), 7694-7698.
- ⁴⁷ Tian, D.; et al.; Domino-like multi-emissions across red and near infrared from solid-state 2-/2,6-aryl substituted BODIPY dyes, *Nat. Commun.*, **2018**, *9*, 2688.
- ⁴⁸ Poirel, A.; et al.; Synthesis of Water-Soluble Red-Emitting Thienyl-BODIPYs and Bovine Serum Albumin Labeling, *Chem. - Eur. J.*, **2014**, *20* (5), 1252-1257.
- ⁴⁹ Diaz-Rodriguez, R. M.; et al.; Synthesis, properties and reactivity of BCl₂ aza-BODIPY complexes and salts of the aza-dipyrinato scaffold, *Org. Biomol. Chem.*, **2020**, *18*, 2139-2147.
- ⁵⁰ Penfold, T. J.; et al.; Spin-Vibronic Mechanism for Intersystem Crossing, *Chem. Rev.*, **2018**, *118* (15), 6975-7025.
- ⁵¹ Komatsu, T.; et al.; Rational design of boron dipyrromethene (BODIPY)-based photobleaching-resistant fluorophores applicable to a protein dynamics study, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)*, **2011**, *47*, 10055-10057.
- ⁵² Kue, C. S.; et al.; Recent strategies to improve boron dipyrromethene (BODIPY) for photodynamic cancer therapy: an updated review, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2018**, *17*, 1691-1708.
- ⁵³ Wu, W.; et al.; Organic Triplet Sensitizer Library Derived from a Single Chromophore (BODIPY) with Long-Lived Triplet Excited State for Triplet-Triplet Annihilation Based Upconversion, *J. Org. Chem.*, **2011**, *76* (17), 7056-7064.
- ⁵⁴ Kamkaew, A.; et al.; BODIPY dyes in photodynamic therapy, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 77-88.
- ⁵⁵ Cakmak, Y.; et al.; Designing Excited States: Theory-Guided Access to Efficient Photosensitizers for Photodynamic Action, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2011**, *50* (50), 11937-11941.

- ⁵⁶ Wang, Z.; et al.; Bodipy–Anthracene Dyads as Triplet Photosensitizers: Effect of Chromophore Orientation on Triplet-State Formation Efficiency and Application in Triplet–Triplet Annihilation Upconversion, *Org. Lett.*, **2017**, *19* (17), 4492-4495.
- ⁵⁷ Filatov, M. A.; et al.; BODIPY-Pyrene and Perylene Dyads as Heavy-Atom-Free Singlet Oxygen Sensitizers, *ChemPhotoChem*, **2018**, *2* (7), 606-615.
- ⁵⁸ https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C2102?gclid=CjwKCAjwu5CDBhB9EiwA0w6sLdDACy0u990Vid_xU1ZT6CaDnnG-7qc_6ZYqWXgsJJS6iO-FCYZZmxoCkWsQAvD_BwE&ef_id=CjwKCAjwu5CDBhB9EiwA0w6sLdDACy0u990Vid_xU1ZT6CaDnnG-7qc_6ZYqWXgsJJS6iO-FCYZZmxoCkWsQAvD_BwE:G:. [online 31. 3. 2021].
- ⁵⁹ <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D6184?SID=srch-hj-D6184#/D6184?SID=srch-hj-D6184> [online: 31. 3 2021.].
- ⁶⁰ Kollmannsberger, M.; et al.; Electrogenerated Chemiluminescence and Proton-Dependent Switching of Fluorescence: Functionalized Difluoroboradiaza-s-indacenes, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1997**, *36* (12), 1227-1355.
- ⁶¹ Gareis, T.; et al.; Phenol/phenolate-dependent on/off switching of the luminescence of 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenes, *Chem. Commun.*, **1997**, *18*, 1717-1718.
- ⁶² Baruah, M.; et al.; A Highly Potassium-Selective Ratiometric Fluorescent Indicator Based on BODIPY Azacrown Ether Excitable with Visible Light, *Org. Lett.*, **2005**, *7* (20), 4377-4380.
- ⁶³ Yamada, K.; et al.; Highly Sodium-Selective Fluoroionophore Based on Conformational Restriction of Oligoethyleneglycol-Bridged Biaryl Boron–Dipyrromethene, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127* (19), 6956-6597.
- ⁶⁴ Zeng, L.; et al.; A Selective Turn-On Fluorescent Sensor for Imaging Copper in Living Cells, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128* (1), 10-11.
- ⁶⁵ Lu, H.; et al.; Experimentation and Theoretic Calculation of a BODIPY Sensor Based on Photoinduced Electron Transfer for Ions Detection, *J. Phys. Chem. A*, **2009**, *113* (51), 14081-14086.
- ⁶⁶ Yue, J.; et al.; BODIPY-based Fluorescent Probe for Fast Detection of Hydrogen Sulfide and Lysosome-targeting Applications in Living Cells, *Chem. - Asian J.*, **2021**, *16* (7), 704-855.

- ⁶⁷ Huang, K.-J.; et al.; Real-time imaging of nitric oxide production in living cells with 1,3,5,7-tetramethyl-2,6-dicarboxy-8-(3',4'-diaminophenyl)-difluoroboradiaza-s-indacene by invert fluorescence microscope, *Nitric Oxide*, **2007**, *16* (1), 36-43.
- ⁶⁸ Bertrand, B.; et al.; Metal-based BODIPY derivatives as multimodal tools for life sciences, *Coord. Chem. Rev.*, **2018**, *358*, 108-124.
- ⁶⁹ Zou, J.; et al.; BODIPY Derivatives for Photodynamic Therapy: Influence of Configuration versus Heavy Atom Effect, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, *9* (38), 32475-32481.
- ⁷⁰ Won, M.; et al.; An Ethacrynic Acid-Brominated BODIPY Photosensitizer (EA-BPS) Construct Enhances the Lethality of Reactive Oxygen Species in Hypoxic Tumor-Targeted Photodynamic Therapy, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2021**, *60* (6), 3196-3204.
- ⁷¹ Aksakal, N.; et al.; Novel ruthenium(II) and iridium(III) BODIPY dyes: insights into their application in photodynamic therapy in vitro, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2019**, *18*, 2012-2022.
- ⁷² Geier, G. R. III.; et al.; Investigation of porphyrin-forming reactions. Part 4.1 Examination of the reaction course in syntheses of porphyrins via dipyrromethanecarbinols, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2001**, 712-718.
- ⁷³ Fu, P. P.; Harvey, R. G.; Dehydrogenation of polycyclic hydroaromatic compounds, *Chem. Rev.*, **1978**, *78* (4), 317-361.
- ⁷⁴ Vázquez-Romero, A.; et al.; Multicomponent Reactions for *de Novo* Synthesis of BODIPY Probes: *In Vivo* Imaging of Phagocytic Macrophages, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (43), 16018-16021.
- ⁷⁵ Awuah, S. G.; You, Y.; Boron dipyrromethene (BODIPY)-based photosensitizers for photodynamic therapy, *RSC Adv.*, **2012**, *2*, 11169-11183.
- ⁷⁶ Coskun, A., et al.; Effective PET and ICT Switching of Boradiazaindacene Emission: A Unimolecular, Emission-Mode, Molecular Half-Subtractor with Reconfigurable Logic Gates, *Org. Lett.*, **2005**, *7* (23), 5187-5189.
- ⁷⁷ Atilgan, S.; et al.; A Sensitive and Selective Ratiometric Near IR Fluorescent Probe for Zinc Ions Based on the Distyryl-Bodipy Fluorophore, *Org. Lett.*, **2008**, *10* (18), 4065-4067.

- ⁷⁸ Ekmekci, Z.; et al.; A Monostyryl-boradiazaindacene (BODIPY) Derivative as Colorimetric and Fluorescent Probe for Cyanide Ions, *Org. Lett.*, **2008**, *10* (3), 461-464.
- ⁷⁹ Dalessandro, E. V.; et al.; Mechanism of the Piperidine-Catalyzed Knoevenagel Condensation Reaction in Methanol: The Role of Iminium and Enolate Ions, *J. Phys. Chem. B*, **2017**, *121* (20), 5300-5307.
- ⁸⁰ Appel, R.; et al.; Electrophilicities of Benzaldehyde-Derived Iminium Ions: Quantification of the Electrophilic Activation of Aldehydes by Iminium Formation, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135* (17), 6579-6587.
- ⁸¹ Limwongyut, J.; et al.; Molecular design of antimicrobial conjugated oligoelectrolytes with enhanced selectivity toward bacterial cells, *Chem. Sci.*, **2020**, *11*, 8138-8144.
- ⁸² Shao, S.; et al.; "Two-Point" Self-Assembly and Photoinduced Electron Transfer in meso-Donor-Carrying Bis(styryl crown ether)-BODIPY-Bis(alkylammonium)fullerene Donor-Acceptor Conjugates, *Chem. - Asian J.*, **2017**, *12* (17), 2258-2270.
- ⁸³ Duan, C.; et al.; Bright solid-state red-emissive BODIPYs: facile synthesis and their high-contrast mechanochromic properties, *J. Mater. Chem. C*, **2019**, *7*, 3471-3478.
- ⁸⁴ <https://www.masterorganicchemistry.com/2014/10/24/the-williamson-ether-synthesis/> [online: 17. 1. 2021].
- ⁸⁵ Bartoli, G.; et al.; Magnesium perchlorate as efficient Lewis acid for the Knoevenagel condensation between β -diketones and aldehydes, *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49* (16), 2555-2557.
- ⁸⁶ Taylor, R. R. R.; Batey, R. A.; A Hetero Diels–Alder Approach to the Synthesis of Chromans (3,4-Dihydrobenzopyrans) Using Oxonium Ion Chemistry: The Oxa-Povarov Reaction, *J. Org. Chem.*, **2013**, *78* (4), 1404-1420.
- ⁸⁷ Gross, K. C.; Seybold, P. G.; Substituent effects on the physical properties and pKa of phenol, *Int. J. Quantum Chem.*, **2001**, *85* (4-5), 569-579.
- ⁸⁸ García-Díaz, M.; et al.; Temocene: the porphycene analogue of temoporfin (Foscan[®]), *MedChemComm*, **2011**, *2*, 616-619.
- ⁸⁹ Adarsh, N.; et al.; Tuning Photosensitized Singlet Oxygen Generation Efficiency of Novel Aza-BODIPY Dyes, *Org. Lett.*, **2010**, *12* (24), 5720-5723.
- ⁹⁰ <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Temoporfin> [online 10. 5. 2021].

- ⁹¹ <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Padeliporfin> [online 10. 5. 2021].
- ⁹² <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Verteporfin> [online 10. 5. 2021].