

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



RIGORÓZNÍ PRÁCE

Syntéza zinečnatých komplexů aryloxy tetrachinoxalinoporfyrasinů



Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Rigorózní práce vznikla za podpory grantu SVV-2010-261-001.

V Praze 30.7.2010

.....

Děkuji PharmDr. Petru Zimčikovi Ph.D. za odborné vedení mé rigorózní práce,
poskytnuté informační zdroje, trpělivost a cenné rady.

Dále bych rád poděkoval Mgr. Veronice Novákové za pomoc během mého pobytu
v laboratoři.

1. Obsah

2.	Seznam zkratk	6
3.	Cíl práce	7
4.	Obecná část	8
4.1.	Historie fotodynamické terapie	9
4.2.	Principy fotodynamické terapie	11
4.3.	Fotodynamický efekt.....	12
4.3.1.	Fotoproces typu I.....	13
4.3.2.	Fotoproces typu II	14
4.3.3.	Změny v krevním zásobení	14
4.3.4.	Imunitní odpověď.....	15
4.4.	Kyslík	15
4.5.	Světlo a průnik světla tkáněmi	16
4.6.	Fotosenzitizér.....	18
4.6.1.	Struktura fotosenzitizéru	19
4.6.2.	Rozdělení fotosenzitizérů	22
5.	Metodická část	25
5.1.	Ftalocyaniny, naftalocyaniny a jejich azaanalogy.....	25
5.2.	Syntéza 4,5-diaminobenzen-1,2-dikarbonitrilu.....	27
5.3.	Syntéza substituovaného chinoxalin-6,7-dikarbonitrilu.....	28
5.4.	Cyklotetramerizace prekurzoru tetrachinoxalinoporfyrinu.....	30
5.5.	Cyklotetramerizace aryloxyprekurzorů AzaPc.....	31
6.	Experimentální část	32
6.1.	Schéma prováděných reakcí	33
6.2.	Příprava 2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6,7-dikarbonitrilu (1).....	34
6.3.	Příprava 2,3-dichlorchinoxalin-6,7-dikarbonitrilu (2)	34
6.4.	Příprava 2,3-di(2,6-diisopropylfenyl)chinoxalin-6,7-dikarbonitrilu (3)	35
6.4.1.	V tetrahydrofuranu s uhličitanem draselným	35
6.4.2.	V tetrahydrofuranu s hydroxidemsodným.....	36

6.5.Příprava 2,3,11,12,20,21,29,30-oktakis(2,6-diisopropylfenoxy)-tetra[6,7] chinoxalinoporfyrizináto zinečnatého komplexu (5).....	37
6.5.1.Příprava chloridu bis(chinolináto) zinečnatého (ZnQ ₂ Cl ₂) (4)	37
6.5.2.Optimalizace reakčních podmínek	38
6.5.3.Příprava 2,3,11,12,20,21,29,30-oktakis(2,6-diisopropylfenoxy)-tetra[6,7] chinoxalinoporfyrizináto zinečnatého komplexu (5).....	38
7.Diskuse.....	40
8.Závěr	42

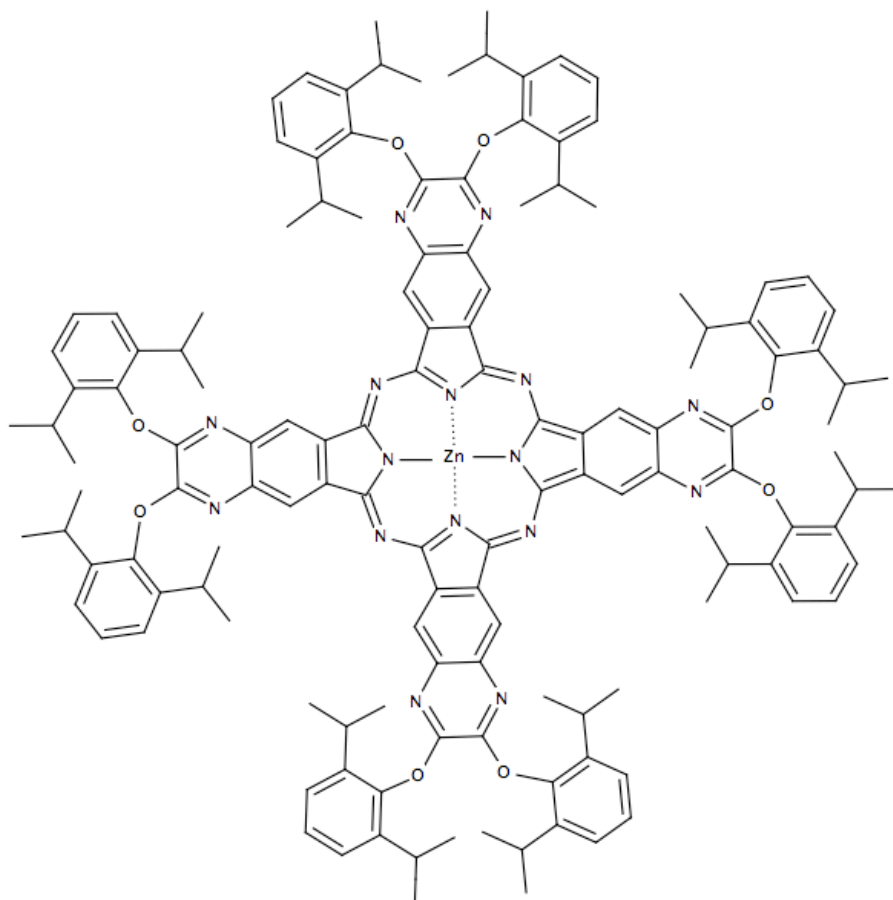
2. Seznam zkratek

AzaPc	azaftalocyanin (azaphthalocyanine)
AzaNc	azanaftalocyanin (azanaphthalocyanine)
DMF	dimethylformamid
Hp	hematoporfyrin
HpD	deriváty hematoporfyrinu (hematoporphyrin derivatives)
ISC	mezisystémová přeměna (intersystem crossing)
Nc	naftalocyanin (naphthalocyanine)
Pc	ftalocyanin (phthalocyanine)
PDT	fotodynamická terapie (photodynamic therapy)
PS	fotosenzitizér (photosensitizer)
PUVA	psoralen + UVA (metoda fotochemické terapie)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie (thin layer chromatography)
TQP	tetrachinoxalinoporfyrin (tetraquinoxalinoporphyrin)

3. Cíl práce

Svou rigorózní prací jsem navázal na svou diplomovou práci, ve které jsem připravil oktasubstituovaný derivát 2,6-diisopropylfenoxy azaftalocyaninu (AzaPc)¹. V předkládané práci jsem se zaměřil na přípravu stejně substituovaného derivátu, avšak tentokrát základní skelet tvořil tetrachinoxalinoporfyrazin (TQP). Cílem mé rigorózní práce bylo tedy připravit 2,3,11,12,20,21,29,30-oktakis(2,6-diisopropylfenoxy)-tetra [6,7]chinoxalinoporfyrazinát zinečnatý komplex (obr. 1).

TQP mají oproti AzaPc posunut Q-pás (*viz. níže*) k vyšším vlnovým délkám. Tato vlastnost je z hlediska fotodynamické terapie (PDT) výhodná, neboť můžeme pro aktivaci fotosenzitizéru (PS) použít světlo větších vlnových délek, které je schopno proniknout hlouběji do tkání.



Obr. 1: Cílová struktura

4. Obecná část

Sluneční paprsky dopadající na zemský povrch jsou nezbytné pro existenci života. Mezi základní procesy, které umožnily vznik života na Zemi, patří bezpochyby fotosyntéza. Jedná se o biochemický proces, při kterém se mění energie slunečního záření na energii chemických vazeb. Obdobně jako příroda využila energie slunečních paprsků ke vzniku života, tak se i člověk naučil používat tuto energii ke svému prospěchu. Jedním z mnoha směrů bylo využití v medicíně. Léčebné procedury, jejichž nezbytnou součástí je světlo, můžeme rozdělit na *fototerapii* a *fotochemoterapii*.

Ve **fototerapii** je světlo hlavním léčebným činitelem. Tato metoda spočívá ve vystavení pacienta viditelnému, UVA nebo UVB záření. Blahodárné účinky světla pozorovali už ve starověkém Egyptě, Indii nebo Číně, když za jeho pomoci léčili vitiligo, lupénku a dokonce i psychózy². Ve starověkém Řecku se o rozvoj fototerapie zasloužil Herodotus. Ten ji označoval jako *helioterapii* a používal ji k léčbě mnoha onemocnění³. K průkopníkům fototerapie v moderní historii patří dánský fyzik Niels Finsen. Tomu se na začátku 20.století podařilo pomocí červeného světla vyléčit neštovice a kožní formu tuberkulózy, za což obdržel v roce 1903 Nobelovu cenu⁴. V dnešní době se fototerapie využívá především v dermatologii a psychiatrii při léčbě depresí, poruch spánku a cirkadiánních rytmů.

Naproti tomu **fotochemoterapie** využívá kromě světla ještě chemickou látku, tzv. fotosenzitizér (PS). Tato látka je aktivována neionizujícím zářením, tedy stejným jako se využívá ve fototerapii a tím dochází k požadovanému účinku⁵. I tato léčba byla využívána ve starověkém Egyptě 4000 let př. n. l. Egypťané používali perorálně podávané rostliny s obsahem psoralenu k léčbě kožních nemocí⁶. Obdobu této metody, známé jako PUVA, se používá dodnes při léčbě lupénky a v imunoterapii.

Z fotochemoterapie lze vyčlenit další léčebnou metodu, pro kterou je kromě světla a PS nezbytný ještě kyslík, tzv. **fotodynamickou terapii** (PDT). Při PDT je energie elektromagnetického záření (světla) absorbována PS a ten ji předá kyslíku, z něhož se vytvoří reaktivní formy (ROS) a singletový kyslík. Tyto formy kyslíku napadají okolní biomolekuly, oxidují je a dochází k porušení jejich funkce, což vede ke smrti takto zasažené buňky.

4.1. Historie fotodynamické terapie

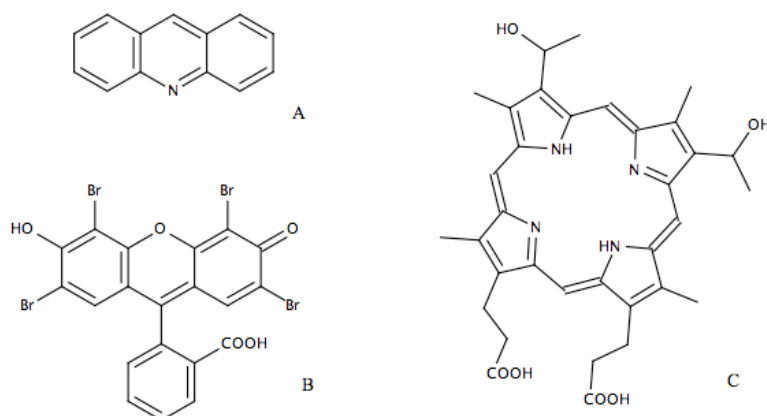
Základní poznatek o PDT je neodmyslitelně spjat s objevem, který učinil Oscar Raab před více než sto lety. Tento student profesora Hermanna von Tappeinera publikoval na přelomu 20.století zprávu o smrtícím efektu akridinové červeně (obr. 2) a světla na prvky rodu *Paramecium*⁷. O tento pozoruhodný objev se zasloužila nejen vnímavost O. Raaba, ale také samotná příroda, neboť potřebné světlo bylo v tomto případě reprezentováno bleskem během bouřky. V průběhu dalšího pozorování Raab zjistil, že účinek akridinu ozářeného až po podání, je mnohonásobně větší než samotného akridinu, světla nebo akridinu ozářeného před podáním⁸. Souběžně s O. Raabem publikoval francouzský neurolog Prime zprávu o pacientech s epilepsií, u kterých byla pozorována silná fotosenzibilizace po podání eosinu (Obr. 2)⁹. V roce 1903 von Tappeiner s francouzským dermatologem Jesionkem popsali léčbu kožních nádorů pomocí lokálně podávaného eosinu s následným ozářením bílým světlem¹⁰. O necelý rok později von Tappeiner s Jodlabuerem dokázali, že k fotodynamické reakci je zapotřebí kyslík. Tři roky na to von Tappeiner poprvé použil výraz “fotodynamický efekt”¹¹.

Spojením poznatků, které byly uveřejněny začátkem 20.století a již známými vlastnostmi hematoporphyrinu (Hp) (Obr. 2) vznikly další studie, které byly u zrodu PDT. První známý záznam o použití Hp jako potenciální látky pro PDT se datuje do roku 1911, kdy vídeňský vědec Hausmann popsal kožní reakci u myši, kterým podal Hp a následně je ozářil světlem¹². Na základě jeho poznatků byla v následujících letech objasněna podstata onemocnění zvaného *porfyrie*. Pacienti s tímto onemocněním mají vrozenou poruchu tvorby červeného krevního barviva, jehož základní složkou je hem. Dochází pak většinou ke kumulaci fotosenzitizujících porfyrinů, jež jsou biosyntetickými prekurzory hemu, čímž se vysvětluje fotosenzibilizace pacientů. Tyto poznatky shrnul ve svých pracích Fischer¹³ a byl za ně roku 1943 oceněn Nobelovou cenou. Fischer upozornil také na to, že by se Hp dal použít v klinické praxi pro PDT, avšak nikdy se o to sám nepokusil. Tento riskantní krok učinil v roce 1913 jeho kolega Meyer-Betz. Sám sobě si injekčně podal 200 mg Hp. Výsledkem byla dlouhotrvající bolest a otok místa exponovaných světlu¹⁴.

Během dalších studií, které učinil francouzský fyzik Policard, bylo zjištěno, že Hp se kumuluje v nádorové tkáni, která po ozáření UV světlem červeně fluoreskuje¹⁵. Policard inspiroval mnoho dalších vědců a vznikla tak nová diagnostická metoda k detekci nádorové tkáně. V 50. letech téhož století se podařilo Schwartzovi s Lipsonem připravit látky s daleko větší účinností než měl hematoporfyrin. Nazvali je deriváty hematoporfyrinu (HpD), neboť se jednalo o látky s podobou chemickou strukturou vzniklé při čištění Hp. Tyto látky byly nejprve použity k diagnostickým účelům¹⁶, následovala léčba nádorů u myši a konečně pozitivní léčba pacienta s nádorem močového měchýře, kterou zveřejnil Kelly¹⁷.

Za otce moderní PDT můžeme právem označit Thomase Doughertyho. Nejenže zdokonalil postupy při syntéze a čištění HpD, které mohly být následně použity pro průmyslovou výrobu, ale také v roce 1977 uspořádal mezinárodní symposium, které bylo zaměřené pouze na PDT. K jeho nejdůležitějším pracím patří studie¹⁸ zaměřena na 25 pacientů trpících nejrůznějšími formami rakoviny s celkem 113 primárními nebo sekundárními ložisky. Z těchto 113 ložisek se mu jich podařilo 98 kompletně vyléčit, 13 vyléčit částečně a pouze 2 nevykazovala známky zlepšení.

Po Doughertyho úspěchu se PDT začalo věnovat mnoho dalších vědců, kteří provedli a dodnes provádí klinické studie zaměřené na nejrůznější tkáně zasažené nádorovým bujením. Jiná skupina vědců se zaměřila na použití PDT při léčbě nenádorových onemocnění jako např. senilní makulární degenerace. Další skupina se snaží připravit nové látky, které budou mít z hlediska PDT lepší vlastnosti než dlouho používaný Photofrin® (HpD).



Obr. 2: A: Akridin B: Eosin C: Hematoporfyrin

Tabulka 1.: Přelomové momenty pro rozvoj fotodynamické terapie

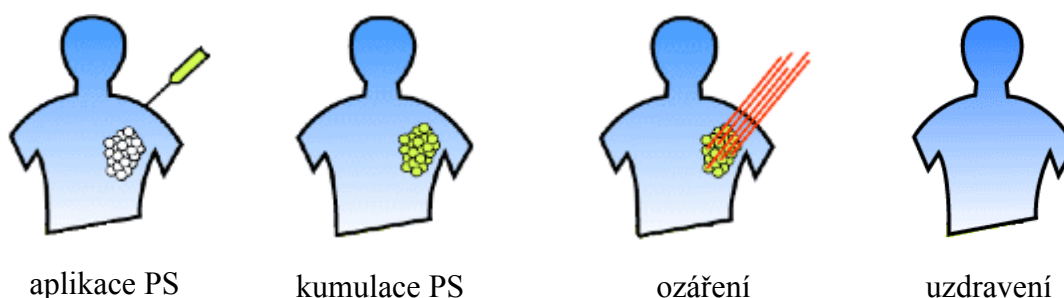
Rok	Osoba	Událost
1900	O. Raab	Cytotoxický efekt (smrt prvoků rodu <i>Paramecium</i>) kombinace akridinu a světla
1903	H. von Tappeiner A. Jesionek	Pomocí eosinu a bílého světla se podařilo vyléčit kožní nádor. Poprvé použit termín “fotodynamický efekt”
1903	F. Niels	Nobelova cena za léčbu kožní tuberkulózy světlem
1911	Hausmann	Pokus s Hp na myších
1913	F. Meyer-Betz	První použití hematoporphyrinu na člověku
1955	S. Schwartz	Syntéza HpD
1960	R. Lipson E. J. Baldes	Fotodetekce nádorů pomocí HpD a jeho akumulace v nádorech
1975	T. J. Dougherty	Léčba tumorů krys pomocí HpD
1975	Kely	Léčba lidského nádoru transplantovaného myším za použití HpD
1978	T. J. Dougherty	Rozsáhlé klinické zkoušky použití HpD v PDT
1993	QLT Inc.	Registrován porfimer sodný pod komerčním názvem Photofrin® a zaveden do klinické praxe k léčbě rakoviny

4.2. Principy fotodynamické terapie

PDT je nejméně invazivní metodou léčby nádorů a jiných benigních procesů. Ve srovnání s ostatními metodami (chirurgie, chemoterapie) nedochází k výraznému poškození okolní tkáně. Mezi další výhody patří časová nezávislost na ostatních léčebných metodách. Může být aplikována dokonce i během chirurgického zákroku.

Jak je demonstrováno na obr. 3 průběh PDT může být rozdělen do 4 kroků. Nejprve injekčně aplikujeme PS do těla pacienta. Poté dochází po určitou dobu ke kumulaci PS v neoplastické tkáni. Kumulace PS může trvat v řádu minut nebo také dní.

V následující fázi je pacient ozářen světlem o určité vlnové délce, čímž dochází k aktivaci PS, vzniku ROS a následné destrukci nádorové tkáně.

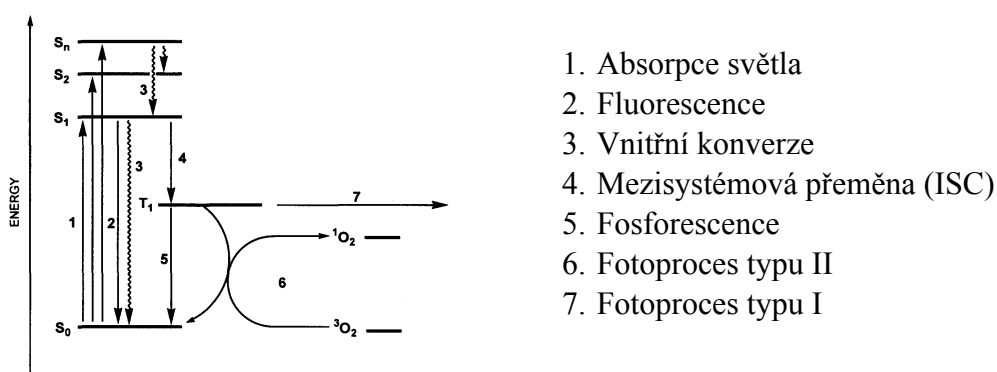


Obr. 3: Průběh fotodynamické terapie

PDT funguje na principu předávání energie mezi jednotlivými složkami. *Elektromagnetické záření* určité vlnové délky (energie) je pohlceno *fotosenzitizérem* (látkou schopnou absorbovat světlo), čímž se dostává do excitovaného stavu. Následně dochází k předání energie *molekulárnímu kyslíku*, který se přemění na ROS a singletový kyslík¹⁹. Tyto vysoce reaktivní molekuly jsou schopné oxidovat řadu biomolekul, čímž dochází k usmrcení buněk a destrukci nádorové tkáně. Kromě přímého efektu PDT způsobuje změny v krevním zásobení a aktivaci imunitního systému. Tyto tři mechanismy umožňují získat kontrolu nad růstem nádoru a podílí se i na jeho konečném zničení.

4.3. Fotodynamický efekt

Princip fotodynamického efektu nejlépe vystihuje modifikovaný Jablonského diagram (obr. 4).



Obr. 4: Modifikovaný Jablonského diagram²⁰

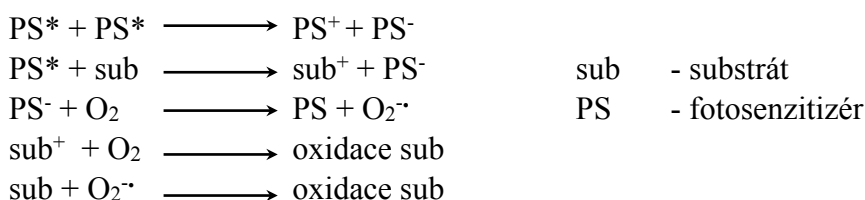
PS absorbováním světelného kvanta přechází ze singletového stavu (S_0) do excitovaného stavu (S_1-S_n). Tento stav trvá velice krátkou dobu, proto se předpokládá, že téměř neovlivňuje fotodynamickou aktivitu PS. Z excitovaného stavu se PS může uvolnit třemi způsoby: *fluorescencí, vnitřní konverzí a mezisystémovou přeměnou* ²¹.

U **vnitřní konverze** dochází ke srážce molekul PS s molekulami rozpouštědla za současného uvolnění energie ve formě tepla. Teplo uvolněné během tohoto přechodu může mít také účinek na buňku.²²

Pro PDT je nejdůležitější třetí typ přechodu pomocí tzv. **mezisystémové přeměny** (ISC, intersystem crossing). PS se dostává do tripletového stavu (T_1). Přechod do tripletového stavu vyžaduje inverzi spinu jednoho z elektronů. Jedná se tedy o spinem zakázaný proces. Dobré PS však přecházejí do tripletového stavu poměrně snadno. V tripletovém stavu se PS nachází poměrně dlouhou dobu a to jim umožňuje interakci s okolními molekulami. Ze stavu T_1 se může PS uvolnit nejméně dvěma cestami. Jednou z nich je radiační fosforescence a druhou je neradiační výměna spinu s jinou molekulou. Při anoxii je předán molekule biologického substrátu elektron (*fotoproces typu I*) a v opačném případě převažuje přenos energie na molekulární kyslík (*fotoproces typu II*) ²⁵. Oba fotoprocesy jsou základem vlastní PDT.

4.3.1. Fotoproces typu I

Při fotoprocesu typu I dochází k odštěpení vodíku nebo k přesunu elektronu mezi excitovaným fotosenzitizérem (PS*) a substrátem, rozpouštědlem nebo jiným PS. Vznikají vysoce reaktivní radikály a radikálové ionty, které mohou reagovat s molekulárním kyslíkem a vytvářet ROS (např. superoxid, $O_2^{\cdot-}$) nebo ireverzibilně poškodit biologický substrát (Obr. 5)²¹.



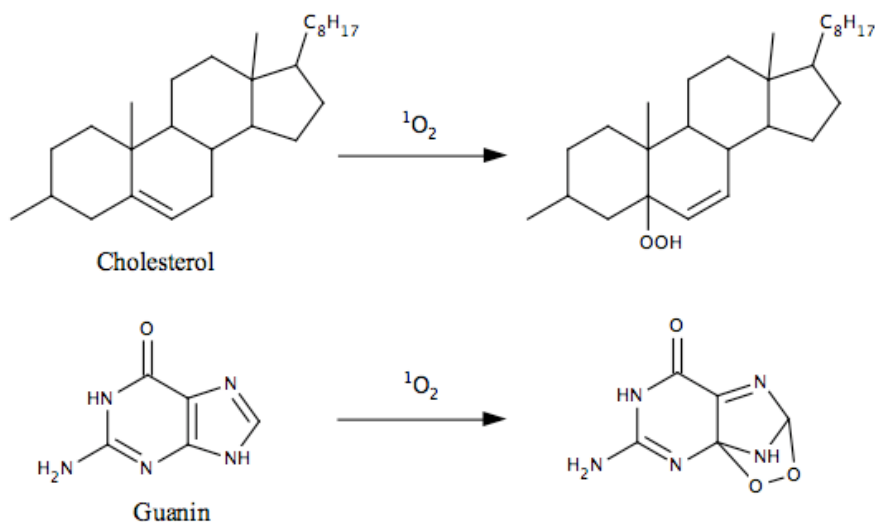
Obr. 5: Reakce probíhající při fotoprocesu typu I

4.3.2. Fotoproces typu II

Při fotoprocesu typu II dochází k přenosu energie z PS* na základní stav kyslíku. U něho dojde k inverzi spinu jednoho z elektronů a tvorbě singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$). $^1\text{O}_2$ je silně reaktivní částice a je schopna oxidovat řadu biomolekul např.: cholesterol, nenasycené mastné kyseliny a některé aminokyseliny (Obr. 6 a 7)²¹.



Obr. 6: Reakce probíhající při fotoprocesu typu II



Obr. 7: Oxidace a cyklooxidace biomolekul

Singletový kyslík způsobuje buněčnou smrt během fotodynamického efektu. Fotoproces typu I získává na důležitosti v hypoxickém prostředí např. solidní tumory. ROS se kromě přímé destrukce nádorových buněk podílejí také na *změnách v krevním zásobení* nádorové tkáně a *imunitní odpovědi*, které se spoluúčastní při destrukci nádoru.

4.3.3. Změny v krevním zásobení

Životaschopnost všech tkání, tedy i nádorové, je závislá na množství kyslíku a živin dodávaných cévy. V roce 1989 bylo zjištěno, že PDT vyvolává uzavření cév v místě ozáření¹⁷. Uzávěry cév jsou vyvolány téměř okamžitě vazokonstrikcí cév. Po

několika hodinách dochází k tvorbě trombů, které přispívají k dlouhodobé kontrole nad nádorem popř. k jeho zničení. Nedostatek kyslíku v prvních fázích terapie, způsobený především vazokonstričním efektem, může spíše omezovat léčbu, proto se začíná spíše s malými dávkami světla po delších časových intervalech. Vliv působení na cévy je také závislý na typu použitého PS. U porfimeru sodného a hydrofobních Pc převažuje vazokonstriční efekt, kdežto u talaporfinu (Laserphyrin®) dominuje tvorba trombů²³.

Uzávěry krevních cest hrají v PDT důležitou roli, především u PS s nízkou selektivitou k nádorové tkáni nebo krátkým biologickým poločasem. U těchto látek se předpokládá, že změny v krevním zásobení jsou pro léčbu důležitější než přímá destrukce nádorové tkáně²⁴.

4.3.4. Imunitní odpověď

Po aplikaci PDT dochází velice často k aktivaci imunitního systému v místech ozáření. Napadená tkáň produkuje mnoho buněčných zbytků ze zničených buněk. Ty jsou signálem pro neutrofile, které vnikají do poškozené tkáně, už po několika minutách po ozáření. Neutrofile vylučují lysozomální enzymy, které ničí okolní buňky a je zahájen zánětlivý proces. Po smrti neutrofile uvolní svůj obsah, který působí jako chemotaktický signál pro další prozánětlivé buňky. Do poškozené tkáně se dostávají žírné buňky, monocyty a makrofágy a rozvíjí se tak silně zánětlivý proces, který přispívá ke konečnému zničení nádoru²⁵.

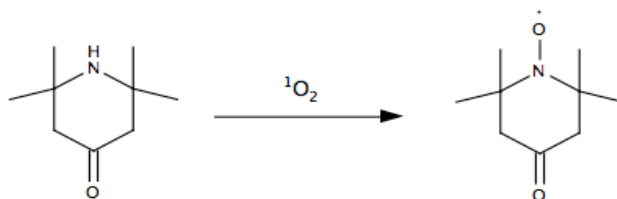
Velice zajímavou studii provedla skupina kolem Hendersonové, která použila lyzát z nádorových buněk izolovaných po PDT k vakcinaci myši proti dalšímu rozvoji nádoru²⁶. Pokud by jejich předpoklady byly správné, znamenalo by to, že bychom se jednou mohli dočkat očkování proti rakovině. K potvrzení této domněnky bude však zapotřebí mnoho dalších studií.

4.4. Kyslík

Jak bylo popsáno v předelších kapitolách hraje kyslík a především jeho reaktivní formy v PDT rozhodující roli. Jsou hlavními cytotoxickými agens způsobujícími nekrózu a apoptózu postižené tkáně. Současně je kyslík také limitujícím faktorem. Neoplastická tkáň je obecně méně zásobena krví, což vede k lokální hypoxii.

Během PDT dochází k vaskulárnímu poškození, což přísun kyslíku ještě zmenšuje. Nedostatek krevního zásobení omezuje použití PDT hlavně u solidních tumorů²⁷.

Na důležitost kyslíku pro PDT upozornil v polovině minulého století Moan se svými kolegy. Ten se také zasloužil o zdokonalení metod k detekci singletového kyslíku. Jeho metoda je založena na reakci singletového kyslíku se stericky chráněným aminem. Z 2,2,6,6,-tetramethylpiperidin-4-onu vznikne stabilní nitroxidový radikál (obr. 8), který lze měřit pomocí elektronové resonance²⁸. S použitím této techniky byl schopen naměřit koncentrace singletového kyslíku okolo 10^{-8} M. Dále poukázal na extrémně krátkou dobu života singletového kyslíku, která se pohybuje řádově v setinách mikrosekund. Maximální vzdálenost, kterou může $^1\text{O}_2$ urazit během své krátké existence, je přibližně 0,01-0,02 μm ²⁹. Při tloušťce cytoplazmatické membrány 0,025-0,05 μm je jasné, že singletový kyslík, který vznikne v extracelulárním prostoru, nemůže proniknout do buňky. Pokud chceme poškodit orgány buňky, musí PS proniknout do intracelulárního prostoru³⁰



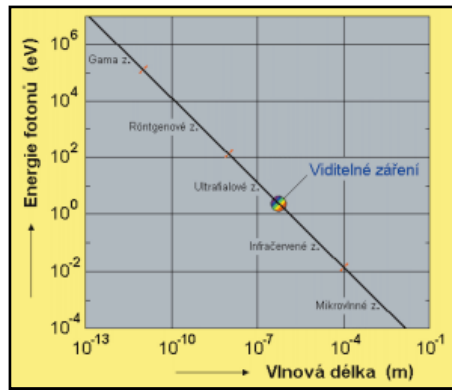
Obr. 8: Vznik stabilního nitroxidového radikálu

4.5. Světlo a průnik světla tkáněmi

Pokroky v PDT nejsou závislé pouze na vlastnostech PS. Ve stejné míře závisí i na pokrocích v tkáňové optice, vědě zabývající se průnikem světla tkáněmi. Abychom správně pochopili průnik světla tkáněmi, musíme si nejprve popsat světlo samotné.

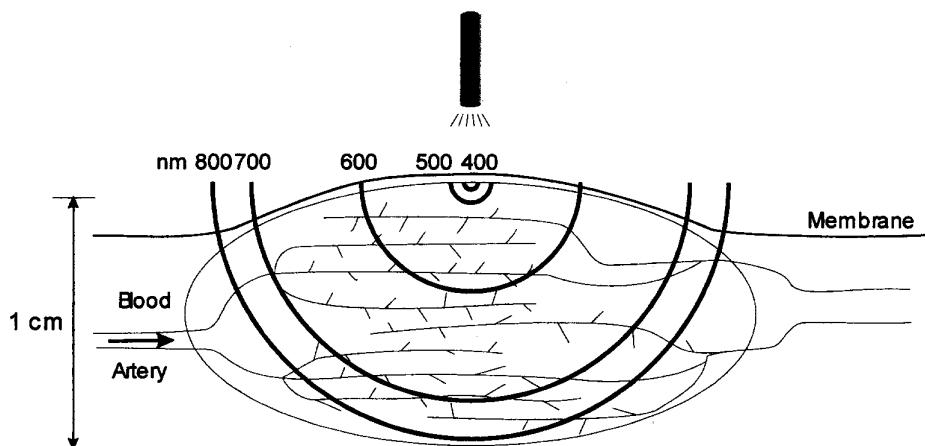
Světlo je viditelná část elektromagnetického záření. V celkovém spektru zaujímá jen zanedbatelnou část, která má však pro člověka rozhodující význam. Nachází se v rozmezí 390 - 770 nm. Jak je vidět na obr. 9, platí mezi vlnovou délkou a energií nepřímá úměra.

Při vlnových délkách vyšších než 800 nm vzniká tripletový stav PS, který se může od základního stavu lišit o méně než 94 kJ/mol, což je minimální energie potřebná ke vzniku singletového kyslíku³¹.



Obr. 9: Závislost energie elektromagnetického záření na jeho vlnové délce

Ve vysokých vlnových délkách je tedy limitujícím faktorem nízká energie elektromagnetického záření. Na opačném konci hraje rozhodující roli v průniku světla tkáněmi absorpce a rozptyl světla. Při nižších vlnových délkách dochází k pohlcování světla endogenními chromofory (hemoglobin, melanin) a také k většímu rozptylu světla. To znamená, že světlo nižších vlnových délek má sice vysokou energii, ale není schopno proniknout dostatečně hluboko do tkání (obr. 10).



Obr. 10: Závislost vlnové délky na hloubce průniku světla

Z výše uvedených vlastností světla a lidské tkáně vyplývá ideální rozsah vlnových délek 680-800 nm použitelný v PDT. Zde je snaha syntetizovat PS, který by absorboval při co možná nejvyšších vlnových délkách.

Zvláštním jevem při PDT je tzv. samostínění. Tímto pojmem se označuje jev, kdy samotný PS omezuje průnik světla do dalších tkání. Tento fenomén můžeme pozorovat především u PS, které výrazně absorbují při léčebné vlnové délce³².

Jako zdroje světelného záření se nejčastěji používají lasery, ale dají se použít např. i LED diody. U vnitřních nádorů je nutné světlo k nádoru přivést pomocí optických vláken. Jak bylo popsáno v předchozích odstavcích, hloubka průniku světla závisí především na jeho vlnové délce. Schopnost světla pronikat tkáněmi je dále ovlivněna výkonem laseru, technickou konstrukcí, pracovním režimem přístroje a samozřejmě také způsobem práce s laserem. Hloubka průniku světla také závisí na typu tkáně. Světlo nejlépe proniká tukovou tkání. Svalová tkáň je na tom o poznání hůře, neboť obsahuje vysoké procento hemoglobinu. Je známo i laserové světlo, které je schopno proniknout kostí. Obecně však platí, že kostní tkáň je pro světlo nejméně propustná.

4.6. Fotosenzitizér

Jedním z největších problémů u prvního klinicky používaného PS - Photofrinu® (HpD) byla jeho chemická nejednotnost. U novějších PS se jedná o čisté a dobře charakterizovatelné látky.

Základní vlastností ideálního PS by měla být vysoká kumulace v neoplastické tkáni. Většina látek, které se dnes používají jako PS, se více či méně kumulují v neoplastické tkáni. Toto chování PS se dodnes nepodařilo zcela objasnit. Existují různé předpoklady, proč tomu tak je. PS jsou většinou látky bazické, a proto se koncentrují v prostředí s nižším pH (tumor). Dalším vysvětlením může být zvýšená propustnost cévních stěn nebo zvýšená fagocytóza v nádorové tkáni³³. HpD se vyznačují velikou afinitou k lipoproteinům a vzhledem k tomu, že v neoplastické tkáni je zvýšené množství LDL-receptorů, dochází k jejich kumulaci³⁴.

Vzhledem k vlastnostem elektromagnetického záření je důležité, aby PS měl maximální absorpci ve vyšších vlnových délkách viditelného světla. Světlo má ještě dostatečnou energii a zároveň je schopné proniknout hlouběji do tkáně.

Dalším významným faktorem v použití látky jako PS je její toxicita za tmy. Jakékoliv účinky, které má látka bez aktivace světlem, se považují za nežádoucí. Mezi další předpoklady patří krátký biologický poločas. Většina PS má tendenci se kumulovat v kůži a vzhledem ke svým vlastnostem způsobují nežádoucí fotosenzitivitu, která může trvat až několik týdnů.

Vzhledem k tomu, že pro PDT je rozhodující vysoký kvantový výtěžek singletového kyslíku, měl by být tento výtěžek co možná největší.

Pokud si PS zachová svou fluorescenci, může být využit k diagnostickým účelům v onkologii nebo také při kontrole lokalizace PS.

Ideální PS by měl mít vlastnosti shrnuté v tabulce 2. Zároveň by měl být snadno připravitelný z běžně dostupných látek s možností automatizace výroby. Jeho výroba by byla levnější a PS by se stal dostupnější pro širší veřejnost.

Tabulka 2: Vlastnosti ideálního fotosenzitizéru

Vlastnosti specifické pro PS	Vlastnosti ideálního léčiva
kumulace v neoplastické tkáni	minimální toxicita
nejvyšší absorpce při 680-800 nm	krátký biologický poločas
vysoký kvantový výtěžek tripletového stavu	možnost modifikovat kinetiku
fluorescence	snadná syntéza
vysoký kvantový výtěžek singletového kyslíku	dostupnost
	chemická čistota

4.6.1. Struktura fotosenzitizéru

Většina dnes používaných PS je odvozena od tetrapyrrolového aromatického jádra. Toto jádro se vyskytuje v mnoha přírodních barvivech (hem nebo chlorofyl). Základní strukturu tedy tvoří čtyři pyrrolová jádra, která jsou spojena přes methinové můstky. Přírozně se vyskytující porfyriny (obr. 11) jsou tvořeny aromatickým systémem z 18 π -elektronů. Pyrrolové kruhy se označují písmeny A, B, C a D. Methinové můstky v polohách 5, 10, 15 a 20 se nazývají též *meso* uhlíky.

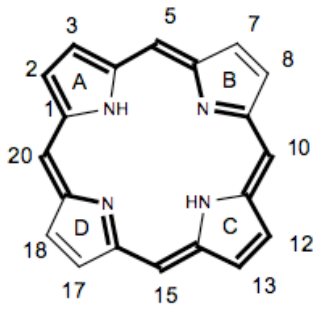
Porfyriny mají maximální vlnovou délku absorpce v oblasti 630 nm. Redukcí jedné dvojně vazby na pyrrolovém kruhu vznikají chloriny (obr. 11) a redukcí dvou takovýchto vazeb vznikají bakteriochloriny (obr. 11). Maximální vlnová délka absorpce chlorinů se posouvá do oblasti 650-690 nm, u bakteriochlorinů do oblasti 740-800 nm.

Také vzrůstá intenzita absorpce při této vlnové délce. Oba tyto faktory jsou pro PDT velice žádoucí. Bakteriochloriny jsou však při skladování značně nestabilní.

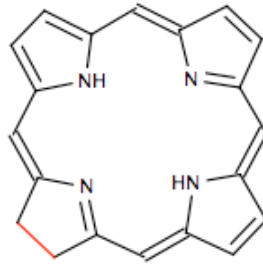
Látky odvozené od tetrapyrrolů mají obvykle široké absorpční pásmo v oblasti 400 nm, známé jako Soretův pás nebo-li B-pás. Druhá, pro PDT významnější absorpce, je v rozmezí 600-800 nm, která se nazývá Q-pás. Porfyriny mají Q-pás v nejnižších vlnových délkách (630 nm) s nízkým extinkčním koeficientem.

Izosterní náhradou *meso* uhlíků za atomy dusíku a přikondenzováním benzenového jádra na každý pyrrolový kruh vznikají ftalocyaniny (Pc). Tyto látky mají Q-pás v červené oblasti viditelného světla (670-700 nm) a výrazně zesílenou absorpci při této vlnové délce. Právě tyto vlastnosti jsou základem ideálního PS a proto jim byla v posledních letech věnována velká pozornost. Kvantový výtěžek singletového kyslíku je u Pc závislý na délce života tripletového stavu. Přítomnost centrálně chelatovaných kovů a polokovů (např.: Si, Zn nebo Al) může tento stav prodloužit a tím zvýšit účinnost PS.

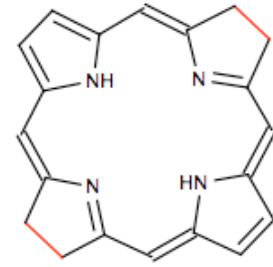
Výše zmiňované látky nebo jejich deriváty se v PDT používají nejvíce. Ve výzkumu je řada dalších látek, ať již přírodního charakteru nebo syntetických. Vědci se je pokoušejí testovat na PDT a případně modifikovat jejich vlastnosti, aby se co možná nejvíce přiblížili vlastnostem ideálního PS. Mezi tyto látky patří např.: fenothiazinová barviva (methylénová modř), xanthenová barviva (bengálská červeň) nebo hypericin³⁵ (obr.11).



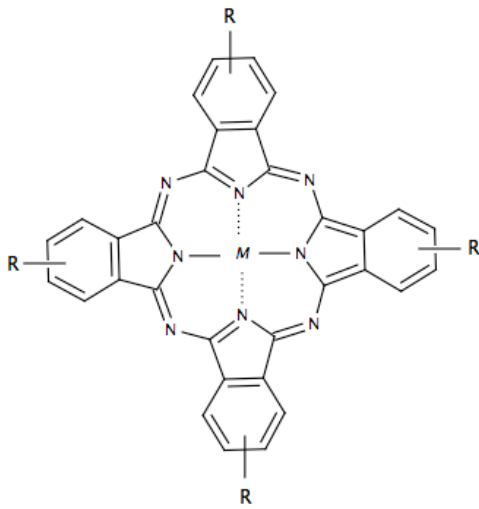
Porfyrin



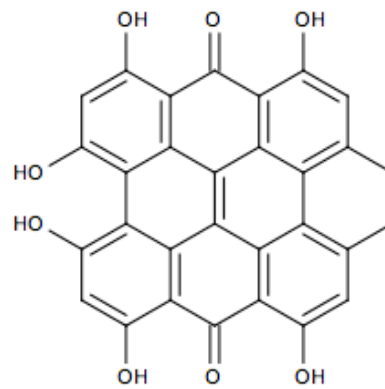
Chlorin



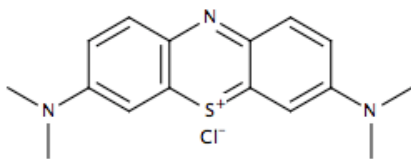
Bakteriochlorin



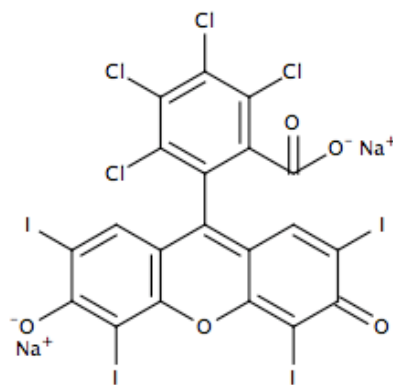
Phtalocyanin



Hypericin



Methylénová modř



Bengálská červen

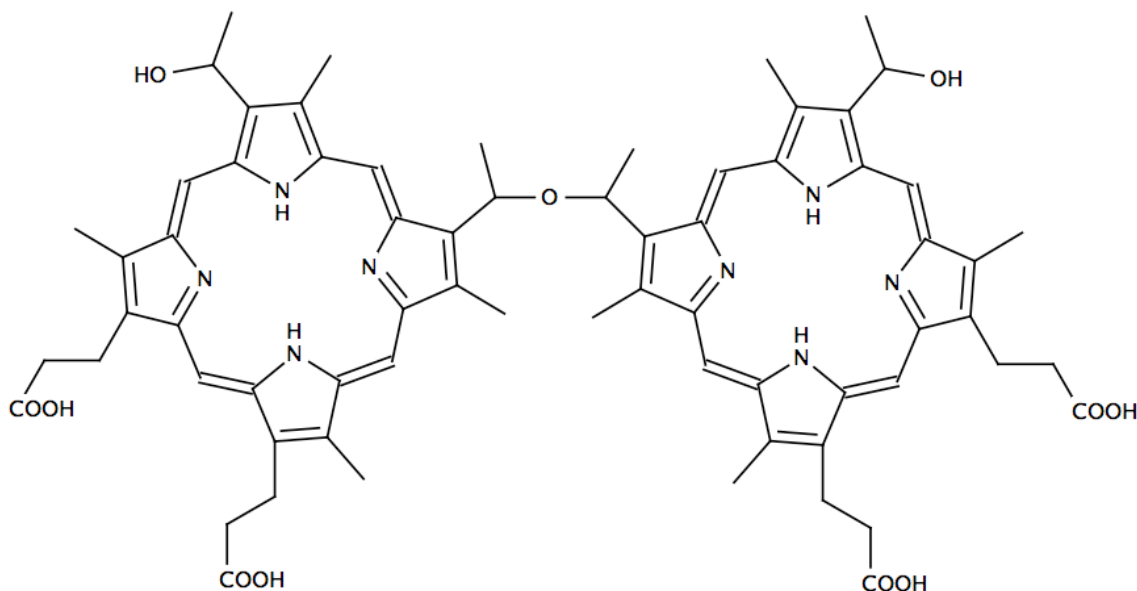
Obr. 11: Vybrané struktury fotosenzitizérů

4.6.2. Rozdělení fotosenzitizérů

Na základě výše zmíněných vlastností můžeme fotosenzitizéry rozdělit do tří generací. První generaci tvoří pouze HpD, které se vyznačují některými nevýhodnými vlastnostmi, kvůli nimž byly připraveny látky druhé generace. Látky druhé generace jsou chemicky jednodušší a mají posunutou maximální absorpci do vyšších vlnových délek než HpD. Do poslední generace patří PS druhé generace spojené s některými biomolekulami, což umožňuje cílenější distribuci v těle³⁶.

První generace

HpD (porfimer sodný, Photofrin[®]) jsou první skupinou PS, které byly v roce 1993 v Kanadě zavedeny k léčbě rakoviny močového měchýře. Mezi hlavní nevýhody porfimeru patří chemická nejednotnost. Nejedná se o chemicky jasně definovanou látku, ale spíše o směs dimerů (obr. 12) a oligomerů. Další nevýhodou je nízká aktivační vlnová délka, takže světlo nemůže pronikat hlouběji do tkání. HpD má nízký extinkční koeficient, a tím pádem je potřeba podávat vysoké dávky. Navíc jeho selektivita k nádorové tkáni není příliš vysoká a má dlouhý biologický poločas, takže neumožňuje pacientovi brzký návrat do běžného života - vysoká fotosenzibilizace kůže přetrvává až 2 měsíce³⁵.



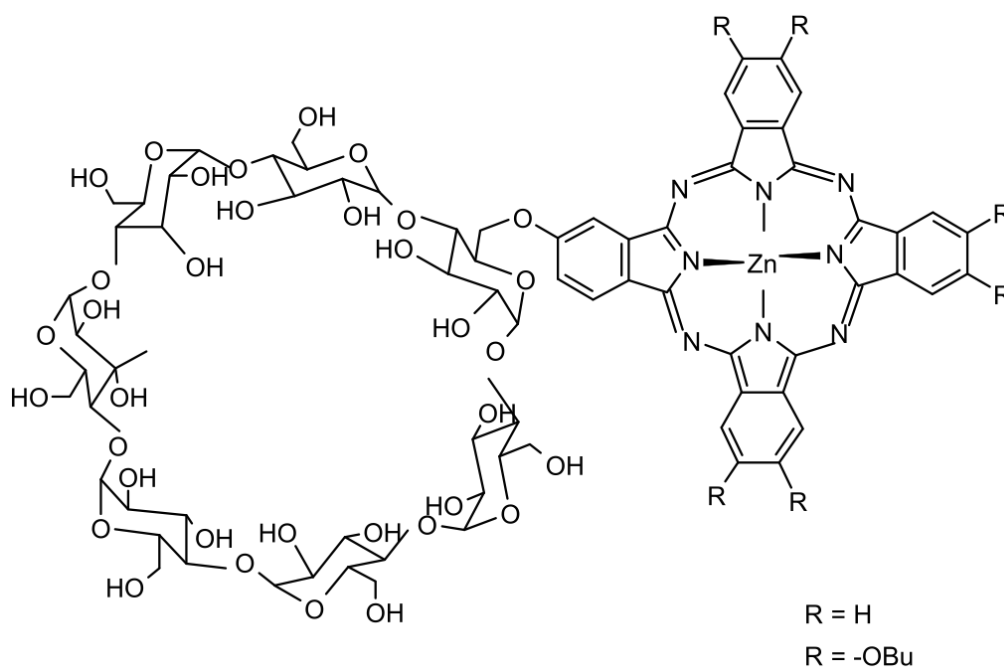
Obr. 12: Příklad části HpD

Druhá generace

Struktura látek druhé generace byla popsána v předchozí kapitole. Od 1. generace se liší především absorpcí světla při vyšších vlnových délkách, vysokým extinkčním koeficientem, minimální toxicitou za tmy a v neposlední řadě se jedná o chemicky jednotné a snadno charakterizovatelné látky³⁷. Popisem jednotlivých PS jsem se věnoval ve své diplomové práci¹. Na toto téma bylo také uveřejněno mnoho odborných prací^{31,35}, a proto zde uvádím pouze přehled klinicky významných PS současnosti (tabulka 3).

Třetí generace

Jako třetí generace bývají označovány konjugáty, které jsou tvořeny PS 1. nebo 2. generace s biomolekulou. Nejčastějšími látkami tvořící fotosenzitivní část bývají porfyriny. Jejich výhodou je snadná příprava a také fakt, že o nich máme nejlepší znalosti, ale prosazují se výrazně i další deriváty, zejména Pc. Biomolekulou bývají nejčastěji steroidy, sacharidy (obr. 13), polynukleotidy, peptidy atd. Hlavní výhodou PS 3. generace je cílená distribuce, např.: steroidy se váží na své receptory²⁰. Tyto látky jsou zatím ve vývoji a jejich použitelnost v PDT ukáže až čas.



Obr. 13 Derivát ftalocyaninu konjugovaný s cyklodextrinem

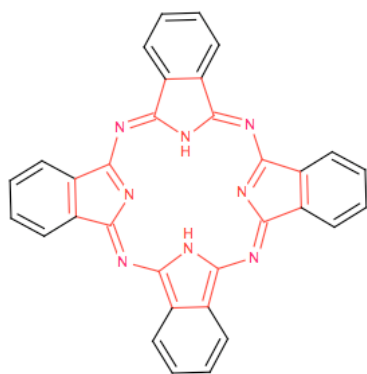
Tabulka 3: Klinicky významné fotosenzitizéry^{31,35}

Název	Léčivá látka	Onemocnění	Aktivační λ [nm]
	Ex.k. [$M^{-1}cm^{-1}$]	Ozáření po inj.	Délka senzibilizace
Photofrin [®]	porfimer sodný	karcinom jícnu, kůže, plíc a děložního krčku	630
	$3,0 \times 10^3$	24-48 hod.	2-3 měsíce
Visudyne [™]	verteporfin	pat. myopie, karcinom kůže	690
	$9,5 \times 10^4$	30-150 min.	3-5 dní
Foscan [®]	temoporfin	karcinom kůže na hlavě a krku	652
	$3,0 \times 10^4$	24-48 hod.	6 týdnů
Levulan [®]	ALA	karcinom kůže, fotodetekce moč. měch.	632
	$< 5,0 \times 10^3$	-	1-2 dny
Metvix [®]	methylester-ALA	prekancerózy kůže, fotodetekce moč. měch.	632
	$< 5,0 \times 10^3$	-	1-2 dny
Hexvix [®]	hexylester-ALA	fotodetekce moč. měch.	632
	$< 5,0 \times 10^3$	-	1-2 dny
Benzvix [®]	benzylester-ALA	fotodetekce jícnu	632
	$< 5,0 \times 10^3$	-	1-2 dny
Purlityn [®]	rostoporfin	karcinom prsu, prostaty, kůže, AIDS	664
	$2,8 \times 10^4$	24 hod.	1 měsíc
Laserphyrin [®]	talaporfin	solidní tumory, AMD	664
	$3,8 \times 10^4$	4 hod.	3-7 dní
Antrin [®]	lutecium motexafin	karcinom prostaty, hlavy, děl. čípku	732
	$4,2 \times 10^4$	3-5 hod.	minimální
Lutex [®]	lutecium motexafin	karcinom prostaty, hlavy, děl. čípku	732
	$4,2 \times 10^4$	3-5 hod.	minimální
Photosens	sulfonovaný hlinitý ftalocyanin	solidní tumory v podkoží	670
	$2,5 \times 10^4$	24-72 hod.	8-10 dní

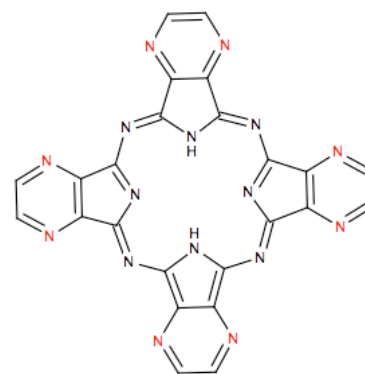
5. Metodická část

5.1. Ftalocyaniny, naftalocyaniny a jejich azaanaloga

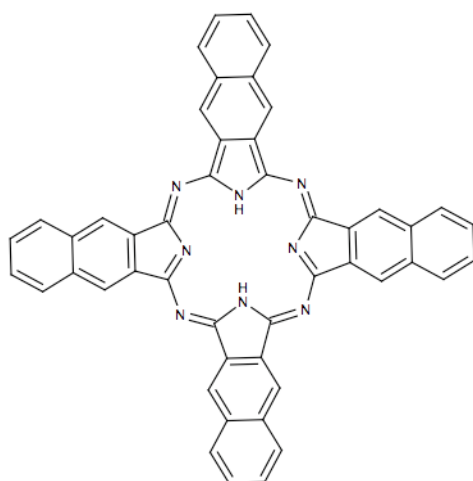
Stejně jako se ftalocyaniny (Pc) liší od azaftalocyaninů (AzaPc) izosterní náhradou jednoho nebo více atomů uhlíku za dusík, můžeme říci, že z naftalocyaninů (Nc) vznikají azanaftalocyaniny (AzaNc) (obr. 14). Do této skupiny patří i tetrachinoxalinoporfyraziny (TQP) (obr. 14). Zatímco studiem Pc a AzaPc se zabývalo nespočet studií, je situace u Nc znatelně horší. O skupině AzaNc, především pak tetra [6,7]chinoxalinoporfyrazinů, jsem v odborných periodických našel pouze 2 studie^{38,39}.



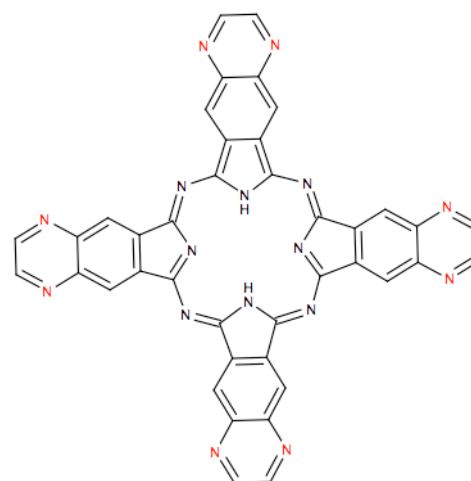
Ftalocyanin
(červeně - porfyrazinový kruh)



Tetrapyrroloporfyrin
(azaftalocyanin)



Naftalocyanin



Tetra[6,7]chinoxalinoporfyrin
(azanaftalocyanin)

Obr. 14: Ftalocyanin, naftalocyanin a jejich azaanaloga

Čisté AzaPc a AzaNc jsou sytě zbarvené pevné látky. Přítomnost atomů dusíku podmiňuje snížení lipofility AzaPc (AzaNc) oproti příslušným Pc (Nc), což je z hlediska PDT považováno za výhodu⁴⁰.

Mezi další výhody azaanalogů patří relativně snadná příprava libovolně substituovaných prekurzorů, které po cyklizaci dají vzniknout různě substituovaným derivátům. Syntéza takto substituovaných derivátů Pc je často velmi obtížná a někdy až nemožná (např. alkylamino substituované Pc)³⁸.

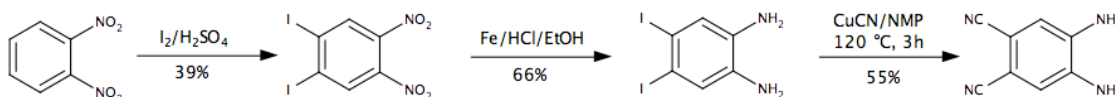
Na druhé straně AzaPc mají oproti Pc posunut Q-pás k nižším vlnovým délkám, přibližně o 30-40 nm. Tato nežádoucí vlastnost může být odstraněna přidáním aromatického kruhu do makrocyclu molekuly. Tím z tetrapyrazinoporfyrazinu vznikne tetra[2,3]chinoxalinoporfyrazin nebo jeho izomer tetra[6,7]chinoxalinoporfyrazin. Posun Q-pásu k vyšším vlnovým délkám je výraznější právě u posledně zmiňovaného izomeru³⁸.

Další nevýhodou AzaPc oproti Pc je jejich snazší shlukování za tvorby dimerů popř. oligomerů. Tato agregace je pro využití AzaPc v PDT nežádoucí. Jedním z vysvětlení, proč jsou AzaPc náchylnější k agregaci, by mohl být fakt, že zvýšená hustota π -elektronů na atomu dusíku vede k snazším interakcím mezi molekulami. Oligomery jsou méně rozpustné, což vede k problémům při čištění. Sníží se tím jejich pohyblivost na silikagelu, a tudíž musí být čištěny méně účinnou metodou promýváním organickými rozpouštědly pomocí Soxhletova přístroje⁴¹. K dalším nepřesnostem může docházet během metod, které mají za úkol charakterizovat molekulu. U dimerů dochází ke zkrácení doby života tripletového stavu, a tím pádem snížení produkce singletového kyslíku. Tato nežádoucí vlastnost AzaPc může být potlačena pomocí dlouhých nebo rozvětvených substituentů na periferii molekuly. Tyto objemné substituenty stericky brání agregaci molekul. Pro zachování monomerního stavu se ukázaly výhodnější rozvětvené substituenty⁴¹.

Z pohledu produkce singletového kyslíku jsou na tom nejlépe Pc. AzaPc se jim téměř vyrovnají⁴¹. Naproti tomu Nc mají v porovnání s Pc přibližně šestkrát menší kvantový výtěžek singletového kyslíku⁴². Pokud je mi známo, studie která, by porovnávala AzaNc s Nc, zatím nebyla publikována. Údaje v tomto odstavci je nutné brát pouze jako orientační, neboť hodnoty se mohou výrazně lišit v závislosti na typu derivátu a agregačních vlastnostech.

5.2. Syntéza 4,5-diaminobenzen-1,2-dikarbonitrilu

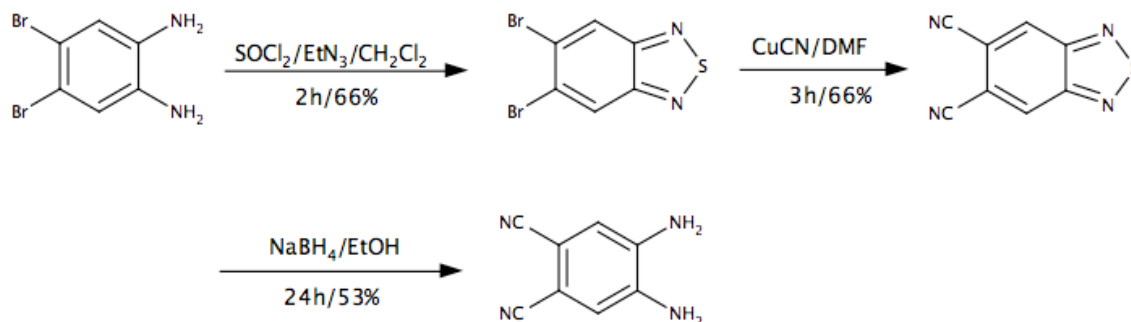
4,5-diaminobenzen-1,2-dikarbonitril je základním stavebním kamenem nejen pro přípravu TQP, ale také např. pro benzimidazoporfyriziny. Při přípravě této látky můžeme vycházet z 1,2-diamino-4,5-dibrombenzenu³⁹ nebo z 1,2-diamino-4,5-dijódbenzenu⁴³. Limitujícím krokem v přípravě požadovaného prekursoru je právě nitrilace těchto dvou látek. Vyšších výtěžků je dosaženo, pokud budeme postupovat podle Youngblooda⁴³, tedy přes 1,2-diamino-4,5-dijódbenzen (obr.15).



Obr. 15: Příprava 4,5-diaminobenzen-1,2-dikarbonitrilu

V prvním kroku této syntézy dochází k reakci *o*-dinitrobenzenu s jódem v prostředí olea. Pokud budeme tuto směs zahřívat 75 minut při $120\text{ }^\circ\text{C}$, tak dojde k jodaci *o*-dinitrobenzenu v polohách 4 a 5. V dalším kroku jsou nitroskupiny redukovány pomocí Fe/HCl . V posledním kroku dochází k náhradě atomů jódu za nitrilové skupiny. Této substituce docílíme zahříváním 1,2-diamino-4,5-dijódbenzenu s $CuCN$ v prostředí *N*-methylpyrrolidinonu po dobu 3 hodin při $120\text{ }^\circ\text{C}$.

V roce 2008 byla uveřejněna studie⁴⁴ popisující přípravu požadovaného prekursoru z 1,2-diamino-4,5-dibrombenzenu. Jedná se o tříkrokovou syntézu, která dosahuje největších výtěžků. Průběh reakce je znázorněn na obr. 16.

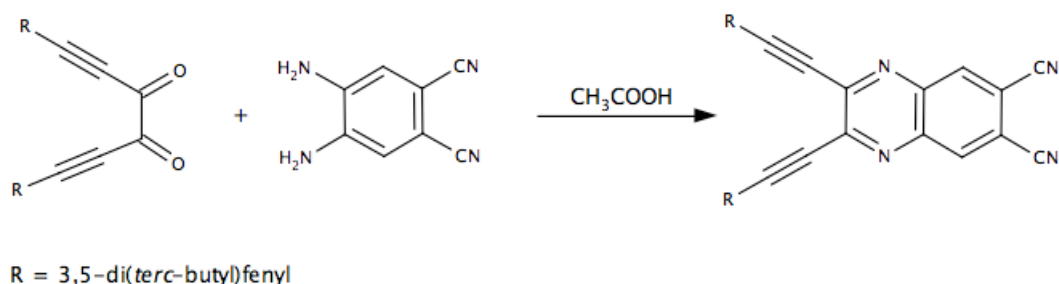


Obr. 16: Příprava 4,5-diaminobenzen-1,2-dikarbonitrilu

Zahříváním 1,2-diamino-4,5-dibrombenzenu s thionyl chloridem pod zpětným chladičem poměrně snadno vzniká 5,6-dibrom-2,1,3-benzothiadiazol v 66 % výtěžku. Přidáním kyanidu měďného dochází k nitrilaci, ale zároveň nedochází k chelataci atomu mědi, a tak nevznikají problémy s přečištěním. V posledním kroku dochází pomocí borohydridu sodného k redukční desulfuraci za vzniku požadovaného produktu.

5.3. Syntéza substituovaného chinoxalin-6,7-dikarbonitrilu

Z 4,5-diaminobenzen-1,2-dikarbonitrilu můžeme připravit substituovaný chinoxalin několika způsoby. První z nich je syntéza podle Mitzela⁴⁵. Základem této syntézy je kondenzace odpovídajícího diketonu s 4,5-diaminobenzen-1,2-dikarbonitrilem (obr. 17).

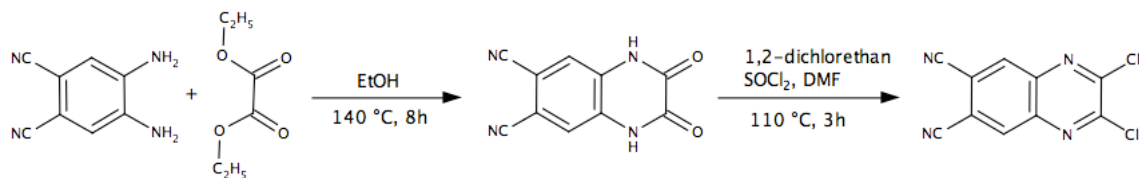


Obr. 17: Příprava substituovaného chinoxalinu podle Mitzela

Jedná se tedy o jednokrokovou reakci, která u derivátu zmiňovaného na obr. 17, probíhá za pokojové teploty pouhým 20 minutovým mícháním vzniklé směsi. Této jednoduché reakci však musí předcházet příprava požadovaných diketonů, tím zdánlivě jednoduchý postup získává na složitosti. V některých případech není příprava požadovaného diketonu možná a tudíž nemůžeme ani připravit libovolně substituovaný chinoxalin-6,7-dikarbonitril.

Druhý způsob, jak připravit požadované chinoxaliny, se může na první pohled jevit jako složitější, avšak v konečném důsledku je mnohem jednodušší a především umožňuje připravit deriváty chinoxalinu substituované přes heteroatom. Základním meziproduktem tohoto postupu je 2,3-dichlorchinoxalin-6,7-dikarbonitril. O výhodných vlastnostech chlorovaného derivátu chinoxalinu se zmíním později. Nejprve bych se však rád věnoval jeho přípravě.

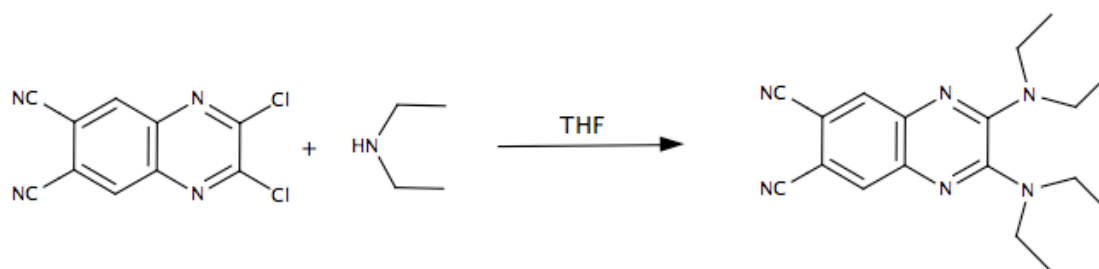
Pokud budeme vycházet z 4,5-diaminobenzen-1,2-dikarbonitrilu, je potřeba nejprve připravit 2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6,7-dikarbonitril, který je následně chlorován za vzniku 2,3-dichlorchinoxalin-6,7-dikarbonitrilu³⁸ (obr. 18).



Obr. 18: Příprava 2,3-dichlorchinoxalin-6,7-dikarbonitrilu

V prvním kroku je 4,5-diaminobenzen-1,2-dikarbonitril zahříván s diethyloxalátem v prostředí ethanolu. Po 8 hodinách vzniká 2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6,7-dikarbonitril. Tato látka se vyskytuje ve dvou tautomerních formách (laktamová a laktimová). Na základě IR a NMR spekter bylo zjištěno, že převažuje laktamový izomer. K chloraci dochází při zahřívání meziproductu s thionylchloridem a dimethylformamidem (DMF) v 1,2-dichlorethanu. Reakce s thionylchloridem v jiných rozpouštědlech (dioxanu a tetrahydrofuranu - THF) nebo použití jiných reaktantů k chloraci (POCl_3) nevedlo k požadovanému produktu³⁸.

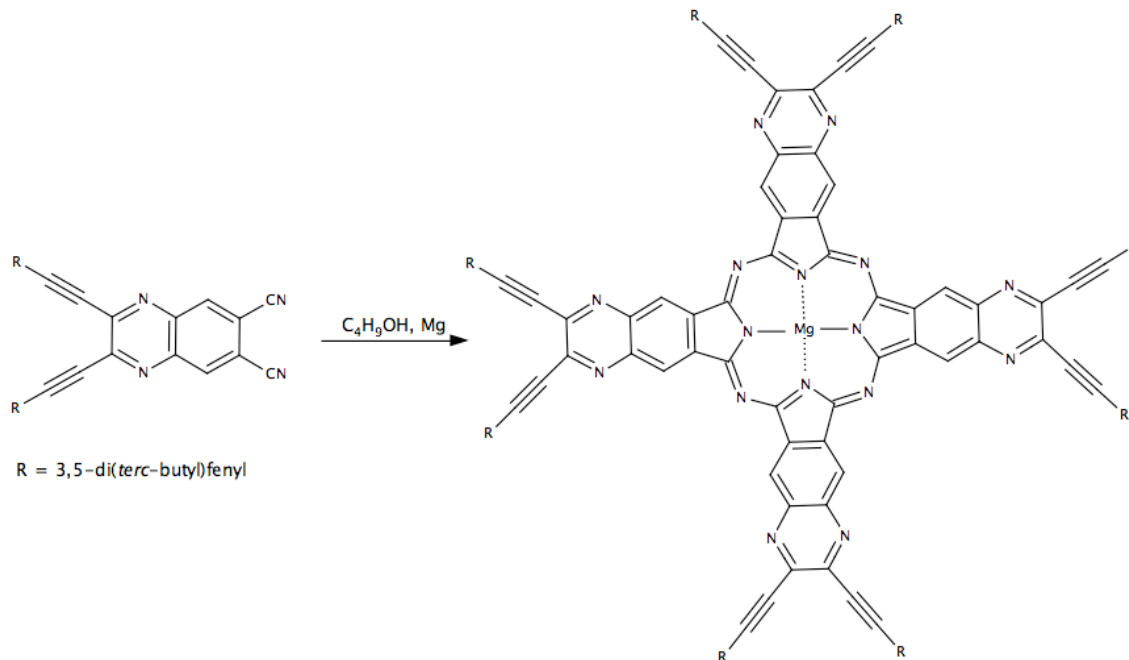
Chemické vlastnosti 2,3-dichlorchinoxalin-6,7-dikarbonitrilu jsou velmi podobné vlastnostem 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu, který se velmi často používá při přípravě AzaPc. Vzhledem k přítomnosti dvou atomů dusíku v heterocyklické struktuře a negativního indukčního efektu karbonitrilových skupin spolu s atomy chloru, jsou atomy uhlíku v polohách 2 a 3 chinoxalinového jádra silně elektrondeficitní. Halogen deriváty chinoxalinu jsou ideálními výchozími sloučeninami pro další substituce, protože dochází ke snadné výměně halogenu za nukleofilní skupinu³⁸. Díky nukleofilní substituci lze poměrně snadno připravit nejrůznější substituované deriváty chinoxalinu, což bylo demonstrováno na příkladu bis (diethylamino) substituovaného derivátu (obr.19).



Obr. 19: Příklad nukleofilní substituce 2,3-dichlorochinoxalin-6,7-dikarbonitrilu

5.4. Cyklotetramerizace prekurzoru tetrachinoxalinoporfyrazinu

Zatímco cyklizačních metod u AzaPc je v odborných publikacích popsána celá řada, obdobné studie u TQP chybí. Jednou z nejčastěji používaných cyklizačních metod u AzaPc je reakce prekurzorů s alkoholátem hořečnatým. Obdoba této reakce byla popsána i u derivátů chinoxalinů⁴⁵. Mitzel zahříval pod zpětným chladičem prekurzory s butanolátem hořečnatým přibližně 1 hodinu. V závislosti na typu použitého prekurzoru byly výtěžky mezi 18-43 %. Schéma cyklizační reakce je na obr. 20.



Obr. 20: Tetramerizace chinoxalinového derivátu

5.5. Cyklotetramerizace aryloxyprekurzorů AzaPc

Na problém při cyklizaci aryloxy derivátů AzaPc upozornila E. Mørkved. Ve své studii⁴⁶ poukazuje na skutečnost, že při reakci methoxy a fenoxxy derivátů pyrazin-2,3-dikarbonitrilu s propanolátem hořečnatým dochází k nahrazení periferních substituentů skupinou propoxylovou. U fenoxxy derivátů se to projeví mj. silným dehtovým zápachem unikajícího fenolu. Běžné cyklizační postupy u těchto derivátů tedy nelze použít.

Snadno odštěpitelná aryloxy skupina byla největším problémem při pokusech syntetizovat fenoxxy deriváty AzaPc. S nežádoucí transesterifikací se setkáváme i v další z možných cyklotetramerizací nekovových AzaPc, za použití pentanolátu lithného nebo sodného. Ve stejné studii⁴⁷ S. Makhseed popisuje přípravu nekovových a kovových fenoxxy derivátů AzaPc. Základem této syntézy bylo zahřívání prekurzoru v bezvodném chinolinu v atmosféře dusíku. Pro přípravu bezkovového AzaPc byla směs zahřívána 24 hodin na 160 °C. V případě kovových AzaPc byl do směsi přidán octan daného kovu a zahříván při stejných podmínkách.

Ve své diplomové práci¹ jsem se snažil najít nejefektivnější způsob syntézy 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis-(2,6-diisopropylfenoxxy)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninato zinečnatého komplexu. Ze série více či méně úspěšných pokusů jsem došel k závěru, že nejlepší způsob přípravy výše zmiňované látky je reakce 5,6-di(2,6-diisopropylfenoxxy)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu se zinečnatými solemi v tavenině chloridu bis(chinolináto) zinečnatého. Tuto směs jsem zahříval 60 minut při 260 °C a dosáhl jsem 81% výtěžku. U dané látky se mi tak podařilo, oproti S. Makhseedovi, dosáhnout vyšších výtěžků v kratším reakčním čase (viz. tab.4).

Tabulka 4: Srovnání výsledků

	Výtěžek	Reakční čas	Reakční teplota
S.Makhseed	15%	24 hod.	160 °C
P.Vůjtěch	81%	1 hod.	260 °C

6. Experimentální část

Teploty tání byly stanoveny na digitálním přístroji pro stanovování teplot tání Electrothermal IA9200 a nejsou korigovány.

Průběh reakcí a čistota produktů a meziproductů byly kontrolovány tenkovrstvou chromatografií na deskách Merck Silikagel 60 F254 s detekcí UV světlem vlnové délky 254 nm a 366 nm. Vyvíjející soustavy jsou uvedeny u jednotlivých příprav. Sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu Merck 60 (40-63 μm).

NMR spektra byla naměřena na přístroji Varian Mercury VxBB 300. Měření bylo prováděno při frekvenci 299,95 MHz (^1H NMR) a 75,43 MHz (^{13}C NMR). Posuny jsou vztaženy k vnitřnímu standardu Si (CH_3)₄.

Spektra ve viditelné oblasti byly měřeny na přístroji Shimadzu UV 240 1 PC: UV-VIS recording spectrophotometer.

Spektra v infračervené oblasti byly měřeny v tabletách z KBr na IR-Spectrometru Nicolet Impact 400.

MALDI-TOF hmotnostní spektra byla měřena na hmotnostním spektrometru Voyager-DE STR (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA).

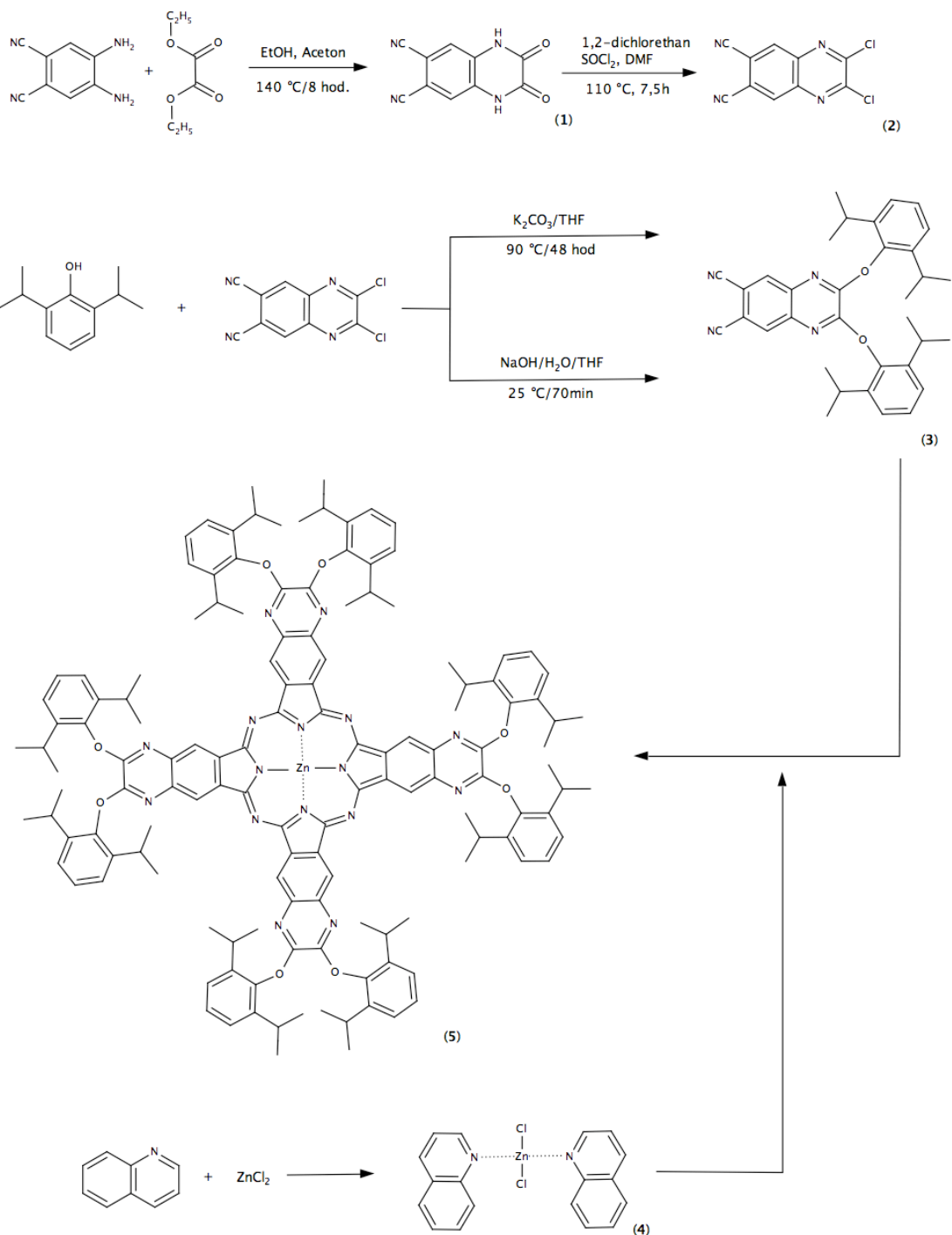
Během experimentů jsem používal horkovzdušnou pistoli Steinel HL 2305 LCD. Při použití horkovzdušné pistole byla reakční teplota odečítána z displeje pistole.

Rozpouštědla byla zakoupena u firmy Penta a chemikálie od firmy Sigma-Aldrich. Chlorid zinečnatý byl vysušen při 78 °C, 20 mbar nad P₂O₅ po dobu 5 hodin.

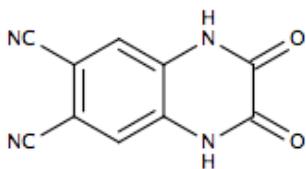
Látka připravovaná již dříve na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv dle publikovaných postupů:

4,5-diaminobenzen-1,2-dikarbonitril³⁸

6.1. Schéma prováděných reakcí



6.2. Příprava 2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6,7-dikarbonitrilu (1)

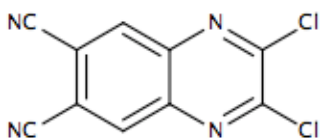


Mr = 212,16

C₁₀H₄N₄O₂

4,5-diaminobenzen-1,2-dikarbonitril (1 g, 6,3 mmol) jsem suspenzoval v malém množství ethanolu (10 ml). Baňku se suspenzí jsem dal do ultrazvuku, aby došlo k dokonalému rozdrobnění. Suspenzi jsem smíchal s diethylesterem kyseliny šťavelové (26,9 g, 184 mmol). Takto připravenou směs jsem zahříval v otevřené baňce při teplotě 140 °C 8 hodin. Výtěžek 0,8739 g hnědých krystalů (tj. 65,17 % teoretického výtěžku). Reakce byla prováděna dle již publikovaného postupu³⁸.

6.3. Příprava 2,3-dichlorchinoxalin-6,7-dikarbonitrilu (2)



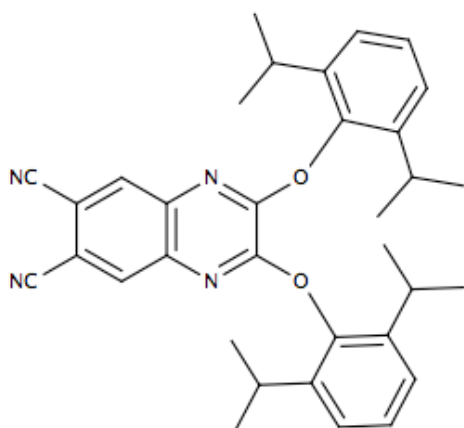
Mr = 249,06

C₁₀H₂Cl₂N

2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6,7-dikarbonitril (1) (0,8739 g 4,1 mmol) jsem dal do baňky a přidal 1,2-dichlorethan (25,12 g, 254 mmol), thionylchlorid (5 g, 42 mmol) a dimethylformamid (942 mg, 12,8 mmol). Směs jsem zahříval při 110 °C pod zpětným chladičem 3 hodiny. Nedošlo k rozpuštění, proto jsem přidal další thionylchlorid (5 g, 42 mmol) a dimethylformamid (942 mg, 12,8 mmol) a zahříval další 2 hodiny. Ani tentokrát se vše nerozpustilo, proto jsem opět přidal thionylchlorid (5 g, 42 mmol) a dimethylformamid (942 mg, 12,8 mmol) a zahříval další 2,5 hodiny.

Provedl jsem kontrolu pomocí tenkovrstvé chromatografie, jako vyvíjející soustavu jsem použil toluen/chloroform 1:1. Při porovnání se standardem jsem zjistil, že v baňce je požadovaný produkt. Rozpouštědla jsem odpařil na vakuové rotační odparce. Produkt jsem 3× extrahoval horkým THF. Znovu jsem odpařil za sníženého tlaku a pevnou látku propláchl benzínem. Výtěžek 880 mg (tj. 86,11 % teoretického výtěžku). Reakce byla prováděna dle již publikovaného postupu³⁸.

6.4. Příprava 2,3-di(2,6-diisopropylfenyl)chinoxalin-6,7-dikarbonitrilu (3)



Mr = 532,68

C₃₄H₃₆N₄O₂

6.4.1. V tetrahydrofuranu s uhličitanem draselným

V destilační baňce jsem rozpustil 2,3-dichlorchinoxalin-6,7-dikarbonitril (2) (940 mg, 3,8 mmol) v THF. Poté jsem přidal 2,6-diisopropylfenol (1,55 g, 8,7 mmol) a předem rozetřený bezvodý uhličitan draselný (3,04 g, 21,6 mmol). Směs jsem zahříval pod zpětným chladičem 24 hodin při 90 °C. Druhý den jsem provedl kontrolu pomocí tenkovrstvé chromatografie a zjistil jsem, že nezreagoval veškerý prekurzor. Proto jsem přidal 2,6-diisopropylfenol (473 mg, 2,6 mmol) a předem rozetřený uhličitan draselný (745 mg, 5,3 mmol) a směs jsem zahříval za stejných podmínek dalších 24 hodin. Z produktu jsem odpařil rozpouštědla a baňku jsem promyl vodou. Suspenzi jsem přefiltroval za sníženého tlaku. Pevný podíl na filtru jsem rozpustil v acetonu. Filtrát

(vodná část po filtraci) byl zakalený, proto jsem ho vytřepal 3× do chloroformu. Chloroformové frakce jsem spojil a vysušil síranem sodným bezvodým a zfiltraval do acetonového roztoku. Ze vzorku jsem na vakuové rotační odparce odstranil rozpouštědla a daný produkt jsem vyčistil pomocí sloupcové chromatografie, jako mobilní fázi jsem použil toluen. Vyčištěný vzorek jsem překrystalizoval z methanolu. Výtěžek 1,06 g (tj. 52,26 % teoretického výtěžku). T.t. 248,6-249,1 °C

6.4.2. V tetrahydrofuranu s hydroxidemsodným

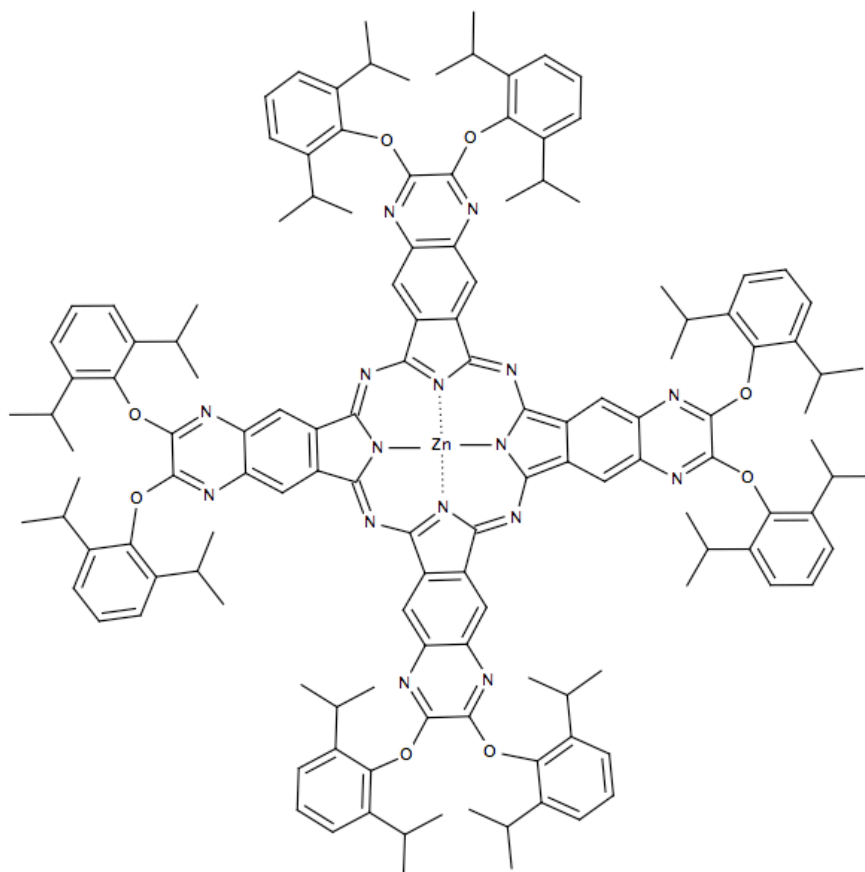
V jedné baňce jsem smíchal roztok hydroxidu sodného (5 ml, koncentrace 1 M) a 2,6-diisopropylfenol (890 mg, 5 mmol) a v druhé baňce jsem suspendoval 2,3-dichlorchinoxalin-6,7-dikarbonitril (**2**) (470 mg, 1,9 mmol) do THF. Obsah obou baněk jsem spojil a míchal 30 minut při laboratorní teplotě. Na tenkovrstvé chromatografii byly stopy výchozí látky, proto jsem míchal směs dalších 40 minut. Po 70 minutách celkového času jsem při kontrole na tenkovrstvé chromatografii pozoroval pouze produkt. Odpařil jsem rozpouštědlo na vakuové rotační odparce. Do baňky jsem přidal vodu a vše 3× vytřepal do chloroformu. Chloroformové frakce jsem spojil, vysušil síranem sodným a poté jsem směs přefiltroval a odpařil. Produkt jsem vyčistil pomocí sloupcové chromatografie, jako soustavu jsem použil toluen. Přečištěný produkt jsem překrystalizoval z methanolu. Výtěžek 0,57 g (tj. 56 % teoretického výtěžku) T.t. 248,5-249,0 °C. Produkt odpovídal charakteristikami i R_f hodnotou produktu z předchozí reakce.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C) δ (ppm) 7,29-7,41 (6 H, m, aromH); 2,97 (8H, sept, $J=6,7$ Hz, CH_3CHCH_3); 1,23 (24 H, br s, CH_3); 8,08 (2 H, s, aromH). ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; 25 °C) δ (ppm) 151,67; 146,76; 140,13; 139,70; 133,37; 127,25; 124,46; 115,12; 112,36; 27,98; 23,55.

IČ (KBr) ν (cm^{-1}) 3474; 2965; 2930; 2870; 2238 (CN); 1617; 1588; 1567; 1502; 1456; 1393; 1363; 1346; 1330; 1252; 1230; 1211; 1173; 1157; 1144; 1092; 1062.

Elementární analýza vypočítáno pro $\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_2$: C 76,66; H 6,81; N 10,52; nalezeno C 76,44; H 7,06; N 10,57.

6.5. Příprava 2,3,11,12,20,21,29,30-oktakis(2,6-diisopropylfenoxy)-tetra[6,7]chinoxalinoporfyrazináto zinečnatého komplexu (5)



Mr = 2196,16

6.5.1. Příprava chloridu bis(chinolináto) zinečnatého (ZnQ₂Cl₂) (4)

Chinolin (3,28 g, 25 mmol) jsem smíchal s vysušeným chloridem zinečnatým (680 mg, 5 mmol) a zahříval 20 minut při 200 °C pod zpětným chladičem. Vzniklou sraženinu jsem promyl etherem a zfiltraval za nízkého tlaku. Reakce byla provedena dle postutu popsáno v literatuře⁴⁸, kde je uveden 96 % výtěžek a teplota taní 237-240 °C. Výtěžek 1,837 g (tj. 92,15 % teoretického výtěžku). T.t. 234-240 °C

6.5.2. Optimalizace reakčních podmínek

2,3-di(2,6-diisopropylfenyl)chinoxalin-6,7-dikarbonitril (**3**) (20 mg, 0,038 mmol) jsem smísil s ZnQ_2Cl_2 (**4**) (14,8 mg, 0,038 mmol). Směs jsem zahřival při různých teplotách 260 °C (olejová lázeň) a 310 °C (horkovzdušná pistole Steinel HL 2305 LCD). Při teplotě 260 °C jsem směs zahřival 30 minut, při vyšší teplotě jsem zkoumal kinetiku reakce, takže jsem směs zahřival 20 a 40 minut. Takto vzniklé produkty jsem každý zvlášť promyl směsí methanol/voda/kyselina octová v poměru 5:5:1. Suspenzi jsem přefiltroval a produkt z filtračního papíru jsem rozpustil v chloroformu. Roztok jsem přefiltroval a odpařil pomocí vakuové rotační odparky. Obsah baňky jsem rozpustil v 1 ml chloroformu. 17,8 μl tohoto roztoku jsem smísil s 10 ml chloroformu a 5 μl pyridinu, výsledný roztok jsem použil na měření absorbance viz tabulka 5. Z naměřených absorbancí vyplynuly reakční podmínky pro další postup. Za optimální lze považovat zahřívání směsi 60 minut při 310 °C.

Tabulka 5: Srovnání reakčních podmínek

Teplota	Čas	A (730 nm)
260 °C	30 min	0,5247
310 °C	20 min	3,0532
310 °C	40 min	3,4307

Chloroformový roztok jsem použil také k hledání ideální mobilní soustavy pomocí tenkovrstvé chromatografie. Nejlepší se během tenkovrstvé chromatografie jevila soustava toluen/hexan/pyridin v poměru 100:30:1.

6.5.3. Příprava 2,3,11,12,20,21,29,30-oktakis(2,6-diisopropylfenoxy)-tetra[6,7]chinoxalinoporfyrizináto zinečnatého komplexu (**5**)

2,3-di(2,6-diisopropylfenyl)chinoxalin-6,7-dikarbonitril (**3**) (500 mg, 0,94 mmol) jsem smísil s ZnQ_2Cl_2 (**4**) (370 mg, 0,94 mmol). Směs jsem zahřival nad horkovzdušnou pistolí Steinel HL 2305 LCD 60 minut při teplotě 310 °C. Produkt jsem promyl směsí methanol/voda/kyselina octová v poměru 5:5:1 a přečistil pomocí

sloupcové chromatografie, kde jsem jako mobilní soustavu použil toluen/hexan/pyridin v poměru 100:30:1. Po překrytalizování z methanolu vznikly bledě zelené krystalky. Výtěžek 120 mg (tj. 23 % teoretického výtěžku).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 25 °) δ (ppm) 7,48– 7,58 (24 H, m, aromH); 3,63 (16 H, sept, $J=6,8$ Hz, CH_3CHCH_3); 1,45 (96 H, s, CH_3); 9,88 (8 H, s, aromH). ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 , 25 °C) δ (ppm) 153,78; 148,24; 141,36; 139,30; 137,58; 127,74; 125,32; 121,37; 28,54; 24,00; 23,19.

IČ (KBr) ν (cm^{-1}) 3433; 2964; 2930; 2870; 1421; 1324; 1229; 1183; 1164; 1145; 1092; 1041.

Elementární analýza vypočítáno pro $\text{C}_{136}\text{H}_{144}\text{N}_{16}\text{O}_8\text{Zn}+3\text{H}_2\text{O}$: C 72,59; H 6,7; N 9,96; nalezeno: C 72,63; H 6,7; N 10,05.

MS (MALDI-TOF): m/z 2193 $[\text{M}]^+$.

7. Diskuse

Z literární rešerše vyplývá, že pro přípravu libovolně substituovaných TQP je základním kamenem 2,3-dichlorchinoxalin-6,7-dikarbonitril (**2**). Mezi hlavní výhody této molekuly patří snadná výměna atomů chlórů za nukleofilní skupiny, čímž se dají připravit nejrůzněji substituované TQP. Při přípravě tohoto prekurzoru jsem vycházel z dříve uveřejněné studie³⁸. Při přípravě z látky (**1**) nedošlo po smíchání všech reaktantů a zahřívání po předepsanou dobu k dokonalému rozpuštění všech reaktantů (jak bylo popsáno v publikované práci), a proto jsem přidával další reakční činidla. I přesto, že jsem přidal další reaktanty, tak se při kontrole na TLC nic nezměnilo. Z toho lze předpokládat, že přidávání nadbytečného množství reaktantů nepřispívá dál k průběhu reakce a je tedy zbytečné a produkt vzniká i v suspenzi. Proto bych pro přípravu 2,3-dichlorchinoxalin-6,7-dikarbonitrilu doporučil postup podle výše zmiňované studie i přesto, že reakční směs vypadá, že není zcela rozpuštěna.

Při přípravě 2,3-di(2,6-diisopropylfenyl)chinoxalin-6,7-dikarbonitrilu (**3**) jsem vyzkoušel dva způsoby. V prvním případě jsem jako reakční prostředí pro prekurzor (**2**) a propofol zvolil K_2CO_3/THF , v druhém případě jsem z propofolu nejprve připravil fenolát, který jsem následně nechal reagovat s prekurzorem (**2**) v THF. Oba tyto postupy jsem již popsal ve své diplomové práci¹, kde jsem připravoval 5,6-di(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitril. Tedy molekulu se stejným substituentem, avšak základem nebyl chinoxalin, ale pyrazin. U pyrazinového i chinoxalinového derivátu se oba postupy lišily v reakčních časech (viz. tabulka 6) a výtěžcích. Zatímco u pyrazinového derivátu je rozdíl mezi výtěžky u použitých postupů velmi výrazný, jsou výtěžky u chinoxalinového derivátu podobné (viz tabulka 6).

Tabulka 6: Porovnání reakčního prostředí

Derivát	Reakce	Čas	Výtěžek
Pyrazinový	K_2CO_3/THF	24 hod	25%
Chinoxalinový		48 hod	52%
Pyrazinový	$NaOH/H_2O/THF$	30 min	83%
Chinoxalinový		70 min	56%

Z tabulky vyplývá, že pro přípravu 2,3-di(2,6-diisopropylfenyl)chinoxalin-6,7-dikarbonitrilu (**3**) je vhodnější použít postup přes fenolát sodný vzhledem k tomu, že celý postup je jednodušší a reakční doba je kratší. Tento postup se osvědčil jak u pyrazinového derivátu tak u chinoxalinového derivátu.

Největším problémem u aryloxy derivátů je tetramerizace. Při použití běžných cyklizačních metod dochází k nežádoucí transesterifikaci, čímž dojde ke vzniku jiného produktu. Pro aryloxy deriváty se mi nejvíce osvědčila¹ reakce prekurzoru s ZnQ_2Cl_2 (**4**). Tuto metodu jsem tedy použil i pro cyklizaci 2,3-di(2,6-diisopropylfenyl)chinoxalin-6,7-dikarbonitril (**3**) a studoval kinetiku a vliv teploty na průběh reakce viz. tabulka 5 (str. 38).

Při teplotě 260 °C nedochází k úplnému zreagování prekurzorů, a tudíž jsou výtěžky v porovnání s reakcí prováděnou při 310 °C malé. Teplota nesmí být ani příliš vysoká, neboť AzaPc a TQP jsou látky, které se spontánně rozkládají při teplotách vyšších než 350 °C⁴⁹. Za ideální lze považovat teplotu okolo 310 °C. Při této teplotě nedochází k rozkladným procesům a zároveň dochází ke zreagování veškerých prekurzorů.

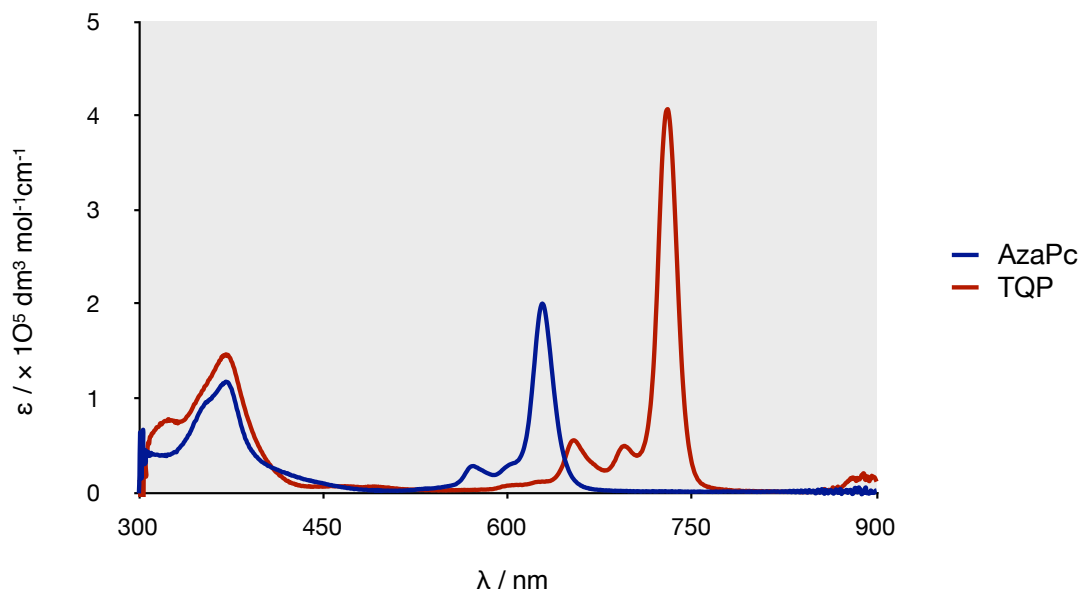
Ze studia kinetiky vyplývá, že reakce při 310 °C probíhá poměrně rychle. Hodnoty absorbancí (vyjadřující množství vznikajícího TQP) se po 20 min a 40 min již příliš neliší, a proto lze očekávat, že reakce je takřka u konce. Pro průběh reakce je proto dostačující 60-ti minutové zahřívání při 310 °C.

8. Závěr

Svou rigorózní prací jsem navázal na experimenty, které jsem prováděl během své praktické části k diplomové práci. Cílem obou prací bylo najít nejefektivnější způsob přípravy téhož aryloxyderivátu AzaPc (diplomová práce) a TQP (rigorózní práce). Mezi hlavní přednosti těchto derivátů patří téměř nulová agregace, vysoká rozpustnost v organických rozpouštědlech, vysoký extinkční koeficient a silná absorpce v červené oblasti viditelného světla. TQP (730 nm) mají oproti AzaPc (628 nm) posunut Q-pás k vyšším vlnovým délkám a zesílenou absorpci při této vlnové délce (viz. graf 1 a tabulka 7), což je z hlediska PDT žádoucí. U obou látek byly později na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv stanoveny základní fotofyzikální a fotochemické parametry⁵⁰. Kvantové výtěžky singletového kyslíku (ϕ_{Δ}) obou zmiňovaných derivátů jsou podobné AzaPc (0,61) a TQP (0,69). Z hlediska fluorescence jsou na tom o poznání lépe AzaPc ($\phi_F = 0,29$) než TQP ($\phi_F = 0,075$). To znamená, že TQP nebude snadné využít k detekci nádorové tkáně. Všechny zmíněné vlastnosti dělají z těchto derivátů AzaPc a zejména pak TQP ideální kandidáty pro PDT.

Tabulka 7: Vlastnosti AzaPc a TQP

	λ_{\max} [nm]	$\phi_{\Delta}^{[a]}$	$\phi_F^{[a]}/\lambda_F$ [nm]
AzaPc	628	0,61	0,29 / 637
TQP	730	0,69	0,075 / 735



Graf 1: Absorpční spektra AzaPc a TQP

A B S T R A K T

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát: Mgr. Petr Vůjtěch

Konzultant: PharmDr. Petr Zimčík Ph.D.

Název rigorózní práce: Syntéza zinečnatých komplexů aryloxy
tetrachinoxalinoporfyrasinů

Ve své rigorózní práci jsem se zaměřil na syntézu derivátu tetrachinoxalinoporfyrasinů (TQP). TQP mají oproti azaftalocyaninům (AzaPc) posunut absorpční Q-pás k delším vlnovým délkám, což je z hlediska fotodynamické terapie, pro kterou jsou deriváty plánované, výhodné. AzaPc i TQP jsou ploché konjugované systémy. Kvůli těmto vlastnostem mají sklon k seskupování za tvorby dimerů a oligomerů. Snadná agregace TQP je z hlediska fotodynamické terapie nežádoucí, protože snižuje produkci singletového kyslíku. Jednou z možností, jak potlačit agregaci, je navázání objemného substituentu na makrocycklus. Z tohoto důvodu jsem zvolil přípravu 2,3,11,12,20,21,29,30-oktakis(2,6-diisopropylfenoxi)-tetra[6,7]chinoxalinoporfyrasináto zinečnatého komplexu. Jelikož při syntéze aryloxy derivátů TQP nelze použít alkoholáty z důvodu transesterifikace, je nutné najít jiné prostředí. Ve své diplomové práci jsem došel k závěru, že aryloxy deriváty AzaPc lze nejlépe připravit v tavenině chloridu bis(chinolináto) zinečnatého. Proto byla tato metoda úspěšně aplikována i u aryloxy derivátů TQP. Rigorózní práce popisuje kinetiku této reakce a vliv teploty na průběh reakce. Dále je rozebírána příprava prekurzorů. Základní sloučeninou pro přípravu TQP je 2,3-dichlorchinoxalin-6,7-dikarbonitril. Z této látky lze pomocí nukleofilní substituce připravit nejrozličnější prekurzory TQP. V práci jsou popsány dva různé způsoby přípravy 2,3-di(2,6-diisopropylfenyl)chinoxalin-6,7-dikarbonitrilu. V prvním případě reaguje 2,3-dichlorchinoxalin-6,7-dikarbonitril s propofolem v suspenzi K_2CO_3 v THF, v druhém případě je z propofolu nejprve připraven fenolát, který následně reaguje s výše zmiňovanou látkou v THF. Druhý z těchto způsobů je efektivnější.

A B S T R A C T

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Kralové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Candidate: Mgr. Petr Vůjtěch

Consultant: PharmDr. Petr Zimčík Ph.D.

Title of Thesis: Synthesis of Zinc (II) Aryloxy Tetraquinoxalinoporphyrazines

The aim of my master thesis was synthesis of tetra[6,7]quinoxalinoporphyrazine derivative (TQP). Advantage of TQP is bathochromic shift when compared to azaphthalocyanines (AzaPc), which is more appropriate for PDT. AzaPc and TQP derivatives are large planar and conjugated systems, which tend to form aggregates. The aggregation is unfavorable property of TQP derivatives that reduces the singlet oxygen quantum yield. The most effective strategy to increase the ratio monomer/aggregates involves the use of bulky substituents attached to the TQP periphery. That is the reason why I focused on synthesis of 2,3,11,12,20,21,29,30-octa(2,6-diisopropylphenoxy)-tetra[6,7]quinoxalinoporphyrazinato zinc(II). Alkoxides cannot be used for cycloteramerization of aryloxy derivatives due to the well-described transesterification problems. As was shown in my diploma thesis the best way to synthesis of aryloxy derivatives of AzaPc is reaction with $Zn(quinoline)_2Cl_2$ in a melt. That is why this method was applied also for TQP derivatives. Kinetic of this reaction and the influence of temperature is described. Preparation of precursors was also studied. The basic building block for TQP is 2,3-dichloroquinoxaline-6,7-dicarbonitrile, which undergoes simple nucleophilic substitution and thus is an excellent substrate for the syntheses of various TQP precursors. There are two ways how to prepare 2,3-bis(2,6-diisopropylphenoxy)quinoxaline-6,7-dicarbonitrile described in this thesis. The first one involves addition of 2,6-diisopropylphenol into suspension of 2,3-dichloroquinoxaline-6,7-dicarbonitrile and K_2CO_3 in THF. In the other reaction 2,6-diisopropylphenol was added to water solution of NaOH and the mixture was dropped portionwise into a THF suspension of 2,3-dichloroquinoxaline-6,7-dicarbonitrile. The second reaction was found more effective.

- ¹ Vůjtěch, P. (2009) Syntéza zinečnatých komplexů aryloxy azaftalocyaninů, Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové.
- ² Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N., Reed, M. (2001). The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, 74, 656-669.
- ³ Moan, J., Peng, Q. (2003). An outline of the hundred-year history of PDT. *Anticancer Res.*, 23, 3591-3600.
- ⁴ Finsen, N. Phototherapy. London: Arnold, 1901.
- ⁵ American Academy of Dermatology (1994). Guidelines of care for phototherapy and photochemotherapy. Practice management information. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 31, 643- 648.
- ⁶ Fitzpatrick, T. B., Pathak, M. A. (1959). Historical Aspects of Methoxsalen and Other Furocoumarins. *J. Invest. Dermatol.*, 32, 229-231.
- ⁷ Raab, O. (1900). Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Z. Biol.*, 39, 524-546.
- ⁸ Mitton, D., Ackroyd, D.(2005) History of photodynamic therapy in Great Britain *Photodiag. Photodyn. Ther.* 2, 239-246.
- ⁹ Prime, J. Les accidentes toxiques par l'éosinate de sodium. Paris: Jouve and Boyer. 1900.
- ¹⁰ von Tappeiner, H., Jesionek, A. (1903). Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Münch. Med. Wochenschr.*, 47, 2042-2044.
- ¹¹ von Tappeiner, H., Jodlbauer, A. (1904). Über Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozan und Enzyme. *Dtsch. Arch. Klin. Med.*, 80, 427-487.
- ¹² Hausmann, W. (1911). The sensitizing action of haematoporphyrin. *Biochem. Z.*, 30, 276- 316.
- ¹³ Fisher, H., Meyer-Betz, F. (1912). Formation of porphyrins. *Z. Physiol. Chem.*, 82, 96-108.
- ¹⁴ Meyer-Betz, F. (1913). Untersuchungen über die Biologische (photodynamische) Wirkung des Haematoporphyrins und anderer Derivative des Blut- und Galenfarbstoffs. *Dtsch. Arch. Klin. Med.* 112, 476-503.
- ¹⁵ Policard, A. (1924). Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinee a la lumiere de Woods. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 91, 1423-1424.
- ¹⁶ Lipson, R. L., Baldes, E. J., Olsen, A. M. (1961). Use of a Derivative of Hematoporphyrin in Tumor Detection. *J. Natl. Cancer Inst.*, 26, 1-11.

- ¹⁷ Zimčik, P., Miletin, M. (2004) Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění I. Historie, základní princip. *Čes.slov. Farm.* 5, 219-224.
- ¹⁸ Dougherty, T. J., Kaufman, J. E., Goldfarb, A., Weishaupt, K. R., Boyle, D., Mittleman, A. (1978). Photoradiation Therapy for Treatment of Malignant-Tumors. *Cancer Res.*, 38, 2628-2635.
- ¹⁹ Sharman, W. M., Allen, C. M., van Lier, J. E. (2000) Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods Enzymol.* 319, 376–400.
- ²⁰ Sternberg, E. D., Dolphin, D., Bruckner, C. (1998). Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron*, 54, 4151-4202.
- ²¹ Sharman, W. M., Allen, C. M., van Lier, J. E. (1999). Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov. Today*, 4, 507-517.
- ²² Jori, D., Spikes, J. D. (1990) Photothermal sensitizers: Possible use in tumor therapy *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 6, 93-101
- ²³ Fingar, V. H., Wieman, T. J., Karavolos, P. S., Doak, K. W., Ouellet, R. and Vanlier, J. E. (1993). The Effects of Photodynamic Therapy Using Differently Substituted Zinc Phthalocyanines on Vessel Constriction, Vessel Leakage and Tumor Response. *Photochem. Photobiol.*, 58, 251-258.
- ²⁴ McMahon, K. S., Wieman, T. J., Moore, P. H., Fingar, V. H. (1994). Effects of Photodynamic Therapy Using Mono-L-Aspartyl Chlorin E(6) on Vessel Constriction, Vessel Leakage, and Tumor Response. *Cancer Res.*, 54, 5374-5379.
- ²⁵ MacDonald, I. J., Dougherty, T. J. (2001). Basic principles of photodynamic therapy. *J. Porphyr. Phthalocyanines*, 5, 105-129.
- ²⁶ Gollnick, S. O., Vaughan, L., Henderson, B. W. (2002). Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy. *Cancer Res.*, 62, 1604-1608.
- ²⁷ Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, Jori, B.W., Kessel, G., Korbek, D., Moan, M., Peng, Q. (1998) Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, 90, 889.
- ²⁸ Moan, J. (1984) The photochemical yield of singlet oxygen from porphyrins in different states of aggregation. *Photochem. Photobiol.* 39, 445-449
- ²⁹ Moan, J., Berg, K. (1991) The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* 53, 549-553
- ³⁰ Boye, E., Moan, J. (1980) The photodynamic effect of hematoporphyrin on DNA. *Photochem. Photobiol.* 31, 223-228
- ³¹ Nyman, E. S., Hynninen, P. H. (2004). Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.*, 73, 1-28.
- ³² Dougherty, T. J., Potter W. R. (1991) Of what value is a highly absorbing photosensitizer in PDT? *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 8, 223.

- ³³ Stables, G.I., Ash, D.V. (1996) Photodynamic therapy, *Cancer Treat. Rev.*, 21, 311-23.
- ³⁴ Jori, G., Beltrami, M., Reddi, E., Salvato, B., Pagnan, A., Ziron, L., Tomlo, L., Tsanov, T. (1984) Evidence for a major role of plasma lipoproteins as haematoporphyrin carriers in vivo. *Cancer Lett.* 24,291-297.
- ³⁵ Zimčik, P., Miletin, M. (2004) Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění I. Přehled fotosenzitizerů. *Čes. slov. Farm.* 6, 271-279.
- ³⁶ Konan, Y. N., Gurny, R., Allemann, E. (2002) State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 66, 89-106.
- ³⁷ Calzavara-Pinton, P. G., Venturini, M., Sala, R. (2005). A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 78, 1-6.
- ³⁸ Musil, Z., Zimčik, P., Miletin, M., Kopecký, K., Lenco, J. (2007) Synthesis, separation and UV/Vis spectroscopy of pyrazino-quinoxalinopyrhyrazine macrocycles. *Eur. J. Org. Chem.*, 4535-4542.
- ³⁹ Mitzel, F., FitzGerald, S., Beeby, A., Faust, R. (2001) Octaalkynyltetra[6,7] quinoxalinaporphyrazines: a new class of photosensitisers with potential for photodynamic therapy. *Chem. Commun.* 2596-2597.
- ⁴⁰ Kudrevich, S. V., Lier, J. E. (1996) Azaanalogs of phthalocyanine: syntheses and properties. *Coord. Chem. Rev.* 156, 163-182.
- ⁴¹ Kostka, M., Zimcik, P., Miletin, M., Klemnera, P., Kopecky, K. and Musil, Z. (2006). Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol. A, Chem.*, 178, 16-25.
- ⁴² Spikes, J. D., van Lier J. E., Bommer J. C. (1995) A comparison of the photoproperties of zinc phthalocyanine and zinc naphthalocyanine tetrasulfonates: model sensitizers for photodynamic therapy of tumors. *J. Photochem. Photobiol. A, Chem.*, 91, 193-198
- ⁴³ Youngblood, W. J. (2006) Synthesis of New *trans*-A₂B₂ Phthalocyanine Motif as a Building Block for Rodlike Phthalocyanine Polymers. *J. Org. Chem.* 71, 3345-3356.
- ⁴⁴ Burmester, Ch., Rüdiger, F. (2008) A Reliable Route to 1,2-Diamino-4,5-phthalodinitrile, *Synthesis* 8, 1179-1181
- ⁴⁵ Mitzel, F., FitzGerald, S., Beeby, A., Faust, R. (2003) Acetylenic Quinoxalinoporphyrazines as Photosensitisers for Photodynamic Therapy. *Chem. Eur. J.* 9,1233-1241.
- ⁴⁶ Mørkved, E. H., Ossletten, H., Kjösen, H. (1999) Preparation of Octa(alkoxy) Azaphthalocyanines. *Acta. Chem. Scand.* 53,1117-1121.

- ⁴⁷ Makhseed, S., Samuel, J., Ibrahim, F. (2008) Synthesis and characterization of non-aggregating octa-substituted azaphthalocyanines bearing bulky phenoxy substituents. *Tetrahedron* 64, 8871-8877.
- ⁴⁸ Mørkved, E. H., Afseth, N. K., Kjösen, H. (2006) Zn(quinoline)₂Cl₂: an efficient reagent for synthesis of zinc azaphthalocyanines with thiomorpholine- or pyrazole substituents. *J. Porphyr. Phthalocyanines* 10, 1301-1308
- ⁴⁹ Makhseed, S., Samuel, J., Ibrahim, F. (2008) Synthesis and spectral properties of tetrapyrazinoporphyrazinatometal complexes derived from a sterically hindered phenol. *ARKIVOC* 10, 85-94
- ⁵⁰ Novakova, V., Zimcik, P., Miletin, M., Kopecky K. and Musil, Z. (2010) Tetra[6,7]quinoxalinoporphyrazines: The Effect of an Additional Benzene Ring on Photophysical and Photochemical Properties. *Eur. J. Org. Chem.* 4, 732-739