

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY



**Nové syntetické postupy pro neperiférně  
substituované ftalocyaniny**

**DIPLOMOVÁ PRÁCA**

**Lucia Kočiščáková**



**Vedúci diplomovej práce: doc. PharmDr. Petr Zimčík, PhD.**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2018**

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

V Hradci Králové 14.05.2018

## **POĎAKOVANIE**

Na tomto mieste by som sa rada poďakovala svojmu školiteľovi doc. PharmDr. Petrovi Zimčíkovi, PhD. za pomoc a odborné rady, ktoré mi pomohli pri vypracovaní tejto práce. Taktiež by som rada poďakovala ďalším členom skupiny azaftalocyanínových farbív Mgr. Jánovi Kollárovi, Mgr. Jiřímu Demuthovi a Mgr. Filipovi Kostelanskému.

Za finančnú podporu ďakujem Grantovej agentúre Českej republiky, projekt číslo 17-19094S a Špecifickému vysokoškolskému výzkumu SVV 260 401.

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát **Lucia Kočišáková**

Školiteľ **Doc. PharmDr. Petr Zimčík, PhD.**

Názov diplomovej práce Nové syntetické postupy pro neperiférně substituované ftalocyaniny

Ftalocyaníny sú makrocyclické zlúčeniny štruktúrne podobné porfyrinom, ktoré sa používajú ako fotosenzitizéry vo fotodynamickej terapii v liečbe predovšetkým nádorových ochorení. Princípom fotodynamickej terapie je aktivácia fotosenzitizéru pomocou určitej vlnovej dĺžky svetla (v oblasti viditeľného spektra), ktoré fotosenzitizér absorbuje a dochádza k zmene jeho stavu na excitačný s vyššou energiou. Takto excitovaný fotosenzitizér sa potom zbavuje energie, pričom sa vytvára reaktívna molekula singletového kyslíka, ktorý spôsobuje poškodenie nádorových buniek.

V mojej diplomovej práci sme syntetizovali predovšetkým prekurzory ftalocyanínov, teda deriváty ftalonitrilu. Boli to 3,6-disubstituované ftalonitrily, pretože substitúciou v týchto polohách dochádza k zlepšeniu vlastností finálnych ftalocyanínov ako je napríklad posun vlnovej dĺžky absorbovaného svetla do infračerveného spektra. Ako postup syntézy sme zvolili nukleofilnú substitúciu a coupling podľa Buchwald-Hartwiga, pričom sme menili podmienky, pri ktorých reakcie prebiehali. Potom sme porovnávali výsledné množstvá produktov v daných reakciách.

## ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department	Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis
Candidate	<b>Lucia Kočišćáková</b>
Supervisor	<b>Doc. PharmDr. Petr Zimčík, PhD.</b>
Title of Thesis	Novel Synthetic Approaches Toward Non-Peripherally Substituted Phthalocyanines

Phthalocyanines are macrocyclic compounds structurally related to porphyrins, which are used as photosensitizers in photodynamic therapy in the treatment of tumor diseases. The principle of photodynamic therapy is based on activation of photosensitizer by specific wave length of light (in the area of visible spectrum), that is absorbed by photosensitizer. The excited photosensitizer releases the absorbed energy by generation of reactive molecule of singlet oxygen that causes damage to cancer cells.

In my diploma thesis, we synthesized precursors for phthalocyanines, derivatives of phthalonitrile. I was focused on the 3,6-disubstituted phthalonitriles because with the non-peripheral substitution of the final phthalocyanines leads to better, such as significant red shift of the main absorption band. We chose nucleophilic substitution and Buchwald-Hartwig coupling as the main synthetic approaches and we compared different reaction conditions to optimize them.

# Obsah

1.	ZOZNAM SKRATIEK.....	8
2.	CIEĽ PRÁCE.....	9
3.	TEORETICKÁ ČASŤ .....	10
3.1	FTALOCYANÍNY .....	10
3.2	FOTODYNAMICKÁ TERAPIA.....	11
3.2.1	MECHANIZMUS PDT .....	12
3.2.1.1	NEKRÓZA, APOPTÓZA, AUTOFÁGIA.....	13
3.2.1.2	PÔSOBENIE NA CIEVY.....	15
3.2.1.3	IMUNITNÁ ODPOVEĎ BUNIEK .....	16
3.2.2	ĎALŠIE VYUŽITIE PDT .....	18
3.2.2.1	PROTINÁDOROVÉ VAKCÍNY .....	18
3.2.2.2	ANTIMIKROBIÁLNA LIEČBA .....	18
3.2.2.3	LIEČBA VÍRUSOVÝCH INFEKCIÍ .....	19
3.3	FOTOSENZITIZÉRY .....	20
3.3.1	IDEÁLNE VLASTNOSTI PS .....	20
3.3.2	PRVÁ GENERÁCIA FOTOSENZITIZÉROV .....	21
3.3.3	DRUHÁ GENERÁCIA FOTOSENZITIZÉROV.....	22
3.3.3.1	PORFYRINOVÉ DERIVÁTY .....	22
3.3.3.2	NEPORFYRINOVÉ DERIVÁTY .....	32
3.3.4	TRETIA GENERÁCIA FOTOSENZITIZÉROV.....	35
4.	METODICKÁ ČASŤ.....	37
5.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	42
5.1	PRÍPRAVA 3,6-DIBRÓMFTALONITRILU (1) .....	42
5.2	PRÍPRAVA 3,6-BIS(TRIFLUROMETYLSULFONYLOXY)FTALONITRILU (2).....	43
5.3	VŠEOBECNÝ POSTUP NUKLEOFILNEJ SUBSTITÚCIE .....	44
5.4	VŠEOBECNÝ POSTUP BUCHWALD-HARTWIGOVHO COUPLINGU .....	45
5.5	KVANTIFIKÁCIA PRODUKTOV.....	47

5.6	ZOSTROJENIE KALIBRAČNEJ KRIVKY.....	48
5.7	CYKLIZÁCIA S POUŽITÍM LÍTIA.....	50
5.8	CYKLIZÁCIA S POUŽITÍM HORČÍKA.....	50
6.	VÝSLEDKY .....	51
6.1	PRÍPRAVA VÝCHODISKOVÝCH LÁTOK.....	51
6.2	PRÍPRAVA 3,6-DIETYLAMINOFTALONITRILU (4) .....	52
6.2.1	NUKLEOFILNÁ SUBSTITÚCIA.....	52
6.2.2	BUCHWALD-HARTWIG COUPLING .....	53
6.3	HODNOTENIE.....	54
7.	DISKUSIA .....	57
8.	ZÁVER .....	59
9.	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	60

## 1. ZOZNAM SKRATIEK

BuOH	butanol
DAMPs	damage-associated molecular patterns (molekulárne vzory asociované s poškodením)
F	intenzita fluorescencie
FDA	Food and Drug Administration (Správa potravín a liečiv)
G-	Gram negatívne
G+	Gram pozitívne
HpD	hematoporphyrin derivates (hematoporfyrinové deriváty)
HPV	human papilloma virus (ľudský papilloma vírus)
ICAM 1	intercellular adhesion molecule 1 (vnútrobunková adhezívna molekula 1)
ICD	immunologic cell death (imunologická smrť bunky)
IL	interleukín
M	atóm kovu
PDD	photodynamic diagnosis (fotodynamická diagnóza)
PDT	photodynamic therapy (fotodynamická terapia)
PS	photosensitizer (fotosenzitizér)
<i>t</i> BuOH	terciárny butanol
TLC	thin layer chromatography (tenkovrstvová chromatografia)
TNF	tumor nekrotizujúci faktor



## 2. CIEĽ PRÁCE

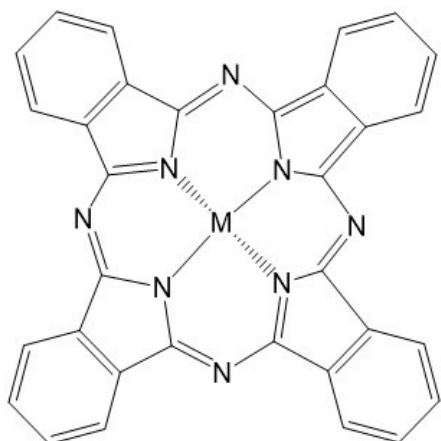
Hlavnou úlohou v rámci mojej diplomovej práce bolo vyskúšať nové postupy v syntéze neperiférne amino substituovaných ftalocyanínov. Následne sme tieto syntetické postupy optimalizovali, aby sme získali produkty v čo najväčšom možnom výťažku.

Neperiférnou substitúciou ftalocyaninových zlúčenín získame potenciálne posun absorpčného spektra nad vlnovú dĺžku 800 nm, čo je už oblasť infračerveného spektra a daná látka by mohla byť využitá ako potenciálny fotosenzitizér vo fotodynamickej terapii s lepšími vlastnosťami.

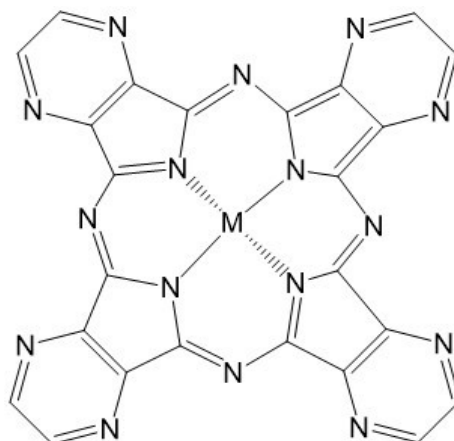
### 3. TEORETICKÁ ČASŤ

#### 3.1 FTALOCYANÍNY

Ftalocyaníny (Obr. 1) sú makrocyclické zlúčeniny odvodené od porfyriu, ktoré sú využívané ako fotosenzitizéry vo fotodynamickej terapii (photodynamic therapy, PDT). Vďaka konjugovanému systému dvojitéch väzieb majú modré, zelené až fialové sfarbenie. Azaftalocyaníny (Obr. 2) sú analógy ftalocyanínov, ktoré majú v makrocyclickom kruhu namiesto atómu uhlíka atóm dusíka. Ďalších osem atómov dusíka na periférii azaftalocyanínov zvyšuje ich rozpustnosť a preto majú väčšie množstvo spôsobov použitia.<sup>1</sup> Ftalocyaníny aj azaftalocyaníny obsahujú centrálné viazaný atóm kovu (M), najčastejšie je to zinok, horčík alebo hliník.

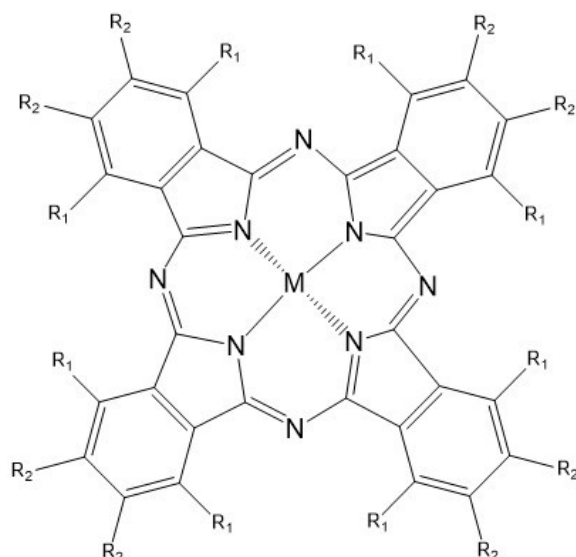


Obr. 1 základná štruktúra ftalocyanínu



Obr. 2 základná štruktúra azaftalocyanínu

Nesubstituované ftalocyaníny sú málo rozpustné vo vode a to limituje ich použitie. Pomocou substitúcie na miestach  $R_1$  a  $R_2$  (Obr. 3) je možné meniť ich fyzikálno-chemické vlastnosti, ako napríklad rozpustnosť vo vode, acidobazické vlastnosti alebo vlnovú dĺžku, pri ktorej absorbujú svetlo.



Obr. 3 Príklady substitúcie ftalocyanínov

Výhody ftalocyanínov spočívajú v intenzívnej absorpcii svetla v červenej oblasti spektra, teda 600-700 nm, sú veľmi účinné v produkcii singletového kyslíka a ich chemická modifikácia je relatívne jednoduchá.<sup>2</sup>

Ftalocyaníny boli pôvodne používané ako priemyselné modro-zelené farbivá.<sup>3</sup> V posledných desiatkach rokov sa začali hlbšie skúmať ich vlastnosti a ich použitie v iných oblastiach, okrem iných aj vo fotodynamickej terapii ako fotosenzitizéry.

### 3.2 FOTODYNAMICKÁ TERAPIA

Fotodynamická terapia je neinvazívna metóda liečby predovšetkým nádorových ochorení, ktorá predstavuje veľký prísľub v tejto oblasti.<sup>4,5</sup> Ide o selektívnu deštrukciu a cytotoxické pôsobenie na nežiadúce nádorové bunky na základe fotochemickej reakcie svetlom aktivovanej molekuly fotosenzitizéra.<sup>6</sup> Terapeutický potenciál svetla bol vyžívaný tisícky rokov. Už staroveké civilizácie v Egypte, Číne alebo Indii používali svetlo v kombinácii s určitými chemikáliami na liečbu vitiliga, psoriázy a rakoviny kože.<sup>6</sup> Prvý fotosenzitizér (porfimer) bol schválený v roku 1993 v Kanade na profylaktickú liečbu rakoviny močového mechúra. Následne bol porfimer schválený v Holandsku a Francúzsku na liečbu pokročilého štádia rakoviny pažeráka a pľúc.<sup>6,7</sup> Postupom času pribúdali ďalšie krajiny, kde boli fotosenzitizéry schválené a taktiež sa rozširovali aj

okruhy ich použitia. V súčasnosti sa fotodynamická terapia využíva na liečbu rakoviny oka<sup>8,9</sup>, prostaty<sup>10</sup>, žlčovodu<sup>11</sup>, prs<sup>12</sup>, nemelanómovej rakoviny kože<sup>13</sup> a podobne.

Pre priebeh PDT sú dôležité tri zložky: svetlo, fotosenzitizér (photosensitizer, PS) a singletový kyslík.<sup>4</sup> PS je netoxický, prípadne minimálne toxický a môže byť aplikovaný lokálne alebo systémovo.<sup>14</sup>

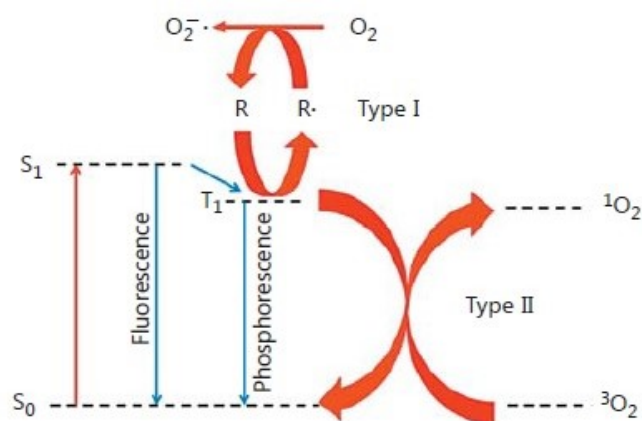
PDT má oproti klasickej chemoterapii viaceré výhody, ako napríklad nižšia systémová toxicita a relatívne selektívna deštrukcia nádoru, vďaka preferovanému umiestneniu PS v rámci tumoru a ožiarení len v požadovanej oblasti. V porovnaní s ostatnými postupmi liečby rakoviny je u PDT vysoká pravdepodobnosť vyliečenia a nízka možnosť opakovaného návratu rakoviny.<sup>15</sup> Ďalšou výhodou PDT je, že PS sa väčšinou nedostane do jadra bunky a z tohto dôvodu je poškodenie DNA a mutagenita takmer zanedbateľné.<sup>14</sup> Použitím červeného svetla sa taktiež minimalizuje riziko poškodenia DNA, pretože energia fotónu je na to príliš nízka - na rozdiel od UV svetla alebo rentgenového a gama žiarenia, ktoré sa používajú v klasickej rádioterapii.<sup>14</sup>

Nevýhodou PDT je fototoxicita, preto je dôležité ju minimalizovať. Okrem toho, jedna štúdia ukázala, že pri liečbe PDT rakoviny kože, boli pozorované nežiadúce účinky ako bolesť a zápalové reakcie.<sup>16</sup> Intenzita bolesti korelovala s anatomickou lokalizáciou nádoru. Pacienti s lokalizovaným nádorom v oblasti hlavy alebo krku sa sťažovali na silnejšiu bolesť, v porovnaní s nádormi lokalizovanými v oblasti trupu a končatín.<sup>17</sup> Ďalšou nevýhodou klasickej PDT je, že svetlo neprenikne do hlbších vrstiev kože, preto je možné ju použiť len pri povrchovo lokalizovaných nádoroch.<sup>18</sup>

### 3.2.1 MECHANIZMUS PDT

Úplne presný mechanizmus PDT je ešte stále predmetom výskumov.<sup>6,19</sup> Základom na molekulárnej úrovni je skutočnosť, že svetlo špecifickej vlnovej dĺžky (ktorá odpovedá absorpčnému spektru PS) aktivuje PS a to vedie k sérii fotochemických reakcií, ktoré spôsobujú deštrukciu ideálne len nežiadúcich buniek, bez poškodenia zdravého tkaniva.<sup>19,20</sup> Aktivovaním PS svetlom dochádza k zmene jeho stavu na excitovaný s vyššou energiou (excitovaný singletový stav), ktorého životnosť je veľmi krátka (nanosekundy).<sup>5,21</sup> Aktivovaný PS sa zbavuje energie viacerými spôsobmi. Môže to byť uvoľnením energie vo forme svetla (fluorescencia) alebo tepla.<sup>21</sup> Týmto spôsobom sa dá

určiť ohraničenie tumoru, ktoré je výhodné pre diagnostiku nádoru.<sup>6,19</sup> Singletový stav PS môže prejsť cez medzisystémový prechod do excitovaného tripletového stavu,<sup>22</sup> ktorý sa zbavuje energie vytvorením radikálu, označované ako fotochemická reakcia I. typu alebo tvorbou singletového kyslíka, označované ako fotochemická reakcia II. typu, ktorá je pre PDT najvýznamnejšia (Obr. 4).<sup>19</sup> Singletový kyslík má krátku životnosť, ktorá sa pohybuje rádovo v nanosekundách, a preto má aj veľmi krátky dosah, rádovo v desiatkach nanometroch.<sup>19</sup> PDT je toxická pre nádorové bunky troma spôsobmi: priama fototoxická aktivita spôsobujúca nekrózu, apoptózu alebo autofágiu (Obr. 5), deštrukcia cievneho systému nádoru (Obr. 6) alebo zápalové poškodenie buniek, ktoré je sprostredkované imunitou (Obr. 7).<sup>20</sup>



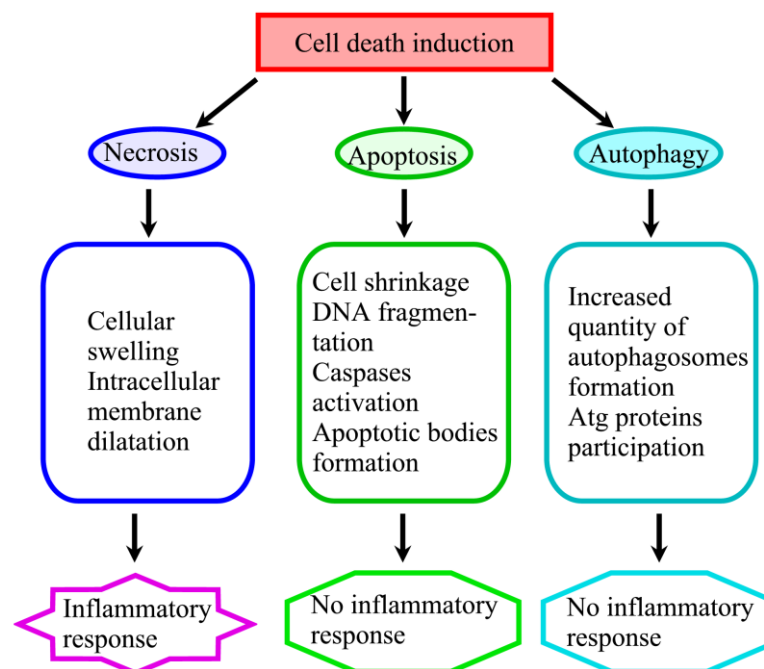
Obr. 4 Schéma aktivácie fotosenzitizéru a mechanizmus tvorby reaktívneho singletového kyslíka. Prevzaté z BENOVA, L. *Photodynamic therapy: Current Status and Future Directions. Med. Princ. Pract*, 2015, 24(1), 14-28

### 3.2.1.1 NEKRÓZA, APOPTÓZA, AUTOFÁGIA

Nekróza je patologický proces, ktorý je často spôsobený vonkajšími faktormi, ako napríklad infekcia, toxíny alebo trauma. Pre nekrózu je charakteristická dezintegrácia organel a napokon lýza bunky.<sup>23</sup> PS je často lokalizovaný v membráne bunky alebo v lyzozóme, a to pravdepodobne blokuje cesty apoptózy a následne nastáva nekróza bunky.<sup>17</sup>

Apoptóza je programovaná smrť bunky a je pre ňu charakteristické kondenzovanie jadra a celkové zmrštenie bunky, ktorého sa zúčastňujú kaspázy, endonukleázy a ďalšie enzýmy.<sup>16,24</sup> Je to jeden z hlavných mechanizmov smrti bunky pri PDT. Ak nenastane okamžite nekróza, apoptóza je druhá najčastejšia forma smrti bunky.<sup>24</sup>

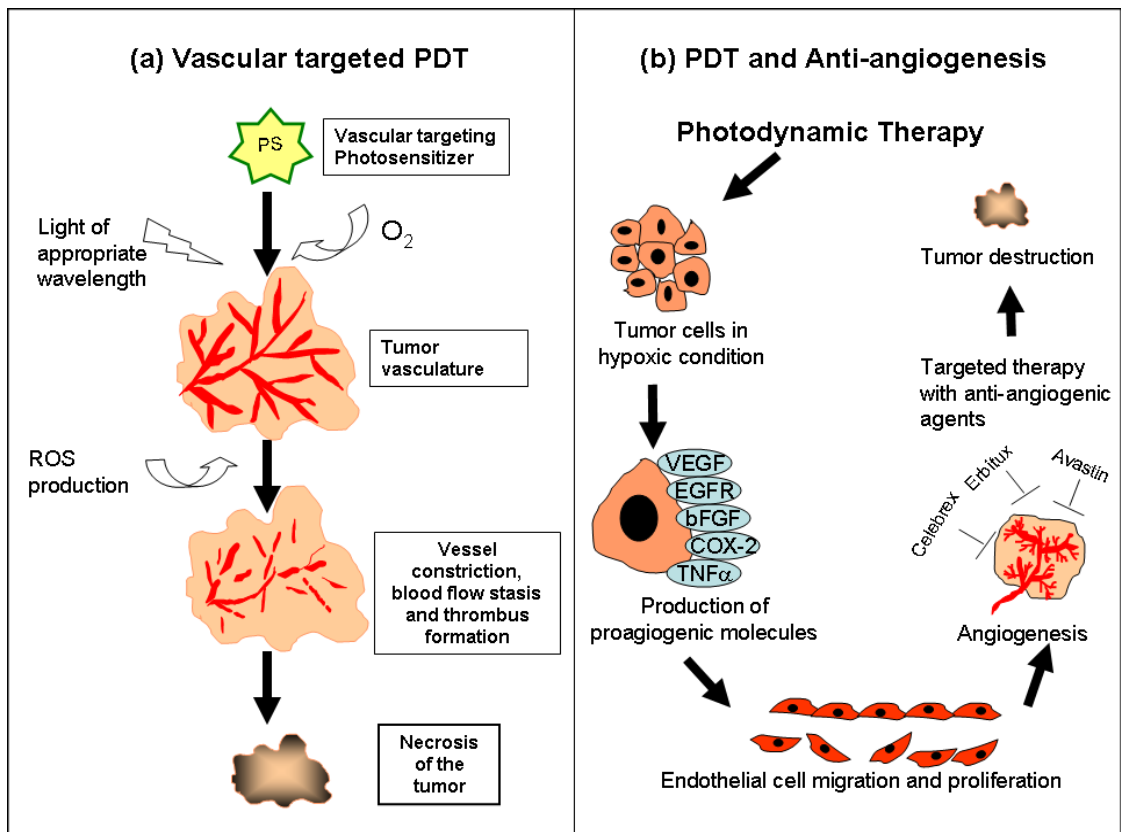
Autofágia doslovne znamená seba-pojedanie a je to deštrukcia intracelulárnych componentov bunky lyzozómami, ktoré obsahujú degradačné enzýmy.<sup>18</sup> Dnes sú známe tri formy autofágie: makroautofágia (deštrukcia organel), mikroautofágia (deštrukcia makromolekul) a autofágia sprostredkovaná chaperonmi.<sup>25</sup> Viaceré štúdie ukázali, že smrť bunky pri PDT je úzko spojená s aktiváciou autofágie.<sup>17</sup>



Obr. 5 Grafické znázornenie možností smrti bunky po PDT a základné vlastnosti, ktoré sú pre nich charakteristické. Prevzaté z ESCOBAR-SÁNCHEZ, M. L.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, L.; SANDOVAL-RAMIREZ, J. *Steroidal Saponins and Cell Deaths in Cancer*. In: Tobias M. Ntuli (Ed.) *Cell Death: Autophagy, Apoptosis and Necrosis*. InTech, 2015., ISBN 978-953-51-2236-4

### **3.2.1.2 PÔSOBENIE NA CIEVY**

V endotelových bunkách kardiovaskulárneho systému, podobne ako v bunkách nádoru môže byť kumulovaný PS. Ten je aktivovaný vhodnou vlnovou dĺžkou svetla a nasleduje tvorba singletového kyslíka. Nastáva narušenie cievnej steny a krv neprúdi do nádoru, ktorý kvôli tomu trpí nedostatkom kyslíka.<sup>19</sup> PDT taktiež môže spôsobiť poškodenie cytoskeletu endotelu a stiahnutie endotelových buniek, čo spôsobuje zväčšenie medzibunkových priestorov endotelu.<sup>26</sup> Kvôli hypoxii nastáva uvoľnenie toxických chemikálií, prebytku vápnika a ďalších bunkových zvyškov. Dochádza k zablokovaniu a totálnemu kolapsu cievneho systému zásobujúceho nádor a nastáva nekróza.<sup>19</sup> Po liečbe sa ale môže stať, že nádorové cievy a bunky môžu znovu vyrásť. Hypoxia totiž podporuje tvorbu signalizačných kaskád ako napríklad VEGF (vascular endothelial growth factor), cyklooxygenáza 2, metaloproteinázy a ďalšie cytokíny, ktoré podporujú rast ciev. Z tohto dôvodu je snaha o optimalizáciu PDT použitím anti-angiogénnych látok, ktoré inhibujú angiogenetické rastové faktory, podporujúce tvorbu ciev (Obr. 6).<sup>27</sup>



Obr. 6 a) účinok PDT na cievy, b) PDT a súčasné použitie anti-angiogénnych látok. Prezaté z OLIVIO, M. et al. Targeted Therapy of Cancer Using Photodynamic Therapy in Combination with Multi-faceted Anti-tumor Modalities. *Pharmaceuticals*, 2010, 3, 1507-1529

### 3.2.1.3 IMUNITNÁ ODPOVEĎ BUNIEK

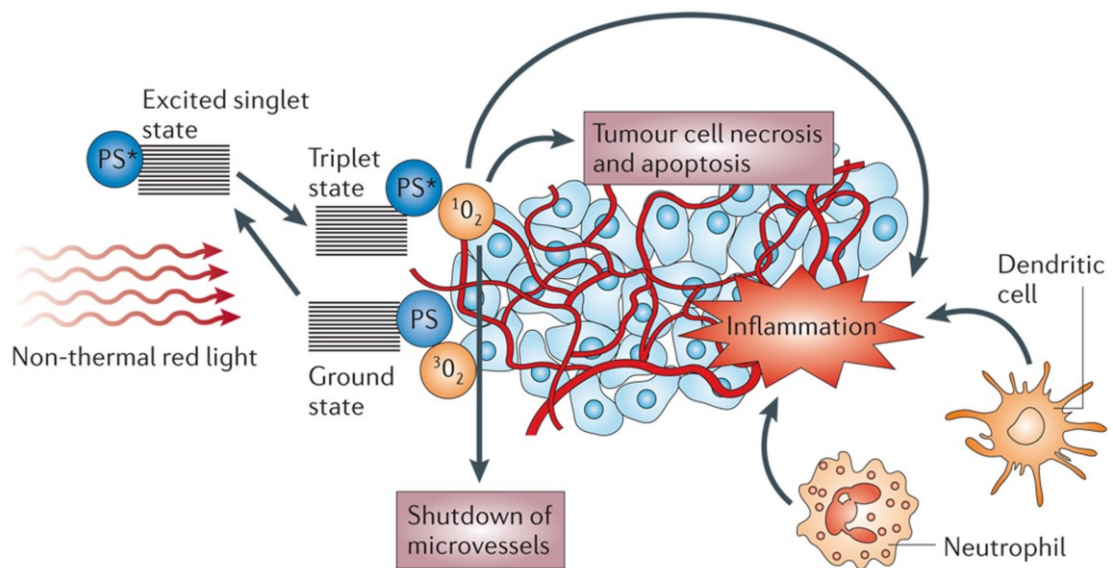
PDT liečba v mieste podania spôsobuje okrem vyššie spomínaných účinkov aj zápalovú reakciu, ktorá spôsobuje imunitnú odpoveď.<sup>28</sup> Akútny zápal je charakterizovaný zvýšenou expresiou pro-zápalových cytokínov, vrátane TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-6, adhézných molekúl E-selektín a ICAM-1, a rýchlu akumuláciou leukocytov.<sup>29,30</sup> Oxidatívny stres, kvôli masívnej produkcii reaktívneho kyslíka, spôsobuje na povrchu buniek expresiu a sekréciu DAMPs (damage-associated molecular patterns). Tieto molekuly signalizujú zranenie alebo smrť bunky.<sup>28</sup> Rozpoznanie DAMPs cez ich špecifické receptory imunitnými bunkami pomáha signalizovať hrozbu pre imunitný systém a umožňuje vhodnú imunitnú odpoveď.<sup>28</sup>



Odpoveď na akútny zápal po PDT zahŕňa aj migráciu neutrofilov na miesto zápalu. Na efektívnu protinádorovú odpoveď je potrebná rýchla a silná migrácia neutrofilov.<sup>31</sup> Je taktiež známe, že po nízkych dávkach PDT sú aktivované makrofágy, ale pri vysokých dávkach PDT sú naopak zabíjané.<sup>31</sup> Makrofágy fagocytujú rakovinové bunky poškodené po PDT a prezentujú bielkoviny z nádoru pomocným CD4 T-lymfocytom, ktoré potom aktivujú cytotoxické CD8 T-lymfocyty.

Táto imunitná reakcia nastáva nie len v oblasti liečenej PDT, ale môže nastať aj vo vzdialenejších oblastiach lymfatického tkaniva. Cytotoxické T-lymfocyty spôsobujú nekrózu, ale môžu indukovať aj cestu apoptózy, kdekoľvek sa vyskytnú nádorové bunky, dokonca aj keď je PDT ukončená.<sup>19</sup>

U pacientov liečených PDT sa vyskytujú zvýšené hladiny viacerých cytokínov a histologické hodnotenie liečeného nádorového tkaniva vykazuje jeho infiltráciu imunitnými bunkami, čo taktiež poukazuje na imunomodulačný efekt PDT.<sup>19</sup>



Obr. 7 Mechanizmy pôsobenia PDT na nádor. Prevzaté z CASTANO, A. P.; MROZ, P.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy and anti-tumor immunity. *Nat. Rev. Cancer*, 2006, 6(7), 535-545

## 3.2.2 ĎALŠIE VYUŽITIE PDT

### 3.2.2.1 PROTINÁDOROVÉ VAKCÍNY

PDT má potenciál generovať protinádorové vakcíny. Gollnick *et al*<sup>27</sup> prehlásil, že lyzáty nádorových buniek po PDT sú silno imunogénne a sú to efektívne protinádorové vakcíny.<sup>27</sup> Tieto vakcíny boli nádorovo špecifické, vyvolali odpoveď cytotoxických T-buniek a nevyžadovali podávanie ďalších pomocných látok aby boli efektívne.<sup>30</sup>

Chirurgicky odstránené nádorové tkanivo vystavené fotodynamickej terapii *ex vivo*, slúži ako veľmi dobrý zdroj autológnych terapeutických protinádorových vakcín.<sup>33</sup> Tieto vakcíny, pozostávajúce z rakovinových buniek, ktoré podstupujú ICD (immunologic cell death), pritiahnu hostiteľské fagocytové bunky špecializované na odstránenie zvyškov, ktoré spracujú a prezentujú nádorový antigénový materiál obsiahnutý v rakovinových bunkách a optimálnym spôsobom pomáhajú rozvoju adaptívnej imunitnej odpovede proti pôvodnému nádoru.<sup>33</sup>

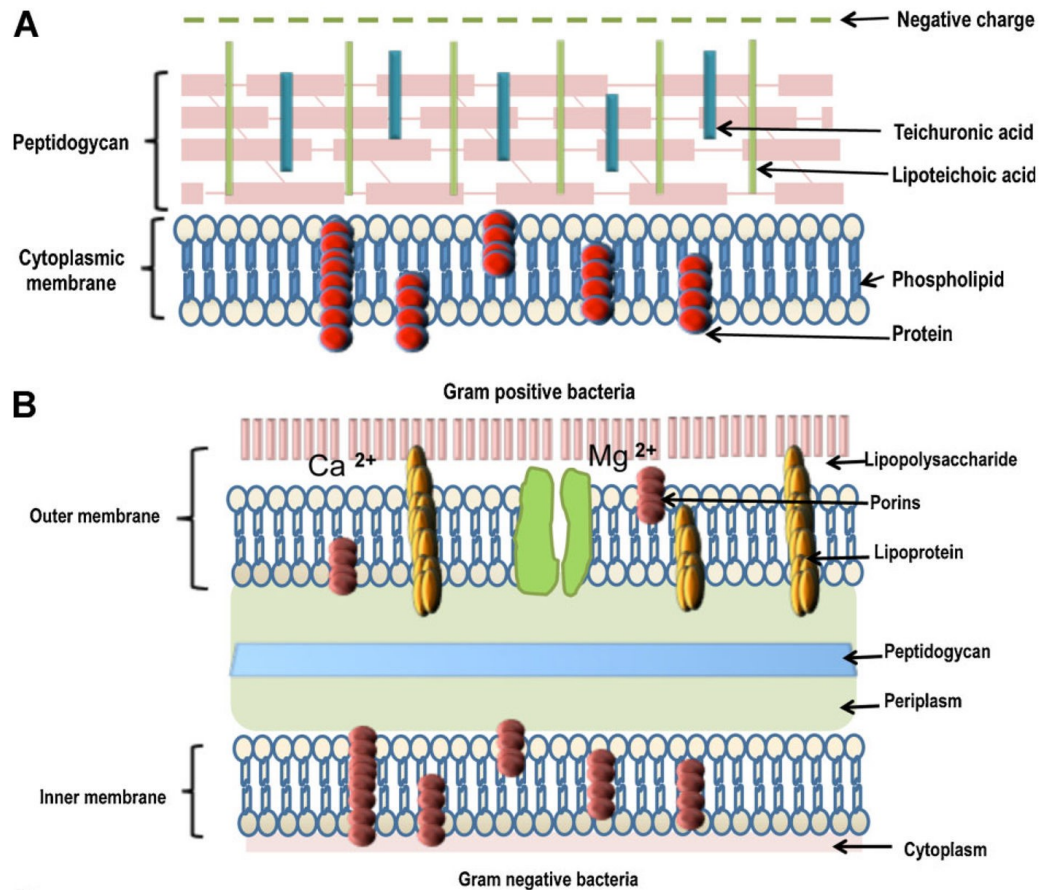
### 3.2.2.2 ANTIMIKROBIÁLNA LIEČBA

Aj keď PDT nie je prvou voľbou antimikrobiálnej liečby, v posledných rokoch, sa objavuje nárast baktérii rezistentných na antibiotiká a antibakteriálne chemoterapeutiká. Z tohto dôvodu sa v súčasnosti obnovil záujem o alternatívne lokalizované antimikrobiálne terapie.<sup>34</sup>

Antimikrobiálna PDT je účinnejšia v inaktivácii G<sup>+</sup> baktérii v porovnaní s G<sup>-</sup> baktériami. Táto rozdielna citlivosť baktérii na PDT je pravdepodobne spôsobená rozdielmi v štruktúre bunkovej steny baktérií (Obr. 8).<sup>34,35</sup>

Väčšina PS na antimikrobiálnu PDT sú zatiaľ testované len *in vitro* a *in vivo* na zvieracích modeloch. Značné úsilie je vynakladané do optimalizácie týchto zlúčenín, ako napríklad selektivita bakteriálnych buniek nad hostiteľskými bunkami cicavcov a maximalizácia absorpcie vo vzdialenej červenej a blízkej infračervenej oblasti spektra. Niektoré PS sa používajú aj v klinických hodnoteniach, sú to napríklad fenotiazínové farbivá, porfyrinové a hematoporfyrinové deriváty.<sup>34</sup>

Klinicky sa antimikrobiálna PDT testuje na liečbu akné, kožných infekcií a taktiež v zubnom lekárstve.<sup>33</sup>



Obr. 8 A: G+ baktérie, cytoplazmatická membrána je obklopená relatívne pórovitou vrstvou peptidoglykánu a lipoteichovej kyseliny, ktorá umožňuje prechod fotosenzitizéru do vnútra bunky; B: G- baktérie, povrch pozostáva z vnútornej cytoplazmatickej membrány a vonkajšej membrány, ktoré sú oddelené vrstvou peptidoglykánu v periplazmatickom priestore, vonkajšia membrána bráni naviazaniu a penetrácii fotosenzitizéru do vnútra bunky. Prevzaté z KHARWAL, G. B. et al. *Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Application. Lasers Surg. Med.*, 2011. 43(7), 755-767

### 3.2.2.3 LIEČBA VÍRUSOVÝCH INFEKCIÍ

Veľa pôvodných klinických štúdií o použití PDT pri infekčných chorobách bolo namierených na virové infekcie. Topicky bola PDT často testovaná na liečbu herpes

simplex virus. Topická aplikácia niektorých PS odstránila genitálny herpes, ale už nezabránila návratu infekcie.<sup>34</sup>

V posledných rokoch sa uskutočnili viaceré klinické štúdie zaoberajúce sa vírusovými infekciami, predovšetkým týkajúce sa ľudského papilloma vírusu (HPV). PDT bola používaná systémovo aj topicky pri liečbe papilomatóz na rôznych častiach tela, spôsobených HPV. Účinok liečby proti HPV pomocou PDT je pravdepodobne spôsobený jeho protizápalovým a antiproliferatívnym účinkom.<sup>34</sup>

Odpoveď na liečbu pomocou PDT u genitálnych lézií je pravdepodobne závislá na imunitnej odpovedi.<sup>36</sup> Veľké riziko HPV infekcií a nedostatok bunkami sprostredkovanej imunity môže hrať významnú úlohu v slabej odpovedi na genitálne lézie po topickej PDT.<sup>34</sup>

### **3.3 FOTOLENITIZÉRY**

PS sú predovšetkým farbivá a pigmenty, ktoré absorbujú a odrážajú určitú vlnovú dĺžku svetla a tým vzniká dojem, že sú to farebné látky. Rozdiel medzi molekulou PS a ostatnými farebnými látkami je schopnosť PS preniesť energiu absorbovaného svetla do blízkych molekúl alebo môže byť použitá v fotochemických reakciách.<sup>37</sup>

#### **3.3.1 IDEÁLNE VLASTNOSTI PS**

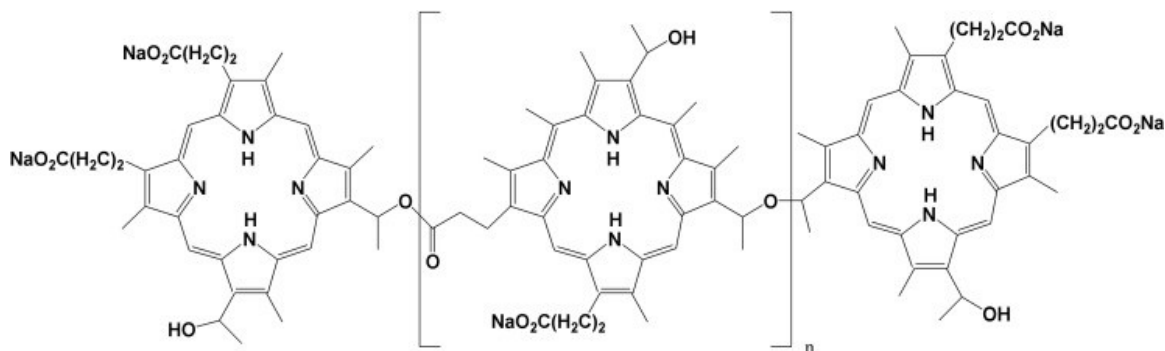
PS by mal mať nízku úroveň toxicity na bunky ľudí aj experimentálnych zvierat a nízku pravdepodobnosť nežiadúcich farmakologických účinkov, ako napríklad hypotenzia alebo alergické reakcie. PS by mal absorbovať svetlo z červenej oblasti svetelného spektra, aby sa dosiahol čo najhlbší možný prienik svetla do tkaniva. Absorpčné pásy kratších vlnových dĺžok ( $\lambda < 600$  nm) neprenikajú do tkaniva dostatočne hlboko a je u nich vyššia pravdepodobnosť kožnej fotosenzitivity. Na druhej strane, pri absorpčných pásoch vysokých vlnových dĺžok ( $\lambda > 800$  nm) fotón nemusí mať dostatočnú energiu na dosiahnutie tripletového stavu PS, na presun energie a vytvorenie singletového kyslíka. Syntéza PS by mala byť relatívne jednoduchá a východiskové materiály ľahko dostupné na uskutočnenie veľkovýroby.<sup>22</sup> Molekula PS by mala byť čistá, s konštantným zložením

a stabilná pri izbovej teplote.<sup>38</sup> PS by sa nemal v biologickom prostredí nadmerne zhlukovať, pretože to znižuje fotochemickú účinnosť. Farmakokinetická eliminácia z tela pacienta by mala byť rýchla, teda menej ako jeden deň, aby bola vylúčená predĺžená kožná fotosenzitivita a systémová toxicita. Pri liečbe rakoviny by sa PS mal po intravenóznei injekcii selektívne kumulovať v nádore. Niektoré PS sa dokážu kumulovať v nádore v pomere 5:1 prípadne aj viac, v porovnaní s okolitým normálnym tkanivom.<sup>22</sup> Taktiež by mal byť relatívne lacný a komerčne dostupný, aby bolo možné jeho masívne využitie.<sup>38</sup>

### 3.3.2 PRVÁ GENERÁCIA FOTOSENZITIZÉROV

Medzi prvú generáciu PS patria porfimer sodný (Photofrin<sup>®</sup>) a ďalšie hematoporfyrinové deriváty (HpD). Výraznou nevýhodou porfimeru je jeho absorpcia svetla iba pri 630 nm. Pri tejto vlnovej dĺžke je prienik svetla do tkaniva len 2-3 mm, čo výrazne limituje liečbu hlbších a väčších nádorov. Kožná fototoxicita je 6-10 týždňov a počas tejto doby je potrebné vyhnúť sa priamej expozícii slnečného žiarenia.<sup>39</sup> Nevýhodou porfimeru je taktiež jeho zložená štruktúra (Obr. 9), ktorá je nepriaznivá pre selektivitu tkaniva a stabilitu intenzity fotodynamického poškodenia.<sup>17</sup>

HpD sú získavané kyslou hydrolýzou hemu, ktorý je prostetickou skupinou hemoglobínu, myoglobínu a cytochrómov.<sup>40</sup> Medzi HpD patria napríklad Photogem<sup>®</sup> a Photosan-3<sup>®</sup>. Photogem<sup>®</sup> pozostáva z monomérov, dimérov a oligomérov a je schválený na klinické použitie v Rusku a Brazílii. Photosan-3<sup>®</sup> bol schválený aj v Európskej únii.<sup>39</sup>



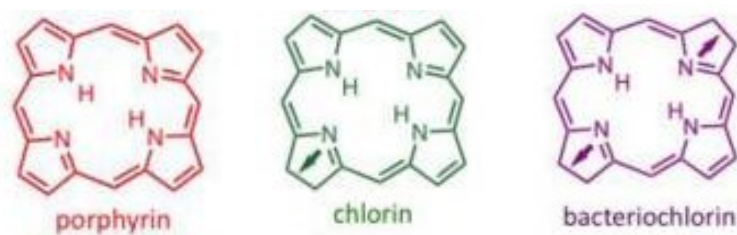
Obr. 9 štruktúra porfimeru,  $n = 0-6$ . Prevzaté z BRESKEY, J. D. et al. *Photodynamic Therapy: Occupational Hazards and Preventative Recommendations for Clinical Administration by Healthcare Providers. Photomed. Laser Surg.*, **2013**, 31(8), 398-407

### 3.3.3 DRUHÁ GENERÁCIA FOTOSENZITIZÉROV

V porovnaní s prvou generáciou PS má druhá generácia zlepšené vlastnosti, ako napríklad čisté zloženie a štruktúra, kratšia kožná fotosenzitivita, lepšie absorpčné spektrum a vyššia selektivita nádorového tkaniva.<sup>17</sup>

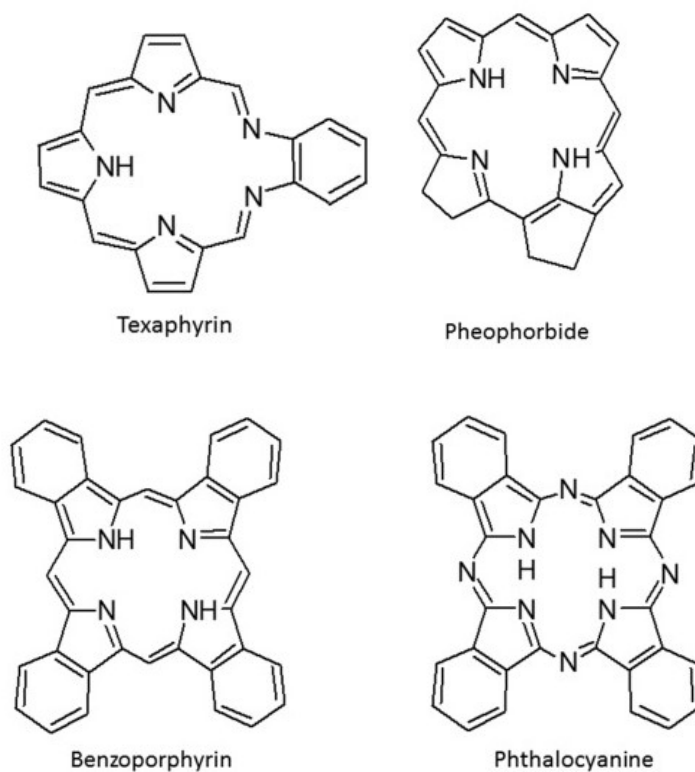
#### 3.3.3.1 PORFYRINOVÉ DERIVÁTY

Charakteristická štruktúra porfyriinových derivátov je založená na štyroch pyrrolových kruhoch spojených metylidénovým mostíkom.<sup>22</sup> Porfyriiny sú nevyhnutné pre biologickú aktivitu všetkých živých organizmov.<sup>41</sup> Prirodzene sa vyskytujúce porfyriiny majú úplne konjugované dvojité väzby a absorbujú svetlo s vlnovou dĺžkou okolo 630 nm. Chloríny sú tetrapyrrolové deriváty s jednou redukovanou dvojitou väzbou, to znamená, že absorbujú svetlo s vlnovou dĺžkou v rozmedzí 650-690 nm. Bakteriochloríny majú dva pyrrolové kruhy s redukovanou dvojitou väzbou a to znamená opäť posunutie absorpčného spektra ešte viac do infračervenej oblasti. V tomto ohľade sa javia bakteriochloríny efektívnejšie ako chloríny, ale v tejto skupine zatiaľ nie je veľa známych molekúl a taktiež je otázna ich stabilita počas skladovania. Preto nie je používanie bakteriochlorínov rozšírené v praxi.<sup>22</sup> Ich chemické štruktúry sú zobrazené na Obr. 10.



Obr. 10 Základná štruktúra porfyriu a jeho derivátov, chlorínu a bakteriochlorínu. Prezaté z PINILLOS BAYONA, A. M.; MROZ, P.; THUNSHELLE, C.; HAMBLIN, M. R. Design features for optimization of tetrapyrrol macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers. *Chem. Biol. Drug Des.*, **2017**, 89(2), 347-364

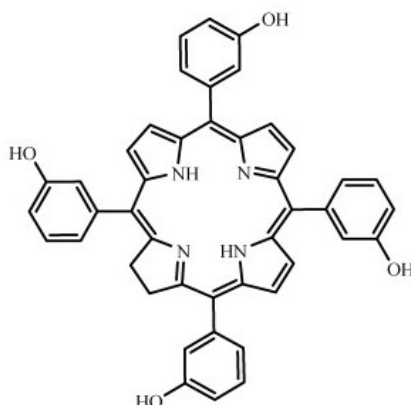
Ďalšie štruktúry odvodené od porfyriu sú zobrazené na Obr. 11.



Obr. 11 Ďalšie porfyriové deriváty. Prezaté z MALATESTI, N.; MUNITIC, I.; JURAK, I. Porphyrin-based cationic amphiphilic photosensitisers as potential anticancer, antimicrobial and immunosuppressive agents. *Biophys. Rev.*, **2017**, 9(2), 149-168

### Klinicky schválené fotosenzitizéry:

- temoporfín (m-THPC, *meso*-tetra(hydroxyphenyl)chlorin, Foscan<sup>®</sup>) – jeho aktivácia svetlom prebieha pri 652 nm<sup>42</sup> a pri efektívnej liečbe sú účinné aj nízke dávky PS a taktiež slabšia intenzita svetla.<sup>41</sup> Jeho nevýhodou je vyššia kožná fotosenzitivita u niektorých pacientov, ktorá trvá aj niekoľko týždňov.<sup>39,43</sup> Tieto nevýhody vyplývajú z vysokej lipofility temoporfínu a v dôsledku toho sa ľahko viaže na bunkové membrány a plazmatické proteíny po intravenózne inžekcii. Taktiež ide o hydrofóbnu molekulu a teda je slabo rozpustný vo vode a v cievnom systéme dochádza k jeho agregácii.<sup>44</sup> Mechanizmus účinku temoporfínu spočíva v priamej toxicite nádorových buniek a taktiež v poškodzovaní ciev.<sup>41</sup> V Európskej únii je schválený na liečbu nádorov v oblasti krku a hlavy,<sup>39,45</sup> taktiež bol úspešne testovaný na liečbu rakoviny prs, prostaty a pankreasu.<sup>39</sup>

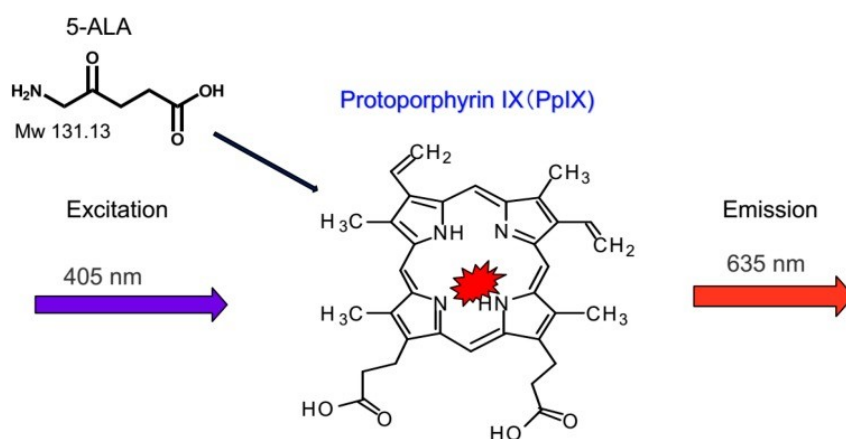


Obr. 12 Chemická štruktúra temoporfínu. Prevzaté z ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. *Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. Materials*, **2013**, 6, 817-840

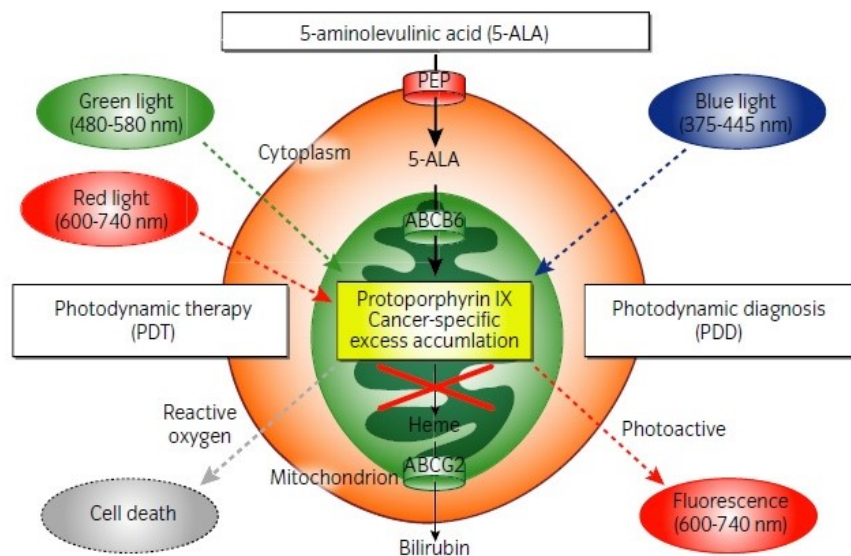
- 1,5-aminolevulová kyselina (5-ALA) – je to aminokyselina prirodzene sa vyskytujúca v živočíchoch a je to prekursor protoporfyrinu IX a hému.<sup>46-48</sup> Je to hydrofilná molekula, ktorá sa používa na liečbu len povrchových lézií kvôli slabej kožnej penetrácii.<sup>49</sup> Endogénne sa vyskytujúca 5-ALA je syntetizovaná zo succinyl koenzýmu A a aminokyseliny glycínu v mitochondriách pomocou enzýmu ALA-syntázy.<sup>46,47</sup> Endogénna aj exogénna 5-ALA podstupuje rovnaké chemické reakcie a cez viaceré prekursor z nej vzniká protoporfyrin IX, ktorý sa



vo fyziologických normálnych bunkách viaže so železom pomocou ferrochelatózy a vzniká hém.<sup>48</sup> Protoporfyrin IX sa kumuluje v nádorových bunkách pravdepodobne kvôli menšiemu množstvu ferrochelatózy,<sup>47,49</sup> zvýšenej proliferatívnej aktivity a tvorbe ciev nádorových buniek.<sup>48</sup> Na Obr. 13 je znázornený princíp fotodynamickej diagnostiky (photodynamic diagnosis, PDD), na ktorú je ALA často využívaná, napríklad v diagnostike rakoviny mozgu, močového mechúra a gastrointestinálneho traktu.<sup>46</sup> Ožarovaním červeného svetla (600-740 nm) alebo modrého svetla (450-580 nm) dochádza k excitácii protoporfyrinu IX a k červenej fluorescencii (využiteľnej v PDD) ako aj k tvorbe reaktívneho singletového kyslíka, ktorý spôsobuje smrť nádorových buniek (Obr. 14) predovšetkým cestou apoptózy, preto bunky a tkanivo v okolí nádoru sú takmer bez poškodenia. Takáto liečba má minimum nežiadúcich účinkov.<sup>46</sup> Pod obchodným názvom Levulan<sup>®</sup> sa používa ako 20% topický roztok na liečbu aktinickej keratózy<sup>41</sup> a je schválený v USA, Kórei, Mexiku, Brazílii, Argentíne, Čile a v Kolumbii.<sup>49</sup> Pod obchodným názvom Ameluz<sup>®</sup> sa používa 5-ALA ako 10% gel nanoemulzie<sup>50</sup> v kombinácii s červeným svetlom na liečbu aktinickej keratózy v USA aj Európskej únii.<sup>49,50</sup>

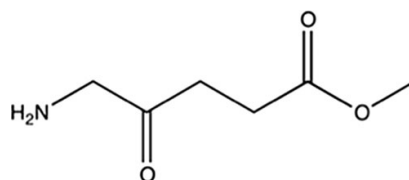


Obr. 13 Chemická štruktúra 5-ALA a protoporfyrinu IX, po excitácii pri 405 nm protoporfyrin IX vyžaruje červenú fluorescenciu pri 635 nm, použitie v diagnostike. Prevzaté z YONEMURA, Y. et al. Photodynamic Detection of Peritoneal Metastases Using 5-Aminolevulinic Acid (ALA). *Cancers*, 2017, 23, 1-13



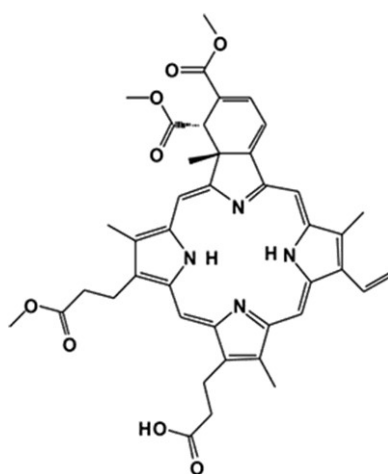
Obr. 14 Mechanizmus PDT a PDD pri použití 5-ALA ako PS. Prevzaté z INOUE, K. 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy for bladder cancer. *Int. J. Urol.*, 2017, 34, 97-101

- metyl aminolevulát (MAL, Metvix®) – je to metyl ester 1,5-aminolevulovej kyseliny (Obr. 15), ktorý bol vyvinutý na zlepšenie prieniku 5-ALA do kožného tkaniva.<sup>49</sup> Výhodou MAL je slabšia intenzita bolesti po ožiarení svetlom v porovnaní s 5-ALA. Je to pravdepodobne spôsobené tým, že 5-ALA je transportovaná neselektívnym GABA transportom do nervových buniek.<sup>49</sup> Pod obchodným názvom Metvix® sa používa ako 16,8% krém a v USA je schválený na liečbu aktinickej keratózy.<sup>49</sup> V Európskej únii je schválený na liečbu aktinickej keratózy, povrchového aj nodulárneho bazocelulárneho karcinómu a Bowenovej choroby.<sup>49,51</sup>



Obr. 15 Chemická štruktúra MAL. Prevzaté z BRESKEY, J. D. et al. *Photodynamic therapy: occupational hazards and preventative recommendations for clinical administration by healthcare providers. Photomed. Laser Surg.*, **2013**, 31(8), 398-407

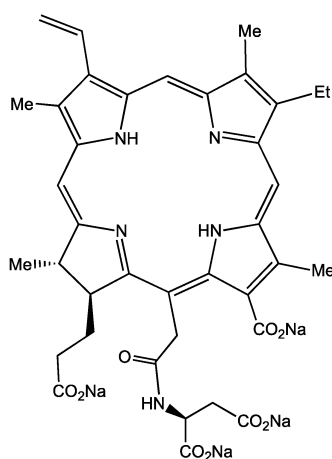
- verteporfín (Visudyne<sup>®</sup>) – je to benzoporfyrinový derivát (Obr. 16),<sup>52</sup> ktorý sa klinicky používa predovšetkým na liečbu chorôb oka, a to s vekom spojenej makulárnej degradácie<sup>41,53</sup> (ktorá je často spojená so stratou zraku u starších ľudí) a polypoidných chorôb cievovky.<sup>53</sup> Podáva sa intravenóznou infúziou.<sup>41</sup> Jeho výhodou je, že absorbuje svetlo s vlnovou dĺžkou 689 nm, je lipofilný a má krátky plazmatický polčas, rýchlo sa vylúči z tela a jeho fotosenzitivita netrvá dlho.<sup>39,54</sup>



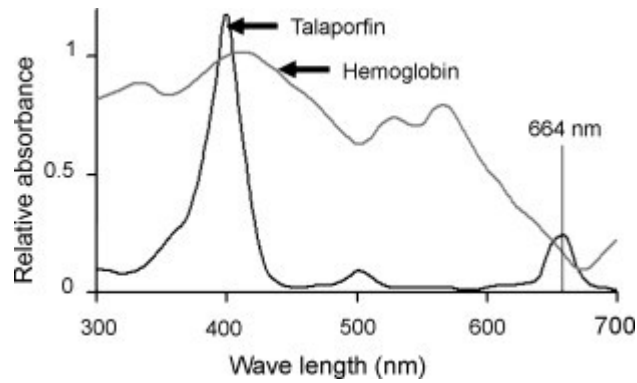
Obr. 16 Chemická štruktúra verteporfínu. Prevzaté z BRESKEY, J. D. et al. *Photodynamic therapy: occupational hazards and preventative recommendations for clinical administration by healthcare providers. Photomed. Laser Surg.*, **2013**, 31(8), 398-407

- talaporfín sodný (N-aspartyl chlorin e6, NP6, TS, Laserphyrin<sup>®</sup>) – je to derivát chlorínu (Obr. 17). Používa sa na intraoperatívnu PDT liečbu maligných

mozgových nádorov. Je klinicky účinný a bezpečný, preto je schválený na klinické používanie v Japonsku.<sup>55</sup> S absorpciou svetla s vlnovou dĺžkou 664 nm je potenciálnym PS v liečbe rakoviny pečene a ústnej dutiny,<sup>39</sup> má krátky plazmatický polčas, preto je z tela rýchlo odstránený a tým pádom sa skraca jeho kožná fototoxicita.<sup>56</sup> V porovnaní s prvou generáciou PS sa rýchlo akumuluje v nádorovom tkanive.<sup>57</sup> Talaporfín sodný absorbuje aj svetlo s vlnovou dĺžkou 400 nm (Obr. 18) a po excitácii taktiež vyžaruje červenú fluorescenciu. Z tohto dôvodu bola vedená klinická štúdia, ktorej cieľom bolo ukázať možnosť intraoperatívnej PDT a súčasne PDD. Pomocou fluorescencie talaporfínu sodného, ktorý sa kumuluje v nádorovom tkanive, by bolo možné diagnostikovať úspešnosť resekcie nádoru a teda aj detekcia jeho zvyšku po terapii.<sup>55</sup>

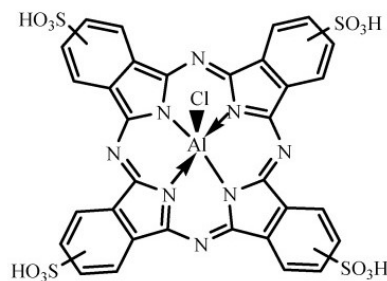


Obr. 17 Chemická štruktúra talaporfínu sodného. Prevzaté z AWASTHI, K. et al. *Fluorescence Characteristics and Lifetime Images of Photosensitizers of Talaporfin Sodium and Sodium Pheophorbide a in Normal and Cancer Cells. Sensors*, **2015**, 15(5), 11417-11430



Obr. 18 Absorpčné spektrum talaporfinu. Prevzaté z YOSHIDA, T. et al. *Therapeutic effects of a new photosensitizer for photodynamic therapy of early fead and neck cancer in relation to tissue concentration. Auris, Nasus, Larynx*, **2008**, 35(4), 545-551

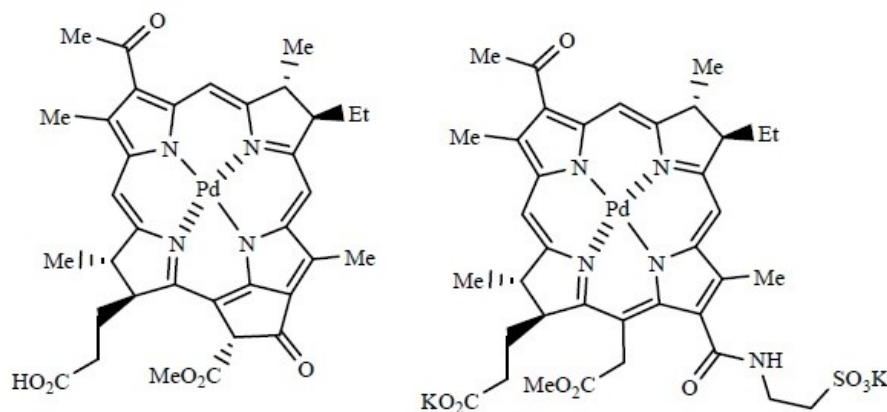
- tetrasulfonovaný hlinitý ftalocyanín (Photosens<sup>®</sup>) – je to ftalocyaninový derivát (Obr. 19), ktorý absorbuje svetlo s vlnovou dĺžkou 676 nm. Je schválený v Rusku a používa sa predovšetkým na liečbu rakoviny žalúdka, kože a prs. Jeho nevýhodou je ale vyššia kožná toxicita, ktorá trvá niekoľko týždňov.<sup>39,58</sup>



Obr. 19 Chemická štruktúra tetrasulfonovaného hlinitého ftalocyanínu. Prevzaté a upravené z ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. *Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. Materials*, **2013**, 6, 817-840

- padeliporfin (palladium bacteriopheophorbide monolysotaurine, TOOKAD<sup>®</sup> Soluble, WST11) – ide o vo vode rozpustný derivát padoporfinu (Obr. 20).<sup>59</sup> Účinkuje predovšetkým na cievy, spôsobuje v nich trombózu a nedostatok kyslíka a živín v nádorových bunkách. Je rýchlo odstránený zo

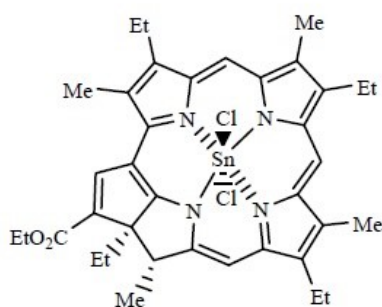
systemového obehu hepatálnymi a renálnymi mechanizmami. Preklinické štúdie na zvieracích modeloch ukázali, že uzavretie celého cievneho systému nádoru nastáva v rámci niekoľkých minút.<sup>59</sup> Používa sa na liečbu lokalizovanej rakoviny prostaty.<sup>60</sup>



Obr. 20 Chemická štruktúra padoporfinu (vľavo) a padeliporfinu (vpravo). Prevzaté z ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. *Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. Materials*, **2013**, 6, 817-840

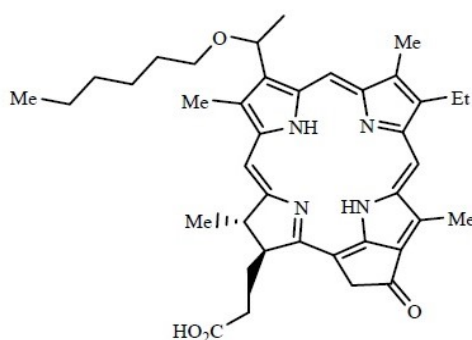
### Fotosenzitizéry v klinických testovaniach

- rostoporfin (tin ethyl etiopurpurin, SnET2, Purlytin™) – je to derivát chlorínu (Obr. 21) aktivovaný svetlom pri 644 nm, ktoré preniká hlbšie do kože ako u porfimeru. Prešiel prvou a druhou fázou klinického hodnotenia na liečbu metastatického adenokarcinomu prs, bazocelulárneho karcinómu a Kaposiho sarkómu. Táto látka taktiež prešla treťou fázou klinického hodnotenia na liečbu vekovo spojennej makulárnej degradácie, ale zatiaľ nebola schválená kvôli ďalšiemu posúdeniu jeho účinnosti a bezpečnosti. Nevýhodou tejto látky je pravdepodobnosť vyššej kožnej fotosenzitivity.<sup>39</sup>



Obr. 21 Chemická štruktúra rostoporfínu. Prevzaté z ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. *Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. Materials*, **2013**, 6, 817-840

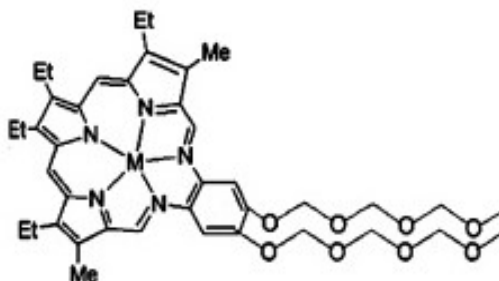
- HPPH (2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide, Photochlor<sup>®</sup>) – je odvodený od chlorofylu (Obr. 22), absorbuje svetlo pri 665 nm.<sup>39,51</sup> Má taktiež nižšie riziko fototoxicity a vyhýbanie sa slnku po ožiarení je potrebné len 7-10 dní.<sup>51</sup> Bol testovaný v prvej a druhej fáze klinického hodnotenia na liečbu rakoviny pažeráka, kože, ústnej dutiny, hltanu, hlavy a krku.<sup>39</sup>



Obr. 22 Chemická štruktúra HPPH. Prevzaté z ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. *Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. Materials*, **2013**, 6, 817-840

- lutecítový motexafín (Lu-Tex, Lutrin<sup>®</sup>) – ide o porfyrinový derivát (Obr. 23), ktorý absorbuje svetlo s vlnovou dĺžkou 732 nm, je rozpustný vo vode a jeho plazmatický polčas je len 7 hodín, čo výrazne znižuje jeho kožnú fotosenzitivitu. Jeho nevýhodou je silná bolesť, ktorá sa objavila u niektorých pacientov počas

fototerapie.<sup>61</sup> Podáva sa intravenózne a pôsobí predovšetkým na nádorové cievy. Prešiel prvou fázou klinického hodnotenia liečby rakoviny prostaty.<sup>62</sup>



Obr. 23 Chemická štruktúra lutecitého motexafínu. Prevzaté z CONOR, A. E.; GALLAGHER, W. M.; BYRNE, A. T. *Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy*. *Photochem. Photobiol.*, **2009**, 85, 1053-1074

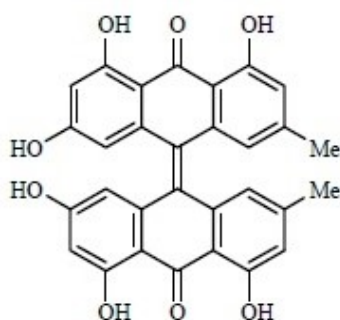
### 3.3.3.2 NEPORFYRINOVÉ DERIVÁTY

Tvorí výrazne menšiu skupinu používaných fotosenzitizérov, predovšetkým preto, že ich absorpčné maximum je v oblasti 420-670 nm (u porfyriových derivátov je to 630-760 nm). Preto je potrebný ďalší výskum v modifikovaní týchto látok a rozšírení ich absorpčného spektra nad hranicu 700 nm. Väčšina týchto derivátov sa používa v medicíne kvôli ich antibakteriálnym a antivírusovým vlastnostiam.<sup>39</sup>

#### Antrachinóny

- hypericín – ide o prirodzene sa vyskytujúci antrachinónový derivát (Obr. 24), extrahovaný z rastliny *Hypericum perforatum* (Ľubovník bodkovaný). Používa sa predovšetkým v liečbe depresie ale má potenciálne využitie aj vo fotodynamickej terapii. Maximum v absorpčnom spektre má pri 599 nm a má krátky plazmatický polčas aj po podaní vysokých dávok. Viaceré štúdie ukázali vysokú nádorovo špecifickú cytotoxicitu a minimum nežiadúcich účinkov.<sup>63</sup> Prebehli rôzne štúdie účinku hypericínu, napríklad na leukémiu<sup>64</sup> alebo rakovinu kože.<sup>65</sup>

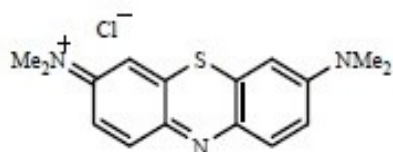




Obr. 24 Chemická štruktúra hypericínu. Prevzaté z CONOR, A. E.; GALLAGHER, W. M.; BYRNE, A. T. *Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. Photochem. Photobiol.*, **2009**, 85, 1053-1074

### Fenotiazíny

- metylénová modrá – je to hydrofilná molekula (Obr. 25), s maximálnou absorpciou pri 660 nm.<sup>66</sup> Jej výhodou je nízka cena, malá toxicita a má taktiež antifungálne a antibakteriálne vlastnosti.<sup>66,67</sup> Je schválená FDA (Food and Drug Administration) na liečbu methemoglobínémie.<sup>66</sup> Ako sľubný fotosenzitizér bola táto látka testovaná na liečbu ochorení spôsobených kvasinkami<sup>68</sup>, baktériami<sup>69,70</sup> a taktiež na liečbu niektorých druhov rakoviny.<sup>71</sup>

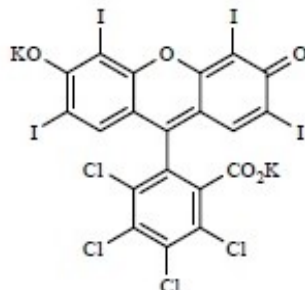


Obr. 25 Chemická štruktúra metylénovej modrej. Prevzaté z ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. *Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. Materials*, **2013**, 6, 817-840

### Xantény

- bengálska ružová – je to vo vode rozpustný xanténový derivát (Obr. 26), ktorý absorbuje pri 549 nm.<sup>39</sup> Používa sa v očnej diagnostike na hodnotenie poškodenia

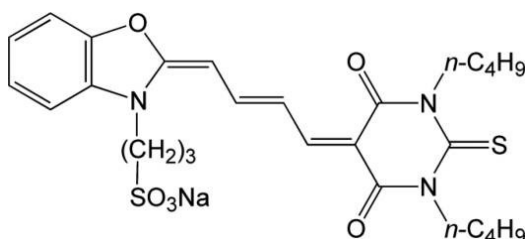
rohovky a spojivky.<sup>72</sup> V rámci fotodynamickéj terapie sa zatiaľ len testuje na liečbu rakoviny prs a kože.<sup>73</sup>



Obr. 26 Chemická štruktúra bengálskej ružovej. Prevzaté z ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. *Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. Materials*, **2013**, 6, 817-840

#### Cyaníny

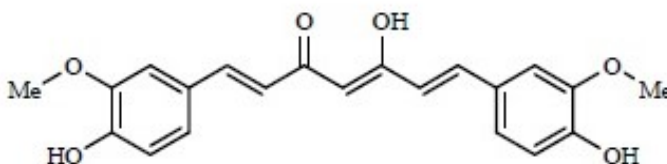
- merocyanín 540 – tento cyanínový derivát (Obr. 27) má absorpčné maximum pri 540 nm.<sup>74</sup> Cieľom jeho pôsobenia sú leukemické bunky a bunky lymfómu. Používa sa v preklinických testovaniach a prvej a druhej fáze klinického testovania na mimotelové prečisťovanie autológnych štepov kmeňových buniek.<sup>75,76</sup>



Obr. 27 Chemická štruktúra merocyanínu 540. Prevzaté z TRAU, D. L.; SIEBER, F. *Inhibitory effects of Merocyanine 540-mediated photodynamic therapy on cellular immune functions: A role in the prophylaxis of graft-versus-host disease? J. Photochem. Photobiol. B*, **2015**, 153, 153-163

## Kurkuminoidy

- kurkumín – je to prírodné farbivo (Obr. 28), izolované z koreňa rastliny *Curcuma longa* (Kurkumovník dlhý) a tradične sa používa ako korenie.<sup>77</sup> Absorpčné maximum má pri 420 nm.<sup>39</sup> Jeho nevýhodou je nízka biodostupnosť, kvôli nízkemu vstrebávaniu z gastrointestinálneho traktu, zlej rozpustnosti a rýchlej metabolizácii. Preto aj po podaní vysokých dávok kurkumínu, nie je dosiahnutý relevantný farmakologický účinok.<sup>77</sup> Aby sa minimalizovali tieto nevýhody, boli navrhnuté rôzne postupy ako zvýšiť biodostupnosť kurkumínu. Je to napríklad príprava nanoemulzií<sup>78</sup> alebo enkapsulácia.<sup>79</sup> Používa sa ako antimikrobiálny fotosenzitizér a v zubnom lekárstve na ničenie patogénov v ústnej dutine.<sup>80</sup>



Obr. 28 Chemická štruktúra kurkumínu. Prevzaté z ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. *Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. Materials*, **2013**, 6, 817-840

### 3.3.4 TRETIA GENERÁCIA FOTOLENZITIZÉROV

Tretia generácia fotosenzitizérov zahŕňa niektoré PS druhej generácie, ktoré sú konjugované na molekulové nosiče, ktoré dodávajú daný fotosenzitizér do nádorového tkaniva. Ako molekulové nosiče sa používajú sacharidy<sup>81</sup>, peptidy<sup>82</sup>, lipozómy<sup>83</sup>, polyméry<sup>84</sup> a nanočastice.<sup>85</sup> Aby sa PS úspešne dostal do nádorových buniek, je potrebné využiť určité vlastnosti nádorových buniek, ktoré ich odlišujú od normálnych zdravých buniek.<sup>38</sup> Súčasný výskum sa sústreďuje na dve oblasti – génové inžinierstvo a nanotechnológiu v PDT.<sup>17</sup>

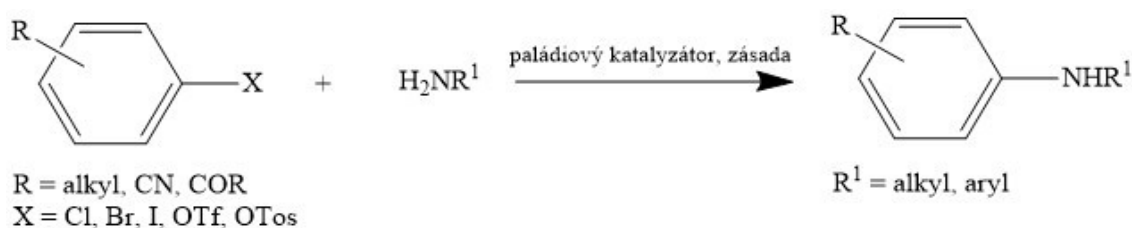
Chlorin e6 a jeho deriváty patria medzi druhú generáciu PS. Chlorin e6 má viaceré výhody, ako napríklad maximum jeho absorpcie je v 400 nm a 660 nm (Obr. 18), preto je možné ho použiť v terapii aj diagnostike a svetlo v oblasti 660 nm prenikne až do hĺbky

7 mm. Na druhej strane má aj nevýhody a to napríklad nízku rozpustnosť vo vode. Jeho molekula obsahuje tri rôzne karboxylové skupiny, ktoré môžu byť potenciálne využité na konjugáciu s biomolekulami.<sup>86</sup> Z tohto dôvodu boli uskutočnené rôzne pokusy o syntézu konjugátov chlorinu e6 s cieľom zlepšiť jeho vlastnosti.

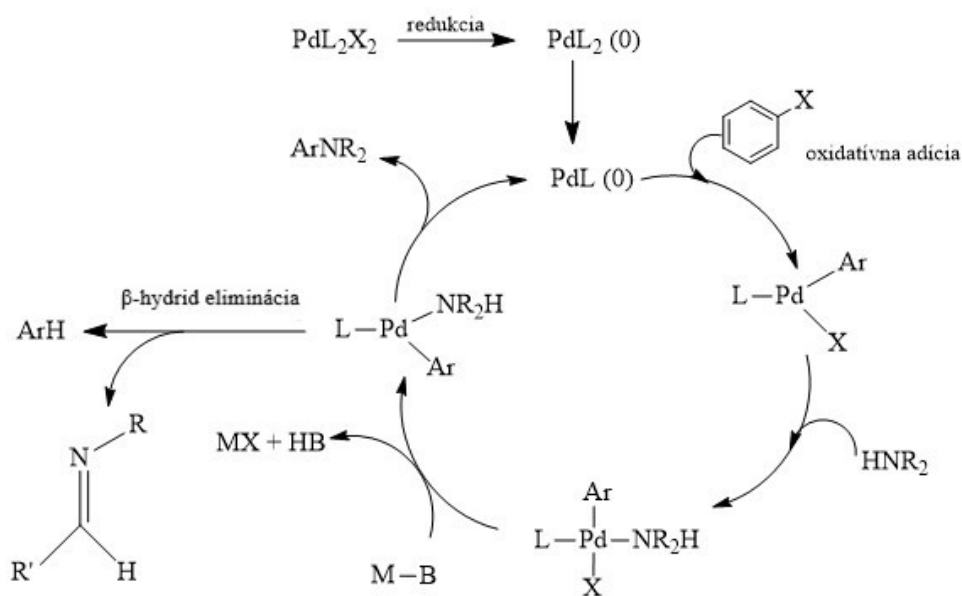
Kostryukova *et al.* vyvinuli nanosystém na dodanie liečiva, založený na sójových fosfolipidoch s časticami menšími ako 20 nm. Po intravenózne aplikácii chlorinu e6 vo fosfolipidových nanočasticách sa v tejto forme chlorin e6 akumuloval v nádorovom tkanive vo väčšom množstve ako samotný chlorin e6 a taktiež bol z tela eliminovaný 5-krát rýchlejšie.<sup>87</sup>

## 4. METODICKÁ ČASŤ

V mojej diplomovej práci som využívala okrem iného aj couplingovú reakciu podľa Buchwald-Hartwiga (Obr. 30). Tá patrí medzi cross-couplingové reakcie katalyzované pomocou paládia medzi amínmi a arylhalogenidovými zlúčeninami alebo zlúčeninami s dobre odstupujúcimi skupinami (tosylát, triflát). Výsledným produktom je aminoderivát naviazaný na aromatické jadro (Obr. 31).



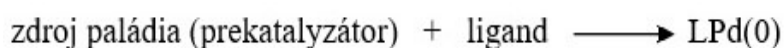
Obr. 30 Reakčná schéma Buchwald-Hartwig couplingu



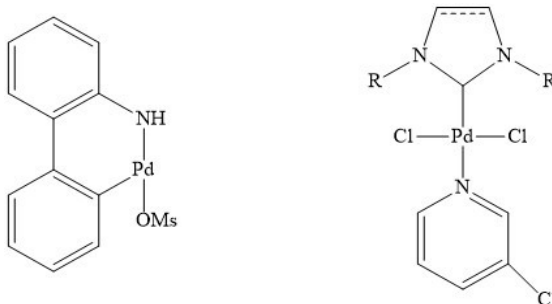
Obr. 31 Mechanizmus Buchwald-Hartwigovho couplingu: Pd(II) je najprv redukované na Pd(0). Po odstránení jedného ligandu (L) z Pd dochádza k oxidatívnej adícii a tvorbe Pd(II) komplexu. V ďalšom kroku je v komplexe X vymenený za amín, za pomoci zásady. Posledným krokom je redukčná eliminácia, pri ktorej sa uvoľní aromatický aminoderivát a PdL, ktorý opäť vstupuje do oxidatívnej adície.

Takýto postup syntézy aromatických amínov má oproti tradičným postupom (nukleofilná substitúcia, redukčná aminácia) viaceré výhody, ako napríklad lepšia kompatibilita funkčných skupín, reakcia pozostáva len z jedného kroku a relatívne mierne reakčné podmienky.<sup>88</sup>

Podstatou paládiovej katalýzy je tvorba aktívneho katalyzátora Ligand-Pd(0) (Obr. 29). Na tvorbu Pd(0) je potrebný zdroj paládia, ktorý vie rýchlo a efektívne generovať Pd(0). Za najúčinnnejšie zdroje paládia sú považované paládiové prekatalyzátory: Pd G3 a PEPSI<sup>TM</sup> (Obr. 30). Pd G3 je účinný v kombinácii s fosfinovými ligandami, PEPSI<sup>TM</sup> sa používa v kombinácii s N-heterocyklickými karbénovými ligandami.



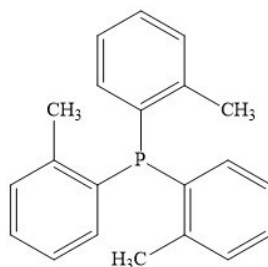
Obr. 29 Tvorba aktívneho katalyzátora



Obr. 30 Štruktúra prekatalyzátorov Pd G3 (vľavo) a PEPSI<sup>TM</sup> (vpravo)

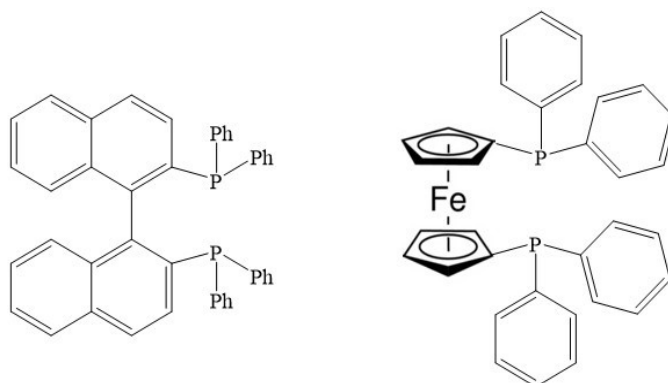
Používané ligandy je možné rozdeliť do troch generácií:

1. generácia – patria tu fosfíny s jedným donorovým atómom, napríklad P(o-tol)<sub>3</sub> (Obr. 31)



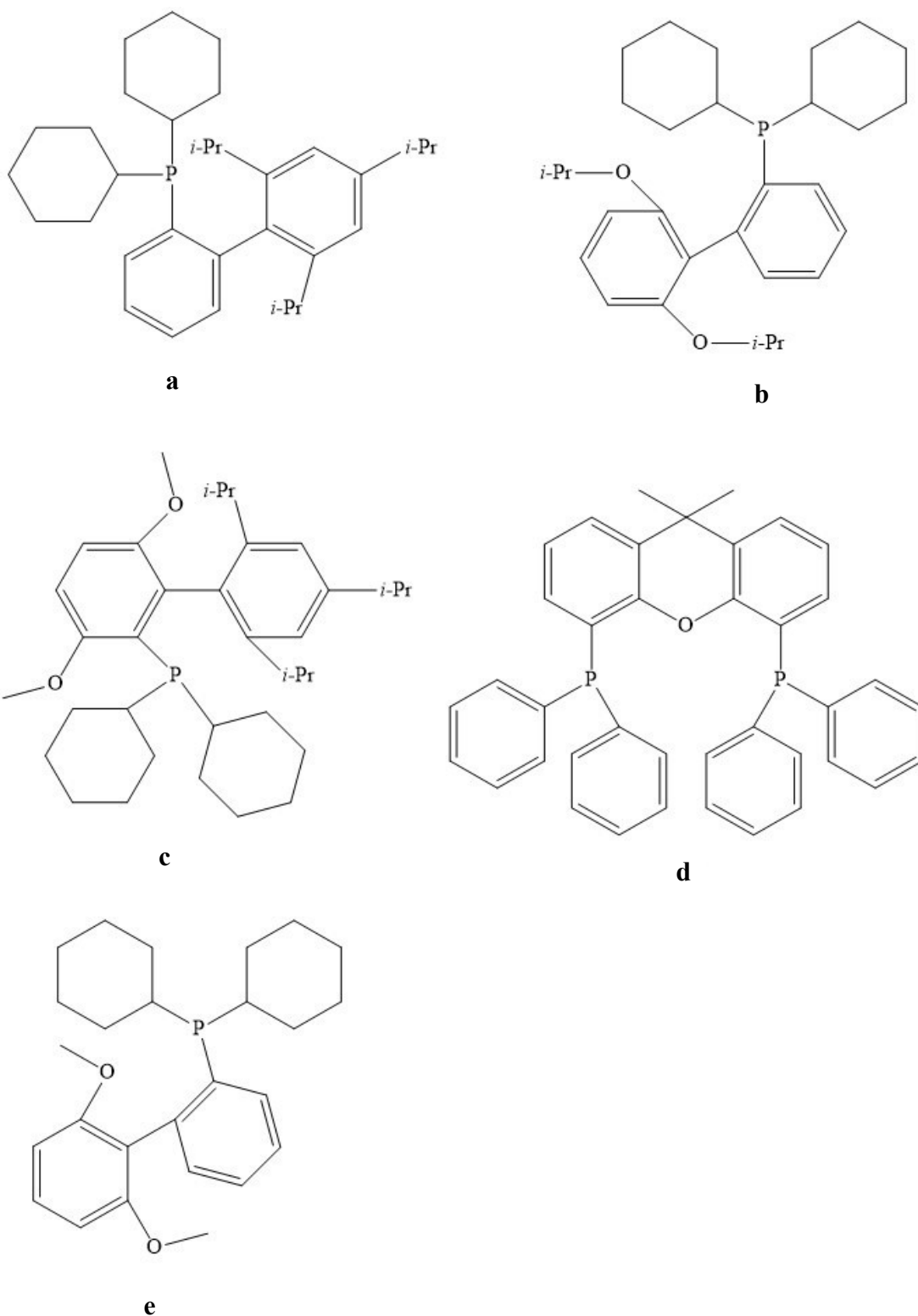
Obr. 31 Štruktúra  $P(o\text{-tol})_3$

2. generácia – sú to predovšetkým fosfíny s dvoma donorovými atómami. U týchto ligandov je výrazne zlepšený rozsah ich použitia v aminačných reakciách. Patria tu napríklad BINAP (2,2'-bis(difenylfosfino)-1,1'-binaftalén), DPPF (1,1' bis(difenylfosfino)ferrocén) (Obr. 32).



Obr. 32 Štruktúra BINAP (vľavo) a DPPF (vpravo)

3. generácia – ide o elektrónovo bohaté a sčéricky bránené fosfinové (Obr. 33) ligandy (XPhos, RuPhos, BrettPhos, XantPhos, SPhos) a taktiež nefosfinové ligandy (iPent). Vďaka týmto ligandom je možné použiť ako substráty aminačných reakcií aj inak nereaktívne ale lacné arylchloridy.



Obr. 33 Štruktúra fosfinových ligandov

a: XPPhos (2-Dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphenyl),

b: RuPhos (2-Dicyclohexylphosphino-2',6'-diisopropoxybiphenyl),

c: BrettPhos (2-(Dicyclohexylphosphino)3,6-dimethoxy-2',4',6'-triisopropyl-1,1'-biphenyl),

d: XantPhos (4,5-Bis(diphenylphosphino)-9,9-dimethylxanthene),

e: SPhos (2-Dicyclohexylphosphino-2',6'-dimethoxybiphenyl)

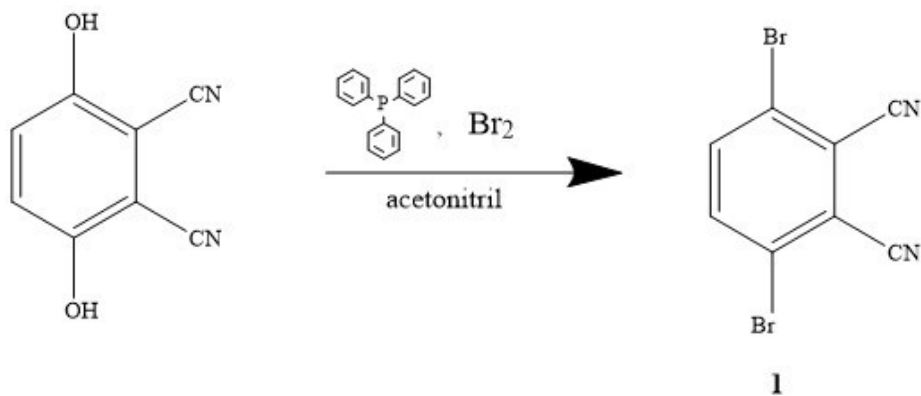


Amíny sa môžu chovať k prekatalyzátoru taktiež ako ligandy, preto je vhodné pridať nadbytok fosfínového ligandu, aby sa predišlo deaktivácii prekatalyzátora. Veľmi dôležitá je čistota používaných amínov, keďže nečistoty v amínoch môžu spôsobiť zlyhanie reakcie.

## 5. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Východiskové látky a rozpúšťadlá použité v uskutočnených reakciách boli zakúpené od nasledujúcich firiem: Lach-Ner, Sigma-Aldrich, Penta, Acros. Teplota topenia látok bola nameraná pomocou digitálneho prístroja ELECTROTHERMAL IA9200. Priebeh reakcií, čistota produktov a hodnotenie výťažku reakcií bolo realizované pomocou chromatografie na tenkej vrstve na doskách Merck Kiesegel 60 F254. Detekcia pod UV lampou prebiehala pri vlnovej dĺžke 366 nm, prípadne 254 nm. Čistenie výsledných produktov reakcií bolo uskutočnené pomocou stĺpcovej chromatografie na stacionárnej fáze Merck Kiesegel 60. Hmotnostné spektrum bolo merané na hmotnostnom spektrometri Advantage Max ion-trap LCQ s ESI zdrojom (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA). IČ spektrá boli merané na IČ spektrofotometri Nicolet 6700 v ATR móde. Spektrá  $^1\text{H}$  NMR a  $^{13}\text{C}$  NMR boli merané pomocou prístroja Varian VNMR S500. Východisková látka 3,6-bis(*p*-toluénsulfonyloxy)ftalonitril (**3**) bola pripravená v minulosti v laboratóriu podľa publikovaného postupu.<sup>89</sup>

### 5.1 PRÍPRAVA 3,6-DIBRÓMFTALONITRILU (1)



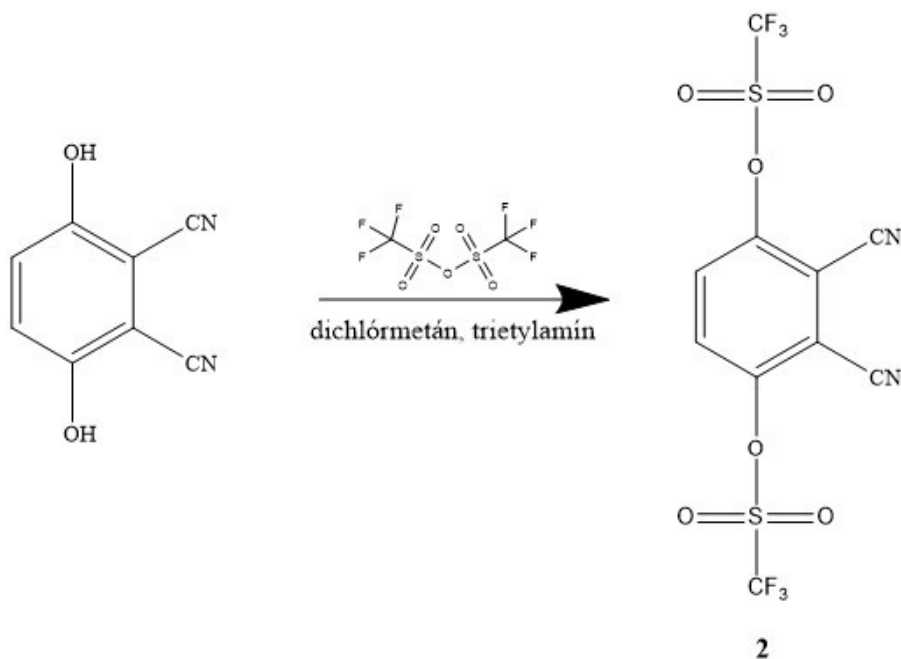
K roztoku trifenyfosfínu (4,5 g; 17,1 mmol) v acetonitrile (15 ml) bol postupne po kvapkách pridávaný bróm (2,8 g; 17,1 mmol) za chladenia pri  $0\text{ }^\circ\text{C}$  a neustáleho miešania. Zmes bola ohriata na izbovú teplotu za stáleho miešania. Potom bol pridaný 2,3-dikyanohydrochinón (1,0 g; 6,2 mmol) a reakčná zmes bola zahrievaná 30 minút pri  $70\text{ }^\circ\text{C}$  pod vzdušným chladičom. Rozpúšťadlo bolo odparené a odparok bol zahrievaný pri  $220\text{--}240\text{ }^\circ\text{C}$  jednu hodinu. Potom bola ešte na chvíľu zvýšená teplota na  $330\text{ }^\circ\text{C}$ , kým sa prestal vytvárať plynný bromovodík. Vzniknutá pevná látka bola rozpustená

v dichlórmetáne (približne 60 ml). Roztok bol premytý s 5% NaHCO<sub>3</sub> a organická fáza oddelená a vysušená bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prefiltrovaná a odparená do sucha. Kryštalizáciou z tetrahydrofuránu bola zmes zbavená väčšiny trifenylfosfinu, ktorý vykryštalizoval. Matečný lúh z kryštalizácie bol odparený a produkt bol vyčistený pomocou stĺpcovej chromatografie. Ako mobilnú fázou sme použili toluén/hexán v pomere 3:1. Produkt bol týmto spôsobom zbavený hrubých nečistôt. Na úplné vyčistenie bolo k produktu pridané malé množstvo chloroformu, v ktorom sa zvyšné nečistoty rozpustili, ale náš produkt nie, a rozpúšťadlo bolo odsaté. Získali sme 1,11 g (15 %) jemne práškovitého produktu takmer bielej farby. Produkt bol pripravený podľa publikovaného postupu a analytické dáta (NMR) zodpovedajú dátam uvedeným v literatúre.<sup>90</sup>

t.t. 245,9-247,1 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO) δ (ppm) 8,1 (s, 2H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO) δ (ppm) 138,7; 125,3; 120,0; 114,7. IČ ATR: ν<sub>max</sub> = 3105, 3063, 2234, 1959, 1556, 1445, 1394, 1204 cm<sup>-1</sup>.

## 5.2 PRÍPRAVA

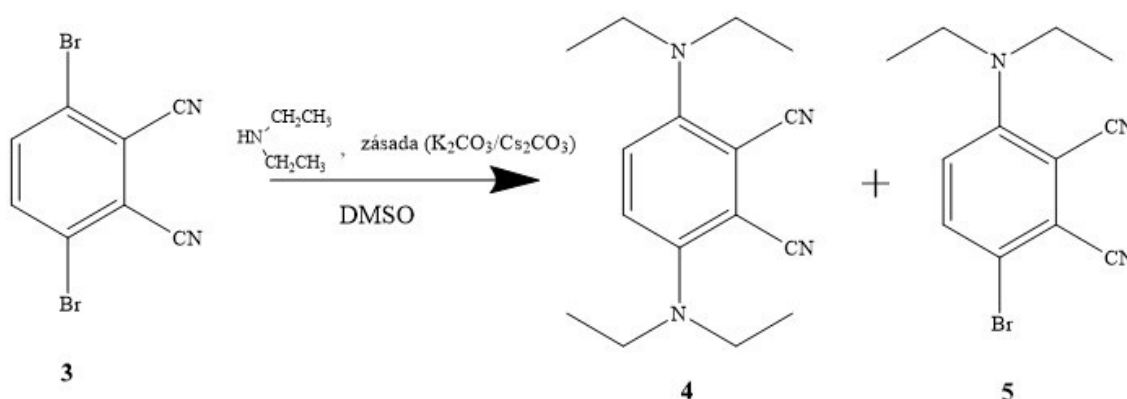
### 3,6-BIS(TRIFLUROMETYLSULFONYLOXY)FTALONITRILU (2)



Reakcia prebiehala v bezvodom prostredí pod plynným argónom. 3,6-dihydroxyftalonitril (3,2 g; 20 mmol) bol rozpustený v zmesi bezvodého dichlórmetánu (20 ml) a trietylamínu (6 ml, 44 mmol). Roztok bol ochladený na teplotu  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  pomocou zmesi ľad+NaCl. Do reakčnej zmesi bol po kvapkách pridávaný roztok anhydridu trifluormetylsulfónovej kyseliny (10 ml, 60 mmol). Zmes bola zahriata na izbovú teplotu a miešaná 14 hod pod argónom. Zmes bola potom 2 krát vytrepaná s vodou. Izolácia produktu prebiehala stĺpcovou chromatografiou. Ako mobilná fáza bola použitá zmes chloroformu a metanolu v pomere 10:1. Následnou kryštalizáciou z metanolu bol získaný výsledný produkt: 5,17 g (61 %) bielej kryštalickej látky. Látka bola pripravená podľa už publikovaného postupu<sup>91</sup> a totožnosť bola overená porovnaním na TLC so štandardom<sup>92</sup> už dávnejšie pripraveným v laboratóriu.

t.t.  $106,5\text{-}107,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  (literatúra<sup>93</sup>  $106\text{-}107\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

### 5.3 VŠEOBECNÝ POSTUP NUKLEOFILNEJ SUBSTITÚCIE



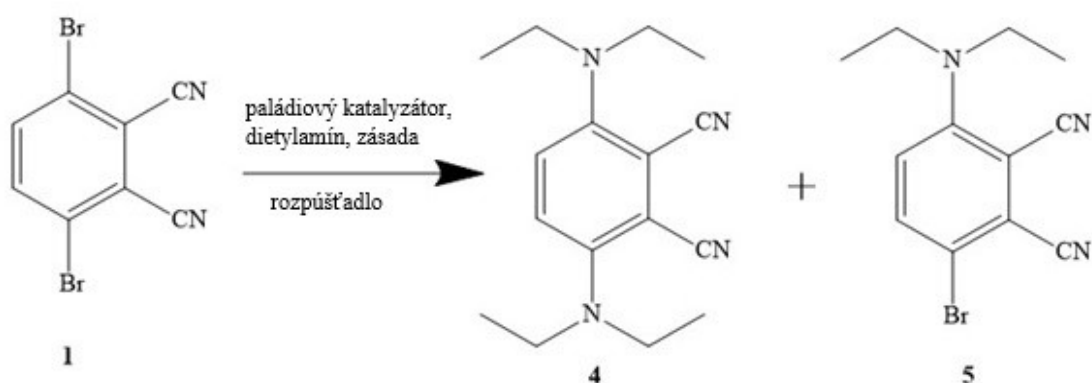
Reakcia prebiehala v bezvodom prostredí, pod plynným argónom. Všetko laboratórne sklo, potrebné v priebehu reakcie (malá sklenená fľaštička s pryžovým uzáverom, 2 sklenené striekačky s ihlou, destilačná banka), bolo najprv sušené 2 hodiny pri  $127\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aby bola minimalizovaná všetka vlhkosť. Potom bolo do fľaštičky pridané malé miešadlo, fľaštička bola vzduchotesne uzavretá a bol v nej vymenený vzduch za argón. Do sklenenej banky boli cez vzduchotesný uzáver napichané striekačky s ihlou a taktiež v nej bol vymenený vzduch za argón. Takto všetko sklo vychladlo. Do malej sklenenej fľaštičky so šrubovacím pryžovým uzáverom boli navážené 3,6-dibromftalonitril (0,07 g; 0,25 mmol) a zásada (0,75 mmol,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  0,10 g alebo  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  0,24 g). Fľaštička

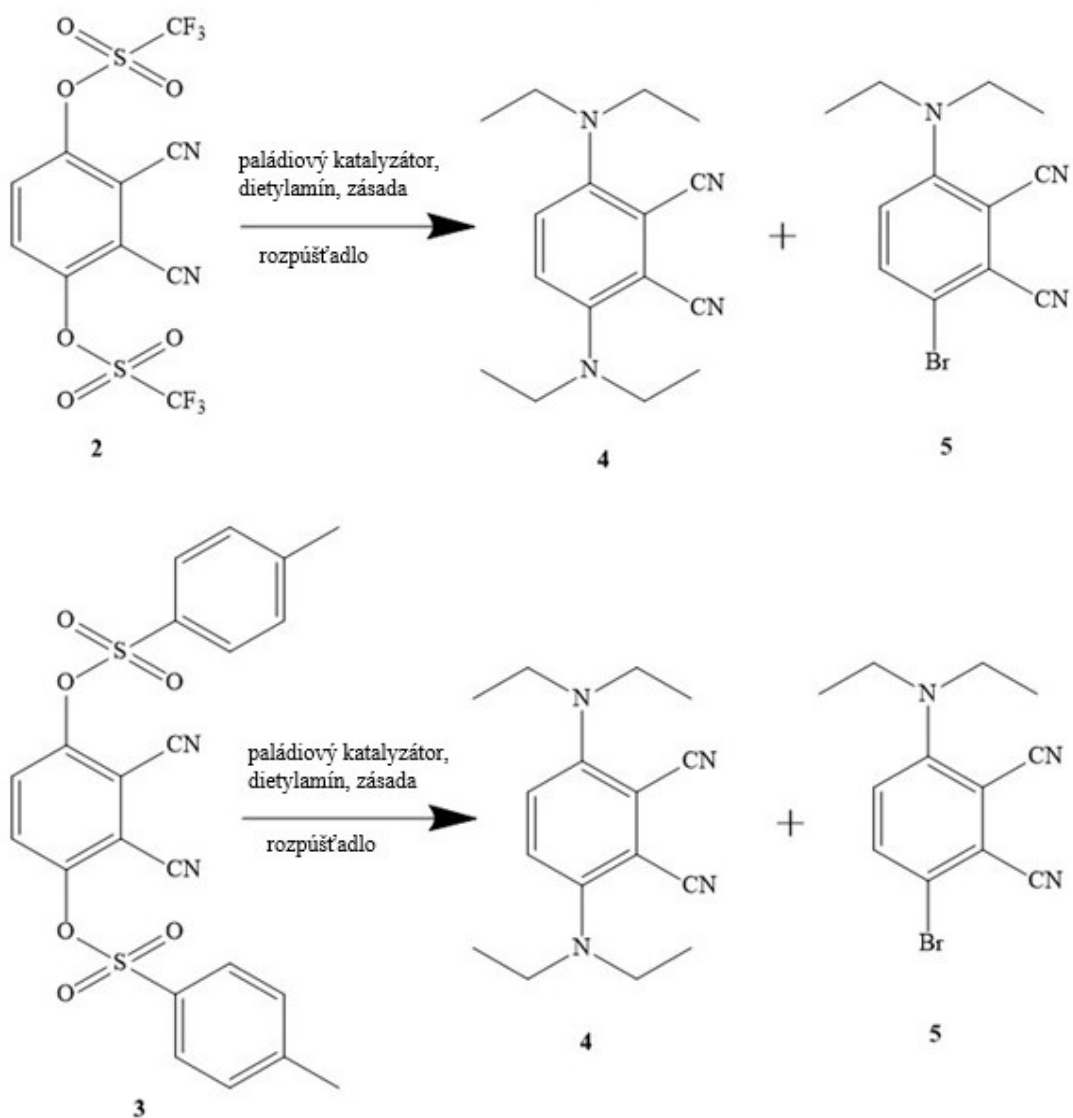
bola uzavretá a opäť bol vymenený vzduch za argón. Striekačkou s ihlou bol pridaný bezvodý dimetylsulfoxid (1,5 ml) a dietylamín (0,182 g; 2,5 mmol). Fľaštička bola vložená do pieskového kúpeľa predhriateho na 80 °C na 24 hodín, počas neustáleho miešania. Na druhý deň prebiehalo hodnotenie, ktorého postup je uvedený nižšie (kapitola 5.5).

Po hodnotení boli reakcie spojené a bol vyizolovaný majoritný produkt **5** na štruktúrnu analýzu. Izolácia produktu prebiehala nasledovne: spojené reakcie boli dané do vody a produkt bol extrahovaný do etylacetátu. Čistenie prebiehalo pomocou stĺpcovej chromatografie a ako mobilná fáza bola použitá kombinácia chloroformu a toluénu v pomere 3:1. Získali sme žltú kryštalickú látku **5**.

t.t. 114,0-115,5 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.56 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, ArH), 6.97 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, ArH), 3.51 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H, NCH<sub>2</sub>), 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 151,9; 136,7; 122,4; 120,3; 116,0; 115,1; 113,0; 102,0; 46,1; 12,8. IČ (ATR):  $\nu_{\max}$  = 3101, 2980, 2934, 2231, 2211, 1585, 1534, 1467, 1414, 1383, 1357, 1317, 1289, 1210.

#### 5.4 VŠEOBECNÝ POSTUP BUCHWALD-HARTWIGOVHO COUPLINGU





Reakcia prebiehala v bezvodom prostredí, pod plynným argónom. Všetko potrebné laboratórne sklo (malá sklenená fľaštička s pryžovým uzáverom, 2-3 sklenené striekačky s ihlou-podľa počtu použitých rozpúšťadiel, destilačná banka), bolo najprv sušené 2 hodiny pri 127 °C, aby bola minimalizovaná všetka vlhkosť. Potom bolo do fľaštičky dané malé miešadlo, fľaštička bola vzduchotesne uzavretá a bol v nej vymenený vzduch za argón. Do sklenenej banky cez vzduchotesný uzáver boli napichané striekačky s ihlou a taktiež bol v nich vymenený vzduch za argón. Takto sklo vychladlo. Do malej sklenenej fľaštičky so šrubovacím pryžovým uzáverom bola navážená východisková látka **1**, **2** alebo **3** (0,25 mmol), zásada (1,25 mmol), paládiový katalyzátor (0,005 mmol) a druhý pomocný katalyzátor (0,0125 mmol). Fľaštička bola uzavretá a opäť bol vzduch vymenený za argón. Striekačkou a ihlou bol pridaný amín (1,5 mmol) a rozpúšťadlá

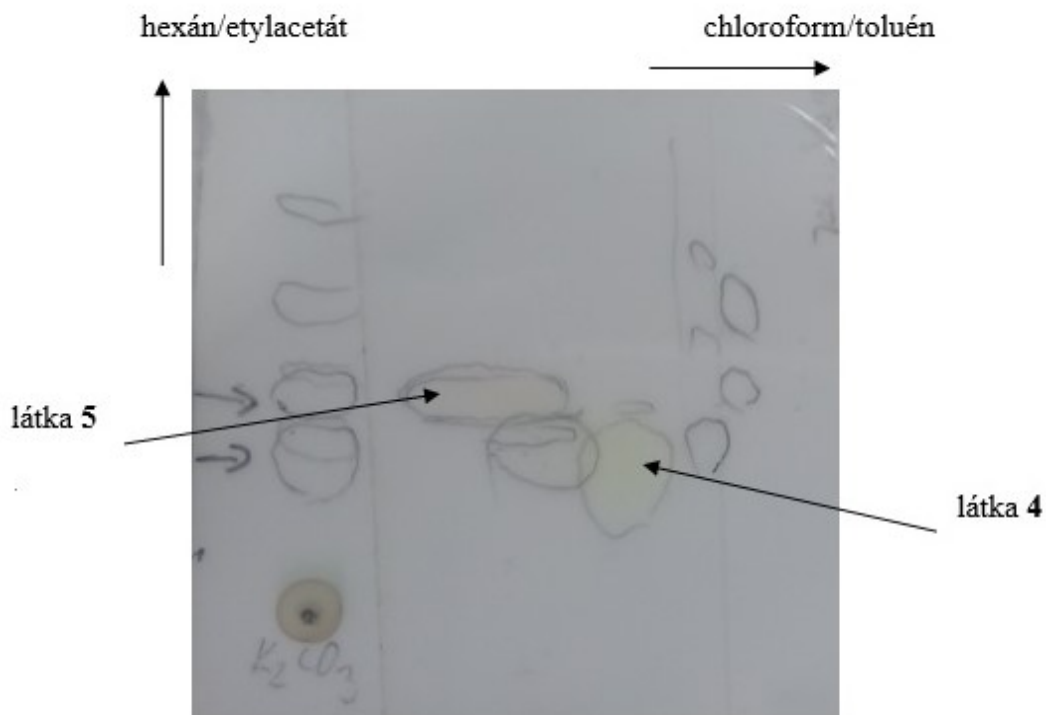
(toluén 0,5 ml + *t*BuOH 0,1 ml alebo dimetylsulfoxid 1,5 ml). Fľaštička bola umiestnená do pieskového kúpeľa predhriateho na 110 °C na 24 hodín, počas neustáleho miešania. Potom prebehla kvantifikácia produktov podľa postupu uvedeného nižšie (kapitola 5.5).

Po kvantifikácii boli obsahy všetkých fľaštičiek zliate do jednej banky, rozpúšťadla boli oddestilované a požadovaná látka **4** bola izolovaná na štruktúrne analýzy a potvrdenie totožnosti. Izolovanie produktu prebiehalo pomocou stĺpcovej chromatografie. Ako prvá mobilná fáza bola použitá zmes chloroformu a hexánu v pomere 3:1. Týmto spôsobom bol produkt zbavený hrubých nečistôt. Za použitia zmesi hexán a etylacetát v pomere 3:1 ako mobilnej fázy, bola izolovaná látka **4**. Bola to jasnožltá olejovitá látka, ktorá po čase stuhla.

t.t. 94,6-95,7 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7,12 (s, 2H, ArH), 3,30 (q, 8H, *J* = 7,2 Hz, NCH<sub>2</sub>), 1,14 (t, 12H, *J* = 7,0 Hz, CH<sub>3</sub>). MS (ESI): *m/z* (%) 293 (30) [M + Na<sup>+</sup>], 271 (100) [M + H<sup>+</sup>]

## 5.5 KVANTIFIKÁCIA PRODUKTOV

Obsah fľaštičky (viď vyššie kapitoly 5.3 a 5.4) bol nariadený tetrahydrofuránom a prefiltrovaný do destilačnej banky. Fľaštičky boli dôkladne premyté tetrahydrofuránom, aby sa celý ich obsah dostal do banky. Potom bolo rozpúšťadlo odparené a následne rozpustené v 2 ml tetrahydrofuránu. Na chromatografickú dosku 5×5 cm bolo mikropipetou nanosených 5 μl roztoku do jedného rohu. Doska bola vyvíjaná najprv v mobilnej fáze hexán a etylacetát v pomere 3:1, potom bola doska vybratá, vysušená a otočená o 90° a vyvíjaná tentoraz v mobilnej fáze chloroform a toluén v pomere 1:1. Z dosky (Obr. 34) bola kvantitatívne vyškrabaná škvrna látka **4** aj **5** do osobitných skúmaviek. Do každej skúmavky boli pridané 2 ml tetrahydrofuránu. Obsah skúmavky bol pretrepaný a prefiltrovaný cez ručný teflónový filter priamo do fluorescenčnej kyvety. Emisné spektrum bolo merané pri 420-600 nm po excitácii pri 400 nm. Hodnotili sme intenzitu fluorescencie pri 505 nm (pre látku **4**) a 472 nm (pre látku **5**). Stanovenie pre každú reakciu bolo urobené dvakrát.

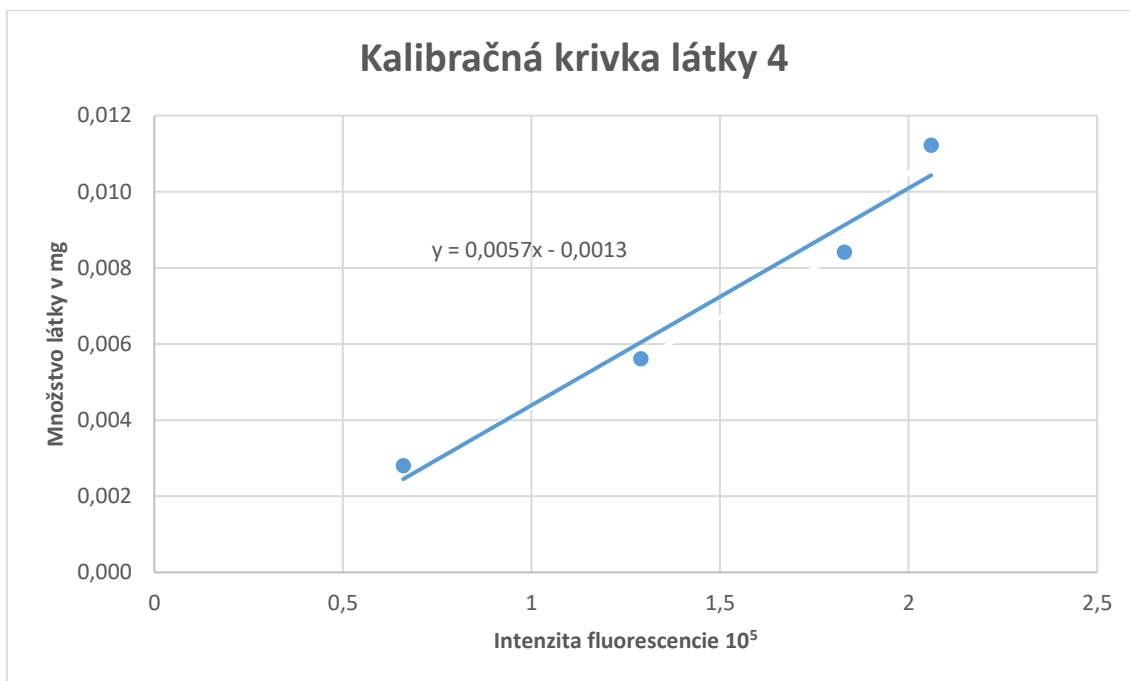


Obr. 34 2D-TLC doska s látkami 4 a 5

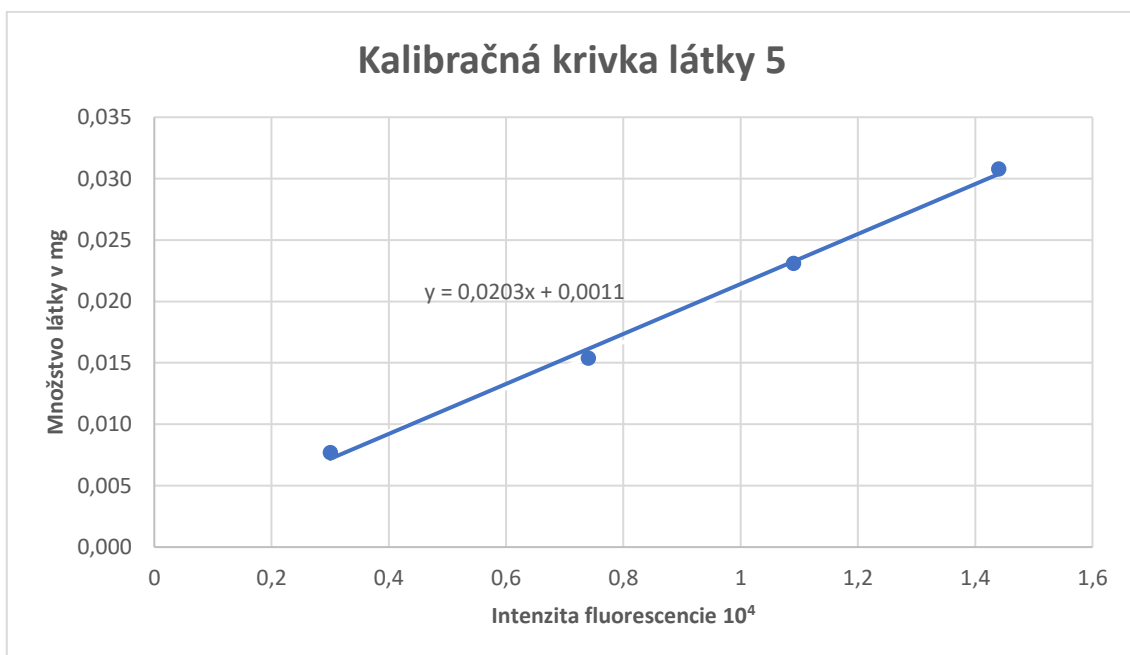
## 5.6 ZOSTROJENIE KALIBRAČNEJ KRIVKY

Látka 4 (0,561 mg) alebo látka 5 (1,539 mg) bola rozpustená v 1 ml tetrahydrofuránu. Na chromatografickú dosku 5×5 cm bolo mikropipetou nanosených 5  $\mu$ l roztoku do jedného rohu. Doska bola vyvíjaná najprv v mobilnej fáze hexán a etylacetát v pomere 3:1, potom bola doska vybratá, vysušená a otočená o 90° a vyvíjaná tentoraz v mobilnej fáze chloroform a toluén v pomere 1:1. Z dosky boli kvantitatívne vyškrabané škvrny skúmanej látky a boli dané do skúmaviek. Do každej skúmavky boli pridané 2 ml tetrahydrofuránu. Obsah skúmavky bol pretrepaný a prefiltrovaný cez ručný teflónový filter priamo do fluorescenčnej kyvety. Emisné spektrum bolo merané pri 420-600 nm po excitácii pri 400 nm. Postup bol rovnaký pri nanosení 10  $\mu$ l, 15  $\mu$ l a 20  $\mu$ l roztoku. Z nameraných hodnôt intenzity fluorescencie bola zostrojená kalibračná krivka (Graf 1, 2).





Graf 1 Kalibračná krivka látky 4

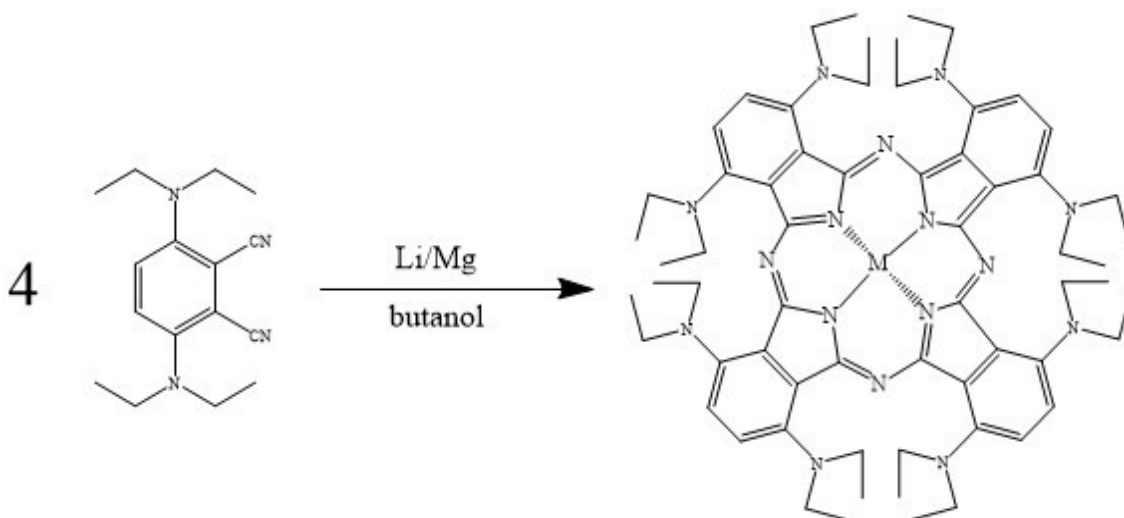


Graf 2 Kalibračná krivka látky 5

## 5.7 CYKLIZÁCIA S POUŽITÍM LÍTIA

Látka **4** (10 mg, 0,037 mmol) bola rozpustená v butanole a krátky čas zahrievaná pri 138 °C, za chladenia vodným chladičom. Do reakcie bolo pridané lítium (1 mg, 0,148 mmol) a zahrievanie pokračovalo ešte 1 hodinu. Potom bola reakcia ukončená, reakčná zmes nariadená tetrahydrofuránom a bolo zmerané absorpčné spektrum. Absorpčné spektrum neindikovalo vznik požadovaného produktu, v oblasti 600-900 nm nebol žiaden absorpčný pás.

## 5.8 CYKLIZÁCIA S POUŽITÍM HORČÍKA



K horčíku (6 mg, 0,247 mmol) bol pridaný butanol a zmes bola zahrievaná 2,5 hodiny pri 138 °C, pod vzdušným chladičom. Látka **4** (10 mg, 0,037 mmol) bola rozpustená v malom množstve butanolu a pipetkou bola pridaná po kvapkách k butanolátu horečnatému. Reakcia bola zahrievaná 24 hodín. Potom bola reakcia ukončená, reakčná zmes nariadená tetrahydrofuránom a bolo zmerané absorpčné spektrum. Absorpčné spektrum neindikovalo vznik požadovaného produktu, v oblasti 600-900 nm nebol žiaden absorpčný pás.

## 6. VÝSLEDKY

Syntéza ftalocyanínov je založená na cyklotetramerizácii vhodne substituovaných ftalonitrilov. V našom prípade bol týmto požadovaným prekursorom 3,6-bis(diethylamino)ftalonitril (**4**). Látka tohto typu, teda 3,6-disubstituovaný ftalonitril, zatiaľ nebola pripravená, pretože klasické metódy nukleofilnej substitúcie boli neúčinné. Preto sme sa v mojej diplomovej práci snažili nájsť a optimalizovať vhodnú metódu na prípravu takýchto zlúčenín. Bolo to pomocou nukleofilnej substitúcie a Buchwald-Hartwigovho couplingu.

### 6.1 PRÍPRAVA VÝCHODISKOVÝCH LÁTOK

Ako východiskové látky sme použili zlúčeniny s dobre odstupujúcimi skupinami:

- 3,6-dibrómftalonitril (**1**)
- 3,6-bis(trifluormetylsulfonyloxy)ftalonitril (**2**)
- 3,6-bis(*p*-toluénsulfonyloxy)ftalonitril (**3**)

Syntéza látok **2** a **3**, s triflátom a tosylátom ako odstupujúcimi skupinami, prebiehala po esterifikácii dihydroxyftalonitrilu dobre, s vysokými výťažkami.

Na druhej strane syntéza látky **1** bola s komplikáciami, hoci podľa postupu<sup>90</sup> to malo byť jednoduché. Po kryštalizácii z tetrahydrofuránu podľa literatúry<sup>90</sup> sme získali len trifenyľfosfínoxid, teda vedľajší produkt reakcie.

Izolovanie nášho produktu, látky **1**, bol dlhý a náročný proces. Vzorku sme dvakrát vyčistili stĺpcovou chromatografiou. Týmto postupom sme oddelili mnoho nečistôt a získali tak relatívne čistú látku. Zvyšných nečistôt sme sa zbavili ich rozpustením v malom množstve chloroformu, v ktorom sa náš produkt nerozpustil. Rozpúšťadlo sme odsali a získali čistú látku **1**.

## 6.2 PRÍPRAVA 3,6-DIETYLAMINOFTALONITRILU (4)

Nasledujúcim krokom bola príprava prekursoru 3,6-dietylaminofthalonitrilu, z ktorého sme neskôr vyskúšali cyklotetramerizáciou nasyntetizovať ftalocyanínový derivát. Syntéza tohto prekursoru bola veľmi zložitá, pretože je veľmi komplikované dostať amíny do polôh 3 a 6 ftalonitrilu. V minulosti bolo mnoho neúspešných pokusov o syntézu takýchto látok.<sup>92</sup>

Na syntézu látky 4 sme zvolili tieto dva postupy: nukleofilná substitúcia a coupling podľa Buchwald-Hartwiga.

### 6.2.1 NUKLEOFILNÁ SUBSTITÚCIA

Pri nukleofilnej substitúcii sme ako východiskovú látku použili len látku 1. Ďalej sme použili dietylamin, uhličitan draselný alebo uhličitan cézny ako bázu a bežný dimetylsulfoxid ako rozpúšťadlo. Týmto spôsobom sme získali len monosubstituovaný derivát ftalonitrilu.

Pri použití bezvodého diethylamínu, bezvodého dimetylsulfoxidu a striktné bezvodých podmienok, sme získali aj malé množstvo disubstituovaného derivátu ftalonitrilu. Taktiež sa výrazne zvýšilo aj množstvo monosubstituovaného derivátu.

V tomto prípade sme predovšetkým menili zásadu a čas, počas ktorého reakcia prebiehala. Všetky kombinácie, ktoré sme vyskúšali, sú uvedené v tabuľke 1.

*Tabuľka 1 Podmienky, za ktorých prebiehali reakcie pomocou nukleofilnej substitúcie. Východisková látka 1*

Číslo reakcie	amín	zásada	rozpúšťadlo	teplota °C	čas
1	dietylamin	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	dimetylsulfoxid	80	24 hod
2	dietylamin	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	dimetylsulfoxid	80	7 dní
3	dietylamin	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	dimetylsulfoxid	80	7 dní

## 6.2.2 BUCHWALD-HARTWIG COUPLING

V tejto reakcii sú veľmi dôležité podmienky, teda použité katalyzátory, zásady, rozpúšťadlá a teplota, pri ktorej reakcia prebieha, a ich vzájomné kombinácie. My sme vyskúšali kombinácie, ktoré sú uvedené v tabuľke 2.

Tabuľka 2 Podmienky, za ktorých prebiehali reakcie couplingu podľa Buchwald-Hartwig

Číslo reakcie	katalyzátor		amín	zásada	rozpúšťadlo	teplota °C
1	Pd(OAc) <sub>2</sub>	X-Phos	dietylamín	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	toluén+tBuOH	110
2	RuPhos-PdG3	Ru-Phos	dietylamín	K-O- <i>t</i> Bu	tetrahydrofurán	70
3	RuPhos-PdG3	Ru-Phos	dietylamín	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	toluén+tBuOH	110
4	RuPhos-PdG3	Ru-Phos	dietylamín	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	toluén+tBuOH	110
5	RuPhos-PdG3	Ru-Phos	dietylamín	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	toluén+tBuOH	110
6	RuPhos-PdG3	Ru-Phos	dietylamín	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	toluén+tBuOH	110
7	RuPhos-PdG3	Ru-Phos	dietylamín	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	toluén+tBuOH	80
8	RuPhos-PdG3	Ru-Phos	dietylamín	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	toluén+tBuOH	80
9	RuPhos-PdG3	Ru-Phos	dietylamín	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	dimetylsulfoxid	80
10	RuPhos-PdG3	Ru-Phos	dietylamín	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	dimetylsulfoxid	80

Ako východiskové látky sme v prvých troch reakciách použili všetky tri látky s rôznymi odstupujúcimi skupinami, teda látky **1**, **2** aj **3**. V nasledujúcich reakciách sme použili už len látku **1**, pretože jedine z tejto východiskovej látky sa nám podarilo nasyntetizovať požadovaný produkt, teda 3,6-dietylaminofalónitril.

### 6.3 HODNOTENIE

Hodnotenie výťažku reakcií bolo na začiatku problematické, keďže sme pracovali s veľmi malými množstvami látok. Preto čistenie pomocou stĺpcovej chromatografie bolo príliš zdĺhavé na rýchle hodnotenie účinnosti reakcie a navyše by mohlo byť stratové, čo by viedlo ku skresleným interpretáciám výsledkov. Nakoniec sme vytvorili vlastný postup, pričom hodnotenie prebiehalo fluorimetricky. Pomocou kalibračnej krivky sme následne vypočítali približné množstvá produktov v každej reakcii, čo umožnilo porovnanie účinnosti jednotlivých reakcií.

Prvým krokom hodnotenia bolo získanie intenzity fluorescence pre každú vzorku. Ich hodnoty sú uvedené v tabuľkách 3 a 4.

*Tabuľka 3 Namerané hodnoty fluorescence (count per second, cps) pri použití nukleofilnej substitúcie. Východisková látka 1*

Číslo reakcie	Látka 5 [ $10^4$ ]			Látka 4 [ $10^5$ ]		
	1.meranie	2.meranie	priemer	1.meranie	2.meranie	priemer
1	24,05	25,50	<b>24,78</b>	1,40	1,15	<b>1,28</b>
2	25,60	30,60	<b>28,10</b>	1,25	1,52	<b>1,39</b>
3	27,70	27,10	<b>27,4</b>	1,08	1,24	<b>1,16</b>

Tabuľka 4 Namerané hodnoty fluorescence (count per second, cps) pri použití Buchwald-Hartwig couplingovej reakcie. Východisková látka **1**.

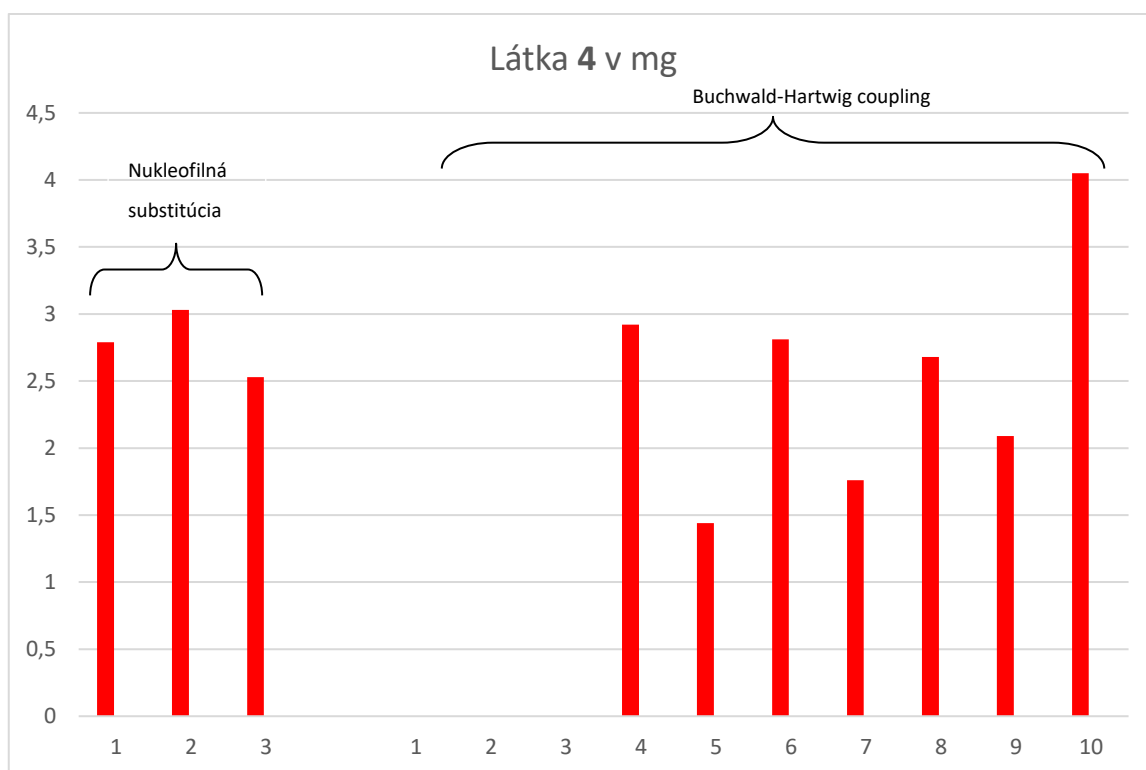
Číslo reakcie	Látka <b>5</b> [ $10^4$ ]			Látka <b>4</b> [ $10^5$ ]		
	1.meranie	2.meranie	priemer	1.meranie	2.meranie	priemer
1	0	0	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>
2	0	0	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>
3	0	0	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>
4	0,43	0,8	<b>0,62</b>	1,43	1,25	<b>1,34</b>
5	2,7	3,66	<b>3,18</b>	0,71	0,6	<b>0,66</b>
6	1,37	2,85	<b>2,11</b>	1,28	1,3	<b>1,29</b>
7	0,6	0,83	<b>0,72</b>	0,8	0,81	<b>0,81</b>
8	1,42	2,35	<b>1,89</b>	1,2	1,25	<b>1,23</b>
9	20,6	24,7	<b>22,65</b>	1,08	0,83	<b>0,96</b>
10	28,8	32,7	<b>30,75</b>	1,76	1,95	<b>1,86</b>

V ďalšom kroku hodnotenia sme zostrojili kalibračnú krivku pre látky **4** a **5** a potom podľa nej vypočítali množstvá látok v každej reakcii.

Výsledné hodnoty získaných produktov v jednotlivých reakciách sú vyjadrené v grafoch 3 a 4.



*Graf 3 Množství získaných produktov v mg vo všetkých reakciách, použitá bola východisková látka 1*



*Graf 4 Množství získaného disubstituovaného derivátu vo všetkých reakciách, použitá bola východisková látka 1*



## 7. DISKUSIA

Pri nukleofilnej substitúcii sme získali mnohonásobne viac monosubstituovaného derivátu než disubstituovaného derivátu (Graf 3). Jeho množstvo bolo približne rovnaké vo všetkých troch skúšaných reakciách. Keď sme ale nechali reakciu prebiehať 7 dní, tak sme získali mierne vyššie množstvo monosubstituovaného derivátu. V porovnaní zásad použitých v reakciách bola účinnejšia  $K_2CO_3$ , pretože sme získali väčšie množstvo monosubstituovaného derivátu.

Na získanie disubstituovaného derivátu pri nukleofilnej substitúcii nemala dĺžka priebehu reakcie významný vplyv (Graf 4), rozdiel bol ešte menší ako v prípade monosubstituovaného derivátu. Dĺžka priebehu reakcie má teda na výťažok iba mierny vplyv a reakcia pravdepodobne po 24 hodinách už ďalej neprebíha. Ako účinnejšia zásada bola výhodnejšia  $K_2CO_3$ , pri ktorej sme získali väčšie množstvo produktu ako pri použití  $Cs_2CO_3$ .

Pri couplingu podľa Buchwald-Hartwiga sme v prvých troch reakciách (podmienky 1-3) použili všetky tri východiskové látky **1**, **2** a **3**.

Po kontrole pomocou TLC, sme ale zistili, že v týchto reakciách vôbec nič nevzniklo, tosylát aj triflát sa úplne rozložili. Len pri východiskovej látke **1** bol mierny náznak produktu. Preto sme v ďalších reakciách pokračovali už len s východiskovou látkou **1**.

V tretej reakcii sme konečne získali aj minimálne množstvo disubstituovaného produktu **4**. Na doske TLC sme videli náznak produktu pri použití východiskovej látky **1**.

V reakciách 4 až 6 sme použili rovnaké rozpúšťadlá (toluén a *tert*-butanol) aj teplotu (110 °C), pri ktorej reakcia prebiehala, menili sme len použitú zásadu. Najviac monosubstituovaného derivátu sme získali pri použití zásady  $K_2CO_3$ , ale množstvo disubstituovaného derivátu bolo v tomto prípade najmenej. Keďže sme sa snažili získať predovšetkým disubstituovaný derivát, v nasledujúcich reakciách sme použili ako zásady už len  $Cs_2CO_3$  a  $K_3PO_4$ . Množstvo disubstituovaného derivátu bolo pri použití týchto dvoch zásad a pri teplote 110 °C takmer rovnaký.

V nasledujúcich dvoch reakciách 7 a 8 sme skúsili vplyv teploty na výťažok reakcie a znížili sme ju na 80 °C. V prípade monosubstituovaného derivátu, bol mierny pokles získaného produktu. V prípade disubstituovaného derivátu bol pokles výraznejší, keď

sme použili ako zásadu  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , ale pri  $\text{K}_3\text{PO}_4$  bol pokles miernejší. Teplota má teda na priebeh reakcie významný vplyv a pri vyššej teplote sme získali väčšie množstvo produktu.

Pri reakciách 4 až 8, kde sme ako rozpúšťadlo použili toluén a *t*BuOH bolo množstvo monosubstituovaného derivátu a disubstituovaného derivátu približne rovnaké. Keď sme už ale v reakciách 9 a 10 použili ako rozpúšťadlo dimetylsulfoxid, takmer 100 násobne nám stúplo množstvo monosubstituovaného derivátu. Množstvo disubstituovaného derivátu bolo taktiež mierne vyššie. Pri použití  $\text{K}_3\text{PO}_4$  ako zásady bol rozdiel ešte výraznejší ako pri zásade  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ . Preto ako výhodnejšie rozpúšťadlo sa javí dimetylsulfoxid. Tu ale nie je možné vylúčiť, že reakcie neprebíhali mechanizmom nukleofilnej substitúcie, pretože výťažky oboch látok boli približne rovnaké pri Buchwald-Hartwigovom couplingu, ako aj pri použití podmienok nukleofilnej substitúcie bez použitia katalyzátorov.

Hmotnosť získaného disubstituovaného derivátu sa výraznejšie nelíšila medzi reakciami (Graf 4). Teplota mala mierny vplyv na výťažky. Ale ako najúčinnější zásada sa takmer vždy ukázala  $\text{K}_3\text{PO}_4$  a pri použití dimetylsulfoxidu ako rozpúšťadla bola získaná najvyššia hmotnosť 3,6-dietylaminoderivátu.

V poslednom kroku sme vyskúšali aj dva postupy cyklizačných reakcií, jednu s použitím lítia a druhú s butanolátom horečnatým. Podrobné postupy reakcií sú popísané v experimentálnej časti mojej diplomovej práce.

Pomocou týchto postupov nám ale žiaden produkt nevznikol. Zisťovali sme to meraním absorpčného spektra v tetrahydrofuráne, na ktorom bolo vidieť len východiskovú látku a žiaden absorpčný pás v oblasti 600-900 nm.

## 8. ZÁVER

V rámci mojej diplomovej práce boli pomocou nukleofilnej substitúcie a couplingu podľa Buchwald-Hartwiga pripravené prekurzory ftalocyanínov: 3,6-bis(dietylamino)ftalonitril a 3-dietylaminoftalonitril. Zistili sme, že sú veľmi dôležité podmienky, pri ktorých reakcie prebiehajú, ako napríklad typ rozpúšťadla a teplota. Pri Buchwald-Hartwigovom couplingu boli taktiež dôležité druhy použitých paládiových katalyzátorov. Aj keď sme použili dva postupy syntézy, nebolo možné jednoznačne vylúčiť, že pri použití paládiových katalyzátorov reakcia neprebíhala taktiež mechanizmom nukleofilnej substitúcie.

Následné cyklotetramerizačné reakcie, za vzniku neperiférne substituovaných ftalocyanínov týchto prekurzorov už neboli úspešné. Ak by sa v budúcnosti podarilo nasyntetizovať ftalocyaníny z neperiférne substituovaných prekurzorov, mohli by byť použité vo fotodynamicknej terapii ako fotosenzitizéry s lepšími vlastnosťami.

## 9. POUŽITÁ LITERATÚRA

- <sup>1</sup> KANTAR, G. K. et al. Phtalocyanine and azaphtalocyanines containing eugenol: synthesis, DNA interaction and comparison of lipase. *J. Chem. Sci.*, **2017**, 129(8), 1247-1256.
- <sup>2</sup> MANOTO, S. L. et al. Modes of Cell Death Induced by Photodynamic Therapy Using Zinc Phthalocyanine in Lung Cancer Cells Grown as a Monolayer and Three-Dimensional Multicellular Spheroids. *Molecules*, **2017**, 22(5), 1-15.
- <sup>3</sup> MØRKVED, E. H. et al. Unsymmetrical zinc azaphtalocyanines, peripherally substituted with thiophen-2-yl and 2-functionalized phenoxy groups. *Polyhedron*, **2010**, 29, 3229-3237.
- <sup>4</sup> WU, W. et al. Controllable Photodynamic Therapy Implemented by Regulating Singlet Oxygen Efficiency. *Adv. Sci.*, **2017**, 4, 1-21.
- <sup>5</sup> MLKVY, P. Postavenie a možnosti fotodynamickej terapie v onkológii. *Onkológia*, **2007**, 2, 299-301.
- <sup>6</sup> VAN STRATEN, D. et al. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers*, **2017**, 9(2), 1-54.
- <sup>7</sup> DOUGHERTY, T. J., et al. Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, **1998**, 90(12), 889-905.
- <sup>8</sup> RUNDLE, P. Photodynamic Therapy for Eye Cancer. *Biomedicines*, **2017**, 5(4), 1-7.
- <sup>9</sup> KONSTANTINIDIS, L.; DAMATO, B. Intraocular metastases-A Review. *Asia-Pac. J. Ophthalmol.*, **2017**, 6(2), 208-214.
- <sup>10</sup> GHEEWALA, T.; SKWOR, T.; MUNIRATHINAM, G. Photosensitizers in prostate cancer therapy. *Oncotarget*, **2017**, 8(18), 30524-30538.
- <sup>11</sup> MOOLE. H., et al. Succes of photodynamic therapy in palliating patients with nonresectable cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *World J. Gastroenterol.*, **2017**, 23(7), 1278-1288.
- <sup>12</sup> BANERJEE, S. M., et al. Photodynamic therapy: Inception to application in breast cancer. *Breast*, **2017**, 31, 105-113.
- <sup>13</sup> GRIFFIN, L. L.; LEAR, J. T. Photodynamic Therapy and Non-Melanoma Skin Cancer. *Cancers*, **2016**, 8(10), 1-13.
- <sup>14</sup> MANSFIELD, R.; BOWN, S.; McEWAN, J. Photodynamic therapy: shedding light on restenosis. *Heart*, **2001**, 86, 612-618.

- 15 TANAKA, M., et al. Immunogenic cell death due to a new photodynamic therapy (PDT) with glycoconjugated chlorin (G-chlorin). *Oncotarget*, **2016**, 7(30), 47242-47251.
- 16 BLANCO, K. C., et al. A Multicenter Clinical Study of Expected and Unexpected Side Reactions During and After Skin Cancer Treatment by Photodynamic Therapy. *Skinmed*, **2017**, 15, 113-118.
- 17 KOU, J.; DOU, D.; YANG, L. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget*, **2017**, 8(46), 81591-81603.
- 18 GAO, W. et al. Photodynamic Therapy Induced Enhancement of Tumor Vasculature Permeability Using an Upconversion Nanoconstruct for Improved Intratumoral Nanoparticle Delivery in Deep Tissues. *Theranostics*, **2016**, 6(8), 1131-1144.
- 19 ALLISON, R. R.; MIGHISSI K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin. Endosc.*, **2013**, 46, 24-29.
- 20 KATAOKA, H., et al. New photodynamic therapy with next-generation photosensitizers. *Ann. Transl. Med.*, **2017**, 5(8), 1-7.
- 21 BENOVA, L. Photodynamic therapy: Current Status and Future Directions. *Med. Princ. Pract.*, **2015**, 24(1), 14-28.
- 22 PINILLOS BAYONA, A. M. et al. Design features for optimization of tetrapyrrol macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers. *Chem. Biol. Drug Des.*, **2017**, 89(2), 347-364.
- 23 WANG, K. Molecular mechanisms of liver injury: Apoptosis and necrosis. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **2014**, 66, 351-356.
- 24 LÓPEZ-MARÍN, N.; MULET, R. In silico modelling of apoptosis induced by photodynamic therapy. *J. Theor. Biol.*, **2018**, 436, 8-17.
- 25 NGABIRE, D.; KIM, G. D. Autophagy and Inflammatory Response in the Tumor Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.*, **2017**, 18(9), 1-15.
- 26 NOWAK-SLIWINSKA, P. et al. Vascular regrowth following photodynamic therapy in the chicken embryo chorioallantoic membrane. *Angiogenesis*, **2010**, 13, 281-292.
- 27 OLIVIO, M. et al. Targeted Therapy of Cancer Using Photodynamic Therapy in Combination with Multi-faceted Anti-tumor Modalities. *Pharmaceuticals*, **2010**, 3, 1507-1529.
- 28 MAEDING, N.; VERWANGER, T.; KRAMMER, B. Boosting Tumor-Specific Immunity Using PDT. *Cancers*, **2016**, 8(91), 1-14.
- 29 BRACKETT, C. M.; GOLLNICK, S. O. Photodynamic Therapy Enhancement of Anti-Tumor Immunity. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2011**, 10(5), 649-652.

- 30 CASTANO, A. P.; MROZ, P.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy and anti-tumor immunity. *Nat. Rev. Cancer*, **2006**, 6(7), 535-545.
- 31 ANZENGRUBER, F. et al. T-cell mediated anti-tumor immunity after photodynamic therapy: Why does it not always work and how we can improve it? *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2015**, 14(8), 1492-1509.
- 32 GOLLNICK, S. O.; VAUGHAN, L.; HENDERSON, B. W. Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy. *Cancer Res.*, **2002**, 62, 1604-1608.
- 33 KORBELIK, M.; BANÁTH, J.; SAW, K. M. Immunoregulatory Cell Depletion Improves the Efficacy of Photodynamic Therapy-Generated Cancer Vaccines. *Int. J. Mol. Sci.*, **2015**, 16, 27005-27014.
- 34 KHARWAL, G. B. et al. Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Application. *Lasers Surg. Med.*, **2011**, 43(7), 755-767.
- 35 CARRERA, E. T. et al. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a critical review. *Laser Phys.*, **2016**, 26(12), 1-23.
- 36 ABDEL-HADY, E. S. et al. Immunological and Viral Factors Associated with the Response of Vulval Intraepithelial Neoplasia to Photodynamic Therapy. *Cancer Res.*, **2001**, 61, 192-196.
- 37 MEHRABAN, N.; FREEMAN, H. S. Development in PDT Photosensitizers for Increased Selectivity and Singlet Oxygen Production. *Materials*, **2015**, 8, 4421-4456.
- 38 YOON, I.; LI, J. Z.; SHIM, Y. K. Advance in Photosensitizers and Light Delivery for Photodynamic Therapy. *Clin. Endosc.*, **2013**, 46, 7-23.
- 39 ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials*, **2013**, 6, 817-840.
- 40 MALATESTI, N.; MUNITIC, I.; JURAK, I. Porphyrin-based cationic amphiphilic photosensitizers as potential anticancer, antimicrobial and immunosuppressive agents. *Biophys. Rev.*, **2017**, 9(2), 149-168.
- 41 BRESKEY, J. D. et al. Photodynamic therapy: occupational hazards and preventative recommendations for clinical administration by healthcare providers. *Photomed. Laser Surg.*, **2013**, 31(8), 398-407.
- 42 KROEZE, S. G. C. et al. Photodynamic therapy as Novel Nephron Sparing Treatment Option for Small Renal Masses. *J. Urol.*, **2012**, 187, 289-295.
- 43 SENGE, M. O.; BRANDT, J. C. Temoporfin (Foscan<sup>®</sup>, 5,10,15,20-Tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin) — A Second-generation Photosensitizer. *Photochem. Photobiol.*, **2011**, 87, 1240-1296.

- 44 XIE, H. et al. Pharmacokinetic and biodistribution study following systemic administration of Fospeg<sup>®</sup> - a Pegylated liposomal mTHPC formulation in a murine model. *J. Biophotonics*, **2015**, 8(1-2), 142-152.
- 45 KANG-HSIN WANG, K.; MITRA, S.; FOSTER, T. H. Photodynamic dose does not correlate with long-term tumor response to mTHPC-PDT performed at several drug-light intervals. *Med. Phys.*, **2008**, 35(8), 3518-3526.
- 46 INOUE, K. 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy for bladder cancer. *Int. J. Urol.*, **2017**, 34, 97-101.
- 47 YONEMURA, Y. et al. Photodynamic Detection of Peritoneal Metastases Using 5-Aminolevulinic Acid (ALA). *Cancers*, **2017**, 23, 1-13.
- 48 HALANI, S. H.; ADAMSON, D. C. Clinical utility of 5-aminolevulinic acid HCl to better visualize and more completely remove gliomas. *OncoTargets Ther.*, **2016**, 9, 5629-5642.
- 49 COHEN, D. K.; LEE, P. K. Photodynamic Therapy for Non-Melanoma Skin Cancers. *Cancers*, **2016**, 8(90), 1-9.
- 50 WAN, M. T.; LIN, J. Y. Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. *Clin., Cosmet. Invest. Dermatol.*, **2014**, 7, 145-163.
- 51 DHILLON, S. S. et al. A Phase I Study of Light Dose for Photodynamic Therapy (PDT) Using 2-[1-hexyloxyethyl]-2 devinyl Pyropheophorbide-a (HPPH) for Treatment of Non-small Cell Carcinoma in situ or Non-small Cell Microinvasive Bronchogenic Carcinoma. A Dose Ranging Study. *J. Thorac. Oncol.*, **2016**, 11(2), 234-341.
- 52 KONSTANTINOOU, E. K. et al. Verteporfin-induced formation of protein cross-linked oligomers and high molecular weight complexes is mediated by light and leads to cell toxicity. *Sci. Rep.*, **2017**, 7, 1-11.
- 53 JAIN, M. et al. Intra-Arterial Drug and Light Delivery for Photodynamic Therapy Using Visudine<sup>®</sup>: Implication for Atherosclerotic Plaque Treatment. *Front. Physiol.*, **2016**, 7(400), 1-13.
- 54 NEWMAN, D. K. Photodynamic therapy: current role in the treatment of chorioretinal conditions. *Eye*, **2016**, 30, 202-210.
- 55 SHIMIZU, K. et al. Intraoperative Photodynamic Diagnosis Using Talaporfin Sodium Simultaneously Applied for Photodynamic Therapy Against Malignant Glioma: A Prospective Clinica Study. *Front. Neurol.*, **2018**, 9(24), 1-9.
- 56 YANO, T. et al. A multicenter phase II study of salvage photodynamic therapy using talaporfin sodium (ME2906) and a diode laser (PNL6405EPG) for local failure after

- chemoradiotherapy or radiotherapy for esophageal cancer. *Oncotarget*, **2017**, 8(13), 22135-22144.
- <sup>57</sup> KASUYA, K. et al. Photodynamic therapy for biliary tract organ via a novel ultra-small composite optical fiberscope. *Exp. Ther. Med.*, **2017**, 14, 4344-4348.
- <sup>58</sup> SEKKAT, N. et al. Like a Bolt from the Blue: Phthalocyanines in Biomedical Optics. *Molecules*, **2012**, 17, 98-144.
- <sup>59</sup> AZZOUZI, A. R. et al. TOOKAD® Soluble focal therapy: pooled analysis of three phase II studies assessing the minimally invasive ablation of localized prostate cancer. *World J. Urol.*, **2015**, 33, 945-953.
- <sup>60</sup> AZZOUZI, A. R. et al. Vascular-targeted photodynamic therapy with TOOKAD® Soluble in localized prostate cancer: standardization of the procedure. *World J. Urol.*, **2015**, 33, 937-944.
- <sup>61</sup> CONOR, A. E.; GALLAGHER, W. M.; BYRNE, A. T. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.*, **2009**, 85, 1053-1074.
- <sup>62</sup> GHEEWALA, T.; SKWOR, T.; MUNIRATHINAM, G. Photosensitizers in prostate cancer therapy. *Oncotarget*, **2017**, 8(18), 30524-30538.
- <sup>63</sup> ZHANG, K. et al. Hypericin-photodynamic therapy inhibits proliferation and induces apoptosis in human rheumatoid arthritis fibroblastlike synoviocytes cell line MH7A. *Iran. J. Basic Med. Sci.*, **2018**, 21(2), 130-137.
- <sup>64</sup> XU, Y. et al. Hypericin-mediated photodynamic therapy induces apoptosis in K562 human leukemia cells through JNK pathway modulation. *Mol. Med. Rep.*, **2015**, 12, 6475-6482.
- <sup>65</sup> KLEEMANN, B. et al. St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) Photomedicine: Hypericin-Photodynamic Therapy Induces Metastatic Melanoma Cell Death. *PLoS One*, **2014**, 9(7), 1-20.
- <sup>66</sup> COSTA DOS SANTOS, M. S. et al. Nanographene oxide-methylene blue as phototherapies platform for breast tumor ablation and metastasis prevention in a syngeneic orthotopic murine model. *J. Nanobiotechnol.*, **2018**, 16(9), 2-17.
- <sup>67</sup> SBEGHEN, M. R. et al. Topical and Intra-dermal Efficacy of Photodynamic Therapy with Methylene Blue and Light-Emitting Diode in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. *J. Lasers Med. Sci.*, **2015**, 6(3), 106-111.
- <sup>68</sup> HOSSEINI, N. et al. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to Photodynamic Therapy Using Four Dyes as the Photosensitizer. *J. Dent. Shiraz Univ. Med. Sci.*, **2016**, 17(4), 354-360.



- <sup>69</sup> RAMOS, R. R. et al. Photodynamic action of the red laser on *Propionibacterium acnes*. *An. Bras. Dermatol.*, **2017**, 92(5), 622-625.
- <sup>70</sup> BRIGGS, T. et al. Antimicrobial photodynamic therapy—a promising treatment for prosthetic joint infections. *Lasers Med. Sci.*, **2018**, 33, 523-532.
- <sup>71</sup> DOS SANTOS, A. F. et al. Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. *BMC Cancer*, **2017**, 17(194), 1-15.
- <sup>72</sup> SONG, L. et al. O<sub>2</sub> and Ca<sup>2+</sup> Fluxes as Indicators of Apoptosis Induced by Rose Bengal-Mediated Photodynamic Therapy in Human Oral Squamous Carcinoma Cells. *Photomed. Laser Surg.*, **2015**, 5(33), 258-265.
- <sup>73</sup> TOOMEY, P. et al. Intralesional Injection of Rose Bengal Induces a Systemic Tumor-Specific Immune Response in Murine Models of Melanoma and Breast Cancer. *PLoS One*, **2013**, 8(7), 1-6.
- <sup>74</sup> WANG, W. et al. Magnetic-luminescent YbPO<sub>4</sub>:Er,Dy microspheres designed for tumor theranostics with synergistic effect of photodynamic therapy and chemotherapy. *Int. J. Nanomed.*, **2014**, 9, 4879-4891.
- <sup>75</sup> TRAU, D. L.; SIEBER, F. Inhibitory effects of Merocyanine 540-mediated photodynamic therapy on cellular immune functions: A role in the prophylaxis of graft-versus-host disease. *J. Photochem. Photobiol. B*, **2015**, 153, 153-163.
- <sup>76</sup> TSUJINO, I. et al. Potentiation of the Anti-Tumor Effect of Merocyanine 540-Mediated Photodynamic Therapy by Amifostine and Amphotericin B. *Photochem. Photobiol.*, **2006**, 82(2), 458-465.
- <sup>77</sup> BEYER, K. et al. Photodynamic Treatment of Oral Squamous Cell Carcinoma Cells with Low Curcumin Concentrations. *J. Cancer*, **2017**, 8, 1271-1283.
- <sup>78</sup> DE MATOS, R. P. A. et al. Effect of Curcumin-Nanoemulsion Associated with Photodynamic Therapy in Cervical Carcinoma Cell Lines. *Biomed Res. Int.*, **2018**, 2018, 1-11.
- <sup>79</sup> TRIGO GUTIERREZ, J. K. et al. Encapsulation of curcumin in polymeric nanoparticles for antimicrobial Photodynamic Therapy. *PLoS One*, **2017**, 12(11), 1-34.
- <sup>80</sup> VIEIRA LEITE, D. P. et al. Effects of Photodynamic Therapy with Blue Light and Curcumin as Mouth Rinse for Oral Disinfection: A Randomized Controlled Trial. *Photomed. Laser Surg.*, **2014**, 32(11), 627-632.
- <sup>81</sup> AGGELIDOU, CH. et al. A versatile  $\delta$ -aminolevulinic acid (ALA)-cyclodextrin bimodal conjugate-prodrug for PDT applications with the help of intracellular chemistry. *Beilstein J. Org. Chem.*, **2014**, 10, 2414-2420.

- <sup>82</sup> LIU, Q. et al. Potent peptide-conjugated silicon phthalocyanines for tumor photodynamic therapy. *J. Cancer*, **2018**, 9, 310-320.
- <sup>83</sup> LIN, M. W. et al. A Formulation Study of 5-Aminolevulinic Encapsulated in DPPC Liposomes in Melanoma Treatment. *Int. J. Med. Sci.*, **2016**, 13(7), 483-489.
- <sup>84</sup> WANG, B. et al. Polymer-drug conjugates for intracellular molecule-targeted photoinduced inactivation of protein and growth inhibition of cancer cells. *Sci. Rep.*, **2012**, 2(766), 1-8.
- <sup>85</sup> MUEHLMANN, L. A. et al. Aluminum-phthalocyanine chloride associated to poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy. *Int. J. Nanomed.*, **2014**, 9, 1199-1213.
- <sup>86</sup> WARUNA JINADASA, R. G. et al. Syntheses and Cellular Investigations of Di(aspartate) and Aspartate-lysine Chlorin e6 Conjugates. *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, 14(3), 1049-1064.
- <sup>87</sup> KOSTRYUKOVA, L. V. et al. Comparison of a new nanoform of the photosensitizer chlorin e6, based on plant phospholipids, with its free form. *FEBS Open Bio*, **2018**, 8, 201-210.
- <sup>88</sup> URGAONKAR, S. Proazaphosphatranes: a highly effective class of triaminophosphine ligands in palladium-catalyzed cross-coupling reactions. *Retrospective Theses and Dissertations*, **2004**, 1707, 1-520.
- <sup>89</sup> MBAMBISA, G. et al. Synthesis and electrochemical properties of purple manganese (III) and red titanium (IV) phthalocyanine complexes octa-substituted at non-peripheral positions with phenylthio groups. *Polyhedron*, **2007**, 26(18), 5355-5364.
- <sup>90</sup> WANG, R. et al. New Synthesis of 3,6-Dibromophthalonitrile and Phthalocyanine Having Eight Thienyl Substituents at Peripheral  $\alpha$ -Positions. *J. Heterocycl. Chem.*, **2015**, 52(4), 1230-1233.
- <sup>91</sup> AL-RAQA S. Y. Synthesis, Photochemical and Photophysical Properties of Novel Unsymmetrically Substituted Zinc(II) Phthalocyanine. *J. Porphyr. Phthalocyanines*, **2006**, 10(1), 55-62.
- <sup>92</sup> BURŠÍKOVÁ, H. Syntéza 3,6-bis(dialkylamino)substituovaných ftalonitrilů. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2014.
- <sup>93</sup> KOBAYASHI, N. et al. Effect of Peripheral Substitution on the Electronic Absorption and Fluorescence Spectra of Metal-Free and Zinc Phthalocyanines. *Chem. Eur. J.*, **2003**, 9, 5123-5134.