

UNIVERZITA KARLOVA  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



# **Syntéza anionických derivátů ftalocyaninů jako potenciálních fotodynamicky aktivních látek**

Disertační práce



Mgr. Jan Kollár

Vedoucí disertační práce:

prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.

Odborný konzultant:

doc. PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D.

Hradec Králové 2020



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

V Hradci Králové, květen 2020

.....

Mgr. Jan Kollár



Rád bych poděkoval mému školiteli prof. PharmDr. Petru Zimčikovi, Ph.D. za pomoc, cenné rady, vedení a trpělivost při vzniku této práce. Doc. PharmDr. Veronice Novákové, Ph.D. bych rád poděkoval za odborné a podnětné rady a trpělivost.

Děkuji také kolegům doc. PharmDr. Miroslavu Miletínovi, Ph.D., Mgr. Jiřímu Demuthovi, Mgr. Filipovi Kostelanskému, Mgr. Lucii Kočiščákové a Mgr. Michaele Kolářové z laboratoří naší výzkumné skupiny „AzaPc Group“ a všem členům Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy za příjemné pracovní prostředí. Doc. PharmDr. Jaroslavu Rohovi, Ph.D. děkuji za odborné konzultace a spolupráci.

Dále děkuji kolegům z Katedry biochemických věd RNDr. Miloslavu Macháčkovi, Ph.D., Mgr. Marii Halaškové a Mgr. Monice Steklé za biologické testování připravených látek.

Rád bych také poděkoval studentce Mgr. Aleně Jančárové za spolupráci na projektu sulfonovaného azaftalocyaninu.

Za změření dat děkuji následujícím pracovníkům: doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc. (NMR spektra), Iva Vencovská (IČ spektra), Věnceslava Hronová a Dana Štěpánová (elementární analýzy), PharmDr. Juraj Lenčo, Ph.D. (MS spektra, LC/MS analýza), prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D. (HRMS spektra), doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D. (HPLC čistota), a také RNDr. Pavel Kubát, CSc. z Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského Akademie věd ČR (měření singletového kyslíku ve vodě).

Velké díky patří mým rodičům, sestře Šárce a manželce Peťce za velkou podporu během celého studia.

Tato disertační práce vznikla za finanční podpory těchto grantů a projektů:

Grantová agentura Univerzity Karlovy (GAUK: 1060216, 1182313, 1620219)

Grantová agentura České republiky

(GAČR: 13-27761S, 17-19094S, 19-14758Y, 20-09212S)

Univerzitní výzkumné centrum UK (UNCE 33/2012)

Specifický vysokoškolský výzkum (SVV 260 547, 260 401)



## ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy  
Kandidát: Mgr. Jan Kollár  
Školitel: prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.  
Konzultant: doc. PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D.  
Disertační práce: Syntéza anionických derivátů ftalocyaninů jako potenciálních fotodynamicky aktivních látek

Ftalocyaniny (Pc) a jejich aza-analogy (např. tetrapyrazinoporfyraziny TPyzPz) představují nadějnou skupinu organických barviv se zajímavými fotofyzikálními vlastnostmi (silná absorpce v oblasti 650-750 nm, vysoká produkce singletového kyslíku) velmi vhodnými pro použití ve fotodynamické terapii (PDT) nádorových onemocnění. Mají však také některé nevýhody snižující jejich potenciální použití v PDT (nízká rozpustnost ve vodě, silná tendence k agregaci).

Téma mé disertační práce úzce navazuje na téma mé diplomové práce, během které byl připraven TPyzPz s 16 karboxylátovými skupinami v rigidním uspořádání, u kterého jsme pozorovali výrazný negativní vliv pH a sérových proteinů na fotodynamickou aktivitu.

V první části disertační práce jsem proto připravil nový zinečnatý TPyzPz s 8 sulfonátovými skupinami na periférii charakterizovaný dobrou rozpustností ve vodě. Sulfonové kyseliny byly vybrány jako silnější kyseliny než karboxylové, takže se očekávalo, že vliv pH bude výrazně omezen. K významné agregaci opravdu došlo až při pH 2,5 v důsledku ztráty odpudivých sil po protonizaci sulfonátových skupin. Změny absorpčního i fluorescenčního spektra naznačovaly také silnou interakci TPyzPz s hovězím sérovým albuminem (BSA). Vazba na BSA vedla k významnému zhášení singletového excitovaného stavu fotosenzitizéru a k prodloužení životnosti tripletových stavů v důsledku omezené difuze kyslíku k excitovanému TPyzPz. Fotodynamická aktivita sulfonovaného TPyzPz byla také silně ovlivněna vazbou na BSA; byla přibližně 100× nižší v kultivačním médiu obsahujícím sérum než v bezsérovém médiu. Fluorescenční mikroskopie odhalila lyzosomy jako místo lokalizace TPyzPz a jejich rupturou po ozáření došlo k uvolnění TPyzPz do cytoplazmy.

Ve druhé části této práce jsem se zaměřil na sérii anionických a kationických Pc a zkoumal jsem jejich fotofyzikální, fyzikálně-chemické, vazebné a biologické vlastnosti s cílem nalézt parametry a/nebo faktory, které mohou přispět k podstatnému rozdílu fotodynamické aktivity mezi Pc nesoucími opačné náboje periferních substituentů. Do studie pro porovnání jak vlivu typu náboje, tak jeho distribuce na jádru makrocyklu byly zařazeny čtyři různé skupiny sloučenin, a to anionické hydrofilní, kationické hydrofilní, anionické amfifilní a kationické amfifilní. Všechny anionické deriváty byly agregovány při pH 4,9 (intralyzomální pH), zatímco kationické deriváty nebyly hodnotou pH ovlivněny. Anionické deriváty (nikoliv kationické) také silně interagovaly s BSA, což vedlo k silnému potlačení excitovaných stavů. Všechny Pc byly testovány *in vitro* na fotodynamickou aktivitu na HeLa, MCF-7 a HCT 116 buňkách s různou aktivitou pro anionické Pc ( $EC_{50} \sim 0,3-10 \mu\text{M}$ ) a mnohem vyšší aktivitou pro kationické Pc ( $EC_{50} \sim 3-50 \text{ nM}$ ). Fotodynamická aktivita anionických Pc se zlepšila, když byly buňky testovány v bezsérovém médiu, což naznačuje významný vliv séra. Celkovým srovnáním výsledků jednotlivých látek jsme v této práci zjistili, že okolní pH, vazba na sérové proteiny, interakce s biomembránami, subcelulární lokalizace a relokalizace po ozáření jsou hlavními faktory pro nižší fotoaktivitu anionických Pc v porovnání s kationickými Pc.



## ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department: Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Author: Mgr. Jan Kollar

Supervisor: prof. PharmDr. Petr Zimcik, Ph.D.

Advisor: doc. PharmDr. Veronika Novakova, Ph.D.

Doctoral Thesis: Synthesis of anionic phthalocyanines as potential photodynamic active photosensitizers

Phthalocyanines (Pcs) and their aza-analogues (e.g. tetrapyrzinoporphyrazines, TPyzPzs) represent a promising group of organic dyes with interesting photophysical properties (strong absorption in area 650-750 nm, strong singlet oxygen production) highly suitable for the use in photodynamic therapy (PDT) of cancer. However, they have also some drawbacks lowering their potential use in PDT (low solubility in water, strong tendency to aggregate).

The topic of my dissertation thesis closely follows the topic of my diploma thesis, during which TPyzPz with sixteen carboxylate groups in rigid arrangement was prepared and in which we have disclosed strong negative effect of low pH and serum proteins on photodynamic activity.

In the first part of this thesis I prepared new zinc TPyzPz with eight sulfonate groups on periphery, which was characterised by good solubility in water. Sulfonates were chosen as stronger acids than carboxylic groups, so they were expected not to be influenced by pH so much. Significant aggregation occurred at pH 2.5 as a consequence of losing repulsion forces after protonation of sulfonate groups. Changes in both absorption and fluorescence spectra indicated also strong interaction of TPyzPz with bovine serum albumin (BSA). Binding to BSA led to significant quenching of the singlet excited state of the photosensitizer and to longer triplet states lifetimes because of limited diffusion of oxygen to the excited TPyzPz. Photodynamic activity of sulfonated TPyzPz was also strongly influenced by binding to BSA; it was 100× lower in the cell culture medium containing serum than in the serum-free medium. Fluorescence microscopy revealed lysosomes as the localization site of the TPyzPz, their rupture after irradiation and subsequent relocalization of TPyzPz to the cytoplasm.

In the second part of this work, I have focused on the series of anionic and cationic Pcs and investigated their photophysical, physicochemical, binding and biological properties with the aim of finding the parameters and/or factors that may contribute to the substantial difference in photodynamic activity between Pcs bearing opposite charges on peripheral substituents. Four different sets of compounds were introduced into the study, namely anionic hydrophilic, cationic hydrophilic, anionic amphiphilic, and cationic amphiphilic to compare both the influence of the charge type and its distribution on the macrocycle core. All anionic derivatives were found aggregated at pH 4.9 (intralysosomal pH), while cationic derivatives were not influenced by pH. The anionic derivatives also interacted strongly with BSA, which led to strong quenching of excited states, however cationic hydrophilic compounds did not. All Pcs were tested *in vitro* on photodynamic activity on HeLa, MCF-7 and HCT 116 cells with different activity for anionic Pcs ( $EC_{50} \sim 0.3\text{-}10 \mu\text{M}$ ) and much higher activity for cationic Pcs ( $EC_{50} \sim 3\text{-}50 \text{ nM}$ ). The photodynamic activity of anionic Pcs improved when the cells were treated in serum-free medium, suggesting an important effect of serum. The effect of pH, binding to serum proteins, interaction with biomembranes, subcellular localization and relocalization after irradiation were disclosed to be the main factors responsible for lower photoactivity of anionic Pcs.

# 1. OBSAH

2.	Seznam použitých zkratk	14
3.	Cíl disertační práce	16
4.	Přehled současného stavu řešené problematiky	17
4.1	Fotodynamická terapie	17
4.1.1	Historie	17
4.1.2	Mechanismus PDT	18
4.1.3	Biologická odpověď	20
4.1.4	Výhody a nevýhody PDT	21
4.1.5	Klinicky používané fotosenzitizéry	22
4.2	Ftalocyaniny a azaftalocyaniny	26
4.2.1	Struktura a jejich vlastnosti	26
4.2.2	Způsob přípravy prekurzorů a makrocyklů	29
4.2.3	Využití ftalocyaninů	31
4.3	Fotosenzitizéry a jejich interakce s proteiny	33
4.3.1	Charakterizace lidského a hovězího albuminu	33
4.3.2	Vliv vazby mezi PS a albuminem na fotofyzikální vlastnosti	35
4.3.3	Vliv vazby mezi PS a albuminem na biologické vlastnosti	37
5.	Experimentální část	41
5.1	Syntéza	43
5.1.1	Příprava sodné soli 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(sulfonátofenyl) tetrapyrazinoporfyrizináto zinečnatého komplexu ( <b>5</b> )	43
5.1.2	Příprava 4,5-bis[3,5-bis(methoxykarbonyl)fenyl]ftalonitrilu ( <b>7</b> )	44
5.1.3	Příprava 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis[3,5-bis(butoxykarbonyl)fenyl] ftalocyanináto zinečnatého komplexu ( <b>11Bu</b> )	44
5.1.4	Příprava sodné soli 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(3,5-dikarboxylátofenyl) ftalocyanináto zinečnatého komplexu ( <b>11</b> )	45

5.1.5	Příprava 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis[3,5-bis(butoxykarbonyl)fenoxy]ftalocyanináto zinečnatého komplexu ( <b>12Bu</b> ).....	46
5.1.6	Příprava hexadekasodné soli 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(3,5-dikarboxyláto-fenoxy)ftalocyanináto zinečnatého komplexu ( <b>12</b> ).....	47
5.1.7	Příprava 2,3-bis[3,5-bis(butoxykarbonyl)fenyl]ftalocyanináto zinečnatého komplexu ( <b>15Bu</b> ).....	48
5.1.8	Příprava tetrasodné soli 2,3-bis(3,5-dikarboxylátofenyl)ftalocyanináto zinečnatého komplexu ( <b>15</b> ).....	49
5.1.9	Příprava 2,3-bis[3,5-bis(butoxykarbonyl)fenoxy]ftalocyanináto zinečnatého komplexu ( <b>16Bu</b> ).....	50
5.1.10	Příprava tetrasodné soli 2,3-bis(3,5-dikarboxylátofenoxy)ftalocyanináto zinečnatého komplexu ( <b>16</b> ).....	52
5.1.11	Příprava 1-(2,6-bis[(3-methyl-1H-imidazol-3-ium-1-yl)methyl]-4-methylfenoxy)-3,4-dimethyl-tribenzo[g,l,q]-N-methylpyridino[3,4-b]porfyrizináto zinečnatého komplexu trijodidu ( <b>18</b> ).....	53
5.2	Stanovení čistoty pomocí HPLC .....	55
5.3	Fotofyzikální studium TPyzPz a Pc.....	57
5.3.1	Měření fotofyzikálních vlastností pro TPyzPz <b>5</b> .....	57
5.3.2	Fotofyzikální měření pro látky <b>1, 2, 11-18</b> .....	57
5.3.3	Vazba TPyzPz <b>5</b> na BSA.....	57
5.3.4	Příprava TPyzPz <b>5</b> inkorporovaného do lipozomů .....	57
5.3.5	Určení stability lipozomů s TPyzPz <b>5</b> po ozáření .....	58
5.3.6	Určení log P.....	59
5.3.7	Příprava prázdných DOPC lipozomů.....	59
5.3.8	Stanovení asociační konstanty s DOPC lipozomy .....	59
5.3.9	Vliv pH a pH-BSA na fotofyzikální vlastnosti .....	60
5.3.10	Interakce s DOPC lipozomy a BSA .....	60
5.3.11	Stanovení asociační konstanty s BSA .....	61
5.3.12	LC-MS analýza interakce BSA se singletovým kyslíkem .....	61

5.4	Biologická aktivita .....	64
5.4.1	Buněčné kultury a příprava vzorků.....	64
5.4.2	Fototoxita a toxicita bez ozáření .....	64
5.4.3	Časový profil vstupu látek do buněk .....	65
5.4.4	Subcelulární lokalizace a relokalizace po ozáření .....	65
5.4.5	Morfologické změny na buňkách .....	66
6.	Výsledky a diskuze.....	67
6.1	Studium zinečnatého hexadekakarboxyláto TPyzPz <b>1</b> .....	67
6.2	Studium zinečnatého oktasulfonáto TPyzPz <b>5</b> .....	69
6.3	Porovnání anionických a kationických ftalocyaninů .....	79
7.	Závěr.....	104
8.	Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací.....	106
9.	Granty, výzkumné stáže a ocenění .....	109
10.	Seznam literatury.....	111
11.	Seznam příloh.....	126

## 2. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ALA	kyselina 5-aminolevulová (5-aminolevulinic acid)
AMD	věkem podmíněná makulární degenerace (age-related macular degeneration)
AzaPc	azaftalocyanin (azaphthalocyanine)
BR	Britton–Robinsonův pufr
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)
DBU	1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-en
DLI	interval mezi podáním léčiva a ozářením (drug-light interval)
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DOPC	dioleoylfosfatidylcholin (dioleoylphosphatidylcholine)
DPPC	dipalmitoylfosfatidylcholin (dipalmitoylphosphatidylcholine)
EC <sub>50</sub>	střední efektivní koncentrace (zde aktivita po ozářením)
EMA	Evropská léková agentura (European Medicine Agency)
FBS	fetální hovězí sérum (fetal bovine serum)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA (Food and Drug Administration)
Hp	hematoporfyrin
HpD	hematoporfyrinový derivát
HSA	lidský sérový albumin (human serum albumin)
IČ	infračervená spektroskopie
ICT	intramolekulární přenos náboje (intramolecular charge transfer)
ISC	mezisystémový přechod (intersystem crossing)
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (liquid chromatography–mass spectrometry)
MeOH	methanol
mBSA	maleylovaný hovězí sérový albumin (maleylated bovine serum albumin)
Nc	naftalocyanin
Pc	ftalocyanin (phthalocyanine)
PDT	fotodynamická terapie (photodynamic therapy)
PpIX	protoporfyrin IX
PS	fotosenzitizér (photosensitiser)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)

SCM	sérové buněčné médium (serum containing medium)
SFM	bezsérové buněčné médium (serum-free medium)
TC <sub>50</sub>	střední toxická dávka (toxicita bez ozáření světlem)
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie (thin layer chromatography)
TPyzPz	tetrapyrazinoporfyrazin
TPPS	<i>meso</i> -tetrakis(4-sulfonátofenyl)porfyrin
t.t.	teplota tání
VTP	fotodynamická terapie zaměřená na cévy (vascular targeted photodynamic therapy)
ZnPc	nesubstituovaný zinečnatý ftalocyanin (unsubstituted zinc phthalocyanine)

### 3. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem disertační práce bylo připravit nové ftalocyaniny (phthalocyanine, Pc) a azaftalocyaniny (azaphthalocyanine, AzaPc) s anionickými skupinami na periferii jako potenciálně fotodynamicky aktivní látky. Tato práce přímo navazuje na mou diplomovou práci, během které jsem připravil AzaPc ze skupiny tetrapyrazinoporfyrinů (TPyzPz) s 16 karboxylátovými skupinami v rigidním uspořádání. Tento TPyzPz byl testován na fotodynamickou aktivitu *in vitro* na HeLa buňkách (lidský karcinom děložního čípku). Fotodynamická aktivita tohoto TPyzPz byla negativně ovlivněna přítomností sérových proteinů v buněčném médiu. TPyzPz se také kumuloval po podání v lyzosomech, jejichž kyselé pH mělo negativní vliv na agregaci TPyzPz kvůli protonizaci karboxylátových skupin.

V první části disertační práce jsem se proto zaměřil na přípravu zinečnatého AzaPc ze skupiny TPyzPz se sulfonátovými skupinami na periferii. Sulfonová kyselina je výrazně kyslejší než karboxylová, tudíž bylo očekáváno, že TPyzPz bude plně ionizovaný v biologickém prostředí i po lokalizaci v lyzosomech.

V druhé části disertační práce jsem se zaměřil na přípravu nových anionických hydrofilních a amfifilních Pc. Ftalocyaninové jádro bylo zvoleno z důvodu posunu absorpčního pásu k vyšším vlnovým délkám než u TPyzPz, čímž by mělo docházet k lepší penetraci světla tkání. Na základě rozdílných aktivit anionických a kationických látek pro fotodynamickou terapii (photodynamic therapy, PDT) jsem se rozhodl detailněji prostudovat tyto dvě skupiny látek a najít faktory, které ovlivňují jejich fotodynamickou aktivitu.

U všech nově připravených látek byly studovány fotofyzikální vlastnosti (kvantový výtěžek fluorescence, kvantový výtěžek singletového kyslíku, absorpční spektra apod.), které jsou důležité pro fotodynamickou aktivitu. Všechny látky pak byly studovány na fotodynamickou aktivitu *in vitro* na buněčných liniích.



## 4. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 4.1 Fotodynamická terapie

PDT je moderní neinvazivní forma léčby používaná při léčbě nádorových i nenádorových onemocnění. Dobré terapeutické výsledky a možnost paralelní aplikace tohoto způsobu léčby s dalšími terapeutickými protokoly dělá PDT dostupnější pro použití i různých oborech. PDT je úspěšně využívána v dermatologii, onkologii, gynekologii, urologii a oftalmologii.<sup>1,2</sup> PDT je založena na 3 základních komponentech: fotosenzitizér (photosensitiser, PS), světlo a kyslík. Tyto komponenty nejsou samy o sobě toxické, ale společně iniciují fotochemickou reakci, která vede ke kumulaci vysoce reaktivních produktů, z nichž nejvýznamnější je singletový kyslík.<sup>2</sup>

Léčba pomocí PDT zahrnuje podání PS, který se více či méně akumuluje v nádorové tkáni, následně je místo ozářeno světlem o vhodné vlnové délce (obecně světlem v červené oblasti spektra). PS se světlem excituje a předává svou energii kyslíku za vzniku singletového kyslíku nebo dalších vysoce reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species, ROS). Tyto cytotoxické fotoprodukty generované při ozáření spouštějí kaskádu biochemických procesů, které způsobují poškození a smrt nádorových buněk.<sup>3</sup>

#### 4.1.1 Historie

Světlo je k léčebným účelům užíváno po staletí.<sup>4</sup> Už starověká egyptská, indická a čínská civilizace používala světlo pro léčbu různých onemocnění – lupénka, křivice, vitiligo, nádorová onemocnění kůže.<sup>5</sup> Když se podíváme na území Evropy, tak v 18. a 19. století ve Francii bylo světlo využíváno k léčbě tuberkulózy, křivice, kurdějí, revmatismu, otoků, či svalové slabosti.<sup>4</sup>

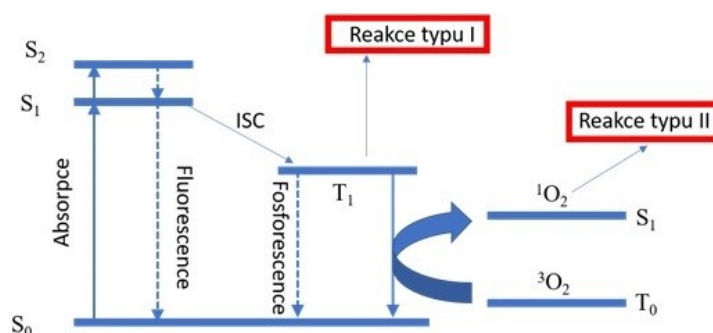
Historie PDT se začala psát v roce 1900, když německý student medicíny Oscar Raab pod vedením prof. Hermana von Tappeinera objevil, že kombinace světla a akridinu je toxická pro trepky (*Paramecium*), zatímco samostatně jsou tyto komponenty netoxické. První zpráva o podání PS člověku je z roku 1900, kdy Prime, francouzský neurolog, který použil perorálně eozin pro léčbu epilepsie, objevil, že tato látka vyvolává dermatitidu po ozáření slunečním světlem. Tento objev vedl k další medicíně aplikaci, kdy von Tappeiner společně s dermatologem Jesionkem použili kombinaci topického eozinu

a bílého světla pro léčbu kožních nádorů. V roce 1904 von Tappeiner společně s Jodlbauerem definovali, že kyslík je pro účinek nezbytný a popsali pojem „fotodynamický efekt“.<sup>4</sup> Experimentální studie provedené poté v 70. letech 20. století potvrdily, že singletový kyslík je hlavním cytotoxickým prostředkem při PDT.<sup>6</sup> V letech 1908-1911 Hausmann popsal fluorescenci a fotosenzitizující účinek hematoporfyrinu na destrukci buněk. Myšlenka využití derivátu porfyriu v medicíně pak vycházela z porfyrie, onemocnění syntézy a metabolismu hemu. Porfyrie je totiž doprovázená silnou citlivostí na světlo, která je způsobena produkcí většího množství derivátů porfyrinů, které se v těle kumulují a po ozáření světlem mohou fungovat jako endogenní PS. To má za následek nechtěný fotodynamický efekt. V roce 1913 Meyer-Betz sám sobě podal efektivní dávku hematoporfyrinu (Hp) a následně se vystavil světlu, čímž na sobě poprvé vyzkoušel fotodynamickou reakci. Bohužel tento riskantní pokus nebyl dlouhou dobu oceněn. V roce 1924, francouzský fyzik Policard popsal zvýšenou fluorescenci nádorových buněk po ozáření, což naznačilo možnou lokalizaci endogenních porfyrinů v nádorové tkáni. Po více než 20 letech pak také Figge a spol. a Rasmussen-Taxdal a další pozorovali selektivní lokalizaci porfyrinů v tumorech, a tím potvrdili Policardovo tvrzení.<sup>7</sup> V 50. letech 20. století Schwartz a Lipson pokračovali v práci Fischera a Meyer-Betze a vyvinuli čistější a účinnější formu Hp, který nazvali hematoporfyrinový derivát (HpD), a který použili pro fluorescenční diagnózu lidských nádorů.<sup>8,9</sup> Na základě dříve zmíněných poznatků a zkušeností použil Dougherty v roce 1978 HpD a ozáření světlem pro léčbu pacientů s některými typy primárních a sekundárních nádorů se značným účinkem. V této klíčové studii ze 113 nádorových lézí bylo 98 zcela vyléčeno, 13 reagovalo částečně a pouze 2 případy byly rezistentní na účinek PDT.<sup>10</sup> Po tomto úspěchu následovalo mnoho studií využívajících HpD v léčbě nádorů plic, jícnu, střev, či mozku. V roce 1993 byl pak HpD zaveden do klinické praxe jako přípravek Photofrin<sup>®</sup>, a to i přesto, že nešlo o strukturně jednoznačně definovanou látku.<sup>7</sup>

#### 4.1.2 *Mechanismus PDT*

PDT je založena na excitaci PS světlem se specifickou vlnovou délkou. PS může být aktivován světlem ze základního stavu do krátkodobého excitovaného singletového stavu. Excitovaný PS může přejít zpět do základního stavu emisí fluorescence nebo může dojít k mezisystémovému přechodu (intersystem crossing, ISC) do dlouhotrvajícího tripletového stavu. PS v excitovaném tripletovém stavu může přejít do základního stavu

emisí fosforescence nebo může reagovat rovnou s okolními substráty (např. buněčná membrána nebo biomolekuly) a tvořit radikály, které mohou reagovat s kyslíkem za vzniku ROS jako je superoxidový aniontový radikál ( $O^{2\cdot-}$ ), hydroxylový radikál ( $\cdot OH$ ) a peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ). Tento typ fotoprocesu nazýváme typem I. Alternativní cesta, a mnohem významnější pro PDT, nastane v případě, že energie excitovaného PS je předána rovnou molekule kyslíku ( $^3O_2$ ), čímž dochází ke vzniku singletového kyslíku ( $^1O_2$ ). Tento fotoproces pak nazýváme typem II.<sup>11</sup> (Obr. 1)



**Obr. 1.** Jablonského diagram.  $S_0$  – základní stav PS,  $S_1$  první excitovaný singletový stav PS,  $S_2$  druhý excitovaný singletový stav PS,  $T_1$  první excitovaný tripletový stav PS, ISC - mezisystémový přechod,  $^3O_2$ , tripletový kyslík,  $^1O_2$ , singletový kyslík.

Pravděpodobnost jednotlivých přechodů udává fyzikální veličina kvantový výtěžek, což je obecně definovaný poměr určité vlastnosti k počtu absorbovaných fotonů. Kvantový výtěžek fluorescence ( $\Phi_F$ ) vyjadřuje počet emitovaných fotonů k počtu absorbovaných fotonů. Kvantový výtěžek singletového kyslíku ( $\Phi_\Delta$ ) pak vyjadřuje počet vytvořených molekul singletového kyslíku na počet absorbovaných fotonů.

Dalším důležitým parametrem pro úspěšnou fotodynamickou terapii je světlo. Průnik světla tkání je složitý proces, který je závislý na optických vlastnostech tkání při dané vlnové délce. Další důležitou roli zde hraje rozptyl světla a absorpce světla endogenními látkami. Světlo kratších viditelných vlnových délek může být absorbováno endogenními chromofory (např. hemoglobinem), zatímco světlo delších vlnových délek může absorbovat voda.<sup>12</sup> Oblast mezi 600-1300 nm je nazývána optické okno biologických tkání. Avšak pouze světlo do vlnové délky 850 nm je výhodné pro PDT, a to z důvodu, že světlo delších vlnových délek už nemusí mít dostatečnou energii aktivovat PS do tripletového stavu, a tím generovat singletový kyslík. Ale světlo delších vlnových délek zase proniká tkání hlouběji. Z tohoto důvodu je ideální, aby PS

absorboval v červené nebo v blízké infračervené oblasti.<sup>13</sup> Naopak modré světlo proniká tkání nejméně.<sup>2</sup>

Mezi další důležité faktory ovlivňující účinek PDT patří interval mezi podáním léčiva a ozářením (drug-light interval, DLI). Dlouhý DLI (až 2-4 dny) je výhodný kvůli zvýšení koncentrace PS v nádorové tkáni vůči zdravé tkáni. Poslední dobou se však ukazuje, že kratší DLI (v řádu minut až hodin) je výhodný proto, že PS stále zůstává přítomen v cévním řečišti, a po ozáření tedy způsobuje značné poškození cév vyživujících nádor. Tento princip se využívá u fotodynamické terapie zaměřené na cévy (vascular targeted photodynamic therapy, VTP) nebo při použití verteporfinu u věkem podmíněné makulární degenerace (age-related macular degeneration, AMD).<sup>2, 14</sup>

#### 4.1.3 *Biologická odpověď*

Byly popsány 3 hlavní mechanismy, jak PDT působí zničení nádorů:

##### A. Přímý účinek singletového kyslíku a ROS

ROS a singletový kyslík reagují s různými biologickými cíli, které jsou náchylné k destrukci oxidací, porušením homeostázy, změnami metabolismu lipidů nebo iontového transportu. Buněčná odpověď na oxidativní stres vede k aktivaci proteinových kináz, expresi transkripčních faktorů a cytokinů a uvolnění vysokého počtu mediátorů odpovědných za buněčnou smrt, které mohou vzniknout při apoptóze nebo nekróze. Mechanismus buněčné smrti ovlivňují různé faktory: rychlost fluktuace světelného zdroje, doba ozáření, typ PS a jeho fyzikálně-chemické vlastnosti, subcelulární lokalizace a koncentrace PS v tkáni.<sup>14</sup> Apoptóza (někdy také nazývaná programovaná buněčná smrt) je normální fyziologický proces nezbytný pro tkáňovou homeostázu. Apoptóza je přísně regulovaný proces buněčné sebevraždy kontrolovaný intracelulárními i extracelulárními signály a zakončený morfologickými a biochemickými změnami vedoucími k zániku buňky. Celý proces je nastaven tak, že nedochází k úniku intracelulárního buněčného materiálu do okolního prostředí, a tím se zabraňuje zánětu tkání. Naproti tomu nekróza je výsledkem vysokého poškození buněk, kdy dochází ke ztrátě integrity plazmatické membrány a ke vzniku zánětu.<sup>15</sup> Nekróza při PDT je často spojená s vysokými dávkami světla a vysokou koncentrací PS. Třetí možností je buněčná smrt způsobená autofagií. Autofagie je proces degradace makromolekulárních složek cytoplasmy a organel, které jsou obklopeny dvojmembránou a tvoří autofagosom. Po sloučení lyzozomu

s autofagosomem dochází k degradaci obsahu. Je možné, že autogafie neslouží primárně ke smrti buňky, ale že její funkcí je ochrana buněk a podpora zdravých buněk a organismu.<sup>14</sup>

#### B. Vliv na cévní zásobení nádorů

PDT cílí také efektivně na krevní zásobení nádorů. Poškození endoteliálních buněk způsobuje narušení endotelu a vede k vytvoření sraženin blokuujících průtok krve v cévách. V důsledku této obstrukce cév dochází k úplnému nebo významně sníženému přísunu kyslíku a živin do nádorových buněk. Výsledkem celého procesu je smrt nádorových buněk.<sup>14</sup> Tohoto účinku využívá VTP.

#### C. Aktivace imunitní odpovědi

Aktivace imunitního systému není považována za primární odpověď na PDT, ale může sloužit k dlouhodobé kontrole nádoru.<sup>7</sup> PDT mění mikroprostředí nádorů a aktivuje různé druhy imunitní odpovědi. Mechanismus stimulace zahrnuje uvolňování prozánětlivých cytokinů, zvýšení počtu krevních neutrofilů a jejich aktivaci v nádoru (společně se žírnými buňkami a makrofágy), zvýšení proteinů akutní fáze, aktivaci komplementového systému a následnou aktivaci protinádorové imunity.<sup>14</sup>

#### 4.1.4 Výhody a nevýhody PDT

Podobně jako ostatní metody používané při léčbě nádorů má i PDT své výhody i nevýhody.<sup>16, 17</sup>

Výhody:

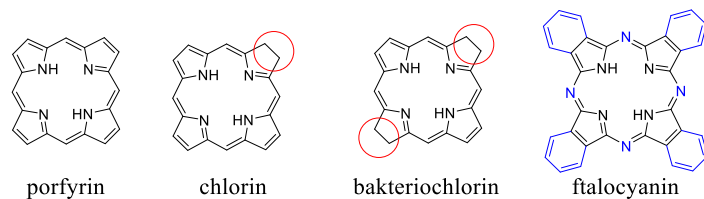
- Jedná se o neinvazivní a ve srovnání s chemoterapií selektivní metodu zaměřenou pouze na vybranou část organismu/tkáně. Nedochozí tedy k vlivu na celý organismus.
- Vedlejší účinky jsou mnohem menší než v případě jiných metod (chemoterapie).
- Může být kombinována s jinými metodami pro léčbu nádorových onemocnění.
- Nedochozí zde k vytváření rezistence.
- S výhodou se dá použít i k fotodiagnostice.
- V případě nádorů rezistentních na chemoterapii nebo radioterapii, lze použít PDT jako paliativní léčbu.

Nevýhody:

- Jedním z nejčastějších nežádoucích účinků PDT je citlivost kůže na sluneční světlo po ukončení léčby (léčiva se často deponují v kůži). Tato fotosenzitivita je jen dočasná a po eliminaci PS z organismu se ztrácí.
- Dalším limitujícím faktorem je vysoká selektivita účinku jen na ozářené místo. Z tohoto důvodu není možné použít PDT pro léčbu metastazujících nádorů.
- PDT není příliš vhodná pro léčbu velkých a objemných nádorů, kdy světlo nemůže proniknout do hloubky, a proto je nutné opakovat terapii v několika cyklech.

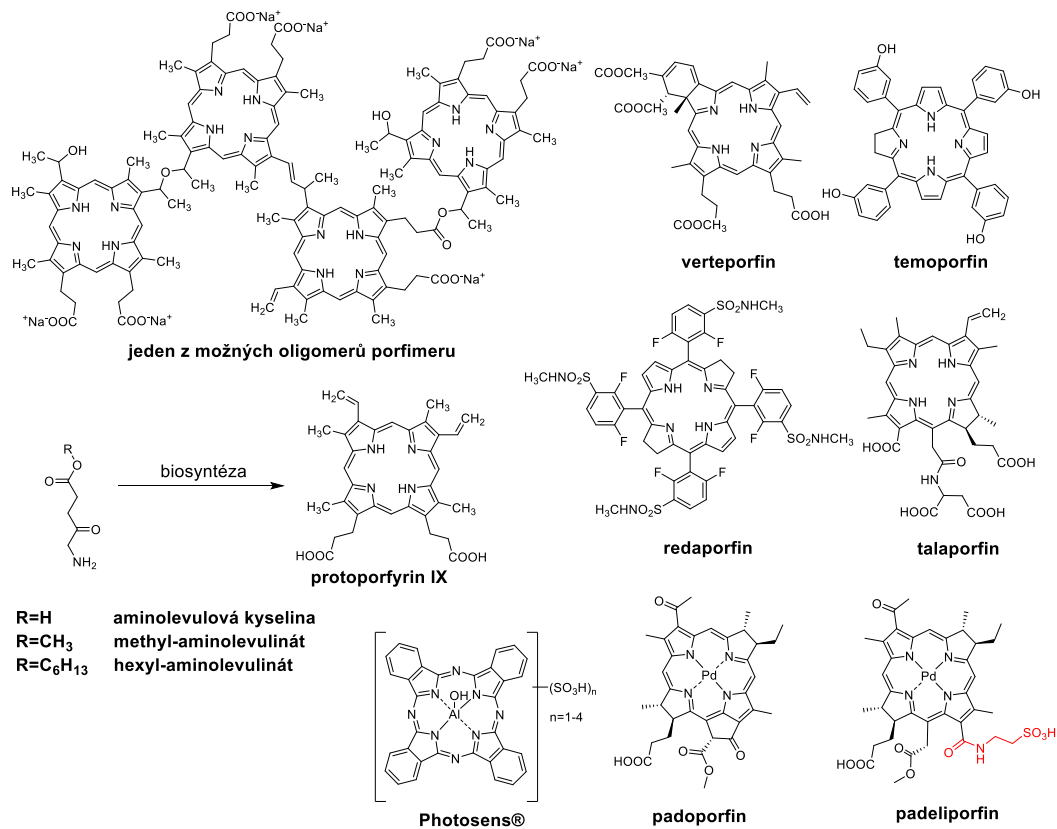
#### 4.1.5 *Klinicky používané fotosenzitizéry*

Největší skupinu klinicky používaných PS tvoří skupina látek s tetrapyrrolovým jádrem. Tetrapyrrolová struktura se vyskytuje v důležitých biomolekulách např. v hemu, chlorofylu nebo bakteriochlorofylu, proto je můžeme také nazývat „pigmenty života“.<sup>18</sup> Tyto přírodní látky se pak staly předlohovými strukturami pro klinicky významné PS. Mezi nejvýznamnější strukturní typy PS patří: porfyriny a jejich analogy (např. benzoporfyriny, chloriny, feoforbid a bakteriochloriny), ftalocyaniny a texafyriny. Porfyrin obsahuje  $22\pi$  elektronů, ale pouze 18 z nich je delokalizováno. Porfyriny tvoří čtyři pyrrolová jádra, která jsou spojena methinovým můstkem. Porfyriny mají absorpční maximum v oblasti okolo 630 nm, ale vyznačují se velmi slabým extinkčním koeficientem v této oblasti. Struktura chlorinů je odvozena od struktury porfyrinu redukcí jedné dvojné vazby na jedné pyrrolové jednotce. Tato změna symetrie jádra vede k absorpci červeného světla (650-690 nm) s vyšším extinkčním koeficientem ( $\epsilon \sim 40\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ). Redukce dvou protilehlých dvojných vazeb ve struktuře porfyrinu vede k struktuře bakteriochlorinu. Tato změna vede k posunu k vyšším vlnovým délkám (740-780 nm) a zvýšení extinkčního koeficientu ( $\epsilon \sim 50\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ). Ftalocyaniny jsou syntetické makrocikly odvozené od porfyrinu konjugací benzenového jádra k pyrrolu a spojením isoindolových jednotek dusíkem. Pro tento aromatický a konjugovaný systém je pak typická silná absorbance v oblasti 650-700 nm s vysokým extinkčním koeficientem ( $\epsilon \sim 200\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ).<sup>5, 7, 19</sup> (Obr. 2)



**Obr. 2.** Základní strukturní typy fotosenzitizérů

Vedle látek odvozených od tetrapyrrolového jádra můžeme najít i PS tricyklické. Mezi tyto látky patří fenothiazinová barviva (např. methylenová modř, toluidinová modř) a deriváty xanthenu (bengálská červeň). Nevýhodou těchto látek je však jejich rychlá enzymatická přeměna na neaktivní látky, proto našly uplatnění převážně v dermatologii nebo v lokální léčbě.<sup>7</sup> Tetrapyrrolové PS (s výjimkou bakteriochlorinu) mají tendenci produkovat singletový kyslík převážně reakcí typu II, PS jiných struktur pak spíše typem I.<sup>20</sup>



**Obr. 3.** Struktury klinicky významných PS

První generaci PS tvoří porfimer sodný (Photofrin<sup>®</sup>), který patří mezi nejvýznamnější a také nejstarší PS (Obr. 3). Jedná se o různorodou směs látek (monomerů, dimerů a oligomerů s nepřesným podílem jednotlivých složek).<sup>7</sup> Absorpční spektrum porfimeru sodného obsahuje 4 absorpční pásy, ale bohužel při 630 nm je

extinkční koeficient velmi nízký (pouze  $2000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), což znemožňuje prostup světla hlouběji do tkáně. Mezi další nevýhody porfimeru sodného patří dlouhá doba citlivosti kůže na sluneční světlo nebo na silné vnitřní osvětlení (v řádu týdnů).<sup>21</sup> Na základě nevýhodných vlastností porfimeru (nejednotná struktura, nízká absorpce červeného světla, vysoká fotosenzitivita), pak byla vyvinuta druhá generace PS, jejíž struktury jsou odvozeny od chlorinů, bakteriochlorinů nebo Pc.

Mezi chloriny řadíme temoporfin, verteporfin a talaporfin (Obr. 3). Temoporfin (Foscan<sup>®</sup>, *m*-tetrahydroxyfenylchlorin (mTHPC)) byl schválen Evropskou lékovou agenturou (European Medicine Agency, EMA) v roce 2001 pro paliativní léčbu u pacientů s karcinomem v oblasti hlavy a krku.<sup>22</sup> Mezi jeho nevýhody patří poškození zdravé tkáně v okolí nádoru. Navíc je zde riziko popálení způsobené extravazací, tj. únikem tekutiny mimo cévní řečiště do okolní tkáně, v místě infuze.<sup>23</sup>

Verteporfin (Visudyne<sup>®</sup>) byl schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv v USA (Food and Drug Administration, FDA) v roce 2000 pro léčbu vlhké formy choroidální neovaskularizace AMD. AMD je jednou z hlavních příčin oslepnutí lidí starších 50 let. Vyskytují se dvě varianty - suchá a vlhká, která je mnohem nebezpečnější a agresivnější. Neovaskulární AMD se vyznačuje abnormálním růstem cév v centrální části sítnice, což vede ke ztrátě vizu v průběhu 2-3 let.<sup>24</sup> Verteporfin byl široce využíván pro léčbu AMD až do doby zavedení monoklonálních protilátek proti VEGF,<sup>25</sup> je však stále používán při léčbě jiných chorioretinálních onemocnění.<sup>22</sup>

Talaporfin je semisyntetický derivát chlorinu e6, který je přímo dostupný z chlorofylu (izoluje se z rodu *Spirulina*).<sup>26</sup> Chemicky se jedná o tetrasodnou sůl mono-L-aspartyl chlorinu e6, známého také pod názvem NPe6.<sup>22</sup> Talaporfin byl v roce 2004 registrován v Japonsku pro léčbu časného karcinomu plic pod obchodním názvem Laserphyrin<sup>®</sup>.<sup>27</sup>

Mezi bakteriochloriny patří padoporfin, padeliporfin a redaporfin (Obr. 3), které jsou odvozené od bakteriochlorofylu (bakteriální ekvivalent chlorofylu). Padoporfin a padeliporfin obsahují jako centrální atom paladium.<sup>28</sup> Padoporfin má nízkou rozpustnost ve vodě, proto se musí pro *i.v.* podání používat v kombinaci s Cremophorem EL. Cremophor EL je farmakologicky a biologicky aktivní látka a její využití jako vehikula není ideální z důvodu možných nežádoucích účinků – akutní reakce (přecitlivělost) a periferní neuropatie.<sup>29</sup> Z tohoto důvodu byl připraven nový PS, padeliporfin (Tookad soluble<sup>®</sup>, WST11), který je ve vodě rozpustný. Padeliporfin byl



připraven aminolýzou padoporfinu taurinem (2-aminosulfonovou kyselinou).<sup>28</sup> Obě tyto látky se vyznačují rychlým nástupem účinku uvnitř krevního řečiště a fotoprocesem typu I, který je typický pro VTP.<sup>22</sup> Padeliporfin byl v roce 2017 přijat EMA pro léčbu dospělých pacientů s unilaterálním adenokarcinomem prostaty.

Nejmladším zástupcem je pak redaporfin, fluorovaný sulfonamidový bakteriochlorin, který byl připraven na univerzitě v portugalské Coimbre ve skupině Luíse Arnauta.<sup>22</sup> V roce 2016 obdrželo léčivo od EMA označení „Orphan Drug“ pro léčbu nádorů žlučových cest.<sup>30</sup>

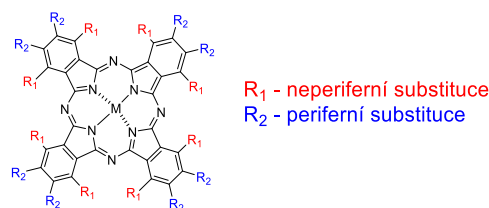
Výjimku mezi (semi)syntetickými PS tvoří kyselina 5-aminolevulová (5-aminolevulinic acid, ALA), která je přirozeně se vyskytující aminokyselinou a klíčovým meziproduktem v syntéze protoporfyrinu IX (PpIX) (Obr. 3). ALA vzniká v mitochondriích ze sukcinyl-CoA a glycinu.<sup>17</sup> Chelatací železitých iontů prostřednictvím ferrochelátázy je pak vzniklý PpIX převeden na hem. Hem je klíčová struktura v přírodních molekulách hemoglobinu, myoglobinu a ostatních hemoproteinech. Biosyntéza hemu je regulována prostřednictvím zpětné vazby, přičemž nadbytek hemu blokuje syntézu ALA. Exogenní podání ALA do buňky vede k nadprodukci PpIX, který kvůli omezené kapacitě ferrochelátázy nemůže být kompletně převeden na hem. ALA v tomto případě slouží jako prolečivo, ze kterého až v těle vzniká fotoaktivní látka PpIX.<sup>31</sup> Endogenně vzniklý PpIX je v cílových tkáních využíván jak k samotné PDT, tak i k fluorescenční diagnostice. Výhodou je jeho rychlá metabolizace (přibližně 48 hodin), a tím snížená kožní fotosenzitivita.<sup>32</sup> Z důvodu nízké lipofility ALA byly pro lepší penetraci do tkáně připraveny její estery (methyl a hexyl ester). Esterová vazba je pak v cílových tkáních rozštěpena esterázami.<sup>33</sup> Methyl ester ALA (Metvix<sup>®</sup>, Metvixia<sup>®</sup>) byl v roce 2004 schválen FDA pro léčbu nehyperkeratotické aktinické keratózy obličeje a hlavy<sup>34</sup> a je také registrován v Evropské unii pro PDT léčbu povrchového bazaliomu a nepigmentovou aktinickou keratózu obličeje a hlavy.<sup>35</sup> Hexylester ALA (Hexvix<sup>®</sup>, Cysview<sup>®</sup>) byl schválen v roce 2010 FDA pro diagnostiku karcinomu močového měchýře.<sup>36</sup>

Poslední skupinu fotosenzitizérů tvoří ftalocyaniny. Mezi klinicky používané ftalocyaniny patří Photosens<sup>®</sup> (Obr. 3). Jedná se o ve vodě rozpustnou směs hlinitých sulfonovaných ftalocyaninů s různým stupněm sulfonace ( $n = 2, 3$  nebo  $4$ ). Photosens<sup>®</sup> je od roku 2001 používán v Rusku pro léčbu nádorů žaludku, kůže, rtů, dutiny ústní, jazyka a karcinomu prsu. Jeho nevýhodou je však relativně dlouhá fotosenzitivita po podání (4-6 týdnů).<sup>7</sup>

## 4.2 Ftalocyaniny a azaftalocyaniny

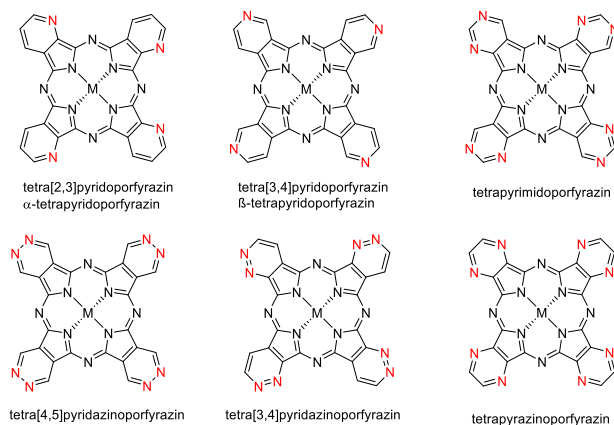
### 4.2.1 Struktura a jejich vlastnosti

Pc jsou syntetické planární aromatické makrocycly, které obsahují 4 isoindolové kruhy spojené atomem dusíku. Jejich jádro je vůči porfyrinům rozšířeno o přikondenzované benzenové jádro. Ve své struktuře obsahují 18 delokalizovaných  $\pi$ -elektronů, které dávají Pc jejich jedinečné fyzikální a optické vlastnosti.<sup>37</sup> Pc mohou být substituovány buď v  $\alpha$  poloze (neperiferně,  $R_1$ ) nebo v  $\beta$  poloze (periferně,  $R_2$ ) (Obr. 4).



Obr. 4. Neperiferní a periferní substituce ftalocyaninu

AzaPc je obecný název pro dusíkaté analogy Pc, u kterých došlo k izosterní záměně methinových skupin na benzenovém jádře za azamethinové. Podle počtu a umístění dusíků můžeme popsat několik skupin AzaPc (Obr. 5).

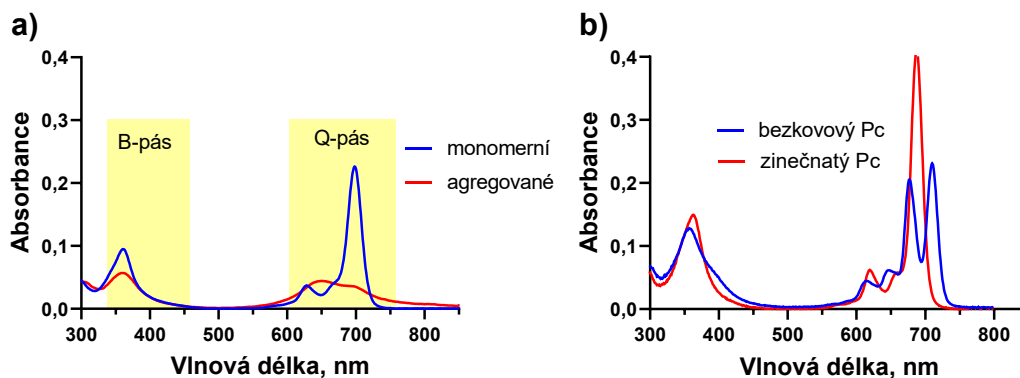


Obr. 5. Strukturní typy azaftalocyaninů

Pc a AzaPc mají potenciál koordinovat uvnitř svého jádra více než 70 kovových a nekovových iontů. Centrální atom ovlivňuje polohu absorpčního maxima, schopnost emitovat fotony ve formě fluorescence, schopnost produkovat singletový kyslík, případně jiné zajímavé oxidoredukční vlastnosti, a do určité míry může ovlivnit i agregaci.<sup>38, 39</sup>

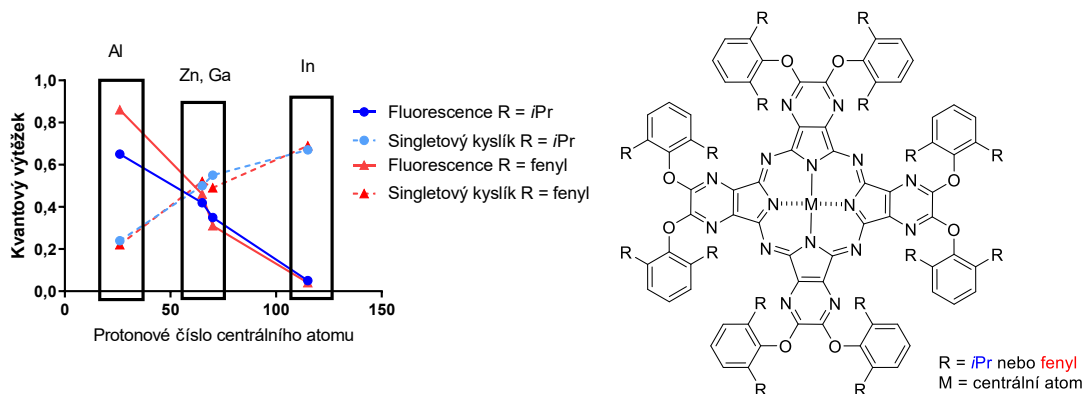
Díky rozšířenému systému  $\pi$ -elektronů dochází u Pc a AzaPc v roztocích k silné tendenci k agregaci za vzniku dimerů, trimerů a oligomerů.<sup>40</sup> Agregace ovlivňuje výrazně spektroskopické, fotofyzikální, elektrochemické vlastnosti a snižuje rozpustnost ve vodě a organických rozpouštědlech.<sup>38, 39</sup> Agregace způsobuje problémy při čištění a charakterizaci Pc a AzaPc. Při agregaci dochází ke zkrácení doby života excitovaných stavů, čímž dochází ke snížení kvantového výtěžku fluorescence a singletového kyslíku. Agregaci je možno ovlivnit jak použitým rozpouštědlem, tak koncentrací Pc nebo AzaPc.<sup>41</sup> Dalšími možnostmi, jak snížit agregaci a zároveň zvýšit rozpustnost těchto látek ve vodě jsou objemné substituenty na periférii<sup>42</sup>, axiální ligandy,<sup>43-46</sup> zavedení pozitivně nebo negativně nabitých substituentů,<sup>47-53</sup>  $\beta$ -cyclodextrinů,<sup>54, 55</sup> či glycerinu<sup>56</sup> do molekuly Pc nebo konjugace s ve vodě rozpustnými látkami např. oligopeptidy,<sup>57</sup> sacharidy,<sup>58</sup> albuminem.<sup>59</sup>

**Absorpční vlastnosti Pc a AzaPc.** Pc a AzaPc se vyznačují dvěma typickými absorpčními pásy. V oblasti okolo 360 nm je vysokoenergetický B-pás, v oblasti 600-750 nm pak nízkoenergetický Q-pás (Obr. 6a). Poloha a tvar absorpčního maxima Q-pásu jsou dány také centrálním atomem. U bezkovových derivátů dochází k rozštěpení Q-pásu (Obr. 6b) z důvodu asymetrie molekuly vzniklé na základě přítomnosti dvou isoindolových dusíků vázajících vodík a dalších dvou dusíků, které jsou zapojeny do iminové funkční skupiny. Z tohoto důvodu dochází k rozdílné polarizaci v ose x a y. Rozštěpený Q-pás pak můžeme vidět i u nesymetrických Pc nebo AzaPc s rozdílnou substitucí na periférii.<sup>60</sup> Na základě tvaru absorpčního spektra lze určit, v jakém stavu se nachází daná látka (agregovaná  $\times$  neagregovaná). Ostrý Q-pás je typický pro monomerní formu, zploštělý tvar je pak typický pro látky agregované (Obr. 6a). Vyskytnou-li se před nebo za Q-pásem nějaké další pásy, jedná se buď o agregaci nebo o protonizaci azomethinových dusíků.<sup>61</sup>



**Obr. 6.** a) Příklad agregovaného (červená) a monomerního spektra (modrá) Pc. b) Příklad spekter Pc s centrálním zinečnatým kationtem (červená) a bezkovových Pc (modrá).

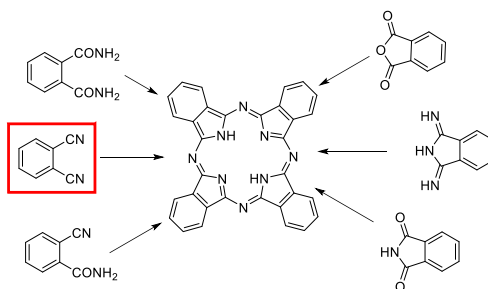
**Fotofyzikální vlastnosti Pc a AzaPc.** Fotofyzikální vlastnosti, které vycházejí z excitovaných stavů molekul, nejlépe popisuje Jablonského diagram (Obr. 1). V této části bych se zaměřil na popis vlivu chemické struktury na fotofyzikální jevy. Centrální atom makrocyklu (Pc nebo AzaPc) ovlivňuje významně fotofyzikální vlastnosti. Hořečnaté nebo křemičité komplexy se obecně vyznačují vyšším kvantovým výtěžkem fluorescence. Zato zinečnaté, palladnaté nebo indité komplexy se vyznačují vyšším kvantovým výtěžkem singletového kyslíku. Tento rozdíl je založen na tzv. „efektu těžkého atomu“. Tento jev je dán substitucí nebo chelatací kationtu kovu s vyšším atomovým číslem v centru makrocyklu, kdy dochází k vyšší preferenci mezisystémového přechodu na úkor emise fotonu fluorescencí.<sup>62</sup> Efekt těžkého atomu byl sledován i u AzaPc, kde byla prokázána lineární závislost mezi atomovým číslem centrálního kationtu a kvantovými výtěžky fluorescence a singletového kyslíku (Obr. 7).<sup>63</sup> Při porovnání AzaPc a Pc makrocyklů u látek se stejným centrálním atomem a se stejnou substitucí na periferii můžeme pozorovat, že Pc mají mírně vyšší produkci singletového kyslíku a nižší produkci fluorescence, zatímco u AzaPc je tomu naopak.<sup>64</sup>



**Obr. 7.** Grafické znázornění závislosti kvantových výtěžků fluorescence a singletového kyslíku na protonovém čísle centrálního atomu

#### 4.2.2 Způsob přípravy prekurzorů a makrocyclů

Ftalocyaniny jsou tradičně připravovány ze substituovaných derivátů kyseliny ftalové – ftalonitrily, 1,3-diiminoisoindoliny, anhydridy kyseliny ftalové, ftalimidy, ftalamidy – z nich jsou však absolutně nejčastějšími výchozími látkami substituované ftalonitrily.<sup>65</sup> (Obr. 8)

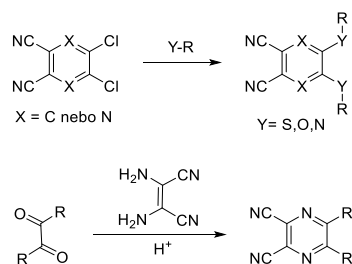


**Obr. 8.** Příprava ftalocyaninového makrocyclu

**Příprava prekurzorů.** Vhodně substituované ftalonitrily jsou nejčastěji připravovány z komerčně dostupných halogenovaných ftalonitrilů (např. 4,5-dichlorftalonitril, 2-jodftalonitril, 3-jodftalonitril) nebo ftalonitrilů substituovaných nitroskupinou (2-nitroftalonitril, 3-nitroftalonitril). Tyto výchozí látky jsou pak využívány k připojení zamýšlených substituentů na ftalonitrilové jádro několika způsoby zahrnujícími velmi často nukleofilní substituci,<sup>66, 67</sup> či couplingové reakce.<sup>68</sup> Substituenty v polohách 3-6 ftalonitrilu se po syntéze Pc nacházejí na obvodu makrocyclu, zatímco nitrilové skupiny jsou zodpovědné za vznik porfyrinového skeletu.

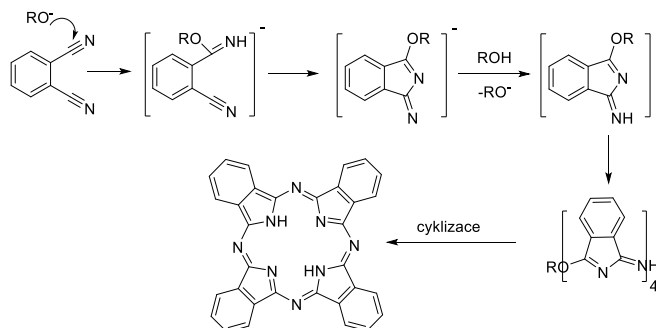
Pro přípravu prekurzoru TPyzPz je možné využít komerčně dostupný 4,5-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril a ten různě substituovat opět buď nukleofilní substitucí<sup>69</sup> nebo couplingovými reakcemi.<sup>70, 71</sup> Alternativní cestou je kondenzace

diaminomaleonitrilu s vhodně substituovanými vicinálními diketony nebo ketoaldehydy v kyselém prostředí za vzniku substituovaného pyrazin-2,3-dikarbonitrilu.<sup>72</sup> (Obr. 9)



Obr. 9. Postupy pro přípravu prekurzorů pro Pc a TPyzPz

**Symetrické Pc.** Nejstarším způsobem pro přípravu symetrických Pc je použití Linsteadovy metody, kdy je reakce iniciována alifatickým alkoholátem alkalických kovů nebo kovů alkalických zemin.<sup>73</sup> Nejčastěji jsou využívány alkoholáty hořečnaté a lithné. Další možností je použití alkoholátu indukovaného silnou bází (např. 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en (DBU) nebo 1,5-diazabicyklo[4.3.0]non-5-en).<sup>74</sup> Alkoholát napadá elektrondeficitní uhlík nitrilové skupiny ftalonitrilu za vzniku intermediátu, který reaguje s další molekulou ftalonitrilu. Dochází tak k postupnému uzavření cyklu Pc (Obr. 10). Nevýhodou alkoholátové metody může být nežádoucí transalkylace (u etherů) nebo transesterifikace (u esterů) periferních substituentů.<sup>47, 75-77</sup>

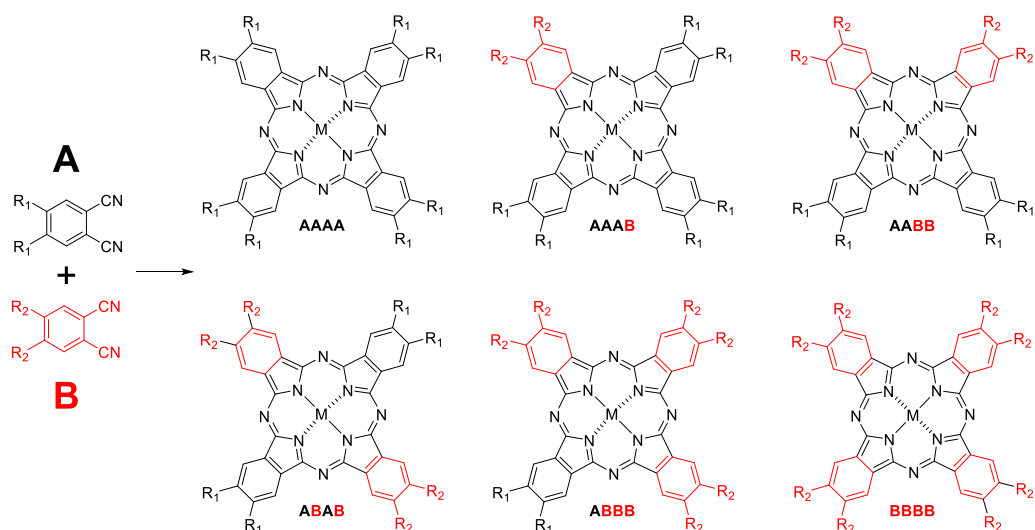


Obr. 10. Mechanismus vzniku makrocyklu cyklotetramerizační reakcí s alkalickým alkoholátem

Druhou možností je templátová reakce, kdy je prekurzor zahříván ve vysoko vřoucí rozpouštědle (např. chinolin, dimethylformamid, pyridin, dimethylaminoethanol) v přítomnosti soli příslušného kovu. Prekurzory se za vysoké teploty k sobě dostatečně přiblíží za vzniku makrocyklu.<sup>78, 79</sup>

**Nesymetické Pc.** Statistická kondenzace je jednou z nejstarších metod používaných pro přípravu nesymetrických Pc ze dvou různých prekurzorů (A a B). Tato metoda není obecně selektivní a při použití dvou různých prekurzorů A a B s podobnou reaktivitou v ekvimolárním množství bychom dostali směs 6 kongenerů (Obr. 11)

v poměru A<sub>4</sub> (8,33 %), A<sub>3</sub>B (25 %), A<sub>2</sub>BB (25 %), ABAB (8,33 %), AB<sub>3</sub> (25 %) a B<sub>4</sub> (8,33 %).<sup>80</sup> Tato metoda se nehodí pro cílenou přípravu všech 6 kongenerů z důvodu často obtížné separace jednotlivých kongenerů. Metoda je vhodná pro přípravu nesymetrického kongeneru A<sub>3</sub>B. Pokud je reaktivita obou prekurzorů podobná a reagují spolu v poměru 3:1 pro A a B, tak by teoretické výtěžky měly být A<sub>4</sub> (33 %), cílový asymetrický produkt A<sub>3</sub>B (44 %) a zbývající kongenery dohromady tvoří zbylých 23 %.<sup>80</sup> V praxi se pak ukázalo, že výtěžky jsou mnohem nižší (typicky 10-20 % pro kongener A<sub>3</sub>B).<sup>38</sup> Některé výzkumné skupiny používají i poměr 9:1 pro omezení vzniku vedlejších kongenerů a usnadnění separace z reakční směsi. Výtěžek kongeneru A<sub>3</sub>B lze očekávat i vyšší v případě substituce ftalonitrilu v poloze 3 a 6, kdy je poměr produktů ovlivněn i sterickými vlastnostmi.<sup>80</sup>



Obr. 11. Struktury kongenerů po reakci dvou různých prekurzorů A a B

#### 4.2.3 Využití ftalocyaninů

Historicky nejstarší uplatnění je využití jejich barevného charakteru a použití jako barviv pro inkousty, textil a papír.<sup>31</sup> Zde našly uplatnění především Pc s centrálním měďnatým kationtem.<sup>81</sup> Postupem času našly Pc a AzaPc díky svým výjimečným vlastnostem uplatnění v mnoha dalších oborech od medicíny až po technické obory.

Jedním z možných využití Pc a AzaPc je použití v PDT. Pc a AzaPc mají výborné předpoklady pro PDT. Absorbují v oblasti 600-800 nm, mají vysoký extinkční koeficient v oblasti Q-pásu a vyznačují se vysokými kvantovými výtěžky singletového kyslíku. Pc a jejich rozšířené konjugované deriváty naftalocaniny neabsorbují viditelné světlo v rozmezí 400-600 nm, čímž je citlivost kůže na sluneční záření nižší než u porfyrinů.<sup>82</sup>

Z klinického hlediska je zajímavý Photosens<sup>®</sup>, který byl schválen v Rusku pro klinické použití. Pc a AzaPc (TPyzPz) našly uplatnění i v mnoha dalších aplikacích jako jsou např. katalyzátory chemických reakcí<sup>83</sup>, nelineární optické materiály<sup>84</sup>, tekuté krystaly<sup>85</sup>, vodivé a polovodivé materiály<sup>60, 86, 87</sup> a v mnoha dalších oborech a aplikacích.

Přítomnost atomů dusíku v jádru TPyzPz dává celému makrocyklu elektronově deficitní charakter v porovnání s mateřským Pc.<sup>88</sup> Proto TPyzPz substituované substituenty obsahujícími donory elektronů (např. aminy) podléhají snadno ultrarychlému intramolekulárnímu přenosu náboje (intramolecular charge transfer, ICT), který je silně kompetitivní k jiným relaxačním cestám excitovaných stavů u TPyzPz.<sup>89</sup> ICT je u TPyzPz natolik účinný, že už přítomnost jednoho donoru (typicky aminoskupina nebo fenolát) v konjugaci s jádrem makrocyklu vede k účinnému zhášení excitovaných stavů. ICT lze blokovat různými faktory, které mohou přepínat fluorescenci mezi stavy „ON“ a „OFF“, čehož lze využít pro vývoj nových pH senzitivních senzorů<sup>90</sup> nebo senzorů citlivých na přítomnost kovových kationtů v analytech.<sup>69, 91</sup>



## 4.3 Fotosenzitizéry a jejich interakce s proteiny

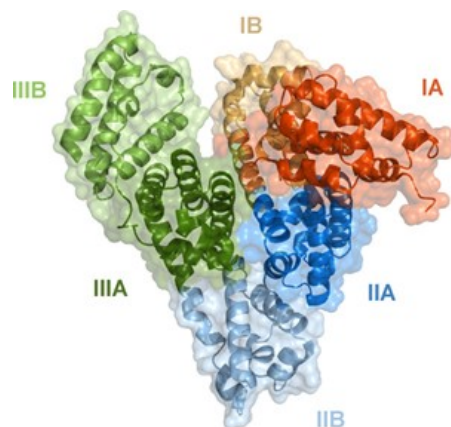
### 4.3.1 Charakterizace lidského a hovězího albuminu

Po aplikaci do těla může PS interagovat s různými biomolekulami. Jednou z nejdůležitějších biomolekul, kterou je třeba vzít v úvahu během aplikace *in vitro* nebo *in vivo*, je albumin, nejhojnější sérový protein.

Lidský sérový albumin (human serum albumin, HSA) (Obr. 12) je nejčastější sérový protein, jehož koncentrace v lidské krvi je průměrně 0,63 mM ( $\approx 4\%$ ). Albumin je univerzální transportní protein, jehož podíl je okolo 60 % z celkového množství krevních proteinů. Účastní se transportu hormonů, vitamínů, mastných kyselin, xenobiotik, léčiv, kovových iontů včetně fyziologických kationtů ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) a toxických kovových iontů. Mezi další funkce HSA patří podíl na osmotickém tlaku, či antioxidační účinek (vychytává ROS).<sup>92</sup> HSA obsahuje ve své struktuře 585 aminokyselinových zbytků a má molekulovou hmotnost okolo 66 kDa.<sup>93</sup>

Hovězí sérový albumin (bovine serum albumin, BSA) (Obr. 12) je protein o molekulové hmotnosti 66,5 kDa a obsahuje 583 aminokyselinových zbytků. Má tři homologní domény (I – III) a ve své struktuře obsahuje dva tryptofany (Trp-134, Trp-212). Sekundární struktura obsahuje volný cystein Cys-34, který je nevázaný, ostatní cysteiny tvoří 17 disulfidických můstků tvořících terciální strukturu. Tento volný cystein byl studován pro antioxidační vlastnosti.<sup>44</sup> BSA představuje 76 % strukturního homologu HSA, oba albuminy mají podobnou 3D strukturu a kompatibilitu.<sup>94</sup> BSA je vzhledem k nízké ceně, dobré dostupnosti a vlastnosti vázat ligandy často používán jako model pro studium interakce léčivo-protein *in vitro*.<sup>95</sup>

BSA je hlavní proteinovou složkou fetálního hovězího séra (fetal bovine serum, FBS), které se používá na přípravu kultivačního média obsahujícího sérum (serum containing medium, SCM) pro buňky. FBS není jednotná směs a jeho složení se do určité míry liší v jednotlivých šaržích. Celkové množství BSA v SCM je přibližně 35  $\mu\text{M}$ .<sup>96</sup>



**Obr. 12.** Struktura hovězího albuminu s vyznačením jednotlivých domén. Obrázek převzat z publikace.<sup>97</sup>

Navázání na proteiny ovlivňuje distribuci, metabolismus a molekulární formu PS např. jejich protonizaci, agregační a disagregační chování a koncentraci volných molekul. Vazba na proteiny ovlivňuje i fotofyzikální vlastnosti.

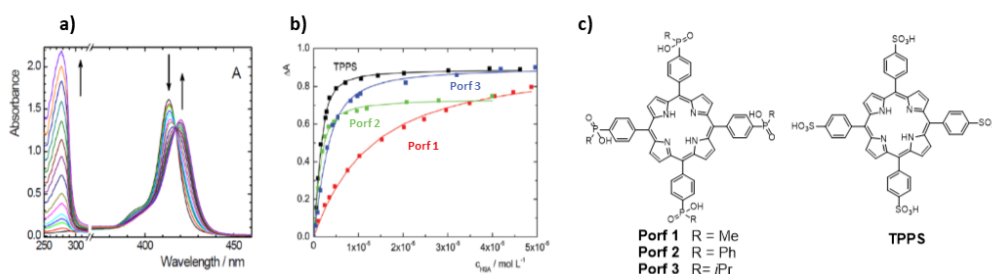
Nekovalentní interakce jsou zodpovědné za seskupování molekul. Jsou tvořeny slabými vazebnými silami, přičemž vzniká nové seskupení, ale ne nová molekula jako při chemické reakci. PS tvoří řadu komplexů s biomolekulami nekovalentně vázanými elektronovými nebo hydrofobními silami. Během komplexace dochází ke změnám fotofyzikálních vlastností z důvodu změny prostředí (většinou za méně polární) v okolí PS. Komplexace s biomolekulami může zvýšit rozpustnost, chemickou nebo fotochemickou stabilitu a fotodynamickou aktivitu. Fotodynamická aktivita je významně ovlivněna lokalizací PS – maximálního účinku je docíleno v případě, že PS je v monomerní formě a nachází se blízko cílové struktury. Fyzikální vlastnosti (fluorescence, tvorba a kvantový výtěžek singletového kyslíku, tripletové stavy) jsou nezbytné pro reakci excitovaného PS s cílovými strukturami (reakce typu I) nebo s kyslíkem (reakce typu II). Znalost nekovalentní interakce mezi PS (Pc a porfyriny) je nezbytná pro porozumění mechanismu a efektivitě fotoreakcí na buněčné úrovni.

Sérové proteiny, tj. albumin, HDL, VLDL, ale i protilátky mohou sloužit jako přírodní transportéry. Mohou transportovat Pc do nádorových buněk a tkání.<sup>98</sup> Z tohoto důvodu byla v literatuře věnována velká pozornost sérovému albuminu a jeho interakci se syntetickými porfyriny a Pc<sup>59, 99-111</sup>

#### 4.3.2 Vliv vazby mezi PS a albuminem na fotofyzikální vlastnosti

V této části se zaměřím na typické změny fotofyzikálních vlastností PS po navázání na proteiny. Vzhledem k zaměření mé práce se budu orientovat zejména na Pc, ale vzhledem k tomu, že interakce s proteiny byla v literatuře daleko více studována u porfyrinů, budou zde uvedeny i příklady z této strukturní skupiny. Řada změn může být velice podobná u obou strukturních typů.

**Absorpční spektra** jsou ovlivněna vazbou na proteiny a v roztoku lze u nich pozorovat rozdíl mezi navázaným a nenavázaným porfyrinem. Tento efekt je dán interakcí mezi rozpouštědlem a rozpuštěnou látkou (solvent-solute interakcí), kdy polarita proteinového prostředí je nižší než vody. Vazba na protein se proto projeví červeným posunem Soretova pásu u porfyrinů a u Pc je obvykle doprovázena hypochromicitou (snížením absorbance). Tyto vazebně indukované spektroskopické změny jsou často používány ke kvantifikaci afinity monomerního PS k vazebným místům v proteinech, kterou lze popsat vazebnou konstantou ( $K_b$ ). Příkladem může být vazba porfyrinů **Porf 1**, **2**, **3** a HSA, kdy došlo k posunu Soretova pásu z 414 nm přibližně k 420 nm.<sup>101</sup> Všechny 3 porfyriny **Porf 1**, **2**, **3** se vyznačují vysokou afinitou k HSA ( $K_b = 2,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  pro *meso*-tetrakis(4-sulfonátofenyl)porfyrin (**TPPS**);  $9,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  pro **Porf 1**;  $1,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  pro **Porf 2** a  $7,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  pro **Porf 3**. (Obr. 13)



**Obr. 13.** a) Změna Soretova pásu po přidání HSA k látce **Porf 1**. Šipka znázorňuje změnu absorbance po přidání HSA. b) Vazebné izotermie látek **Porf 1-3** a **TPPS**. c) Struktury látek **Porf 1-3** a **TPPS**. Převzato a upraveno z článku.<sup>101</sup>

**Fluorescenční vlastnosti** jsou také velmi citlivé na změnu prostředí, a jsou proto výhodné pro studium vazebných procesů. Fluorescence v ustáleném stavu je doprovázena červeným posunem emisního maxima. Také dochází k překryvu emisního spektra proteinových aromatických aminokyselinových zbytků a absorpčního spektra porfyrinu navázaného na protein, který podporuje přenos energie fluorescence k navázanému porfyrinu.<sup>112, 113</sup> Přenos energie z proteinu na navázaný porfyrin umožňuje detailnější studium vazebných míst proteinu.

Vazba na proteiny se může projevit na molekulární úrovni. Mnoho porfyrinů a Pc má tendenci agregovat ve vodných roztocích s vysokou iontovou silou. Po přidání nadbytku proteinu k tomuto roztoku dochází k rozdělení agregátů na monomery a následně k vazbě monomerů na molekuly proteinu.<sup>59, 99, 105, 107-109, 114, 115</sup> Vazba monomerů na proteiny pak může být popsána pomocí absorpční nebo fluorescenční spektroskopie, protože spektrální vlastnosti jsou závislé na formě PS v roztoku.

Dále se vazba PS na proteiny projeví v oblasti doby života fluorescence. Navázáním porfyrinu a Pc na proteiny se prodlužuje doba života excitovaných singletových stavů.<sup>112, 113, 116, 117</sup> Časově rozlišená fluorescence je běžně po vazbě na proteiny charakterizována monoexponenciální závislostí s prodlouženou dobou života<sup>112, 113</sup> nebo zobrazuje kinetiku, kterou lze charakterizovat dvěma nebo až třemi exponenciálními funkcemi.<sup>116-118</sup> To by mohlo naznačovat, že příslušné fluorofory jsou umístěny v různých částech uvnitř proteinové matrice, což naznačuje existenci několika populací navázaných PS.

V literatuře<sup>116-118</sup> bylo popsáno například několik populací sulfonovaných hlinitých Pc (**AIPcS<sub>n</sub>**, n = 1–4) vázaných na HSA. Analýza časově rozlišené fluorescence vedla k identifikaci tří populací v závislosti na tom, v jakém prostředí se molekuly **AIPcS<sub>n</sub>** nacházejí: (i) excitované molekuly **AIPcS<sub>n</sub>** jsou ve volném kontaktu s vodou ( $\tau_F = 5,0$  ns); (ii) molekuly vody jsou vyloučeny nebo přednostně solvatují složky proteinu ( $\tau_F = 6,7$  ns); (iii) lokalizace, kde se vyskytuje další zhášení ( $\tau_F = 0,4-1,2$  ns). Příspěvky příslušných složek závisí na počtu sulfonátových skupin a mohou korelovat s hydrofilností molekul rostoucí od **AIPcS<sub>1</sub>** k **AIPcS<sub>4</sub>**. V důsledku toho se nejvíce hydrofobní **AIPcS<sub>1</sub>** molekuly nachází mezi vodnou a proteinovou fází (převažuje i a iii), méně hydrofobní **AIPcS<sub>2</sub>** a **AIPcS<sub>3</sub>** jsou vázány na povrchu proteinu v hydrofobních místech chráněných před vodou (převládá i a ii) a hydrofilní **AIPcS<sub>4</sub>** je navázán na povrch proteinu (proces i).

Vliv vazby PS na proteiny se může projevit i u **tripletových stavů**. Triplet-triplet absorpční pásy porfyrinu navázaného na protein jsou širší a podobné volnému porfyrinu a doba života tripletových stavů je po navázání mnohem delší než u volné molekuly v roztoku.<sup>99, 116-119</sup> Důvodem je, že PS je navázán v prostředí, kde je rychlost deaktivace tripletových stavů nižší než ve vodném prostředí. Příkladem může být doba tripletových stavů u **TPPS** a **AIPcS<sub>n</sub>** vázaného na BSA, kdy dochází k nárůstu z 510  $\mu$ s a 440  $\mu$ s na 2400  $\mu$ s a 1160  $\mu$ s.<sup>119, 120</sup>

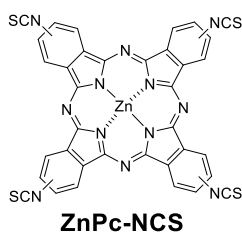
#### 4.3.3 *Vliv vazby mezi PS a albuminem na biologické vlastnosti*

V rámci PDT byly zkoumány interakce různých Pc s BSA nebo s HSA jako s potenciálními transportními systémy,<sup>121</sup> cílovými strukturami<sup>122</sup> nebo pro potenciální zvýšení fotodynamické aktivity.<sup>44, 123</sup> Účinky interakce proteinu s Pc na PDT jsou velmi rozdílné od vysoce pozitivního efektu, vedoucího k vyšší aktivitě po navázání<sup>94, 123</sup> přes neutrální účinek<sup>123, 124</sup> až po silně negativní účinek.<sup>109, 113, 125</sup>

Využitím BSA jako transportního systému se zabývá publikace Garcíi et al.,<sup>121</sup> která porovnává rozdíl při podání nesubstituovaného ZnPc v dipalmitoylfosfatidylcholinových (dipalmitoylphosfatidylcholine, DPPC) lipozomech nebo aduktu s BSA. V případě ZnPc v aduktu s BSA je dle absorpčního spektra látka agregovaná, v DPPC lipozomech je naopak monomerní. Fotodynamická aktivita na HeLa buňkách byla rozdílná, přestože vychytávání obou látek bylo v obou případech podobné. Vyšší fotodynamická aktivita byla pozorována u aduktu s BSA, kde rozdíl v aktivitě byl dán rozdílnou lokalizací v buňkách. Adukt ZnPc s BSA se lokalizoval v blízkosti buněčného jádra, zato ZnPc v DPPC lipozomech v buněčné membráně.

Mnoho hydrofilních Pc (např. **AlPcS<sub>4</sub>** - tetrasulfonovaný hlinitý Pc) se váže na sérové proteiny více než na LDL nosiče, které jsou více preferované hydrofobními látkami (např. nesubstituovaným ZnPc). Tyto nosičové systémy mohou zlepšovat fotodynamický účinek *in situ* na základě zvýšení intracelulární koncentrace látek díky receptorem zprostředkované endocytóze a vést k lepšímu zacílení PDT.<sup>122</sup> Mj. i například makrofágy asociované s nádorem vychytávají mnohem více PS než normální buňky.

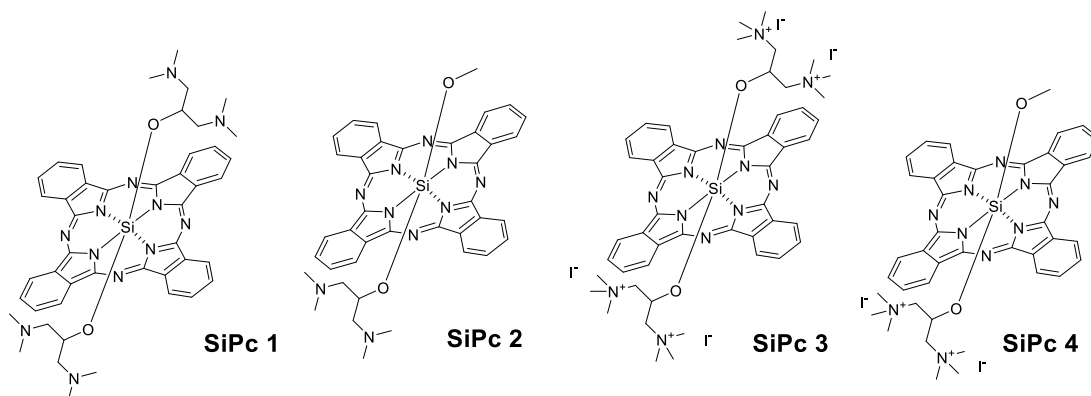
Silva et al.,<sup>44</sup> studovali tetraizothiokyanátový zinečnatý Pc kovalentně vázaný k molekule BSA s cílem ověřit vyšší účinnost na HepG2 buňkách (buňky lidského karcinomu jater). V této práci byla porovnána fotodynamická aktivita jak konjugovaného (**ZnPc-NCS-BSA**), tak nekonjugovaného Pc (**ZnPc-NCS**) (Obr. 14). Konjugovaný **ZnPc-NCS-BSA** se dostával do buněk ve větší koncentraci a zároveň v lyzosomech buněk docházelo k degradaci jeho vazby na albumin a uvolnění PS. Po ozáření světlem byly PS uvolněny z lyzosomu a relokalizovány do dalších citlivých organel (např. jádro, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát). Tetraizothiokyanátový **ZnPc-NCS-BSA** konjugát tak byl mnohem účinnější na HepG2 buňkách než nekonjugovaná sloučenina z důvodu lepšího vychytávání PS v nádorových buňkách.



**Obr. 14.** Struktura tetraizothiokyanátového zinečnatého Pc

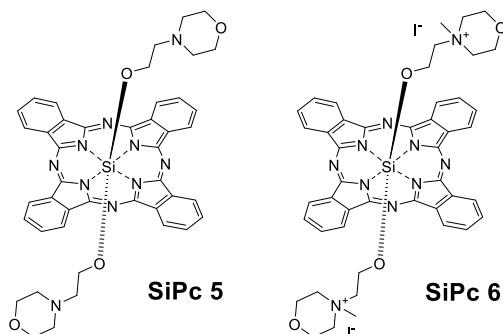
K podobným výsledkům došli ve svých pracích i autoři Jiang et al.,<sup>126</sup> a Huang et al.<sup>123</sup>. Během těchto prací bylo připraveno 6 křemičitých ftalocyaninů, u kterých byla fotodynamická aktivita vyšší u aduktu (nekovalentní vazba) než u nekonjugovaných látek.<sup>126</sup>

Huang et al.<sup>123</sup> se ve své práci věnovali přípravě nekovalentních aduktů křemičitých Pc, které ve struktuře obsahují axiálně vázané 1,3-bis(dimethylamino)-2-propoxy skupiny, s rozdílnými sérovými albuminy (BSA, mBSA (maleylovaný hovězí sérový albumin))(Obr. 15). Všechny molekuly byly testovány na fotodynamickou aktivitu na HepG2 buňkách ve formě jak samotných Pc, tak aduktů s BSA nebo mBSA. U molekuly **SiPc 1** došlo při tvorbě aduktu s mBSA ke zvýšení fotodynamické aktivity –  $EC_{50}$  z 0,23  $\mu\text{M}$  na 0,07  $\mu\text{M}$ . Vyšší aktivita byla dána pravděpodobně vyšším prostupem PS do buněk. U látky **SiPc 2**, která byla nejsilnějším PS v této sérii, nebyl u aduktu pozorován lepší účinek – hodnoty  $EC_{50}$  byly podobné v rozmezí 0,05-0,08  $\mu\text{M}$  nezávisle na přítomnosti některého ze studovaných albuminů. Největší změnu v účinku na HepG2 buňky autoři pozorovali v případě látky **SiPc 4**, kdy došlo v případě aduktu s mBSA ke zvýšení účinku a změně  $EC_{50}$  z 0,40  $\mu\text{M}$  na 0,08  $\mu\text{M}$  a v případě aduktu s BSA na 0,05  $\mu\text{M}$ . Na druhou stranu bylo pozorováno, že u aduktu s látkou **SiPc 3** nedošlo vůbec k ovlivnění fotodynamické aktivity po navázání na albumin. Autoři tyto výsledky připisují dvěma protichůdným efektům. Po vazbě na albumin dochází ve všech případech ke zvýšenému vstupu všech látek do buněk, ale u **SiPc 3** byla pozorována agregace v kavitě bílkoviny. Tato agregace pak snižovala potenciálně zvýšený efekt daný větším množstvím Pc v buňkách.



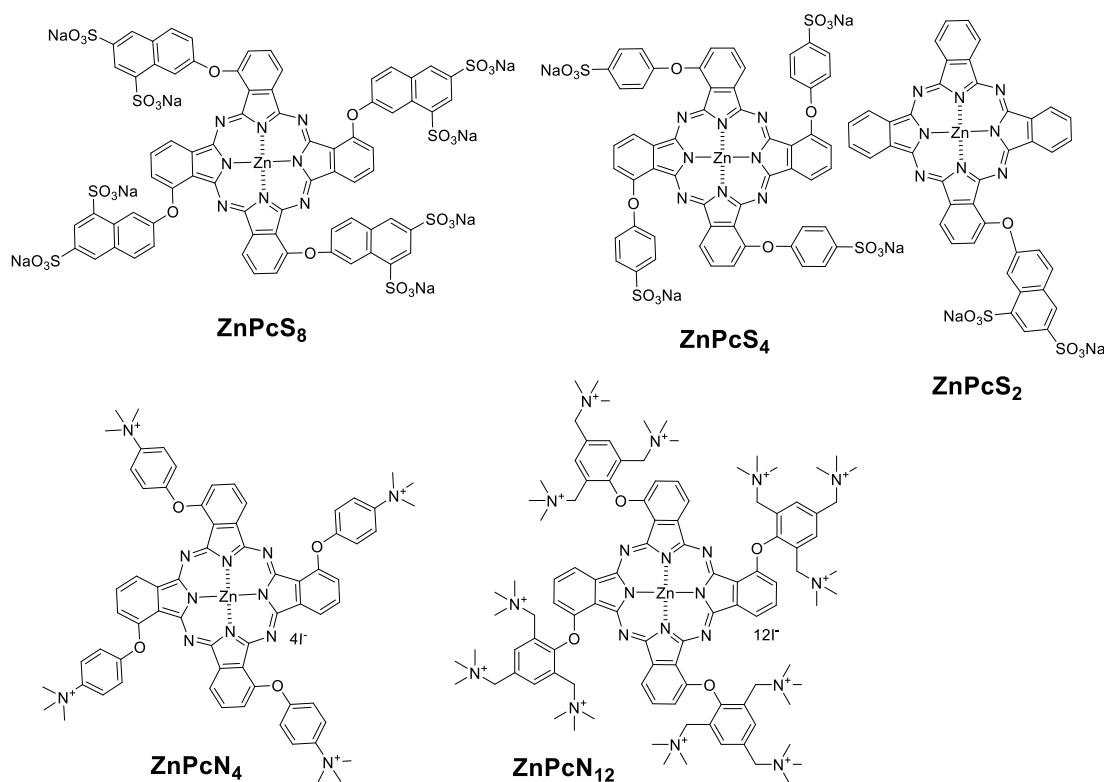
Obr. 15. Struktury křemičitých Pc (SiPc 1-4)

V práci Zhu et al.<sup>124</sup> byly připraveny další nové křemičité Pc **SiPc 5** a **SiPc 6** (Obr. 16). Obě látky byly axiálně modifikovány 2-morfolinoethoxy skupinou (**SiPc 5**) nebo jejím *N*-metylovaným analogem (**SiPc 6**). Látky vykazují nízkou vlastní toxicitu na B16 buňkách (myší nádorové buněčné linie použity pro výzkum jako model lidského karcinomu kůže), ale po ozáření červeným světlem jejich aktivita roste. Z důvodu zajímavých fotodynamických aktivit byly připraveny nekovalentní adukty s BSA, HSA a apo-transferinem, a to kvůli zlepšení selektivity vůči nádorovým buňkám. Avšak nedošlo k žádnému ovlivnění fotodynamické aktivity u **SiPc 5-BSA** aduktu ( $EC_{50} = 1,52 \mu\text{M}$ ) v porovnání se samotnou látkou **SiPc 5** ( $EC_{50} = 1,02 \mu\text{M}$ ). K tomu došlo pravděpodobně z důvodu, že B16 buňky nemají zvýšenou afinitu k vychytávání albuminu do nádorových buněk. Autoři této práce navrhli jako řešení použít tento adukt na jiné buněčné linii. Zajímavostí bylo, že látka **SiPc 6** netvořila nekovalentní adukt s proteiny, i když vykazovala vysokou schopnost zhášet excitované stavy BSA ( $K_{sv} = 1,26 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ). Po provedení gelové chromatografie nebyly pozorovány žádné frakce obsahující produkt jako konjugát, ani při poměru 10:1 látka vůči BSA).



Obr. 16. Struktury křemičitých Pc s 2-morfolinoethoxy skupinami

V práci od Li et al.<sup>59</sup> zkoumali vliv vazby anionických a kationických Pc na albumin a jeho funkci jako přirozeného transportéru ( Obr. 17). Kationické deriváty se váží selektivněji na dimer BSA než na monomer BSA. U anionických Pc dochází k vazbě jak na monomer, tak na dimer BSA. Všechny tyto Pc silně se vážící na albumin byly studovány *in vivo* na myších s nádorem (SSC7, myšší spinocelulární karcinom). Po *i.v.* podání Pc byla sledována biodistribuce pomocí fluorescence, přičemž ihned po podání došlo k distribuci do celého organismu a postupnému hromadění v místě nádoru. Tato schopnost cílení na nádor byla pravděpodobně způsobena cíleným transportem *in vivo* po navázání na albuminy. Stejný efekt byl pozorován i u dalších xenograftových myších modelů s buňkami HT-29 (buňky lidského kolorektálního adenokarcinomu). Tento jev však nebyl popsán u methylenové modře, která se jen částečně váže na proteiny. V rámci této práce byla poté porovnána fotodynamická aktivita dvou látek (**ZnPcS<sub>8</sub>** a **ZnPcN<sub>4</sub>**) *in vivo* na myších s nádorem tvořeným HT-29 buňkami s rozdílnými výsledky. U **ZnPcN<sub>4</sub>** došlo k potlačení nádoru, naopak u **ZnPcS<sub>8</sub>** k potlačení nádoru nedošlo a nádor se dále zvětšoval. A to i přesto, že obě látky měly stejnou koncentraci v tkáních *in vivo* i *ex vivo*.



Obr. 17. Struktury zkoumaných zinečnatých Pc



## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Všechna organická rozpouštědla použitá pro syntézu byla v analytické kvalitě. Bezvodý butanol pro cyklotetramerizaci byl sušen hořčíkem a pod zpětným chladičem byl při teplotě varu oddestilován v čas potřeby. Nesubstituovaný zinečnatý ftalocyanin (ZnPc) byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich. Všechny ostatní chemikálie pro syntézu byly zakoupeny u certifikovaných dodavatelů (např. Sigma-Aldrich, TCI Europe, Acros, nebo Merck) a byly použity tak, jak byly dodány. Pro tenkovrstvou chromatografii (TLC) byly použity hliníkové folie pokryté silikagelem 60 F254 (Merck). Pro čištění produktu sloupcovou chromatografií byl použit Merck Kieselgel 60 (0,040–0,063 mm). Teplota tání (t.t.) sloučenin byla měřena pomocí digitálního přístroje Electrothermal IA9200. Infračervená spektra byla měřena na Nicolet 6700 spektrofotometru v ATR modu.  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra byla měřena na přístroji VNMR S500 NMR. Zapsané chemické posuny jsou vztaženy relativně k vnitřnímu standardu  $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ . Hodnoty  $J$  jsou uváděny v Hz. UV-Vis spektra byla měřena na přístroji Shimadzu UV-2600 spektrofotometr. HR MS spektra byla měřena pomocí UHPLC systému Acquity UPLC I-class (Waters, Millford, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením (HR MS) Synapt G2Si (Waters, Manchester, Velká Británie) založeném na Q-TOF (Quadrupole Time-of-Flight). Chromatografie pro toto HR MS měření byla provedena na Acquity UPLC Protein BEH C4 ( $2,1 \times 50$  mm;  $1,7 \mu\text{m}$ ,  $300 \text{ \AA}$ ) s využitím kolony s gradientovou elucí acetonitrilem a 0,1% kyselinou mravenčí při průtoku  $0,4 \text{ ml/min}$ . K detekci byla použita ionizace elektrosprejem (ESI) v pozitivním módu. ESI spektra byla zaznamenána v rozmezí  $500\text{-}5000 \text{ m/z}$  s využitím leucin-enkefalinu jako referenční látky a jodidu sodného k externí kalibraci, nebo v rozmezí  $50\text{-}2000 \text{ m/z}$  s využitím leucin-enkefalinu jako referenční látky a mravenčanu sodného pro externí kalibraci. MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) hmotnostní spektra byla měřena v negativním a pozitivním refletronovém módu na přístroji 4800 MALDI TOF/TOF mass spectrometer (AB Sciex, Framingham, USA) využívajícím jako matici kyselinu  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicovou s přísadkou HCl (pro negativní mód) nebo *trans*-2-[3-(4-*tert*-butylfenyl)-2-methyl-2-propenyliden]malononitril (pro pozitivní mód). Přístroj byl kalibrován za použití externího pětibodového kalibračního standardu Peptide Calibration Mix1 (LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, Francie). Elementární analýza byla provedena pomocí Vario Micro Cube Elemental Analyzer (Elementar Analysensysteme GmbH,

Hanau, Německo). Gelová chromatografie byla prováděna na přístroji Amersham Pharmacia ÄKTA fast protein liquid chromatography system, jako kolona byla použita XK kolona s náplní Superdex 30 (GE Healthcare). Fluorescence byla měřena na FS5 spektrofluorimetru (Edinburgh Instruments).

Výchozí látky: zinečnatý TPyzPz (**3**, výtěžek 35 %),<sup>127</sup> 5-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)isofthalát (**6**, výtěžek 86 %),<sup>128</sup> 4,5-[(3,5-bismethoxykarbonyl)fenoxyl]ftalonitril (**9**, výtěžek 59 %),<sup>47</sup> 2-(2,6-bis[(1*H*-imidazol-1-yl)methyl]-4-methylfenoxyl)-5,6-dimethylpyridin-3,4-dikarbonitril (**10**, výtěžek 73 %)<sup>129</sup> byly připraveny podle literatury. Sloučeniny **1**, **2**, **13**, **14** a **17** byly dostupné v laboratoři z předešlých publikovaných projektů.<sup>48, 49, 96, 129, 130</sup> Čistota nových sloučenin **5**, **11**, **12**, **15**, **16** a **18** byla stanovena pomocí HPLC a ve všech případech byla > 96 %.

## 5.1 Syntéza

### 5.1.1 Příprava sodné soli 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(sulfonátofenyl) tetrapyrazinoporfyrazinátu zinečnatého komplexu (5)

Zinečnatý komplex **3** (0,48 g, 0,40 mmol) byl rozpuštěn v kyselině chlorsulfonové (2,5 ml, 37,5 mmol) a tato směs byla zahřívána za teploty varu 1 hodinu. Obsah reakční baňky byl následně přelit do nasyceného roztoku chloridu sodného ve vodě za chlazení ledem, přičemž vznikla zelená sraženina. Sraženina **4** byla odfiltrována a promyta studenou destilovanou vodou do neutrálního pH. K zeleným krystalům byl přidán 5% roztok NaHCO<sub>3</sub> (10 ml) a pár krystalků NaHCO<sub>3</sub>. Směs byla poté rozsuspendována v ultrazvukové lázni a míchána přes noc při pokojové teplotě. Následně byl zelený roztok látky **5** odpařen do sucha na rotační vakuové odparce, pevný produkt byl rozsuspendován v ethanolu, přefiltrován a důkladně promyt ethanolem. Surový produkt **5** byl dále čištěn pomocí gelové permeační chromatografie se stacionární fází Superdex 30 a vodou jako mobilní fází za těchto podmínek: objem kolony 130 ml, rychlost průtoku 0,5 ml/min, velikost frakcí po 1 ml. Čistota každé frakce byla hodnocena na základě absorpčního spektra ve vodě v oblasti 200-800 nm. Kvalita spektra byla určována v oblasti 250-400 nm a jako čisté frakce byly pak považovány frakce s poměrem A<sub>366</sub>/A<sub>306</sub> větším než 2. Čisté frakce byly odpařeny do sucha a následně promyty ethanolem za zisku tmavě zelené látky (77 mg, 10 %).

MALDI-TOF:  $m/z$  vypočítáno pro C<sub>72</sub>H<sub>40</sub>N<sub>16</sub>O<sub>24</sub>S<sub>8</sub>Zn [M - H]<sup>+</sup> (volná kyselina) 1832,0. Nalezeno 1830,0. HRMS (ESI):  $m/z$  vypočítáno pro C<sub>72</sub>H<sub>40</sub>N<sub>16</sub>O<sub>24</sub>S<sub>8</sub>Zn + H<sup>+</sup>: [M + H]<sup>+</sup>: 1832,9542. Nalezeno: 1832,9475. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O/pyridin-d<sub>5</sub>) δ 7,93 (bs, 16H); 7,78 (bs, 8H); 7,54 ppm (bs, 8H). Elementární analýza: počítáno pro molekulu C<sub>72</sub>H<sub>32</sub>N<sub>16</sub>Na<sub>8</sub>O<sub>24</sub>S<sub>8</sub>Zn + 8H<sub>2</sub>O; C, 40,13; H, 2,25; N, 10,40; S, 11,90 %. Nalezeno: C, 40,36; H, 2,85; N, 10,62; S, 12,26 %. λ<sub>max</sub> (voda, 1 μM, po 2 dnech od naředění)/nm 649 (ε/dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, 123 300), 588 (19 100), 369 (84 100). λ<sub>max</sub> (voda + pyridin (5% v/v), 1 μM)/nm 654 (ε/dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> 133 700), 592 (19 210), 373 (80 910).

### 5.1.2 Příprava 4,5-bis[3,5-bis(methoxykarbonyl)fenyl]ftalonitrilu (7)

Sloučenina **6** (5,02 g, 15,7 mmol), 4,5-dichloroftalonitril (1,05 g, 5,3 mmol), K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (3,27 g, 15,4 mmol), octan palladnatý (56 mg, 0,25 mmol), XPhos (362 mg, 0,76 mmol) byly rozpuštěny v bezvodém tetrahydrofuranu (THF) (110 ml) a míchány 24 hodin pod argonovou inertní atmosférou při pokojové teplotě. Poté byla přidána voda (5 ml) a pokračovalo se v míchání dalších 24 hodin. Organická rozpouštědla byla odpařena a vodný zbytek byl vytřepán 3× s ethyl-acetátem. Oddělená organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným, přefiltrována a odpařena do sucha. Produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Jako mobilní fáze byla použita směs hexan/ethyl-acetát (2:1, R<sub>f</sub> = 0,28). Přečištěný produkt byl rekrystalizován ze směsi chloroform/methanol za vzniku bílých krystalů. Výtěžek: 2,25 g (82 %).

t. t. = 207,8-208,4 °C (chloroform/MeOH). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,60 (s, 2H); 7,96 (d, *J* = 1,6 Hz, 4H); 7,93 (s, 2H); 3,89 (s, 12H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 165,06; 143,79; 137,51; 135,43; 134,22; 131,33; 130,80; 115,66; 114,69; 52,60. IČ (ATR) ν = 2957 (C-H<sub>alif</sub>), 2235 (CN), 1716 cm<sup>-1</sup> (C=O).

### 5.1.3 Příprava 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis[3,5-bis(butoxykarbonyl)fenyl]ftalocyanináto zinečnatého komplexu (**11Bu**)

Do baňky byly naváženy hořčičkové hobliny (65 mg, 2,7 mmol), přidán bezvodý butanol (20 ml) a malý krystalek jodu a po dobu 5 hodin se tato směs zahřívala za teploty varu rozpouštědla, dokud všechny hořčičky nezreagovaly na butanolát hořečnatý. Ftalonitril **7** (185 mg, 0,36 mmol) byl přidán a reakční směs se dále zahřívala za teploty varu dalších 20 hodin. Reakční směs pak byla ochlazená a zahuštěna pod sníženým tlakem na polovinu objemu. Tmavá suspenze byla následně vlita do směsi voda/methanol/kyselina octová (25:25:1, 100 ml) a míchána 60 minut při pokojové teplotě do odstranění nezreagovaného butanolátu hořečnatého. Zelená sraženina byla zfiltrována a krystaly promyty vodou a methanolem. Hořečnatý komplex byl charakterizován pomocí MALDI-TOF (*m/z* počítáno pro C<sub>160</sub>H<sub>176</sub>MgN<sub>8</sub>O<sub>32</sub> [M]<sup>+</sup>: 2745,2. Nalezeno: 2745,0) a byl rovnou převeden na bezkovový derivát. Hořečnatý komplex (240 mg) a monohydrát kyseliny *p*-toluensulfonové (166 mg, 0,87 mmol) byly rozpuštěny v THF (20 ml). Roztok byl míchán 1 hodinu při pokojové teplotě a poté byl THF odpařen na vakuové odparce za sníženého tlaku. Pevný produkt byl rozsuspendován ve vodě a zfiltrován, zelené krystaly byly promyty vodou a methanolem. Produkt reakce byl přečištěn sloupcovou

chromatografií na silikagelu, kdy jako mobilní fáze byla použita směs toluen/THF (20:1,  $R_f = 0,47$ ). Čisté frakce byly spojeny a odpařeny do sucha. Čistý produkt byl krystalizován po přidání vysoce koncentrovaného roztoku bezkovového derivátu v chloroformu do methanolu. Zelené krystaly bezkovového derivátu byly odsáty, usušeny a charakterizovány pomocí MALDI-TOF ( $m/z$  počítáno pro  $C_{160}H_{178}N_8O_{32}$   $[M]^+$ : 2723,3. Nalezeno: 2723,0). Bezkovový derivát (142 mg, 0,052 mmol) byl rozpuštěn v pyridinu (30 ml) a byl přidán octan zinečnatý (26 mg, 0,142 mmol). Směs byla zahřívána za teploty varu rozpouštědla pod zpětným chladičem 6 hodin. Poté byla směs odpařena na vakuové odparce do sucha. Získaný produkt byl rozsuspendován ve vodě a odsát na fritě. Krystaly byly promyty vodou a methanolem. Produkt reakce byl čištěn sloupcovou chromatografií, kdy jako mobilní fáze byla použita směs chloroform/ethyl-acetát (50:1,  $R_f = 0,20$ ). Čistý produkt byl překrystalizován pomalým přidáváním roztoku zinečnatého komplexu v chloroformu do methanolu. Krystaly byly odsáty a vysušeny za zisku tmavě zelených krystalů. Výtěžek 112 mg (45 % z látky 7).

MS MALDI-TOF:  $m/z$  počítáno pro  $C_{160}H_{176}N_8O_{32}Zn$   $[M]^+$ : 2785,2. Nalezeno: 2784,9.  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ /pyridin- $d_5$ )  $\delta$  9,88 (s, 8H); 8,85 (t,  $J = 1,6$  Hz, 8H); 8,61 (d,  $J = 1,6$  Hz, 16H); 4,41 (t,  $J = 6,6$  Hz, 32H); 1,83 – 1,75 (m, 32H); 1,55 – 1,46 (m, 32H); 1,04 (t,  $J = 7,4$  Hz, 48H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ /pyridin- $d_5$ )  $\delta$  165,61; 154,47; 142,19; 140,72; 138,74; 131,41; 129,57; 125,52; 65,32; 30,76; 19,31; 13,80. Jeden aromatický signál byl překryt signálem rozpouštědla.  $\lambda_{max}$  (DMF, 1  $\mu M$ )/nm 694 ( $\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$  325 240), 625 (49 170), 368 (105 550).  $\lambda_{max}$  (THF, 1  $\mu M$ )/nm 687 ( $\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$  368 200), 619 (55 780), 363 (134 500). IČ (ATR)  $\nu = 2960$  (C-H<sub>alif</sub>), 2873 (C-H<sub>alif</sub>), 1723  $cm^{-1}$  (C=O).

#### 5.1.4 Příprava sodné soli 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(3,5-dikarboxylátofenyl)ftalocyaninátu zinečnatého komplexu (11).

Zinečnatý Pc **11Bu** (112 mg, 40  $\mu mol$ ) byl rozpuštěn v THF (7 ml) a byl pomalu přidáván do nasyceného roztoku NaOH ve vodě/methanolu (1:5) (50 ml). Směs byla míchána 4 hodiny při 40 °C a výsledné krystaly byly odfiltrovány a promyty opakovaně methanolem a chloroformem. Produkt reakce byl rozpuštěn ve vodě a okyselen 1M HCl na pH 1. Vzniklá sraženina byla zcentrifugována a tekutina nad produktem byla dekantována. Tento proces se opakoval dvakrát. Po odstranění tekutiny byla zelená sraženina rozsuspendována ve směsi methanol, aceton, pyridin, suspenze byla

ultrazvukována, převedena do baňky a odpařena do sucha. Pevný produkt byl rozsuspendován v diethyletheru a odsátím byly získány zelené krystaly (79 mg, 89 %). I po důkladném promytí diethyletherem a vysušení vzorku (podle NMR včetně 2D NMR) obsahoval Pc přibližně čtyři molekuly pyridinu na jeden Pc. Pc s volnými kyselinami byl poté převeden na sodnou sůl **11**. Látka **11COOH** (65 mg, 34  $\mu\text{mol}$ ) byla rozpuštěna v 1,0 M roztoku NaOH (544  $\mu\text{l}$ , 544  $\mu\text{mol}$ ) a voda byla odpařena do sucha.

Data pro **11COOH**: výtěžek: 79 mg (89 %).

MS MALDI-TOF:  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{96}\text{H}_{48}\text{N}_8\text{O}_{32}\text{Zn} [\text{M}]^+$ : 1888,2. Nalezeno: 1888,0.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13,31 (s, 16H); 9,66 (s, 8H); 8,47 (t,  $J = 1,6$  Hz, 8H); 8,32 (d,  $J = 1,6$  Hz, 16H) + signály pro pyridin 8,68-8,64 (m, 8H); 8,03-7,97 (m, 4H); 7,59-7,54 (m, 8H). Poměr mezi Pc a pyridinovým signálem ukazuje přítomnost 4 molekul pyridinu na 1 molekulu Pc.  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  166,82; 154,04; 148,00; 142,15; 140,65; 138,55; 135,61; 131,81; 125,28 + signály pro pyridin 139,42; 129,12; 124,73.  $\lambda_{\text{max}}$  (DMF, 1  $\mu\text{M}$ )/nm 693 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  213 010), 626 (39 240), 368 (79 100). IČ (ATR)  $\nu = 3068$  (C-H<sub>alif</sub>), 1704  $\text{cm}^{-1}$  (C=O).

Data pro **11**:

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  9,60 (d,  $J = 2,5$  Hz, 8H); 8,23–8,19 (m, 8H); 8,14–8,10 (m, 16H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  174,63; 154,53; 142,34; 141,09; 137,23; 136,62; 133,36; 128,02; 124,72.  $\lambda_{\text{max}}$  (PBS, 1  $\mu\text{M}$ )/nm 698 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  22 1910), 628 (35 300), 362 (92 440).  $\lambda_{\text{max}}$  (DMF, 1  $\mu\text{M}$ )/nm 696 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  203 740), 627 (36 340), 367 (80 280). IČ (ATR)  $\nu = 1611$  (C=O), 1563  $\text{cm}^{-1}$  (C=O). HPLC analýza:  $t_{\text{r}} = 18,41$  min; čistota 96,4 %.

### 5.1.5 Příprava *2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis[3,5-bis(butoxykarbonyl)fenoxy]ftalocyaninátu zinečnatého komplexu (12Bu)*

Směs ftalonitrilu **9** (915 mg, 1,68 mmol), octanu zinečnatého (150 mg, 0,68 mmol) a pár kapek DBU byla zahřívána v *n*-butanolu (20 ml) při teplotě 140 °C po dobu 18 hodin. Obsah baňky byl odpařen za sníženého tlaku za vzniku zelenomodrého pevného produktu, který byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu, jako mobilní fáze byla použita směs chloroform/ethyl-acetát (100:1,  $R_{\text{f}} = 0,62$ ). Přechištěný produkt byl překrystalizován pomalým přidáváním koncentrovaného chloroformového roztoku **12Bu** do methanolu za vzniku tmavě zelené sraženiny. Sraženina byla odsáta a vysušena. Výtěžek: tmavě zelené krystaly (502 mg, 41 %).

MS MALDI-TOF:  $m/z$  vypočteno pro  $C_{160}H_{176}N_8O_{40}Zn [M]^+$ : 2913,1. Nalezeno: 2913,1.  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ /pyridin- $d_5$  3:1)  $\delta$  8,89 (s, 8H); 8,37 (t,  $J = 1,5$  Hz, 8H); 8,17 (d,  $J = 1,5$  Hz, 16H); 4,31-4,23 (m, 32H); 1,75 – 1,68 (m, 32H); 1,45 – 1,36 (m, 32H), 0,83 (t,  $J = 7,4$  Hz, 48H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ /pyridin- $d_5$  3:1)  $\delta$  164,85; 158,02; 150,97; 148,78; 132,66; 125,43; 122,52; 115,87; 65,42; 30,71; 19,27; 13,76. Jeden aromatický signál se překrýval se signálem rozpouštědla.  $\lambda_{max}$  (THF, 1  $\mu M$ )/nm 671 ( $\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$  120 900), 640 (91 630), 350 (107 730).  $\lambda_{max}$  (DMF, 1  $\mu M$ )/nm 640 ( $\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$  92 660), 350 (98 910). IČ (ATR)  $\nu = 3088$  (C- $H_{arom}$ ), 2960 (C- $H_{alif}$ ), 2874 (C- $H_{alif}$ ), 1723  $cm^{-1}$  (C=O).

#### 5.1.6 Příprava hexadecasodné soli 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(3,5-dikarboxylát-fenoxy)ftalocyaninátu zinečnatého komplexu (12)

Zinečnatý Pc **12Bu** (290 mg, 100  $\mu mol$ ) byl rozpuštěn v THF (7 ml) a pomalu přidáván do nasyceného roztoku NaOH ve směsi voda/methanol (1:5) (90 ml). Směs byla míchána při 40 °C po dobu 4 hodin, výsledná sraženina byla odfiltrována a promyta opakovaně methanolem a chloroformem. Modrá sraženina byla rozpuštěna ve vodě a okyselená 1 M HCl na pH 1, zcentrifugována a opatrně dekantována. Následně byla sraženina rozsuspendována v okyselené vodě s kapkou 1% HCl, zcentrifugována a opatrně dekantována. Tento postup byl opakován dvakrát. Po odstranění kapalně fáze byla pevná látka rozsuspendována v acetonu, ultrazvukována (malé množství produktu se rozpustilo), převedena do baňky a odpařena. Tento postup byl opakován ještě dvakrát, dokud aceton nezůstal bezbarvý. Poté byla pevná látka promyta diethyletherem a vysušena. Výtěžek reakce: modré krystaly 103 mg (51 %). Volná kyselina byla převedena kvantitativně na sodnou sůl. Produkt **12COOH** (103 mg, 51  $\mu mol$ ) byl rozpuštěn v 1,0 M NaOH roztoku (816  $\mu l$ , 816  $\mu mol$ ) a voda byla odpařena do sucha.  $^1H$  NMR spektrum v čisté  $D_2O$  indikovalo rovnováhu mezi ionizovanou a neionizovanou formou stejně jako bylo publikováno dříve.<sup>47</sup>

Data pro **12COOH**:

MS MALDI-TOF:  $m/z$  vypočteno pro  $C_{96}H_{48}N_8O_{40}Zn [M]^+$ : 2016,1. Nalezeno: 2016,0.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12,94 (s, ~13H); 8,91–8,61 (m, 8H); 8,00–7,90 (m, 8H); 7,85 – 7,66 (m, 16H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  166,02; 157,51; 150,56; 148,37; 135,28; 133,16; 125,65; 121,70. Z důvodu špatného signálu nebylo možné spektrum správně a úplně analyzovat, chybí jeden signál uhlíku.  $\lambda_{max}$  (DMF, 1  $\mu M$ )/nm

674 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  216 950), 610 (35 070), 361 (76 970). IČ (ATR)  $\nu = 3090$  (C-H<sub>alif</sub>), 1701  $\text{cm}^{-1}$  (C=O).

Data pro **12**:

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  9,22 (s, 8H); 7,98 (s, 8H); 7,62 (d,  $J = 1,5$  Hz, 16H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  174,61; 157,74; 154,21; 149,65; 139,09; 136,07; 124,96; 120,56; 117,24.  $\lambda_{\text{max}}$  (PBS, 1  $\mu\text{M}$ )/nm 680 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  193 260), 613 (32 060), 355 (81 780).  $\lambda_{\text{max}}$  (DMF, 1  $\mu\text{M}$ )/nm 674 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  205 950), 610 (33 240), 362 (72 930). IČ (ATR)  $\nu = 1614 \text{ cm}^{-1}$  (C=O). HPLC analýza:  $t_r = 20,34$  min; čistota 99,2 %.

### 5.1.7 Příprava 2,3-bis[3,5-bis(butoxykarbonyl)fenyl]ftalocyaninátu zinečnatého komplexu (**15Bu**)

Hořčikové piliny (394 mg, 16,2 mmol) s malým krystalem jodu byly suspendovány v bezvodém butanolu (20 ml). Suspenze byla zahřívána při teplotě varu rozpouštědla 5 hodin, dokud všechen hořčík nezreagoval na butanolát hořečnatý. Ftalonitril **7** (300 mg, 0,59 mmol) a ftalonitril (225 mg, 1,76 mmol) byly přidány a směs byla zahřívána za teploty varu rozpouštědla dalších 20 hodin. Poté byla směs ochlazená a butanol byl částečně odpařen za sníženého tlaku, zahuštěný obsah byl poté přidán ke směsi voda/methanol/kyselina octová (25:25:1, 100 ml). Suspenze byla míchána při pokojové teplotě 60 minut, dokud se neodstranil nezreagovaný butanolát hořečnatý. Sraženina byla odfiltrována a surový hořečnatý komplex byl čištěn sloupcovou chromatografií, při které byla použita jako mobilní fáze směs chloroform/THF (20:1,  $R_f = 0,30$ ) za eluce požadovaného AAAB kongeneru jako druhé nejintenzivnější modré frakce. Surový produkt byl rekrystalizován z chloroformu a methanolu za vzniku modré sraženiny (123 mg, 19 %), která byla charakterizována pomocí MALDI-TOF ( $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{64}\text{H}_{56}\text{MgN}_8\text{O}_8$   $[\text{M}]^+$ : 1088,4. Nalezeno: 1088,3), a která byla rovnou převedena na bezkovový derivát. Hořečnatý komplex (123 mg, 113  $\mu\text{mol}$ ) a monohydrát kyseliny *p*-toluensulfonové (214 mg, 1,13 mmol) byly rozpuštěny v THF (10 ml). Roztok byl míchán při pokojové teplotě 2 hodiny a následně bylo rozpouštědlo odpařeno za sníženého tlaku. Pevný produkt byl promyt vodou a methanolem. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází chloroform/toluen/THF (25:25:1,  $R_f = 0,3$ ). Přečištěný produkt byl rekrystalizován z chloroformu a methanolu za vzniku modré pevné látky (62 mg, 51 %). Bezkovový derivát byl charakterizován pomocí MALDI-TOF ( $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{64}\text{H}_{58}\text{N}_8\text{O}_8$   $[\text{M}]^+$ : 1066,4. Nalezeno: 1066,4) a rovnou



převeden na zinečnatý komplex **15Bu**. Bezkovový derivát (62 mg, 58  $\mu\text{mol}$ ) byl rozpuštěn v pyridinu (7 ml), poté byl přidán octan zinečnatý (76 mg, 0,41 mmol). Směs byla zahřívána za teploty varu rozpouštědla 6 hodin. Následně byl pyridin odpařen za sníženého tlaku na vakuové odparce. Pevný produkt byl promyt vodou a methanolem. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází chloroform/THF/ethyl-acetát (30:1:1,  $R_f = 0,52$ ). Přečištěný produkt byl překrytalizován pomalým přidáváním koncentrovaného chloroformového roztoku **15Bu** do methanolu za vzniku modrých krystalů (58 mg, 88 %).

MS MALDI-TOF:  $m/z$  vypočítáno pro  $\text{C}_{64}\text{H}_{56}\text{N}_8\text{O}_8\text{Zn} [\text{M}]^+$ : 1128,4. Nalezeno: 1128,3. HRMS (ESI):  $m/z$  vypočítáno pro  $\text{C}_{64}\text{H}_{56}\text{N}_8\text{O}_8\text{Zn} + \text{H}^+ [\text{M} + \text{H}^+]$ : 1129,3590. Nalezeno: 1129,3547.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-}d_5$  3:1)  $\delta$  9,35 – 9,29 (m, 4H); 9,25 – 9,17 (m, 4H); 8,95 (s, 2H); 8,72 (d,  $J = 1,6$  Hz, 4H); 8,18 (dd,  $J = 5,6, 2,8$  Hz, 2H); 8,16–8,11 (m, 4H); 4,53 (t,  $J = 6,6$  Hz, 8H); 1,91 (q,  $J = 8,0; 7,4$  Hz, 8H); 1,65–1,56 (m, 8H); 1,12 (t,  $J = 7,4$  Hz, 12H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-}d_5$  3:1)  $\delta$  165,88; 153,80; 153,53; 152,73; 151,38; 142,67; 139,14; 138,64; 138,31; 138,29; 137,86; 135,97; 131,42; 129,47; 129,30; 129,15; 129,09; 124,85; 122,89; 122,77; 122,68; 65,45; 30,94; 19,46; 13,94.  $\lambda_{\text{max}}$  (DMF, 1  $\mu\text{M}$ )/nm 681 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  176 200), 609 (31 570), 352 (64 150).  $\lambda_{\text{max}}$  (THF, 1  $\mu\text{M}$ )/nm 676 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  223 680), 607 (41 020), 351 (96 220). IČ (ATR)  $\nu = 3063$  (C-H<sub>arom</sub>), 2961 (C-H<sub>alif</sub>) 2873 (C-H<sub>alif</sub>), 1723  $\text{cm}^{-1}$  (C=O).

#### 5.1.8 Příprava tetrasodné soli 2,3-bis(3,5-dikarboxylátofenyl)ftalocyaninátu zinečnatého komplexu (**15**)

Zinečnatý komplex **15Bu** (58 mg, 51  $\mu\text{mol}$ ) byl rozpuštěn v THF (5 ml) a byl pomalu přidáván k nasycenému roztoku NaOH ve směsi voda/methanol (1:5) (30 ml). Směs byla míchána 4 hodiny při teplotě 40 °C. Poté byla vzniklá sraženina odfiltrována, rozpuštěna ve vodě a okyselena 1M HCl na pH 1. Vzniklá sraženina byla odfiltrována, rozsuspendována ve vodě s kapkou 1% HCl, zcentrifugována a opatrně dekantována. Tento proces byl opakován ještě dvakrát. Po vysušení byl pevný Pc rozpuštěn v malém množství pyridinu a po kapkách nakapán do diethyletheru. Modré krystaly byly odsáty a vysušeny za zisku **15COOH** (37 mg, 80 %). Volná kyselina byla převedena na sodnou sůl. Látka **15COOH** (37 mg, 1  $\mu\text{mol}$ ) byla rozpuštěna v 0,1 M NaOH (1,63 ml, 163  $\mu\text{mol}$ ) a voda byla odpařena do sucha. Modré krystaly látky **15** byly rozsuspendovány v ethanolu, zcentrifugovány a promyty čistým ethanolem, odsáty a usušeny.

Data pro **15COOH**:

MS MALDI-TOF:  $m/z$  vypočteno pro  $C_{48}H_{24}N_8O_8Zn [M]^+$ : 904,1. Nalezeno: 904,0.

HRMS (ESI):  $m/z$  vypočteno pro  $C_{48}H_{24}N_8O_8Zn + [M]^+$ : 904,1003. Nalezeno: 904,0987.

$^1H$  NMR (500 MHz, pyridin- $d_5$ )  $\delta$  9,95 (s, 2H); 9,79 (dd,  $J = 5,5$ ; 3,0 Hz, 2H); 9,73 (d,  $J = 6,3$  Hz, 2H); 9,67 (d,  $J = 6,4$  Hz, 2H); 9,57 (d,  $J = 1,7$  Hz, 2H); 9,20 (d,  $J = 1,6$  Hz, 4H); 8,30 (dd,  $J = 5,6$ ; 2,9 Hz, 2H); 8,25 (tt,  $J = 7,2$ ; 3,6 Hz, 4H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz, pyridin- $d_5$ )  $\delta$  168,48; 154,76; 154,66; 154,30; 153,52; 142,88; 141,20; 139,30; 139,20; 139,16; 138,68; 133,52; 130,50; 130,01; 129,95; 129,89; 125,47; Některé aromatické signály byly překryté se signálem rozpouštědla.  $\lambda_{max}$  (DMF, 1  $\mu$ M)/nm 676 ( $\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$  158 130), 610 (29 680), 345 (49 820). IČ (ATR)  $\nu = 3063$  (C-H<sub>arom</sub>), 1711  $cm^{-1}$  (C=O).

Data pro **15**:

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ /D $_2$ O 1:1)  $\delta$  8,97 (dd,  $J = 5,4$ ; 2,9 Hz, 2H); 8,78 (d,  $J = 7,3$  Hz, 2H); 8,69 (d,  $J = 7,3$  Hz, 2H); 8,63 (s, 2H); 8,39 (s, 2H); 8,35 (s, 4H); 8,06 (t, 4H); 7,96 (t,  $J = 7,1$  Hz, 2H).  $^{13}C$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ /D $_2$ O 1:1)  $\delta$  172,74; 152,26; 152,02; 151,76; 151,00; 141,57; 141,41; 137,80; 137,24; 136,90; 136,82; 136,08; 133,25; 129,71; 129,52; 128,56; 124,49; 122,82; 122,62; 122,57. Jeden signál nebyl detekován z důvodu překrytí signálu se signálem rozpouštědla.  $\lambda_{max}$  (PBS, 1  $\mu$ M)/nm 640 ( $\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$  69 530), 339 (53 980).  $\lambda_{max}$  (DMF, 1  $\mu$ M)/nm 677 ( $\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$  167 840), 610 (29 010), 354 (60 050). IČ (ATR)  $\nu = 1558$  (C=O) 1614  $cm^{-1}$  (C=O). HPLC analýza:  $t_r = 16,83$  min; čistota 99,3 %.

#### 5.1.9 Příprava 2,3-bis[3,5-bis(butoxykarbonyl)fenoxy]ftalocyaninátu zinečnatého komplexu (**16Bu**)

Hořčíkové piliny (1,95 g, 81,25 mmol) s malým krystalem jodu byly suspendovány v bezvodém butanolu (50 ml). Suspenze byla zahřívána při teplotě varu rozpouštědla 4 hodiny, dokud všechen hořčík nezreagoval na butanolát hořečnatý. Ftalonitril (1,12 g, 8,73 mmol) a látka **9** (1,58 g, 2,91 mmol) byly přidány a směs byla zahřívána za teploty varu rozpouštědla dalších 20 hodin. Poté byla reakční směs ochlazená na pokojovou teplotu a zakoncentrována na vakuové odparce pod sníženým tlakem. Tmavá směs byla poté nalita do směsi voda/methanol/kyselina octová (10:10:1, 300 ml) a suspenze byla míchána při pokojové teplotě přes noc do doby než zreagoval všechen butanolát hořečnatý. Zelená sraženina byla odfiltrována a promyta vodou

a malým množstvím methanolu. Směs hořečnatých komplexů byla čištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu a jako mobilní fáze byla použita směs chloroform/THF (20:1,  $R_f = 0,55$ ). Požadovaný AAAB kongener byl izolován jako druhá nejintenzivnější modrá frakce. Čisté frakce byly spojeny a odpařeny za sníženého tlaku a vysušeny. Výtěžek: 857 mg (26 %) jako tmavá pevná látka. Hořečnatý komplex byl rovnou převeden na bezkovový derivát. Hořečnatý komplex (857 mg, 0,764 mmol) a *p*-toluensulfonová kyselina monohydrát (1451 mg, 7,64 mmol) byly rozpuštěny v THF (100 ml). Roztok byl 3 hodiny míchán při pokojové teplotě. Následně byl THF odpařen do sucha za sníženého tlaku na vakuové odparce. Pevný produkt byl promyt vodou a methanolem. Surový produkt z reakce (okolo 600 mg) byl rozpuštěn v pyridinu (50 ml) a byl přidán octan zinečnatý (700 mg, 3,81 mmol). Směs byla zahřívána za teploty varu směsi přes noc, druhý den byl pyridin odpařen za sníženého tlaku. Pevný produkt byl promyt vodou a methanolem. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu, jako mobilní fáze byla použita směs chloroform/THF (100:1,  $R_f = 0,71$ ). Čistý produkt byl krystalizován pomalým přidáváním koncentrovaného chloroformového roztoku **16Bu** do methanolu. Krystaly byly odsáty, vysušeny a spojeny za zisku tmavých krystalů (514 mg, 15 % z původního ftalonitrilu **9**).

HRMS (ESI):  $m/z$  vypočteno pro  $C_{64}H_{56}N_8O_{10}Zn + H^+$  [ $M + H^+$ ]: 1161,3484. Nalezeno: 1161,3455.  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3-d$ )  $\delta$  9,21 (dd,  $J = 5,5; 3,0$  Hz, 2H); 9,18–9,16 (m, 2H); 9,13–9,10 (m, 2H); 8,99 (s, 2H); 8,67 (t,  $J = 1,5$  Hz, 2H); 8,28 (d,  $J = 1,5$  Hz, 4H); 8,19–8,14 (m, 2H); 8,14–8,06 (m, 4H); 4,41 (t,  $J = 6,7$  Hz, 8H); 1,83–1,76 (m, 8H); 1,52–1,42 (m, 8H); 0,91 (t,  $J = 7,4$  Hz, 12H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  165,37; 158,32; 153,69; 153,50; 152,81; 151,05; 148,32; 138,50; 138,31; 138,30; 133,00; 129,25; 129,14; 129,09; 125,54; 122,93; 122,80; 122,69; 122,65; 115,77; 65,56; 30,80; 19,35; 13,80. Jeden aromatický signál byl překrytý signálem rozpouštědla.  $\lambda_{max}$  (DMF, 1  $\mu M$ )/nm 673 ( $\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$  227 220), 605 (37 830), 350 (72 940).  $\lambda_{max}$  (THF, 1  $\mu M$ )/nm 669 ( $\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$  213 900), 602 (35 320), 346 (76 290). IČ (ATR)  $\nu = 3063$  (C-H<sub>arom</sub>), 2959 (C-H<sub>alif</sub>), 2873 (C-H<sub>alif</sub>), 1725  $cm^{-1}$  (C=O).

#### 5.1.10 Příprava tetrasodné soli 2,3-bis(3,5-dikarboxylátofenoxy)ftalocyaninátu zinečnatého komplexu (**16**)

Zinečnatý komplex **16Bu** (392 mg, 0,337 mmol) se rozpustil v THF (12 ml) a byl pomalu přidáván k nasycenému roztoku NaOH ve směsi voda/methanol (1:5) (100 ml). Tato směs byla míchána při teplotě 40 °C po dobu 4 hodin za vzniku sraženiny. Sraženina byla zahuštěna za sníženého tlaku. Pevný produkt byl rozpuštěn ve vodě a okyselen 1 M HCl na pH 1. Vzniklá sraženina byla odfiltrována a rozsuspendována ve vodě s kapkou 1% HCl, zcentrifugována a opatrně dekantována. Tento postup byl opakován dvakrát. Pevný produkt byl vysušen a rozpuštěn v malém množství pyridinu a pomalu přidáván do diethyletheru. Modré krystaly byly odsáty a vysušeny. Výtěžek **16COOH** (220 mg, 70 %). Volná kyselina byla převedena na sodnou sůl. Pevný **16COOH** (220 mg, 234 μmol) byl rozpuštěn v 0,1 M NaOH (9,36 ml, 936 μmol) a voda byla odpařena do sucha. Modré krystaly byly rozsuspendovány v ethanolu, zcentrifugovány a promyty čistým ethanolem, odsáty a vysušeny.

Data pro **16COOH**: Výtěžek: 220 mg (70 %).

HRMS (ESI):  $m/z$  vypočteno pro  $C_{48}H_{24}N_8O_{10}Zn + H^+$  [ $M + H^+$ ]: 937,0980. Nalezeno: 937,0981.  $^1H$  NMR (500 MHz, pyridin- $d_5$ )  $\delta$  9,63–9,57 (m, 6H); 9,56 (d,  $J = 7,3$  Hz, 2H); 9,37–9,34 (m, 2H); 8,84–8,79 (m, 4H); 8,26–8,14 (m, 6H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz, pyridin- $d_5$ )  $\delta$  168,04; 158,70; 154,47; 154,45; 154,03; 152,69; 150,28; 139,10; 139,08; 139,01; 136,31; 136,00; 129,85; 129,74; 126,72; 124,04; 123,08; 116,35. Některé signály byly překryté se signály rozpouštědla.  $\lambda_{max}$  (DMF, 1 μM)/nm 681 ( $\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$  174 120), 673 (185 470), 608 (28 880), 353 (46 380). IČ (ATR)  $\nu = 3072$  (C- $H_{arom}$ ), 1719  $cm^{-1}$  (C=O).

Data pro **16**:

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ /D $_2$ O 1:1)  $\delta$  9,01 (dd,  $J = 5.5, 2.9$  Hz, 2H); 8,73 (d,  $J = 5,2$  Hz, 2H); 8,45 (d,  $J = 5,0$  Hz, 2H); 8,28 (s, 2H); 8,25–8,19 (m, 2H); 8,06–7,99 (m, 8H); 7,93 (s, 2H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ /D $_2$ O 1:1)  $\delta$  171,80; 156,53; 152,24; 151,89; 151,39; 149,89; 149,31; 140,23; 137,37; 136,80; 132,81; 129,77; 129,48; 129,44; 125,68; 122,89; 122,51; 121,74; 112,53. Dva signály nebyly detekovány.  $\lambda_{max}$  (PBS, 1 μM)/nm 635 ( $\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$  68 410), 337 (51 000).  $\lambda_{max}$  (DMF, 1 μM)/nm 672 ( $\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$  156 920), 608 (30 150), 345 (48 130). IČ (ATR)  $\nu = 1614$  (C=O), 1567  $cm^{-1}$  (C=O). HPLC analýza:  $t_r = 17.24$  min; čistota 98,6 %.

5.1.11 *Příprava 1-(2,6-bis[(3-methyl-1H-imidazol-3-ium-1-yl)methyl]-4-methylfenoxy)-3,4-dimethyl-tribenzo[g,l,q]-N-methylpyridino[3,4-b]porfyrinátu zinečnatého komplexu trijodidu (18)*

Hořčikové hobliny (680 mg, 29,0 mmol) a pár krystalků jodu byly zahřívány k teplotě varu v čerstvě nadestilovaném butanolu (30 ml) po dobu 3 hodin než všechny hořčík zreagoval na butanolát hořečnatý. Sloučenina **10** (423 mg, 1,0 mmol) a ftalonitril (384 mg, 3,0 mmol) byly přidány do reakční směsi a zahřívány za teploty varu dalších 20 hodin. Butanol byl poté odpařen z reakční směsi za sníženého tlaku. Směs chloroformu a THF (2:1) byla přidávána ke zbytku v baňce. Obsah baňky byl ultrazvukován, nerozpustný zbytek byl odfiltrován a opatrně promyt chloroformem, THF a pyridinem. Organická rozpouštědla byla odpařena do sucha za sníženého tlaku. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu, jako mobilní fáze byla použita směs chloroform/pyridin/methanol (10:1:1,  $R_f = 0,40$ ). Požadovaný AAAB kongener byl eluován jako druhá nejintenzivnější zelená frakce s výtěžkem 240 mg. Hořečnatý komplex byl charakterizován pomocí MALDI-TOF ( $m/z$  vypočteno pro  $C_{48}H_{33}MgN_{13}O [M]^+$ : 831,3. Nalezeno: 831,2). Hořečnatý komplex (240 mg, 0,29 mmol) a *p*-toluensulfonová kyselina monohydrát (544 mg, 2,86 mmol) byly rozpuštěny ve směsi rozpouštědel methanol/THF/chloroform (15 ml, 1:1:1) a míchány 2 hodiny při pokojové teplotě. Rozpouštědla byla odpařena do sucha a zbytek byl rozsuspendován v 5% roztoku  $NaHCO_3$  (40 ml). Suspenze byla zfiltrována, sraženina byla promyta vodou a vysušena. Získaný bezkovový ligand (231 mg) byl charakterizován pomocí MALDI-TOF ( $m/z$  vypočteno pro  $C_{48}H_{35}N_{13}O [M]^+$ : 809,3. Nalezeno: 809,3). Bezkovový derivát (231 mg, 0,29 mmol) byl rozpuštěn v pyridinu (10 ml) a poté byl přidán octan zinečnatý (524 mg, 2,86 mmol). Reakční směs byla zahřívána při teplotě varu 2 hodiny. Po ochlazení na pokojovou teplotu byl pyridin odpařen z reakční směsi za sníženého tlaku. Produkt byl rozsuspendován ve vodě, odfiltrován a několikrát promyt vodou. Zinečnatý komplex byl extrahován ze sraženiny směsí rozpouštědel (methanol, chloroform, pyridin). Roztok organických rozpouštědel byl přefiltrován a odpařen do sucha za sníženého tlaku a promyt hexanem, čímž bylo získáno 70 mg tmavě modrého komplexu. Zinečnatý komplex byl charakterizován pomocí MALDI-TOF ( $m/z$  vypočteno pro  $C_{48}H_{33}N_{13}OZn [M]^+$ : 871,2. Nalezeno: 871,2). Zinečnatý komplex (57 mg, 65  $\mu$ mol) byl rozpuštěn v bezvodém DMF (4 ml) pod inertní argonovou atmosférou. Methyljodid (205  $\mu$ L, 3,29 mmol) byl přidán do reakční směsi a reakce byla zahřívána při teplotě 80 °C

po dobu 20 hodin. Reakční směs byla odpařena do sucha za sníženého tlaku a promyta diethyletherem. Výtěžek: 45 mg tmavých krystalů (4 % z počátečního ftalonitrilu **10**).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,48 (d,  $J = 7,5$  Hz, 1H); 9,42 (d,  $J = 6,8$  Hz, 1H); 9,34 (d,  $J = 6,7$  Hz, 1H); 9,31–9,26 (m, 1H); 9,22–9,17 (m, 1H); 9,07 (d,  $J = 7,7$  Hz, 1H); 8,98 (d,  $J = 6,0$  Hz, 1H); 8,94 (s, 2H); 8,39–8,33 (m, 1H); 8,33–8,25 (m, 2H); 8,22–8,16 (m, 2H); 8,16–8,09 (m, 1H); 7,87 (s, 2H); 7,77 (s, 2H); 7,36 (s, 2H); 5,63 (d,  $J = 14,7$  Hz, 2H); 5,50 (d,  $J = 14,6$  Hz, 2H); 3,79 (s, 3H); 3,31 (s, 3H); 3,10 (s, 6H); 2,72 (s, 3H); 2,57 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  155,63; 155,12; 154,94; 154,67; 154,55; 153,97; 153,47; 151,98; 151,18; 150,03; 149,28; 145,70; 145,39; 144,96; 138,49; 138,29; 138,26; 138,17; 138,09; 137,71; 136,85; 136,54; 133,46; 130,48; 130,41; 130,12; 129,98; 128,68; 127,86; 123,88; 123,80; 123,17; 122,96; 122,72; 122,48; 122,34; 116,49; 54,57; 48,40; 35,62; 22,53; 20,81; 14,42. Jeden aromatický signál nebyl detekován.  $\lambda_{\text{max}}$  (voda, 1  $\mu\text{M}$ )/nm 636 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  37 560), 334 (34 630).  $\lambda_{\text{max}}$  (PBS, 1  $\mu\text{M}$ )/nm 630 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  25 050), 341 (27 730).  $\lambda_{\text{max}}$  (DMF, 1  $\mu\text{M}$ )/nm 689 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  96 190), 671 (71 310), 612 (16 680), 354 (27 110). IČ (ATR)  $\nu = 3014 \text{ cm}^{-1}$  (C-H<sub>alif</sub>). HPLC analýza:  $t_r = 20,69$  min; čistota 98,6 %.

## 5.2 Stanovení čistoty pomocí HPLC

Čistota nových sloučenin (**11**, **12**, **15**, **16** a **18**) byla hodnocena systémem LC 20A Prominence (Shimadzu, Duisburg, Německo). Chromagraf se skládal z několika částí: odplyňovače DGU-20A3, čerpadla LC-20 AD, autosampleru SIL-20AC, kolonové pece CTO-20AC, detektoru fotodiódového pole SPD-M20A a komunikačního modulu CBM-20AC. Data byla zpracována pomocí softwaru LabSolutions, verze 5.85.

Anionická látka **5** byla analyzována na koloně Hypersil Gold C18 (100 × 4,6 mm, velikost částic 3 mm; ThermoFisher Scientific). Separace byla provedena za použití triethylaminu jako iontově-párového činidla. Látka **5** byla analyzována za použití mobilní fáze – triethylamino-acetát (50 mM, pH 6,3, mobilní fáze A) a methanolu (mobilní fáze B). Časový program přechodu byl nastaven takto: 0–3 min 30 % B; 3–23 min 30 → 70 % B; 23–25 min 70 % B; 25,5–30 min 30 % B a kolona byla znovu ekvilibrována po dobu 3,5 minuty za počátečních podmínek.

Anionické vzorky (**11**, **12**, **15**, **16**) byly analyzovány na koloně Hypersil BDS C18 (100 × 4,6 mm, velikost částic 2,4 mm; ThermoFisher Scientific). Separace byla provedena za použití triethylaminu jako iontově-párového činidla. Látky **11** a **12** byly analyzovány za použití mobilní fáze – triethylamino-acetát (50 mM, pH 6,3, mobilní fáze A) a methanolu (mobilní fáze B). Časový program přechodu byl nastaven takto: 0–20 min 20 → 40 % B; 20–30 min 40 % B; 30–30,5 min 40 → 20 % B a kolona byla znovu ekvilibrována po dobu 4 minut za počátečních podmínek.

Pro sloučeniny **15** a **16** byl použit acetonitril jako mobilní fáze B a gradientový program byl upraven následujícím způsobem: 0–20 min 20 → 45 % B; 20–25 min 45 % B; 25–30 min 45 → 85 % B, 30–35 min 85 % B, 35–36 min 85 → 20 % B a kolona byla znovu ekvilibrována po dobu 4 minut za počátečních podmínek. Teplota kolony byla nastavena na 40 °C a průtok byl nastaven na 0,75 ml/min pro methanolicou mobilní fázi a na 1 ml/min pro mobilní fázi obsahující acetonitril.

Chromatografické podmínky pro separaci kationické látky **18** byly změněny. Tato sloučenina byla analyzována na stacionární fázi modifikované zirkoniem modifikovaným polybutadienem (150 × 4,6 mm; velikost částic 5 μm; ZirChrom Separations, Inc). Separace byla provedena za kyselých podmínek za použití mobilní fáze A - 25 mM kyseliny chlorovodíkové (pH 2,1 upravené pomocí Tris) a methanolu jako mobilní fáze B. Eluce gradientu byla stanovena následujícím způsobem: 0–10 minut 20 % B; 10–15 min 20 → 65 % B, 15–25 min 65 % B; 25–25,5 min 65 → 20 % B a poté byla

kolona znovu ekvilibrována po dobu 4 minut za počátečních podmínek. Teplota kolony byla nastavena na 40 ° C a průtok byl 0,5 ml/min.

Všechny sloučeniny byly analyzovány detektorem diodového pole a chromatogramy byly zaznamenány při vlnových délkách odpovídajících absorpčním maximům jednotlivých vzorků (**5** – 649 nm; **11** – 697 nm; **12** a **15** – 677 nm; **16** – 673 nm; **18** – 690 nm). Čistota byla ve všech případech > 96 %.



### 5.3 Fotofyzikální studium TPyzPz a Pc

#### 5.3.1 Měření fotofyzikálních vlastností pro TPyzPz 5

Fotogenerace singletového kyslíku po excitaci TPyzPz **5** a **TPPS** laserem Quantel Nd YAG ( $\lambda_{\text{exc}} = 355$  nm, pulsní šířka  $\sim 5$  ns) byla měřena pomocí časově rozlišené blízké infračervené luminiscenční spektroskopie. Luminiscence singletového kyslíku při 1270 nm byla zaznamenána pomocí interferenčních filtrů a Ge detektoru. Kinetika tripletových stavů TPyzPz **5** a **TPPS** byla měřena na laserovém kinetickém spektrometru LKS 20 po excitaci barvivovým laserem ( $\lambda_{\text{exc}} = 658$  nebo 420 nm, šířka pulzu  $\sim 28$  ns) čerpaného excimerovým laserem COMPEX 102.

Kvantový výtěžek fluorescence byl stanoven porovnávací metodou s referenční látkou ZnPc v THF ( $\Phi_F = 0,32$ ).<sup>131</sup> Vzorek a referenční látka byly excitovány při 600 nm. Pro porovnání dat po navázání na BSA byl přidán BSA v pevném stavu do kyvety, kdy finální koncentrace BSA byla vyšší než 200  $\mu\text{M}$ .

#### 5.3.2 Fotofyzikální měření pro látky 1, 2, 11-18

Kvantový výtěžek singletového kyslíku a kvantový výtěžek fluorescence byly stanoveny v DMF nebo PBS na základě publikované porovnávací metody s nesubstituovaným ZnPc jako referenční látkou.<sup>132</sup> Ve výpočtech byly použity tyto hodnoty pro ZnPc  $\Phi_F = 0,32$  (THF)<sup>131</sup> a  $\Phi_{\Delta} = 0,56$  (DMF).<sup>133</sup>

#### 5.3.3 Vazba TPyzPz 5 na BSA

Roztok TPyzPz **5** (2,5 ml, 1  $\mu\text{M}$ ) ve vodě byl připraven v křemičité kyvetě a ponechán k monomerizaci po dobu 2 dnů ve tmě při pokojové teplotě. Následně byl přidáván po malých přídavicích (5  $\mu\text{l}$ ) zásobní roztok BSA ve vodě (20  $\mu\text{M}$ ). Roztok byl míchán pár sekund a poté byla měřena absorpční a emisní spektra ( $\lambda_{\text{exc}} = 600$  nm).

#### 5.3.4 Příprava TPyzPz 5 inkorporovaného do lipozomů

Lipidy (dioleoylfosfatidylcholin, DOPC (Lipoid GmbH, Německo), 20 mg, 2,56  $\mu\text{M}$ ) byly rozpuštěny v chloroformu (20 ml) a ten byl odpařen za sníženého tlaku v destilační baňce (100 ml) na vodní lázni, kdy teplota nepřesáhla hodnotu 37 °C. Tenký lipidový film byl dále ponechán ve vodní lázni po dobu 30 minut při tlaku 5 mbar, aby se odstranily zbytky chloroformu. TPyzPz **5** (15 mg) byl rozpuštěn v destilované vodě

(1 ml) a byl přidán k tenkému filmu lipidů. Lipidy byly smyty ze stěny baňky jemnými krouživými pohyby. Vzniklá směs byla 5 minut vortexována za vzniku multilamelárních lipozomů, které se nechaly 24 hodin bobtnat ve tmě za pokojové teploty. Velké unilamelární lipozomy byly následně připraveny z této směsi použitím malého ručního extruderu LiposoFast Basic (Avestin, Canada). Suspenze byla protlačena přes 2 polykarbonátové filtry (průměr pórů 100 nm) tam a zpět 21× za pokojové teploty. Tento roztok byl čištěn pomocí gelové chromatografie za použití PBS jako mobilní fáze na koloně naplněné stacionární fází Superdex 30. Podmínky separace: objem kolony 130 ml, rychlost průtoku 0,5 ml/min, velikost frakcí 1 ml). Čisté frakce s lipozomy byly spojeny (objem okolo 8 ml) a zakoncentrovány na vakuovém koncentrátoru (Eppendorf) při pokojové teplotě na 1 ml. Tento roztok byl uzavřen do dialyzační celulózy membrány (Sigma-Aldrich) a dialyzován v PBS (500 ml) přes noc v temné chladné místnosti. Následující den byl PBS pufr vyměněn za čerstvý roztok PBS (500 ml) a dialyzováno opět přes noc. Koncentrace látky **5** uzavřené v lipozomech byla určena měřením absorbance při 652 nm. Lipozomy byly charakterizovány pomocí fotonového korelačního spektroskopu Zetasizer Nano-ZS (Malvern, UK), průměrná velikost byla 158 nm, index polydisperzity 0,15.

#### 5.3.5 *Určení stability lipozomů s TPyzPz 5 po ozáření*

Zásobní roztok obsahující lipozomy látky **5** byl naředěn PBS puftrem na koncentraci 55,5  $\mu\text{M}$  a následně ozářen za stejných podmínek jako buňky (vzorek byl umístěn do 96-ti jamkové destičky a ozařován 15 minut). Dále byly připraveny tyto vzorky: negativní kontrolní vzorek (rozpuštěný v PBS, ale neozařovaný), pozitivní kontrolní vzorek (rozpuštěný v PBS s 1% Tritonem X-100 a ozařovaný) a roztok látky **5** neuzavřené v lipozomech (v odpovídající koncentraci a neozařovaný). Petriho miska (6 cm průměr) byla naplněna 2,5% agarosovým roztokem (10 ml), všechny vzorky (100  $\mu\text{l}$ ) byly umístěny do jamky v centru Petriho misky (jamka byla vytvořena během tvrdnutí gelu). Následující difuzní experiment probíhal během 48 hodin ve tmě při pokojové teplotě. Fotografie byly pořízeny za použití 100 mm makro objektivu s APSC kamerou se zabudovaným bleskem v manuálním modu.

### 5.3.6 *Určení log P*

Zásobní roztoky studovaných Pc byly připraveny v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  v DMF (**2**, **17**, **18**) nebo ve vodě (**1**, **11**, **12**, **15**, **16**). Pro kationické Pc (**2**, **17** a **18**) byl do zkumavky napipetován PBS (400  $\mu\text{l}$ ), *n*-oktanol (400  $\mu\text{l}$ ) a následně byl přidán zásobní roztok Pc v DMF (20  $\mu\text{l}$ ). Pro anionické látky **1**, **11**, **12**, **15**, **16** byl do zkumavky napipetován PBS pufr (380  $\mu\text{l}$ ) *n*-oktanol (400  $\mu\text{l}$ ), DMF (20  $\mu\text{l}$ ) a následně byl přidán zásobní roztok Pc ve vodě (20  $\mu\text{l}$ ). Směs byla vortexována 5 minut při pokojové teplotě a následně centrifugována (10 000 rpm, 10 min, pokojová teplota). Oktanolová a vodná fáze se rozdělily (prostřední část mezi fázemi byla odstraněna) a 20  $\mu\text{l}$  každé fáze bylo naředěno do DMF (2 ml). Následně byla změřena emisní spektra ( $\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$ ) těchto DMF roztoků. Log *P* byl poté vypočítán jako:  $\log P = \log (F_{\text{OktoH}}/F_{\text{PBS}})$ , kde  $F_{\text{OktoH}}$  a  $F_{\text{PBS}}$  jsou integrovaná emisní spektra v DMF z *n*-oktanolové nebo vodné vrstvy.

### 5.3.7 *Příprava prázdných DOPC lipozomů*

Lipidy DOPC (Lipoid GmbH, Německo) (39,3 mg, 50  $\mu\text{mol}$ ) byly rozpuštěny v chloroformu (40 ml) a ten byl odpařen za sníženého tlaku v destilační baňce (100 ml) na vodní lázni, kdy teplota nepřesáhla hodnotu 37 °C. Tenký lipidový film byl dále ponechán ve vodní lázni po dobu 30 minut při tlaku 5 mbar, aby se odstranily zbytky chloroformu. Poté byl přidán PBS (2 ml) a lipidy byly smyty ze stěny baňky jemnými krouživými pohyby. Suspenze byla vortexována 5 minut za vzniku multilamelárních váčků, které byly nechány 24 hodin bobtnat ve tmě za pokojové teploty. Velké unilamelární lipozomy byly následně připraveny z této směsi použitím malého ručního extruderu LiposoFast Basic (Avestin, Canada). Suspenze byla protlačena přes 2 polykarbonátové filtry (průměr pórů 100 nm) tam a zpět 21× za pokojové teploty. Takto byl připraven zásobní roztok lipozomů o koncentraci 25 mM. Lipozomy byly charakterizovány pomocí fotonového korelačního spektroskopu Zetasizer Nano-ZS (Malvern, UK) naředěním na 1 mM roztok: průměrná velikost byla  $127,7 \pm 1,32 \text{ nm}$ , index polydisperzity =  $0,075 \pm 0,020$  (průměr ze 3 měření).

### 5.3.8 *Stanovení asociační konstanty s DOPC lipozomy*

Roztoky všech Pc (**1**, **2**, **11-16**) (2 ml, 1  $\mu\text{M}$ ) v PBS pufru byly připraveny v křemičité kyvetě. V případě látek **17** a **18** byl použit zásobní roztok v DMSO (10 mM), který byl naředěn PBS na finální koncentraci 1  $\mu\text{M}$ . Následně byl přidáván malými

přídavky (2-10  $\mu$ l) DOPC lipozomální zásobní roztok (25 mM) v PBS pufru. Roztok byl několik minut míchán a po každém přídavku byla měřena absorpční a emisní spektra ( $\lambda_{exc} = 350$  nm (**15**), 350 nm (**16**), 335 nm (**17**) a 370 nm (**18**)). Vazebná konstanta  $K_L$  byla stanovena nelineární regresí (Prism 8 pro Windows, GraphPad Software) z grafu závislosti navázané frakce na koncentraci lipidů. Navázaná frakce byla vypočtena z intenzity emise  $(F-F_{min})/(F_{max}-F_{min})$ , kde  $F$  je intenzita fluorescence při dané koncentraci.  $F_{min}$  je fluorescence bez lipidů,  $F_{max}$  je fluorescenční intenzita při plném nasycení.  $F_{min}$  byla rovna nule pro silně agregované sloučeniny **15**, **16** a **18**, které neměly fluorescenci v PBS.

### 5.3.9 *Vliv pH a pH-BSA na fotofyzikální vlastnosti*

Spektrální a fotofyzikální data pro Pc (**1**, **2**, **11-18**) byly stanoveny v Britton-Robinsonově pufru (BR) (0,04 M  $H_3BO_3$ , 0,04 M  $H_3PO_4$  a 0,04 M  $CH_3COOH$  upraveném na vybrané pH (4-11) pomocí 0,2 M NaOH) s iontovou silou upravenou NaCl na  $I = 0,15$  M. Měření pH bylo prováděno na pH metru (pH 8+ DHS pH meter, XS instruments), který byl před měřením kalibrován na 3 různá pH = 4,00; 7,00 a 10,00.

Zásobní roztoky Pc **1**, **2**, **11-16** (25  $\mu$ M) byly připraveny v BR pufru o pH 6,00. V případě ve vodě málo rozpustných Pc **17** a **18**, byl roztok připraven ze zásobního roztoku v DMSO (10 mM). Do kyvety byly napipetovány 2 ml vybraného pufru a 80  $\mu$ l zásobního roztoku Pc **1**, **2**, **11-18** (finální koncentrace Pc byla 1  $\mu$ M). Následně byly změřeny absorpční a emisní spektra ( $\lambda_{exc} = 595$  nm pro TPyzPz **1**,  $\lambda_{exc} = 610$  nm pro látky **2**, **11-18**).

V případě, kdy byl zkoumán vliv pH i BSA, byl zásobní roztok Pc smíchan s roztokem BSA v BR pufru (500  $\mu$ M) a po naředění do kyvety byla finální koncentrace v kyvetě 20  $\mu$ M BSA a 1  $\mu$ M Pc.

### 5.3.10 *Interakce s DOPC lipozomy a BSA*

V křemičité kyvetě byl připraven roztok Pc **15-18** (2 ml, 1  $\mu$ M) v PBS pufru a k tomu byl přidán DOPC lipozomální zásobní roztok (25 mM) (100  $\mu$ L; finální koncentrace lipidů 1,2 mM). Roztok byl pár sekund míchán a následně byla změřena absorpční a emisní spektra. Poté byl přidán BSA v PBS pufru (finální koncentrace BSA 35  $\mu$ M) a byla změřena absorpční a emisní spektra. V případě opačného pokusu byl BSA

v PBS přidán nejdříve (finální koncentrace 35  $\mu\text{M}$ ) a poté byly přidány DOPC lipozomy (finální koncentrace lipidů 1,2 mM).

### 5.3.11 Stanovení asociační konstanty s BSA

V křemičité kyvetě byl připraven roztok Pc **1**, **2**, **11-18** (2,5 ml, 1  $\mu\text{M}$ ) v PBS pufru. Následně byl po malých objemech přidáván zásobní roztok BSA v PBS pufru (2 mg BSA v 1 ml PBS nebo 30 mg BSA v 1 ml PBS). Roztok byl několik sekund míchán a poté byla změřena absorpční a emisní spektra (Tabulka 1). Asociační konstanta  $K_b$  byla určena nelineární regresí (program Prism 8 for Windows, GraphPad Software) ze závislosti vázané frakce na koncentraci BSA. Vázaná frakce byla vypočítána ze změny absorbance ( $\Delta A$ ) v Q-pásmu při vlnové délce s maximální změnou v absorbanci (Tabulka 1). Pro látky **2**, **13** a **14** nebyly detekovány žádné změny v absorpčních spektrech, což svědčí o žádné nebo velmi omezené interakci. Emisní spektra byla použita pro výpočet  $\Phi_F$  a pro stanovení případného zhasnutí excitovaných stavů Pc vlivem BSA.

**Tabulka 1** Excitační a monitorované vlnové délky pro jednotlivé Pc

Sloučenina	$\lambda_{\text{exc}}$	Monitorovaná vlnová délka
<b>1</b>	607	647
<b>11</b>	635	694
<b>12</b>	618	676
<b>15</b>	612	676
<b>16</b>	612	680
<b>17</b>	605	635
<b>18</b>	605	635

### 5.3.12 LC-MS analýza interakce BSA se singletovým kyslíkem

Zásobní roztok BSA v PBS (2 ml, 1 mg/ml, 15  $\mu\text{M}$ ) byl smíchán se zásobním roztokem **12** a **2** v PBS (finální koncentrace ve vzorku 5  $\mu\text{M}$ ). Roztok byl rozdělen na polovinu a 1 ml byl ozařován na Petriho misce za stejných podmínek jako při fototoxických experimentech ( $\lambda > 570$  nm, 12,4 mW  $\text{cm}^{-2}$ , 15 min, 11,2 J  $\text{cm}^{-2}$ ). Druhá polovina byla uchována striktně ve tmě a použita jako kontrola bez ozáření. Roztoky BSA v PBS (1 mg/ml, 15  $\mu\text{M}$ ) samostatně, ozářený (1 ml) nebo neozářený (1 ml), byly použity jako další kontroly. Všechny roztoky byly připraveny *ad hoc* v temné místnosti bez přítomnosti světla. Experiment byl prováděn v kvadruplikátu.

Bezprostředně po ozáření byl BSA ze 100  $\mu$ l každého vzorku přečištěn gelovou filtrací za použití kolon Zeba Spin s mezní molekulovou hmotností 7 kDa. Vzorky byly pufovány přidáním 5  $\mu$ l 1 M Tris-HCl pufru o pH 7,5. Disulfidické můstky v BSA byly redukovány 5 mM tris(2-karboxyethyl)fosfinem při teplotě 37 °C po dobu 60 min. Poté byl přidán trypsin v hmotnostním poměru 1:50 a BSA se nechal štěpit při teplotě 37 °C přes noc. Následující den byla redukční reakce zopakována a volné thiolové skupiny byly thiomethylovány 20 mM S-methylmethanthiosulfonátem při pokojové teplotě po dobu 30 minut.

LC-MS analýza byla prováděna pomocí Vanquish Horizon UHPLC systému spojeného s hmotnostním spektrometrem Q Exactive HF-X. Jako mobilní fáze byla použita voda (A) a acetonitril (B). Obě mobilní fáze byly okyseleny 0,1% kyselinou mravenčí. Peptidy z 5  $\mu$ l každého vzorku byly separovány pomocí kolony Acquity UPLC, 1,7  $\mu$ m CSH C18, 130 Å, 2.1  $\times$  150 mm udržované při 60 °C za použití gradientu 1-34 % mobilní fáze B během 23 min při průtoku 250  $\mu$ L/min. Před začátkem gradientu byl tok před ionizačním zdrojem odkloněn do odpadu a nezadržené nečistoty byly vymyty 1% mobilní fází B po dobu 2 minut. Peptidy eluované gradientem byly ionizovány elektrosprejovou ionizací při napětí 3 kV. MS spektra byla měřena při rozlišení 60 000 v rozmezí m/z 325-2000 s maximálně  $3 \times 10^6$  náboji v orbitální pasti a maximálním plnicím časem 100 ms. Tři nejintenzivnější prekurzory z každého MS spektra s  $> 2$  a  $\leq 5$  náboji a prahovou intenzitou  $2,5 \times 10^5$  byly vybrány pro kolizní disociaci s vyšší energií. Pouze nábojový stav peptidu s nejvyšší intenzitou byl podroben disociaci. Disociované prekurzory byly po dobu 10 s vyloučeny z výběru prekurzorů. Prekurzory byly vybírány s izolačním oknem 2,6 m/z posunutým o 0,3 m/z a disociovány normalizovanou kolizní energií 27. MS/MS spektra byla zaznamenávána s rozlišením 15 000 s maximálně  $2 \times 10^5$  nábojů v orbitální pasti a maximálním plnicím časem 200 ms. Analýzy všech vzorků byly provedeny v duplikátu.

Data z LC-MS byla přiřazena tryptickým peptidům BSA pomocí Proteome Discoverer ver. 2.3 (Thermo Fisher Scientific) používajícím integrovaný vyhledávač Byonic ver. 3.5. (Protein Metrics). Bylo použito úplné tryptické štěpení, přičemž bylo povoleno maximálně jedno vynechané štěpení. Tolerance hmot byla stanovena na 10 ppm pro prekurzory a 20 ppm pro fragmenty. Pro detekci a kvantifikaci oxidačních změn na BSA indukovaných ozářenými Pc **12** a **2** byly dříve popsány modifikace iniciované singletovým kyslíkem považované za dynamické modifikace: His + 14, His + 16,

His + 32, Met + 16, Met + 32, Cys + 32, Cys + 48, Trp + 16, Trp + 32 a Tyr + 16. Nebyla nalezena žádná modifikace Tyr. Peptidy identifikované se skóre  $\geq 200$  spolu s chromatografickou plochou píku jejich prekurzorů byly exportovány do Prism pro Windows ver. 8.4.0 (software GraphPad) pro statistickou analýzu.

## 5.4 Biologická aktivita

Studium biologické aktivity probíhalo na Katedře biochemických věd pod vedením RNDr. Miloslava Macháčka, Ph.D. a postgraduálními studentkami Mgr. Marií Halaškovou a Mgr. Monikou Steklou. V této části budou zmíněny pouze základní informace, podrobnější informace jsou obsaženy v jednotlivých publikacích.

### 5.4.1 *Buněčné kultury a příprava vzorků*

Většina experimentů byla prováděna na buněčné líní HeLa (karcinom děložního čípku). V některých případech však došlo k využití i dalších maligních buněčných linií – HCT 116 (karcinom tlustého střeva) a MCF-7 (adenokarcinom prsu). Zásobní roztoky látek byly připraveny v kultivačních médiích s obsahem séra (SCM) nebo bez něho (serum free-medium, SFM) v závislosti na experimentu. Koncentrace látek v zásobním roztoku byla 1,0 mM (pro **2**, **11**, **13**, **15**, **16**), 1,5 mM (**1**, **12**, **14**), 2,5 mM (S<sub>3</sub>AlOHPc). U látek se špatnou rozpustností ve vodném prostředí byly zásobní roztoky připraveny v DMSO v koncentraci 10 mM (**17** a **18**). Vzorky byly sterilizovány filtrací přes 0,22 μm filtr (MCE membrána). Kontrola koncentrace byla provedena změřením absorpčního spektra před a po filtraci, přičemž nebyla pozorována žádná změna.

### 5.4.2 *Fototoxita a toxicita bez ozáření*

Fotodynamická aktivita po ozáření byla určena jak pro linii HeLa, tak i pro další buněčné linie (MCF-7, HCT 116). Buňky byly 12 hodin inkubovány s danou látkou v různých koncentracích. Poté byly buňky opláchnuty, bylo přidáno čerstvé médium a byly ozařovány červeným světlem na 96-ti jamkové destičce pomocí 450 W Xe-lampy osazené vodním a cut-on filtrem ( $\lambda > 570$  nm, 12,4 mW/cm<sup>2</sup>, 15 min, 11,2 J/cm<sup>2</sup>). Po dalších 24 hodinách byla určena životaschopnost buněk testem s neutrální červení. Vlastní toxicita (toxicita bez ozáření) byla určena po 24 hodinové inkubaci s HeLa buňkami. Životaschopnost buněk byla opět určena testem s neutrální červení. Koncentrace studovaných sloučenin, které vyvolaly 50% pokles životaschopnosti buněk bez ozáření (TC<sub>50</sub>, střední toxická koncentrace) nebo po ozáření (EC<sub>50</sub>, střední efektivní koncentrace), byly vypočteny pomocí softwaru GraphPad Prism (verze 8.0.1; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) pro každý nezávislý experiment.



#### 5.4.3 Časový profil vstupu látek do buněk

HeLa buňky byly nasazeny na Petriho misky a ponechány růst 24 hodin. Poté bylo buněčné médium odstraněno a k buňkám byly přidány 4  $\mu$ M roztoky látek **1, 2, 5, 11-18** v kultivačním médiu na dobu 0–12 hodin. Poté byly buňky opláchnuty, seškrábnuty, centrifugovány a zlyzovány opakovaným zmražením na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Fluorescence látek byla měřena po přidání 2 obj. % monomerizační přísady (Tabulka 2). Excitační a emisní vlnové délky jsou doplněny v Tabulka 2. Kalibrační křivka byla připravena přidáváním zásobního roztoku PS o známé koncentraci do buněčného lyzátu. Všechny experimenty byly provedeny v duplikátu a bez přítomnosti světla.

**Tabulka 2** Excitační a emisní vlnové délky a přídavky monomerizační přísady

Sloučenina	$\lambda_{\text{exc}}$	$\lambda_{\text{emi}}$	Monomerizační přídava
<b>1</b>	375	663	1M NaOH
<b>11</b>	361	710	1M NaOH
<b>12</b>	361	693	1M NaOH
<b>2</b>	360	691	1M HCl
<b>13</b>	620	690	1M HCl
<b>14</b>	630	726	1M HCl
<b>15</b>	352	690	10% Triton-X 100
<b>16</b>	352	684	10% Triton-X 100
<b>17</b>	608	684	-
<b>18</b>	613	698	-
<b>S<sub>3</sub>AIOHPc</b>	608	675	1M NaOH

#### 5.4.4 Subcelulární lokalizace a relokalizace po ozáření

Subcelulární lokalizace a relokalizace po ozáření byla testována na HeLa buňkách pomocí fluorescenčního a konfokálního mikroskopu na Petriho miskách se skleněným dnem vhodných pro konfokální mikroskopii (WilCo Wells, Nizozemsko). Buňky byly značeny fluorescenčními sondami A) LysoTracker Blue DND-22 (značení lyzosomů) a MitoTracker Green FM (značení mitochondrií), nebo B) Hoechst 33342 (barvení jader) a CellMask Green (značení membrán).

#### 5.4.5 *Morfologické změny na buňkách*

Morfologické změny způsobené PDT byly na HeLa buňkách sledovány pomocí konfokálního a fluorescenčního mikroskopu na fixovaném i nativním, fluorescenčně značeném preparátu. Pro značení jader byla využita sonda Hoechst 33342, pro značení mitochondrií byla použita fluorescenční sonda MitoTracker Red CMXRos (fixovaný preparát) nebo MitoTracker Green FM (nativní preparát) a k označení aktinového cytoskeletu byla použita sonda Actin Green. Celkové morfologické změny byly pozorovány v diferenciatním interferenčním kontrastu.

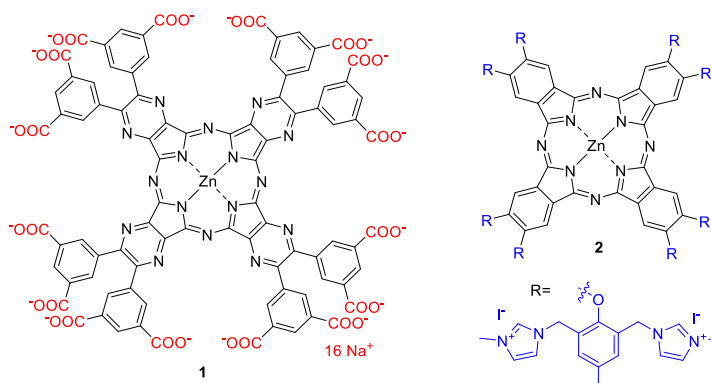
## 6. VÝSLEDKY A DISKUZE

Tématem přípravy nových PS ze skupiny TPyzPz jsem se zabýval už během své diplomové práce<sup>125</sup>. Po nástupu na doktorské studium jsem v průběhu prvních měsíců dokončil práci na tomto projektu a výsledky práce byly publikovány.<sup>96</sup> Výsledky tohoto projektu se pak staly základem pro můj další projekt realizovaný v rámci doktorského studia. Vzhledem k tomu, že nové výsledky logicky navazují na některá má zjištění publikovaná v této práci, uvádím zde v první podkapitole i krátký souhrn těchto výsledků, přestože je nelze plně použít jako podklad pro získání titulu Ph.D.

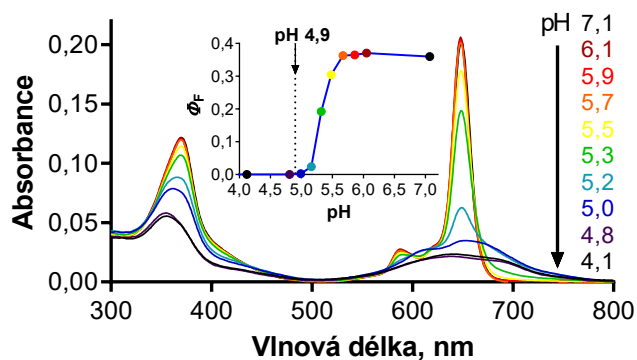
### 6.1 Studium zinečnatého hexadekakarboxyláto TPyzPz 1

Během diplomové práce jsem připravil TPyzPz 1 s 16 karboxylátovými skupinami na periférii v rigidním uspořádání (Obr. 18). Karboxylátové skupiny byly zvoleny z důvodu zvýšení rozpustnosti ve vodě a také z důvodu snížení agregace. Periferní karboxylátové skupiny byly umístěny na fenylech, které jsou v *ortho* uspořádání výrazně vytočeny z roviny TPyzPz makrocycly, což vede k umístění negativně nabitých skupin nad a pod cyklem. V tomto rigidním uspořádání tak inhibují agregaci ve vodě na základě elektrostatických odpuzivých sil mezi molekulami nesoucími stejné náboje. TPyzPz 1 byl proto ve vodě rozpustný a nevykazoval žádné známky agregace ve vodě nebo v pufru při pH > 5,7. Při nižším pH došlo k postupné protonizaci karboxylátových skupin a při pH < 4,8 byla látka plně agregovaná, protože volné karboxylové skupiny již nepřispívaly k inhibici agregace (Obr. 19). TPyzPz 1 byl dále studován na fotodynamickou aktivitu *in vitro* na HeLa buňkách. Zde bylo zjištěno, že se látka 1 lokalizuje v lyzosomech, které mají nízké pH (okolo 4,9). Fotodynamická aktivita látky 1 byla velmi nízká ( $EC_{50} = 5,7 \pm 1,1 \mu\text{M}$ ) v porovnání s kationickým Pc 2 nesoucím 16 stabilních kladných nábojů ( $EC_{50} = 0,037 \mu\text{M}$ ), který v této práci sloužil pro porovnání (Obr. 18).<sup>48</sup> Při hlubším studiu bylo dále potvrzeno, že fotodynamická aktivita tohoto anionického TPyzPz 1 je silně negativně ovlivněna přítomností sérových proteinů v buněčném médiu. To bylo následně potvrzeno na rozdílné fotodynamické aktivitě na HeLa buňkách v SCM ( $EC_{50} = 5,7 \pm 1,1 \mu\text{M}$ ) a SFM ( $EC_{50} = 0,55 \pm 0,09 \mu\text{M}$ ) (Obr. 20). U kationického Pc 2 jsme nepozorovali žádnou vazbu na sérové proteiny, ani ovlivnění fotofyzikálních parametrů. Ze zmíněných výsledků jsme vyvodili, že během interakce s proteiny dochází zřejmě ke zhášení excitovaných stavů, což se negativně projevuje jak na fotofyzikálních vlastnostech, tak následně na fotodynamické aktivitě.

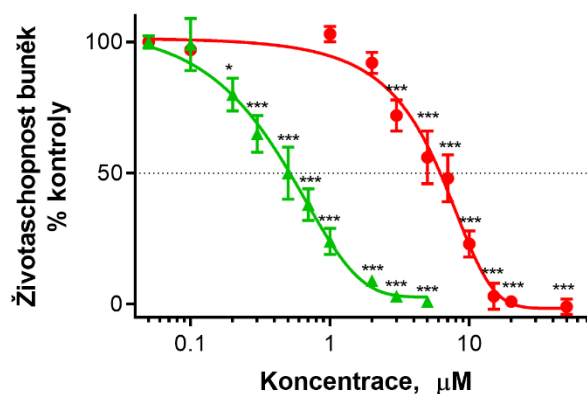
Z tohoto úvodního článku tedy vyplynulo, že na aktivitu anionického TPyzPz **1** má negativní vliv jak kyselé prostředí lyzozomu, tak i vazba na sérové proteiny. V kyselém prostředí dochází k protonizaci karboxylátových skupin a tím k agregaci, která se negativně projeví na fotofyzikálních vlastnostech TPyzPz a tím i na celkové fotodynamické aktivitě. Při vazbě na sérové proteiny pak dochází ke zhášení excitovaných stavů TPyzPz, které se opět projeví negativně na fotodynamické aktivitě.



Obr. 18. Struktura anionického TPyzPz **1** a kationického Pc **2**



Obr. 19. Změny v absorpčním spektru TPyzPz **1** ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) v citráto-fosfátovém pufru při různých hodnotách pH. Vložený obrázek: závislost  $\Phi_F$  TPyzPz **1** v pufru na pH ( $\lambda_{exc} = 594 \text{ nm}$ ). Šipka při pH 4,9 naznačuje pH v lyzosomech. Převzato a upraveno z publikace.<sup>96</sup>



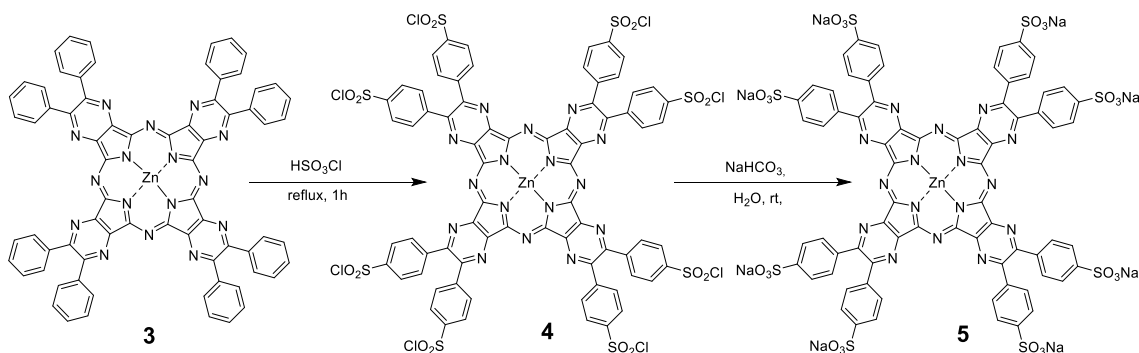
**Obr. 20.** Fototoxicita ( $\lambda > 570 \text{ nm}$ ,  $12,4 \text{ mW cm}^{-2}$ ,  $15 \text{ min}$ ,  $11,2 \text{ J cm}^{-2}$ ) látky **1** *in vitro* na HeLa buňkách v SFM (zelená) nebo SCM (červená). Převzato a upraveno z publikace.<sup>96</sup>

## 6.2 Studium zinečnatého oktasulfonátu TPyzPz 5

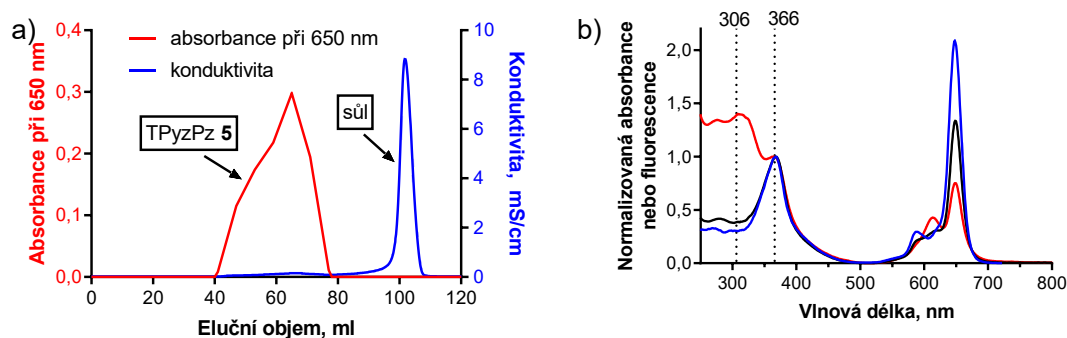
První projekt v rámci disertační práce byl zaměřen na přípravu nového zinečnatého TPyzPz, který obsahuje na periférii sulfonátové skupiny. Sulfonové kyseliny byly navrženy do této struktury, protože se jedná o výrazně silnější kyseliny než karboxylové kyseliny, a proto jsme očekávali, že nebudou ovlivněny nízkým pH v lysosomech jako v předchozí práci.

**Syntéza.** Sulfonovaný TPyzPz **5** byl připraven několikakrokovou syntézou (Obr. 21). Výchozí TPyzPz **3** byl připraven podle dříve publikovaného postupu.<sup>127</sup> Nejprve byl připraven prekurzor, 5,6-difenylpyrazin-2,3-dikarbonitril, kondenzační reakcí diaminomaleonitrilu s benzylem. Tento prekurzor pak dále v cyklotetramerizační reakci reagoval s octanem zinečnatým v 2-(dimethylamino)ethanolu za vzniku zinečnatého TPyzPz **3**. Zinečnatý TPyzPz **3** poté reagoval s kyselinou chlorsulfonovou za vzniku chlorsulfonovaného produktu **4**. Následná hydrolyza je v literatuře obvykle popisována pomocí vody.<sup>134, 135</sup> Použití vody k hydrolyze u látky **4** vedlo však k destrukci TPyzPz jádra a následnému odbarvení produktu ze zeleného na žlutý po rozpuštění pevného produktu ve vodě. Vysvětlením rozpadu jádra může být nízká stabilita TPyzPz jádra vůči HCl, která vzniká během hydrolyzy vodou *in situ*. Proto byl pro hydrolyzu použit vodný roztok hydrogenuhličitanu sodného, který zneutralizoval HCl a zároveň došlo ke vzniku požadovaného produktu **5** ve formě sodné soli bez jakéhokoliv rozpadu. Ve vodě dobře rozpustný TPyzPz **5** byl čištěn od nízkomolekulárních nečistot a nadbytků soli gelovou permeační chromatografií na stacionární fázi Superdex<sup>®</sup> 30 (Obr. 22a). Odstranění nízkomolekulárních látek a přebytků solí bylo sledováno měřením absorpčních spekter a vodivosti jednotlivých frakcí. Spektra byla hodnocena v oblasti

250-450 nm a to bylo použito jako kritérium čistoty. TPyzPz **5** absorbuje při 366 nm v B-pásu a nízkomolekulární látky absorbují v oblasti 300 nm, a proto byl k určení čistoty frakcí zvolen poměr  $A_{366}/A_{306} > 2$ . Absorpční spektrum čisté látky bylo následně porovnáno s excitačním spektrem ( $\lambda_{em} = 730$  nm), kdy došlo ke shodě těchto spekter i v UV oblasti (Obr. 22b).



Obr. 21. Příprava sulfonovaného TPyzPz **5**

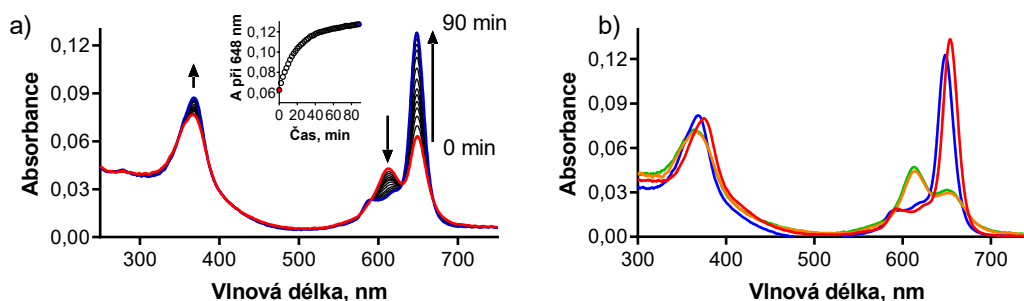


Obr. 22. a) Eluční diagram z gelové chromatografie se stacionární fází Superdex® 30 (objem kolony 130 ml; průtok 0,5 ml/min; objem frakcí 1 ml) při čištění TPyzPz **5** po syntéze (mobilní fáze: voda). b) Absorpční spektra čistého TPyzPz **5** (černá), excitační spektrum ( $\lambda_{em} = 730$  nm) čistého TPyzPz **5** (modrá) a absorpční spektrum frakce obsahující nízkomolekulární nečistoty (červená). Spektra byla normalizovaná na hodnotu 1 při 366 nm. Čistota frakcí byla hodnocena na základě absorpční intenzity v UV oblasti jako poměr  $A_{366}/A_{306}$ . Jako čisté frakce byly pak považovány frakce s poměrem  $> 2$ . Rozdíl v oblasti Q pásu (okolo 650 nm) je dán různou úrovní agregace TPyzPz **5** a nebyl posuzován při hodnocení čistoty. Převzato a upraveno z publikace.<sup>136</sup>

**Absorpční vlastnosti.** TPyzPz **5** je vysoce rozpustný ve vodě s absorpčními pásy typickými pro TPyzPz – nízkenergetický Q-pás při 648 nm a vysokoenergetický B-pás při 366 nm. Po naředění z koncentrovaného vodného roztoku (100  $\mu\text{M}$ ) na 1  $\mu\text{M}$  roztok byl pozorován široký Q-pás při 612 nm značící silnou agregaci. Postupem času však docházelo k poklesu pásu při 612 nm a postupnému nárůstu pásu při 648 nm s několika isobestickými body ve spektru, což dokazuje postupnou monomerizaci z dimeru na

monomer (Obr. 23a). Proces monomerizace byl pomalý a nebyl úplný ani po 2 hodinách. Absorpční spektrum 1  $\mu\text{M}$  roztoku po 2 dnech stání ve tmě se podobalo spektru monomerní látky, ale stále lze očekávat přítomnost minimálního množství agregátů na základě mírně odlišného absorpčního spektra při porovnání se spektrem excitačním. Takto pomalé rozvolňování agregátů (dimerů) je netypické, protože oddělení dimerů na monomery je obvykle v literatuře popisováno bezprostředně po naředění roztoků. Pouze v případě komplexů oktapyridyl TPyzPz byla monomerizace v organických rozpouštědlech pozorována v čase.<sup>84</sup>

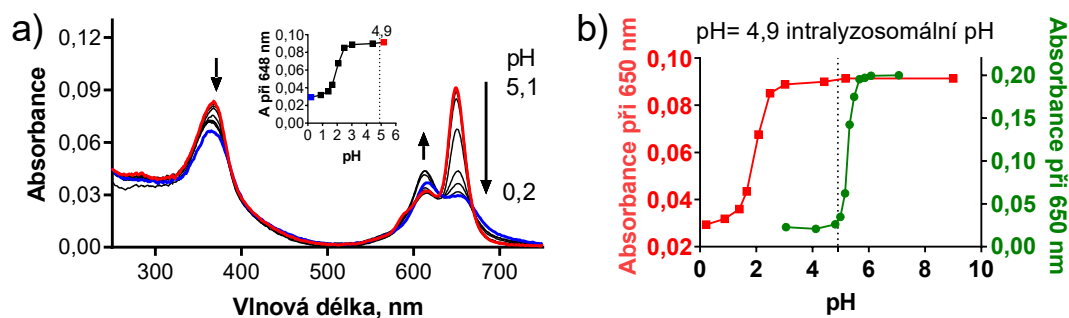
Postupné přidávání pyridinu k agregovanému vodnému roztoku látky **5** (pár minut po naředění na 1  $\mu\text{M}$  roztok) vedlo k postupné monomerizaci obdobně jako ve výše popsaném případě. V tomto případě bylo plně monomerní spektrum získáno po přidavku 3 % pyridinu (v/v). Obdobné výsledky byly pak získány po přidání THF k vodnému roztoku látky **5**, v tomto případě bylo potřeba vyššího množství THF (okolo 20 % (v/v)). V obou případech byla plně monomerní forma látky **5** potvrzená stejnými excitačními spektry. Na druhou stranu byl pozorován negativní vliv zvýšení iontové síly jak v PBS při fyziologickém pH, tak i v případě SFM, kdy byla pozorována agregace, která se v závislosti na čase neměnila (Obr. 23b).



**Obr. 23.** a) Absorpční spektra TPyzPz **5** ve vodě ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) po naředění ze 100  $\mu\text{M}$  vodného roztoku (červené spektrum) a změna v čase (modré spektrum = 90 min). Vložený obrázek: Změna absorbance při 648 nm v závislosti na čase. b) Absorpční spektra TPyzPz **5** při koncentraci 1  $\mu\text{M}$  ve vodě po 2 dnech stání (modrá), ve vodě s přidavkem 5 % pyridinu (červená), v PBS (zelená) a v SFM (oranžová). Převzato a upraveno z publikace.<sup>136</sup>

**Vliv pH na absorpční vlastnosti.** Sulfonátové skupiny v molekule **5** jsou dostatečně kyselé, aby nebyly ovlivněny pH ve fyziologickém rozmezí. To bylo potvrzeno monitorováním absorpčních spekter v závislosti na pH ve vodných roztocích kyselin o různém pH. Spektra zůstala nezměněna až do pH 2,5, při nižším pH dochází ke změně tvaru Q-pásu, která indikuje agregaci. K agregaci dochází z důvodu snížení elektrostatických odpuzivých sil kvůli protonizaci některých sulfonátových skupin.

Hodnoty pH, při kterých k tomu dochází jsou mnohem nižší než u TPyzPz **1** nesoucího 16 karboxylátových skupin, a navíc jsou tyto hodnoty mimo fyziologické rozmezí pH v buňce. Z tohoto důvodu by intracelulární pH nemělo mít vliv na fotodynamickou aktivitu z pohledu zvýšené agregace (Obr. 24).



**Obr. 24.** a) Vliv pH na absorpční spektra TPyzPz **5** (1  $\mu$ M, voda). Vložený obrázek: změna absorbance při 648 nm v závislosti na pH. b) Porovnání změny absorbance při 650 nm v závislosti na pH pro TPyzPz **1** (zelená) a TPyzPz **5** (červená). Intralysosomální pH 4,9 je v obou obrázcích zobrazeno tečkovanou čárou. Převzato a upraveno z publikace.<sup>136</sup>

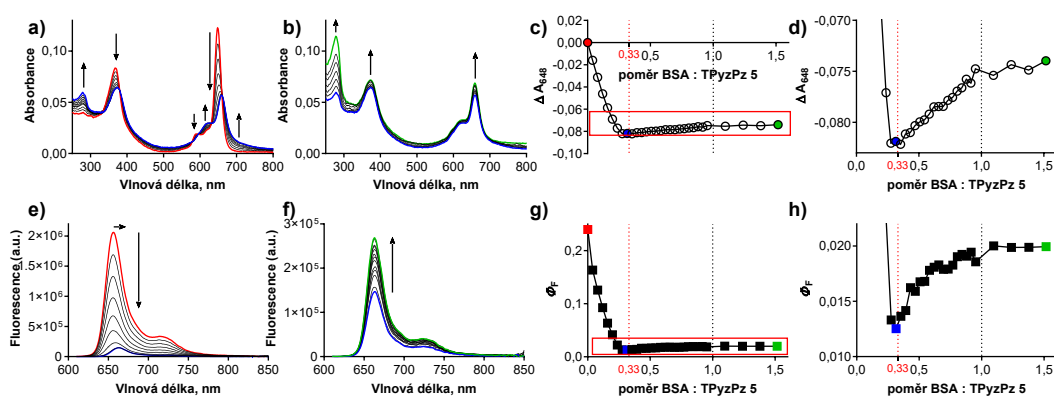
**Fotofyzikální vlastnosti.** Fluorescenční emisní spektrum TPyzPz **5** ve vodě má typický tvar pro tento typ látek s maximem při 656 nm. Excitační spektrum ve vodě ani po 2 dnech od naředění neodpovídalo zcela absorpčnímu spektru, což naznačuje nízké množství agregátů v roztoku. Excitační spektrum ve vodě s přidávkem 5 % pyridinu (v/v) dokonale překrývalo odpovídající absorpční spektrum, tím můžeme prokázat, že pyridin plně monomerizuje látku **5**. Také nižší kvantový výtěžek fluorescence  $\Phi_F = 0,24$  ve vodě oproti  $\Phi_F = 0,31$  ve vodě s 5 % pyridinu ukazuje, že je látka částečně agregovaná v čisté vodě. Silná agregace v PBS naznačená již výše tvarem absorpčních spekter byla potvrzena také velice nízkým  $\Phi_F = 0,0005$  pro PBS.

Měření kvantového výtěžku singletového kyslíku a měření tripletových stavů ve vodě probíhalo ve spolupráci s RNDr. Pavlem Kubátem, CSc. z Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského Akademie věd ČR. Fotogenerace singletového kyslíku po ozáření látky **5** ve vodě byla měřena pomocí luminiscence singletového kyslíku při  $\sim 1270$  nm, kdy byl TPPS použit jako standard ( $\Phi_\Delta = 0,62$ ).<sup>137</sup> Látka **5** má nižší kvantový výtěžek singletového kyslíku ve vodě ( $\Phi_\Delta \sim 0,30$  ve vodě) než standard TPPS. To je částečně ovlivněno agregací, která vede k rychlé deaktivaci tripletových stavů. Dále byla stanovena i doba života tripletových stavů ( $\tau_T$ ) pro TPyzPz **5** a TPPS pomocí



exponenciální funkce z dat pro transientní absorpční spektroskopii, která dosahovala hodnoty  $\tau_T = 2,1 \mu\text{s}$  (TPyzPz **5**) a  $\tau_T = 1,8 \mu\text{s}$  (pro TPPS).

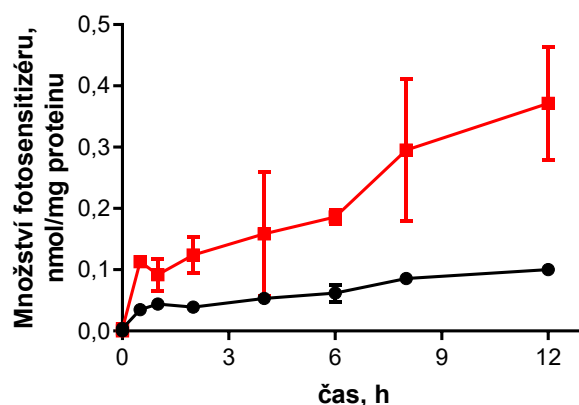
**Interakce s BSA.** Další částí projektu bylo studování interakce BSA s látkou **5** ( $1 \mu\text{M}$  roztok) ve vodě (po 2 dnech od naředění z koncentrovaného roztoku pro omezení případné agregace). Interakce byla studována pomocí změn absorpčních a emisních spekter. Po přidání BSA do vodného roztoku TPyzPz **5** až do poměru BSA:**5** = 1:3 byla pozorována snížená absorbance v maximu Q-pásu (648 nm) a zároveň došlo k posunu maxima Q-pásu k vyšším vlnovým délkám (659 nm) s několika isosbestickými body. Tato změna byla doprovázena výrazným poklesem  $\Phi_F$  (z 0,24 na 0,013) a posunem emisního maxima z 656 nm na 663 nm (Obr. 25). Další změny byly pozorovány i při vyšších přídavicích BSA, kdy došlo ke zvýšení intenzity absorbance a fluorescence bez jakékoliv změny tvaru nebo polohy těchto maxim. Tyto změny probíhaly až do poměru BSA: **5** = 1:1 a při dalším přidání BSA už nebyly pozorovány žádné významné změny. Na základě významných změn až do poměru 1:3, následovaných malými změnami do poměru 1:1, jsme došli k závěru, že při nadbytku TPyzPz interagují 3 molekuly látky **5** s jednou molekulou BSA. Ve chvíli, kdy je naopak BSA v nadbytku, dochází k jeho přerozdělování na jiné molekuly BSA až do poměru 1:1. Interakce 3 molekul Pc s BSA je zcela atypická. V literatuře jsou většinou uváděny jen interakce v poměru 1:1,<sup>108, 138</sup> nebo 2 molekul sulfonovaných nebo vysoce lipofilních Pc s 1 molekulou BSA.<sup>105, 111, 139</sup>



**Obr. 25.** Změna absorpčních (a-d) a emisních (e-h,  $\lambda_{exc} = 600 \text{ nm}$ ) spekter TPyzPz **5** ( $1 \mu\text{M}$ , voda) po přidání BSA. Spektrální změny po přidání BSA v poměru BSA: TPyzPz **5** mezi 0:1 až 1:3 (a, e), spektrální změny po přidání BSA v poměru BSA: TPyzPz **5** mezi 1:3 až 3:2 (b, f), závislost rozdílu absorbance při 648 nm na poměru BSA: TPyzPz **5** (c, d), závislost  $\Phi_F$  na poměru BSA: TPyzPz **5** (g, h). Zvýšení absorpčního pásu 278 nm (a, b) je z důvodu přidavku BSA. Obrázky d) a h) jsou zvětšené části obrázků c) a g). Převzato a upraveno z publikace.<sup>136</sup>

Vazba TPyzPz **5** (a také standardu TPPS) na BSA vedla také ke snížení produkce singletového kyslíku o více než polovinu a k pomalejší kinetice rozkladu. Po vazbě na BSA bylo u obou látek pozorováno prodloužení doby života tripletových stavů ( $\tau_T$  z 2,1 na 5,9  $\mu$ s u TPyzPz **5** a  $\tau_T$  z 1,8 na 9,7  $\mu$ s u TPPS). Tyto změny mohou být přičítány pomalejší difuzi kyslíku v základním stavu směrem k tripletovým stavům PS a v důsledku toho dochází k jejich méně efektivnímu zhášení kyslíkem. Podobně se očekává, že bude také stericky bráněna difuze singletového kyslíku produkovaného z TPyzPz **5** navázaného na BSA k cílovým buněčným strukturám, které mají být zničeny fotodynamickým účinkem. Omezená difuze a malá koncentrace singletového kyslíku mohou proto ve finále bránit účinné fotooxidaci buněčných struktur, a tím snižovat fotodynamickou aktivitu.

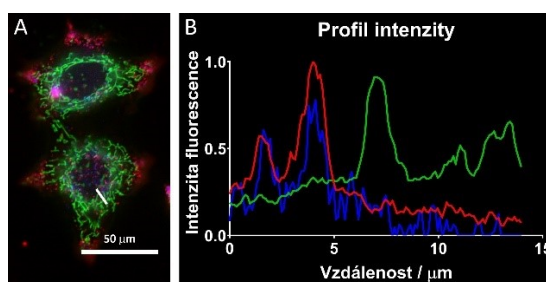
**Fotodynamická aktivita.** Fotodynamická aktivita byla studována *in vitro* na HeLa buňkách. Prvním krokem pro *in vitro* studie bylo studování rychlosti vstupu látky **5** do HeLa buněk. Buňky byly 12 hodin inkubovány s látkou **5** v SCM nebo v SFM, a po tuto dobu bylo sledováno množství látky, které vstupuje do buněk. V obou případech došlo k rychlému vychytávání v prvních 30 minutách a pak k pozvolnějšímu vychytávání dalšího množství látky **5**. Konečné hodnoty byly 0,10 nmol na mg proteinu v SCM a 0,37 nmol na mg proteinu v SFM po 12 hodinách inkubace. Rozdíl mezi SCM a SFM je pravděpodobně dán v důsledku horší difuze a absorpce látky **5** vázané na velkou molekulu BSA (Obr. 26).



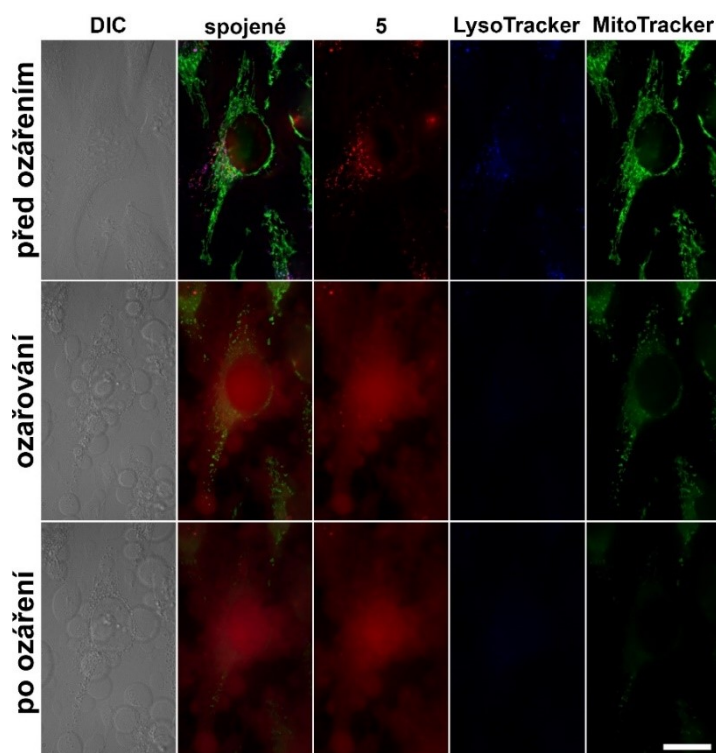
**Obr. 26.** Příklad časových profilů prostupu TPyzPz **5** do HeLa buněk po inkubaci v SCM (černá) a v SFM (červená). Převzato a upraveno z publikace.<sup>136</sup>

Subcelulární lokalizace byla určena na základě vlastní fluorescence látky **5** a dalších fluorescenčních sond specifických pro jednotlivé orgány. Překryvem signálu pro LysoTracker a signálu látky **5** bylo určeno, že látka **5** se primárně lokalizuje

v lysosomech (Obr. 27). Po ozáření mikroskopickým fluorescenčním LED světlem dochází k fotodestrukci lysosomálních váčků obsahujících látku **5** a následné relokizaci látky **5** z lysosomů do buněčné cytoplasmy. Dále byly zjištěny morfologické změny v HeLa buňkách (velké vystupující membránové puchýře, zkrácení mitochondrií, ztráta fluorescence LysoTrackeru). Všechny tyto změny naznačují rozsáhlé oxidativní poškození a rychlou indukci buněčné smrti pravděpodobně prostřednictvím nekrózy (Obr. 28).

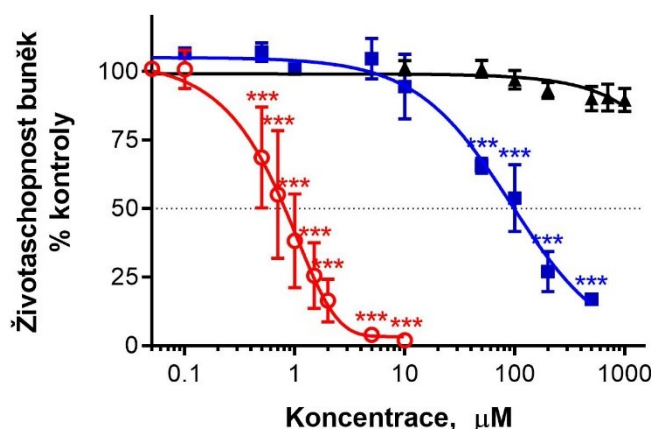


**Obr. 27.** Subcelulární lokalizace TPyzPz **5** (červená) v HeLa buňkách vizualizovaná pomocí fluorescenčního mikroskopu za využití specifických sond pro mitochondrie (zelená) a lysosomy (modrá). Spojený obrázek je zobrazen v a) a odpovídající fluorescenční profil intenzit je v obrázku b). Převzato a upraveno z publikace.<sup>136</sup>



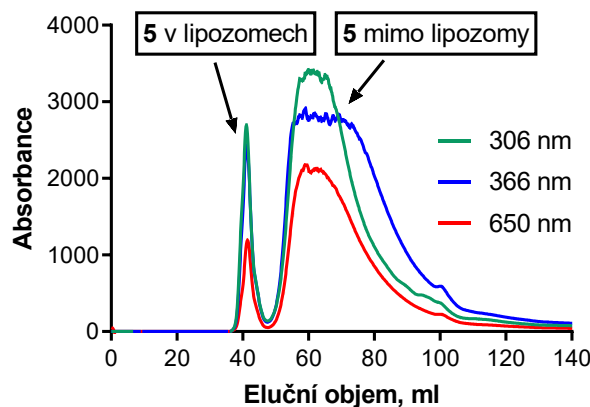
**Obr. 28.** Morfologické změny před, během a po ozáření HeLa buněk s látkou **5** (červená). HeLa buňky byly vizualizovány pomocí fluorescenční mikroskopie za použití specifických sond pro mitochondrie (MitoTracker, zelená) a lysosomy (LysoTracker, modrá). DIC = diferenciální interferenční kontrast. Měřítka je 20 μm. Převzato a upraveno z publikace.<sup>136</sup>

Fotodynamická aktivita *in vitro* byla stanovena na HeLa buňkách po ozáření světlem ( $\lambda > 570$  nm,  $11,2 \text{ J cm}^{-2}$ ) a byla vyjádřena jako střední efektivní koncentrace  $EC_{50} = 99,8 \pm 23,5 \text{ }\mu\text{M}$ . Toxicita látky bez přítomnosti světla byla vyjádřena jako střední toxická koncentrace  $TC_{50} > 1000 \text{ }\mu\text{M}$ , což naznačuje velice nízkou toxicitu bez aktivace světlem. Z důvodu negativního účinku vazby látky **5** na BSA byly provedeny fotodynamické experimenty také na HeLa buňkách v SFM. V tomto případě byla fotodynamická aktivita o dva řády vyšší ( $EC_{50} = 0,83 \pm 0,31 \text{ }\mu\text{M}$ ), což potvrzuje extrémní význam vazby na sérové proteiny pro fotodynamickou aktivitu této látky (Obr. 29). Podobné výsledky byly získány i v případě TPyzPz **1** s 16 karboxylátovými skupinami na periferii v mé první práci, kde byly získány tyto hodnoty -  $EC_{50} = 5,7 \pm 1,1 \text{ }\mu\text{M}$  pro SCM a  $EC_{50} = 0,55 \pm 0,09 \text{ }\mu\text{M}$  v SFM.<sup>96</sup>



**Obr. 29.** Vlastní toxicita bez ozáření světlem (černá), fototoxicita ( $\lambda > 570$  nm,  $11,2 \text{ J cm}^{-2}$ ) pro TPyzPz **5** na HeLa buňkách v SFM (červená) nebo v SCM (modrá). Byly provedeny 4 nezávislé experimenty, každý v kvadruplikátu. Klíč: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . Převzato a upraveno z publikace.<sup>136</sup>

Za účelem ochrání TPyzPz **5** před negativním vlivem BSA na jeho fotodynamickou aktivitu bylo navrženo inkorporovat látku **5** do lipozomů. Lipidový film (DOPC) byl hydratován roztokem látky **5** a vzniklé lipozomy byly extrudovány přes polykarbonátový filtr za vzniku unilamelárních lipozomů s velikostí přibližně 158 nm. Lipozomy obsahující látku **5** byly pak efektivně odseparovány od volné látky **5** v roztoku pomocí gelové chromatografie. (Obr. 30). Lipozomálně chráněný TPyzPz **5** byl testován na fotodynamickou aktivitu na HeLa buňkách v SCM. Nebylo však pozorováno žádné výrazné zvýšení fotodynamické aktivity a hodnota  $EC_{50} \sim 100 \text{ }\mu\text{M}$  byla podobná jako v případě samotné látky **5** v SCM ( $EC_{50} = 99,8 \pm 23,5 \text{ }\mu\text{M}$ ).



**Obr. 30.** Eluční diagram z gelové chromatografie se stacionární fází Superdex® 30 (objem kolony 130 ml; průtok 0,5 ml/min; objem frakcí 1 ml). Separace TPzPz **5** v lipozomech od TPzPz **5** mimo lipozomy. (mobilní fáze: PBS). Převzato a upraveno z publikace.<sup>136</sup>

Na základě tohoto výsledku jsem se zaměřil na hlubší zkoumání osudu látky **5** inkorporované do lipozomů v buňkách a jejich chování po ozáření. Pro zkoumání světelné stability lipozomů byl použit systém agarozového gelu. Sloučenina **5** zachycená v lipozomech a udržovaná bez přítomnosti světla zůstala v agaroze v místě aplikace a nedifundovala do okolí kvůli velkému průměru lipozomů. Stejný výsledek byl ovšem získán i pro lipozomy ozářené světlem za stejných podmínek, které byly použity při stanovení fotodynamické aktivity. Z toho vyplývá, že lipozomy neuvolňují svůj obsah po ozáření. Jako kontrola byla aplikována samotná látka **5**, která difundovala z místa aplikace zcela. Stejného efektu bylo pak dosaženo i v případě, kdy byl k lipozomům s látkou **5** přidán Triton X-100, který narušuje strukturu lipozomů. Tímto experimentem bylo potvrzeno, že lipozomy nejsou během ozařování poškozeny. Podobné výsledky byly popsány také pro vysoce hydrofilní kationický ftalocyanin, který po ozáření nebyl uvolněn z lipozomů.<sup>130</sup> Dále byla sledována i subcelulární lokalizace a relokace lipozomálně chráněného TPzPz **5** na HeLa buňkách ve srovnání s daty pro samotnou látku **5**. Po inkubaci byl červený fluorescenční signál lipozomálně chráněného TPzPz **5** kolokalizován modrým signálem LysoTrackeru, podobně jako v případě, kdy byl TPzPz **5** aplikován samostatně. Po ozáření se ovšem morfologické změny projeví pomaleji a poškození buněk bylo pozorováno až po ozáření, nikoli už při samotném ozáření. Dalším rozdílem je neschopnost látky **5** v lipozomech uvolnit se z lyzosomech po ozáření. Po ozáření nedochází k relokaci do cytoplasmy, TPzPz **5** je v těchto lipozomálních váčcích stále zachycen i po ozáření a jeho červený signál je stále v buňkách dobře zřetelný jako bodová fluorescence v lyzosomech, nikoliv jako signál difundovaný

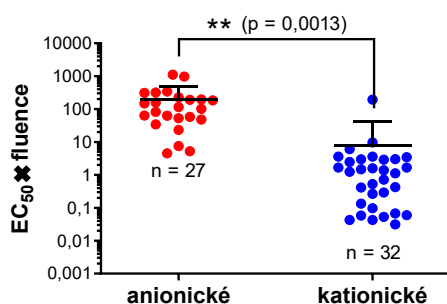
do celé cytoplasmy, jak bylo pozorováno při aplikaci bez lipozomů. Proto, i když je lipozomální TPyzPz **5** chráněn před vazbou na albumin, produkuje zřejmě singletový kyslík pouze lokálně ve vezikulách a nedochází k jeho dostatečné difuzi k lyzosomální membráně, kde by mohl vykonávat svou destrukční aktivitu. Aktivita ovšem není zcela odstraněna, protože vzdálenost, kterou musí singletový kyslík od lipozomů dosáhnout k cíli (lyzosomální membráně), je stále v rámci aktivního poloměru singletového kyslíku ve vodě (aktivní poloměr singletového kyslíku je přibližně 220 nm, typická velikost lyzosomů je přibližně 100–1000 nm, velikost lipozomů v této studii je přibližně 158 nm). V důsledku toho byl sice TPyzPz **5** před albuminem inkorporací do lipozomů ochráněn, ale finálně to nevedlo ke zlepšení fotodynamické aktivity, kvůli limitovanému dosahu pouze lokálně produkovaného singletového kyslíku.

**Závěr.** V této části disertační práce byl připraven sulfonovaný TPyzPz **5**, jehož aktivita, jak jsme předpokládali, nebyla ovlivněna změnou pH okolí. Lze ovšem předpokládat, že díky nízkému počtu sulfonovaných skupin může ve vyšších koncentracích dojít k agregaci. Při vazbě na BSA došlo ke zhoršení fotofyzikálních vlastností (pokles fluorescence), a tím došlo k negativnímu ovlivnění fotodynamické aktivity. Vliv vazby na sérové proteiny byl potvrzen rozdílnou fotodynamickou aktivitou v SCM ( $EC_{50} = 99,8 \pm 23,5 \mu\text{M}$ ) a v SFM ( $EC_{50} = 0,83 \pm 0,31 \mu\text{M}$ ). Fotodynamická aktivita je u této látky v SFM o dva řády vyšší. Dále byly připraveny DOPC lipozomy s TPyzPz **5** z důvodu ochrany TPyzPz před vazbou na proteiny. Bohužel tato modifikace nevedla ke zvýšení fotodynamické aktivity ( $EC_{50} \sim 100 \mu\text{M}$ ).

Výsledky tohoto projektu byly publikovány v časopise *Dyes and Pigments* jako publikace: **Kollar, J.**; Machacek, M.; Jancarova, A.; Kubat, P.; Kucera, R. Miletin, M.; Novakova, V.; Zimcik, P., Effect of bovine serum albumin on the photodynamic activity of sulfonated tetrapyrazinoporphyrazine. *Dyes Pigm.* **2019**, 162, 358-366.

### 6.3 Porovnání anionických a kationických ftalocyaninů

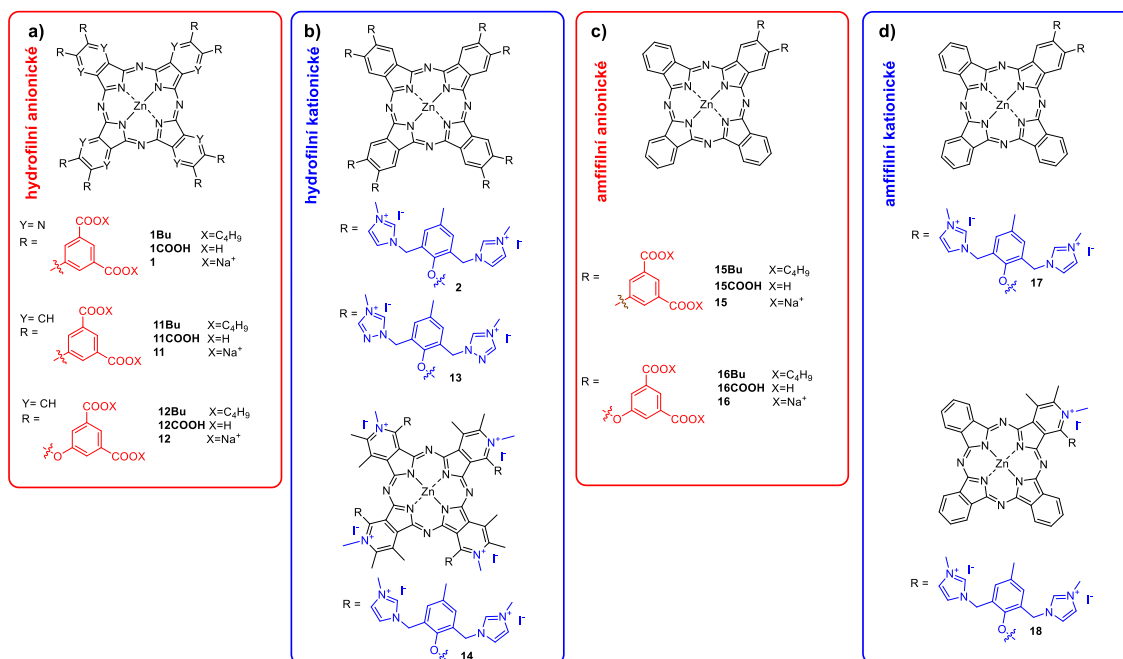
Během dlouhodobého pozorování fotodynamické aktivity nově připravených Pc v naší nebo i v jiných vědeckých skupinách jsme zaznamenali významný rozdíl ve fotodynamické aktivitě anionických (obsahujících karboxylátové nebo sulfonátové skupiny) a kationických (obsahujících kvarterní amoniové skupiny) Pc. Při analýze fotodynamické aktivity *in vitro* u více než 60 různých PS obsahujících anionické nebo kationické funkční skupiny publikované v literatuře různými výzkumnými skupinami, můžeme pozorovat výrazně nižší fotodynamický účinek anionických Pc než kationických Pc (Obr. 31).



**Obr. 31.** Porovnání fotodynamické aktivity *in vitro* anionických (červená) a kationických (modrá) Pc publikovaných v literatuře. Pro účely srovnání je aktivita vyjádřena hodnotou EC<sub>50</sub> (μM) vynásobenou fluencí (J cm<sup>-2</sup>) pro korekci heterogenity dat kvůli rozdílným podmínkám ozáření. Průměr a směrodatná odchylka jsou zobrazeny černě. Statistická analýza byla provedena Welchovým t-testem. Graf byl přejet z publikace.<sup>140</sup>

V rámci této části disertační práce jsem se zaměřil na přípravu nových anionických ftalocyaninů nesoucích karboxylátové skupiny na periferii a porovnání těchto látek s kationickými Pc s cílem najít parametry a faktory, které mohou být zodpovědné za rozdíly v účinnosti mezi Pc nesoucími opačně nabitými substituenty na periferii.

**Návrh a syntéza.** V tomto projektu jsem se zaměřil na sérii Pc (Obr. 32), kterou tvoří 4 skupiny látek, a to látky anionické hydrofilní (**1**, **11**, **12**), kationické hydrofilní (**2**, **13**, **14**), anionické amfifilní (**15** a **16**) a kationické amfifilní (**17** a **18**).



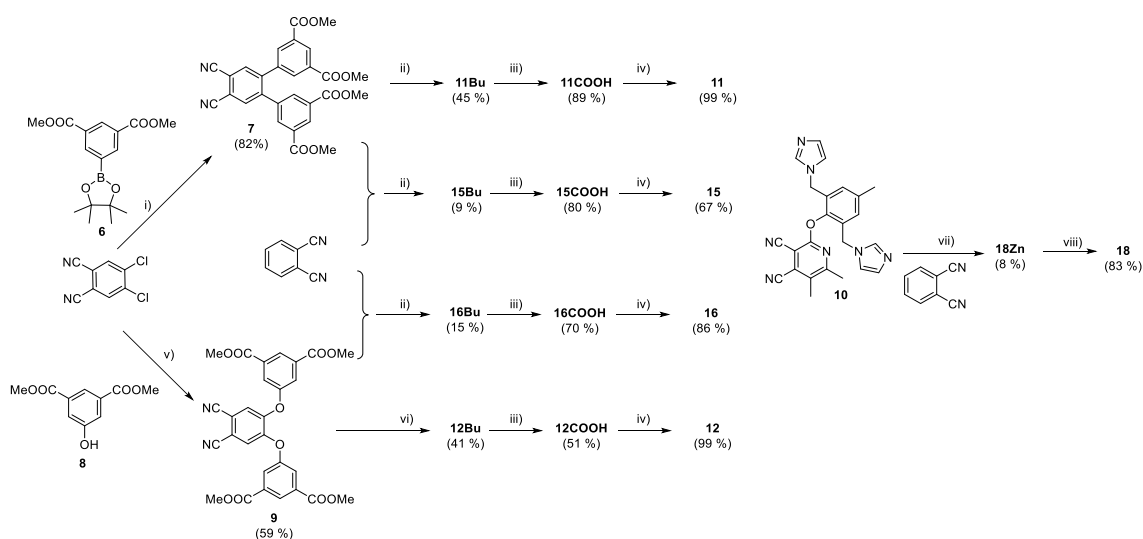
Obr. 32. Struktury Pc porovnávaných v rámci této části projektu.

Příprava látek **1**, **2**, **13**, **14**, **17** byla v literatuře už popsána, látky **11**, **12**, **15**, **16**, **18** byly připraveny *de novo* nebo modifikací publikovaných postupů (Obr. 33).<sup>48, 49, 96, 129, 130</sup> Ftalonitrilový prekurzor **7** byl připraven Suzuki-Miyaurovou cross-couplingovou reakcí 4,5-dichlorftalonitrilu s látkou **6** připravenou postupem popsáným v literatuře.<sup>128</sup> Couplingová reakce byla optimalizována s ohledem na různá rozpouštědla (dioxan, voda, toluen, THF), katalyzátory (Pd(AcO)<sub>2</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) a kokatalyzátory (SPhos, XPhos). Nejlepší výsledek s výtěžkem 82 % byl získán při použití Pd(AcO)<sub>2</sub>, XPhos, s K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ve směsi THF a voda. Následnou cyklotetramerizací prekurzoru **7** s butanolátem hořečnatým, jako iniciátorem reakce, byl připraven hořečnatý Pc. Během této reakce byly methyl estery transesterifikovány na butyl estery, což bylo popsáno už v minulosti v literatuře.<sup>47, 76, 77</sup>

Hořečnatý komplex byl rovnou převeden na bezkovový derivát reakcí s *p*-toluensulfonovou kyselinou v THF a ten následně reakcí s octanem zinečnatým v pyridinu na zinečnatý complex **11Bu** s celkovým výtěžkem 45 % (počítáno z prekurzoru **7**). Alternativní přímá syntéza **11Bu** z prekurzoru **7** reakcí s DBU a octanem zinečnatým v butanolu vedla k nízkému výtěžku okolo 3 %. Posledním krokem byla bazická hydrolyza esterových vazeb **11Bu** s NaOH ve směsi rozpouštědel (voda/MeOH/THF) za vzniku ve vodě vysoce rozpustného Pc **11**. Syntéza symetrického Pc **12** byla modifikována oproti původnímu postupu.<sup>47</sup> Prekurzor **9** byl připraven



nukleofilní substitucí 4,5-dichlorftalonitrilu fenolem **8** v DMF za přítomnosti  $K_2CO_3$ . Ftalonitril **9** reagoval s octanem zinečnatým a katalytickým množstvím DBU v butanolu za vzniku zinečnatého Pc **12Bu** (41% výtěžek z výchozího prekurzoru **9**) s butyl estery na periferii, který byl následně hydrolyzován na Pc **12**. Nesymetrické Pc **15** a **16** byly připraveny statistickou kondenzací ftalonitrilu (prekurzor A) s látkami **7** nebo **9** (prekurzor B) reakcí s butanolátem hořečnatým jako iniciátorem. Obdobně jako u symetrických Pc došlo k transesterifikaci methyl esterů na butyl estery. Statistická kondenzace vede ke směsi 6 rozdílných kongenerů, odpovídající AAAB kongener byl izolován ze směsi kongenerů sloupcovou chromatografií ještě ve formě hořečnatých komplexů. Hořečnaté komplexy byly poté převedeny na odpovídající bezkovové ligandy a následně na zinečnaté komplexy s výtěžky 9 % pro **15Bu** a 15 % pro **16Bu** (počítáno na výchozí ftalonitrily). Takové výtěžky jsou typické pro syntézu nesymetrických Pc typu AAAB pomocí přístupu statistické kondenzace.<sup>38, 141</sup> Nakonec byly esterové vazby hydrolyzovány za vzniku **15** a **16**. Nesymetrický kationický Pc **18** byl připraven statistickou kondenzací ftalonitrilu (prekurzor A) s látkou **10** (prekurzor B) reakcí s butanolátem hořečnatým v butanolu. Odpovídající hořečnatý AAAB kongener byl izolován sloupcovou chromatografií a následně převeden na bezkovový derivát reakcí s *p*-toluensulfonovou kyselinou v THF a ten na zinečnatý komplex **18Zn** reakcí s octanem zinečnatým v pyridinu s výtěžkem 8 %. Finální reakcí byla alkylace imidazolových a pyridinových dusíků reakcí s jodmethanem v bezvodém DMF pod inertní argonovou atmosférou (83% výtěžek) (Obr. 33).



**Obr. 33.** Postup přípravy symetrických a nesymetrických Pc. Podmínky reakce: i)  $K_3PO_4$ ,  $Pd(AcO)_2$ , XPhos, THF/voda, rt; ii) Mg, BuOH, reflux; dále *p*-toluensulfonová kyselina, THF rt; dále  $Zn(AcO)_2$ , pyridin, reflux; iii) NaOH, voda/MeOH/THF, rt; dále HCl, rt; iv) ekvimolárně NaOH, voda, rt; v)  $K_2CO_3$ , DMF, 60 °C; vi)  $Zn(AcO)_2$ , DBU, butanol, reflux; vii) Mg, butanol, reflux; dále *p*-toluensulfonová kyselina, THF/ $CHCl_3$ /MeOH rt; dále  $Zn(AcO)_2$ , pyridin, reflux; viii)  $CH_3I$ , DMF, 80 °C.

**Rozpustnost a absorpční vlastnosti.** Všechny hydrofilní látky (**1**, **2**, **11-14**) a anionické amfifilní Pc (**15**, **16**) byly dobře rozpustné ve vodě nebo v PBS ve vysokých koncentracích ( $\gg 1$  mM). Naopak relativně nízká rozpustnost ( $\sim 100$   $\mu$ M) byla pozorována u amfifilních kationických látek **17** a **18**, které nad tuto koncentraci ve vodě precipitují. Tato data byla dále podpořena i stanovením rozdělovacího koeficientu mezi oktanolem a vodou (PBS, pH 7,4) kde látky **1**, **2**, **11-16** byly distribuovány téměř výhradně do vodné fáze ( $\log P < -2$ , Tabulka 3), zatímco **17** a **18** byly více lipofilní s  $\log P$   $-0,07$  (**17**) a  $0,72$  (**18**). Přímé porovnání hodnot  $\log P$  pro látky **15** (nebo **16**) s hodnotou pro látku **17** ukázalo (přestože počet nábojů byl stejný a molekuly měly velmi podobnou strukturu), že zavedení karboxylátových skupin vede k vyšší rozpustnosti ve vodě než zavedení kvarterních amoniových skupin.

**Tabulka 3** Log  $P$ , fotofyzikální data pro sloučeniny **1**, **2**, **11-18** v DMF a asociační konstanty s BSA a DOPC lipozomy v PBS<sup>a</sup>

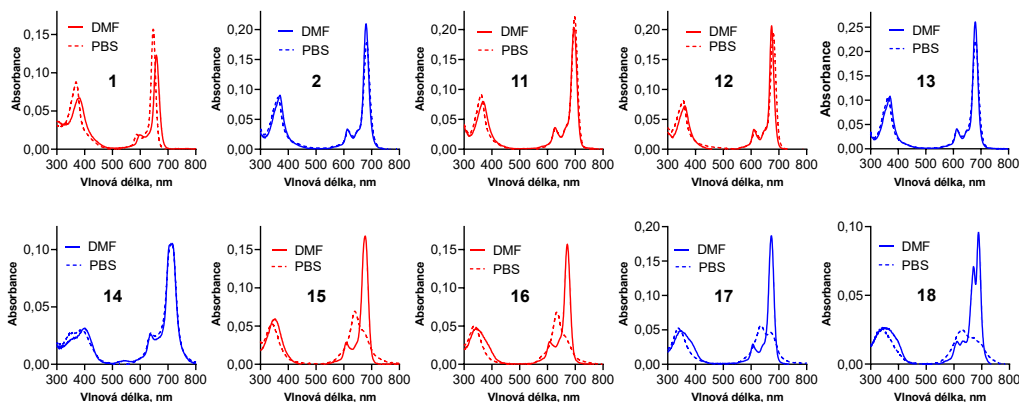
Sloučenina	Log $P$	$\lambda_{\max}/\text{nm}$ (log $\epsilon$ )	$\lambda_F/\text{nm}$	$\Phi_F^b$	$\Phi_\Delta$	$K_b \times 10^{-6}$ ( $M^{-1}$ )	$K_L \times 10^{-3}$ ( $M^{-1}$ )
<b>1</b>	-2,15	647 <sup>c</sup>	657 <sup>c</sup>	-, (0,36) <sup>c</sup>	0,23 <sup>d</sup>	0,712	-
<b>2</b>	-2,42	681	683	0,15 <sup>f</sup> (0,15)	0,61 <sup>f</sup>	-	-
<b>11</b>	-2,45	693	702	0,12 (0,27)	0,45	1,24	-
<b>12</b>	-2,68	674	681	0,19 (0,25) <sup>e</sup>	0,42 <sup>e</sup>	2,80	-
<b>13</b>	-3,0 <sup>g</sup>	680	687	0,15 <sup>g</sup> (0,18)	0,49 <sup>g</sup>	-	-
<b>14</b>	-1,99 <sup>h</sup>	710	721	0,13 <sup>h</sup> (0,10)	0,69 <sup>h</sup>	-	-
<b>15</b>	-2,45	676	686	0,17 (0,23) <sup>i</sup>	0,33	0,0514	4,76
<b>16</b>	-2,44	672, 681	682	0,09 (0,33) <sup>i</sup>	0,41	0,527	13,2
<b>17</b>	-0,07	673	681	0,25 <sup>j</sup> (0,25) <sup>i</sup>	0,57 <sup>j</sup>	0,0435	7,07
<b>18</b>	0,72	671, 689	694	0,20 (0,22) <sup>i</sup>	0,66	-	11,6

<sup>a</sup> Rozdělovací koeficient mezi 1-oktanolem a PBS v logaritmickém měřítku (Log  $P$ ), absorpční maximum ( $\lambda_{\max}$ ), emisní maximum ( $\lambda_F$ ), kvantový výtěžek fluorescence ( $\Phi_F$ ), kvantový výtěžek singletového kyslíku ( $\Phi_\Delta$ ), asociační konstanta s BSA ( $K_b$ ), asociační konstanta s DOPC lipozomy ( $K_L$ ). Z důvodu problému s rozpustností, byla data pro anionické sloučeniny **1**, **11**, **12**, **15**, **16** v DMF určena pro jejich neionizované analogy obsahující volné karboxylové kyseliny.

<sup>b</sup>Hodnoty v závorkách jsou pro stanovení v PBS. <sup>c</sup>V H<sub>2</sub>O, odkaz<sup>96</sup>. <sup>d</sup>V D<sub>2</sub>O, odkaz<sup>96</sup>. <sup>e</sup>ref.<sup>48</sup>. <sup>f</sup>Podobné hodnoty ( $\Phi_F = 0,26$  (voda, pH >7),  $\Phi_\Delta = 0,40$  (DMF)) byly publikovány pro látku **12COOH** v literatuře<sup>142</sup>. <sup>g</sup>ref.<sup>49</sup>. <sup>h</sup>ref.<sup>129</sup>.

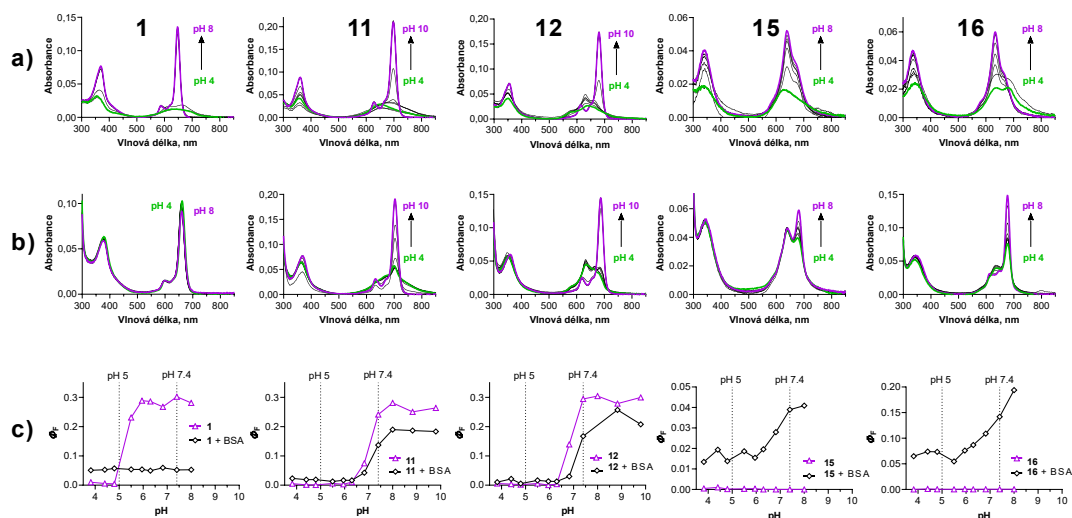
<sup>i</sup>V PBS s lipozomy ( $c_{(Pc)} = 1 \mu\text{M}$ , poměr Pc:DOPC = 1:1200). <sup>j</sup>ref.<sup>130</sup>.

Absorpční spektra všech studovaných látek v DMF měla tvar charakteristický pro monomerní stav s intenzivními Q-pásky v rozmezí 670–690 nm a B-pásky okolo 350/370 nm. Výjimku tvořila látka **1** s TPzPz jádrem, které způsobilo hypsochromní posun Q-pásky k 647 nm, a neperiferně substituovaná látka **14** s bathochromním posunem Q-pásky k 710 nm. Nesymetrický charakter amfifilních látek **15-18** může potenciálně vést k rozštěpení Q-pásky, to však bylo pozorováno pouze u látky **18**. Zvýšení polaroty prostředí a iontové síly v PBS vedlo k agregaci všech amfifilních látek (**15-18**), avšak plně monomerní charakter byl zachován u všech hydrofilních Pc **1**, **2**, **11-14** i v PBS (Obr. 34).

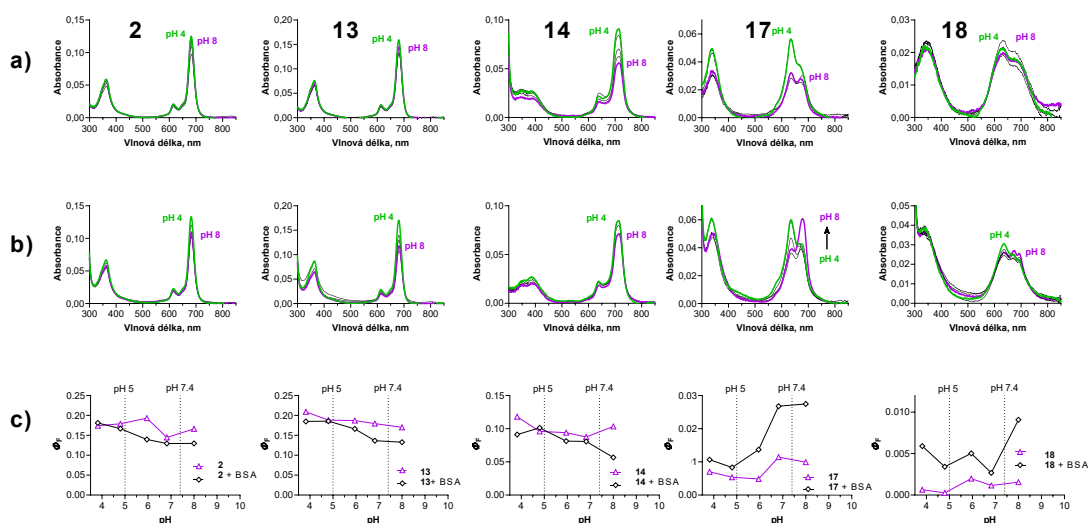


**Obr. 34.** Absorpční spektra **1, 2, 11-18** v DMF (plná čára) a v PBS (čárkovaná čára) v koncentraci 1  $\mu\text{M}$ . Vzorky byly připraveny ze 100  $\mu\text{M}$  zásobního roztoku připraveného v PBS (**1, 2, 11-16**) nebo v DMF (**17, 18**). Anionické látky (červená), kationické látky (modrá). Převzato a upraveno z publikace.<sup>140</sup>

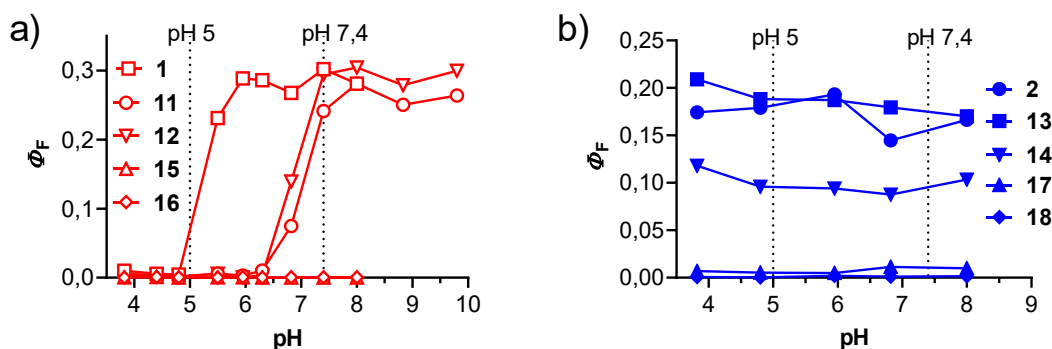
**Vliv pH.** Na rozdíl od stabilního pozitivního náboje na kvartérních amoniových skupinách, ionizace karboxylátových skupin může být ovlivněna změnami pH.<sup>47, 96, 142</sup> Protonizace karboxylátových skupin v nízkém pH u látek **1, 11, 12** vede k silné agregaci, která se projevila snížením intenzity, rozšířením a hypsochromním posunem Q-pásu (Obr. 35a). Tento efekt lze snadno zdůvodnit ztrátou elektrostatických odpudivých sil mezi jednotlivými makrocykly ve chvíli, kdy jsou karboxylové skupiny neionizované. Vysoce elektrondeficitní charakter TPyzPz jádra<sup>39, 143</sup> v molekule **1** vedl ke zvýšení kyselosti karboxylových skupin a změna agregace byla proto pozorována při mnohem nižších hodnotách pH než u Pc **11** a **12**. Amfifilní anionické látky **15** a **16** jsou agregovány bez ohledu na pH, ale agregace se zvyšuje při nižších hodnotách pH (Obr. 35a). Celkově lze konstatovat, že všechny anionické látky bez ohledu na makrocyclické jádro byly silně agregovány při pH 4,9, které odpovídá intralyzomálnímu prostředí buňky.<sup>49, 96</sup> Po agregaci jsou tyto látky fotofyzikálně inaktivní, protože kvantový výtěžek fluorescence byl výrazně snížen (Obr. 35c, Obr. 37a). Naopak vliv pH na kationické deriváty **2, 13, 14, 17, 18** byl minimální. Došlo pouze k malému zvýšení intenzity Q-pásů a kvantového výtěžku fluorescence při nižších hodnotách pH (Obr. 36, Obr. 37b).



**Obr. 35.** Anionické Pc. a) Změna absorpčních spekter pro látky **1**, **11**, **12**, **15**, **16** ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) v BR pufru o rozdílném pH ( $I = 0,15 \text{ M}$ ). b) Změna absorpčních spekter pro látky **1**, **11**, **12**, **15**, **16** ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) v BR pufru o rozdílném pH ( $I = 0,15 \text{ M}$ ) v přítomnosti BSA ( $20 \mu\text{M}$ ). c) Změna  $\Phi_F$  pro látky **1**, **11**, **12**, **15**, **16** ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) v BR pufru o rozdílném pH ( $I = 0,15 \text{ M}$ ) v nepřítomnosti (fialová) nebo přítomnosti BSA (černá,  $20 \mu\text{M}$ ). Převzato a upraveno z publikace.<sup>140</sup>



**Obr. 36.** Kationické Pc. a) Změna absorpčních spekter pro látky **2**, **13**, **14**, **17**, **18** ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) v BR pufru o rozdílném pH ( $I = 0,15 \text{ M}$ ). b) Změna absorpčních spekter pro látky **2**, **13**, **14**, **17**, **18** ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) v BR pufru o rozdílném pH ( $I = 0,15 \text{ M}$ ) v přítomnosti BSA ( $20 \mu\text{M}$ ). c) Změna  $\Phi_F$  pro látky **2**, **13**, **14**, **17**, **18** ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) v BR pufru o rozdílném pH ( $I = 0,15 \text{ M}$ ) v nepřítomnosti (fialová) nebo přítomnosti BSA (černá,  $20 \mu\text{M}$ ). Převzato a upraveno z publikace.<sup>140</sup>



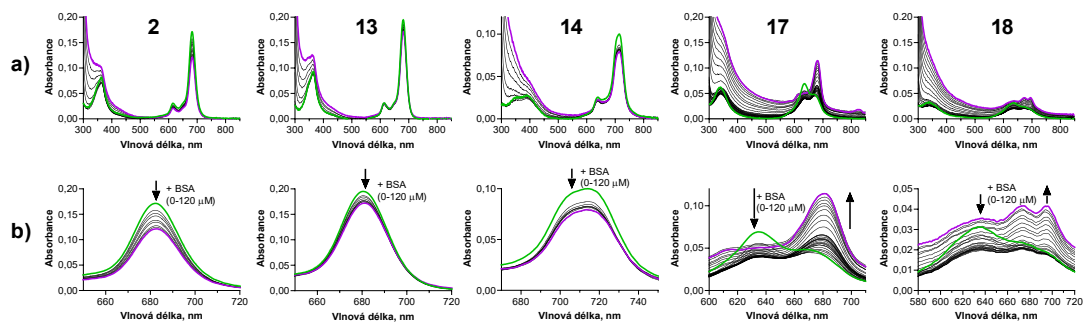
**Obr. 37.** Vliv pH na kvantový výtěžek fluorescence: a) anionické Pc b) kationické Pc. Převzato a upraveno z publikace.<sup>140</sup>

**Fotofyzikální vlastnosti.** U všech studovaných látek byla pozorována červená fluorescence s typickým tvarem emisního spektra pro Pc s malým Stokesovým posunem. Hodnoty  $\Phi_F$  v DMF byly obvykle nad 0,10 a v řadě případů dokonce vzrostly ve chvíli, kdy byla data změřena v PBS (Tabulka 3). Pro měření v PBS musely být amfifilní sloučeniny **15-18** formulovány v DOPC lipozomech pro monomerizaci vzorků (poměr látky k lipidu 1:1200 byl dostatečný pro úplnou monomerizaci vzorků). Pouze látka **17** měla slabou fluorescenci v čistém PBS,  $\Phi_F \sim 0,01$ .

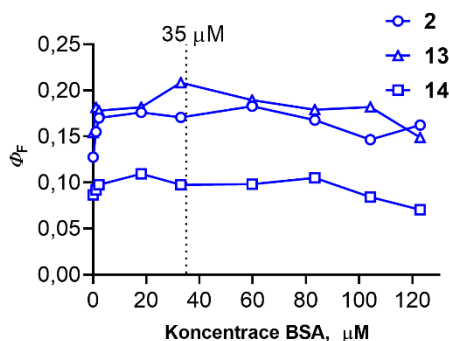
Produkce singletového kyslíku, nejdůležitějšího reaktivního produktu v PDT, byla stanovena v DMF pomocí látky vychytávající singletový kyslík, 1,3-difenyliisobenzofuranu. Hodnoty singletového kyslíku se pohybovaly v rozmezí 0,4 až 0,7. To zapadá do obecně publikovaných hodnot pro zinečnaté Pc.<sup>109</sup> Získaná data pak naznačují malý rozdíl mezi anionickými a kationickými Pc už na fotofyzikální úrovni. Hodnoty  $\Phi_\Delta$  byly pro anionické látky nižší než 0,45, ale hodnoty pro kationické látky byly vyšší než 0,5 (Tabulka 3).

**Interakce s BSA.** V literatuře je velmi dobře popsána zejména vazba anionických Pc na albumin,<sup>59, 107, 111</sup> ale i interakce kationických Pc s tímto proteinem byly zmíněny.<sup>59, 110</sup> Po zkušenostech z mých předchozích dvou prací,<sup>96, 136</sup> kde vazba na proteiny výrazně snižovala fotodynamický účinek, jsme se i u této nové skupiny látek zaměřili na interakci s BSA.

Po přidání BSA v PBS k hydrofilním kationickým Pc **2, 13, 14** jsme nepozorovali žádné kvalitativní změny v absorbanci a emisních spektrech, a ani hodnoty  $\Phi_F$  nenaznačovaly žádné detektovatelné interakce s tímto proteinem (Obr. 38, Obr. 39).



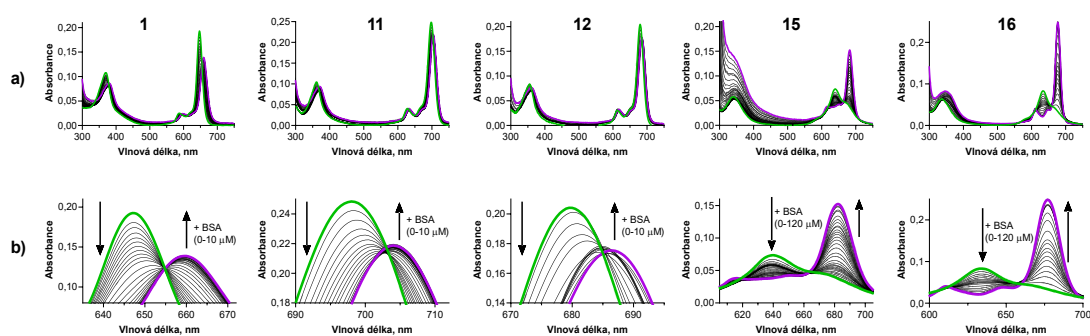
**Obr. 38.** Kationické deriváty a) Změna absorpčních spekter pro látky **2**, **13**, **14**, **17**, **18** v PBS ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) po přidání zvyšujícího se množství BSA – koncentrace od  $0 \mu\text{M}$  (zelená) do  $120 \mu\text{M}$  (fialová). b) Detail Q-pásu jednotlivých látek. Převzato a upraveno z publikace.<sup>140</sup>



**Obr. 39.** Závislost kvantového výtěžku fluorescence na koncentraci BSA pro kationické hydrofilní látky **2**, **13**, **14**. Tečkovaná čára znázorňuje koncentraci BSA v SCM.

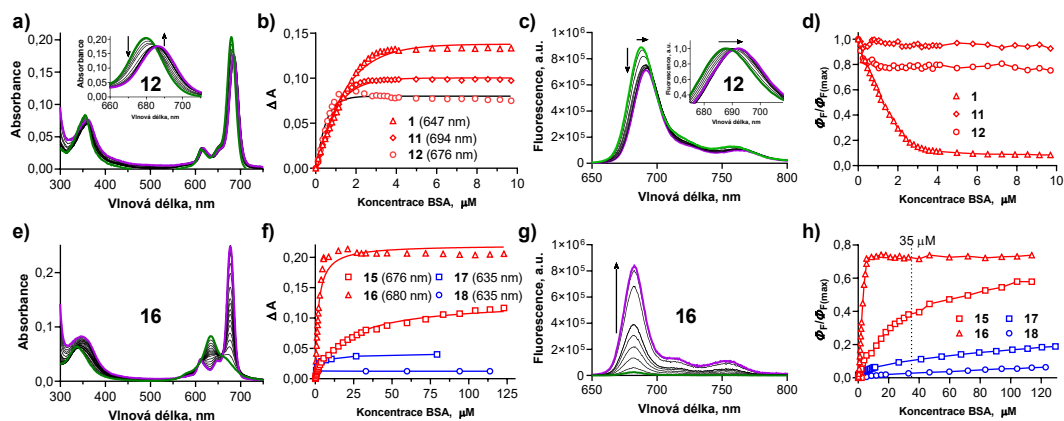
Na druhou stranu postupné přidávání BSA k anionickým hydrofilním Pc **1**, **11**, **12** (monomerní v PBS) způsobilo malý červený posun Q-pásu a emisního maxima (okolo 7 nm) s jasnými isosbestickými body v absorpčních spektrech (Obr. 40), které indikují vazbu Pc na albumin.<sup>98</sup> Změny absorpce vynesené proti koncentraci BSA byly použity pro výpočet hodnot vazebné konstanty ( $K_b$ ), u kterých bylo zjištěno, že jsou přibližně v řádu  $10^6 \text{ M}^{-1}$  ( $K_b = 7,12 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ,  $1,24 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  a  $2,80 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  pro látky **1**, **11** a **12**, Obr. 41b, Tabulka 3). Tyto hodnoty byly zhruba na stejné úrovni jako pro jiné anionické hydrofilní zinečnaté Pc, nebo anionické porfyriny uvedené v literatuře, a naznačovaly silnou interakci s BSA.<sup>101, 109, 114</sup> Intenzita fluorescence látek **1** a **12** (Obr. 41c) se snížila po přidání BSA v důsledku potlačení excitovaných stavů a emisní maximum se posunovalo bathochromně v souladu s malým červeným posunem absorpčního maxima. Je zajímavé, že BSA neměl žádný vliv na intenzitu fluorescence látky **11**, došlo pouze k bathochromnímu posunu emisního maxima o 4 nm. Zhášení excitovaných stavů bylo pouze mírné pro Pc **12** (~ 80 % zbytkové fluorescence při plné vazbě) na druhou stranu

bylo velmi silné pro TPyzPz **1** (< 10 % zbytkové fluorescence při plné vazbě, Obr. 41d). Podobný vliv byl popsán už výše u oktasulfonovaného TPyzPz **5** (< 5 % zbytkové fluorescence<sup>136</sup>). Z těchto výsledků lze předpokládat, že interakce BSA s tímto typem aza-analogu Pc způsobuje silné zhášení excitovaného stavu TPyzPz, a má spíše omezený efekt na excitované stavy Pc. U amfifilních látek **15-18**, které jsou silně agregovány v PBS, dochází po přidání BSA k monomerizaci (Obr. 41e, f). Tento jev byl dobře pozorován zejména u anionických Pc s  $K_b = 5,14 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  (**15**) a  $K_b = 5,27 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  (**16**). Došlo také k výraznému nárůstu fluorescence, která byla v PBS snížena u těchto látek agregací (Obr. 41g). Fotofyzikální vlastnosti však nebyly plně obnoveny na hodnoty typické pro monomery v PBS s lipozomy (~ 40% a ~ 75% aktivita při 35  $\mu\text{M}$  BSA pro **15** a **16**, Obr. 41h), což naznačuje zhášení excitovaných stavů po vazbě na albumin. Naproti tomu interakce kationických amfifilních **17** a **18** s BSA byla mnohem slabší ( $K_b = 4,35 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  pro **17**,  $K_b$  nebylo možné stanovit pro **18**), a i při vysokých koncentracích BSA (> 100  $\mu\text{M}$ ), látky zůstaly agregované částečně (**17**) nebo převážně (**18**) s velmi nízkou fluorescencí (Obr. 41h).



**Obr. 40.** Anionické deriváty a) Změna absorpčních spekter pro látky **1**, **11**, **12**, **15**, **16** v PBS ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) po přidání zvyšujícího se množství BSA – koncentrace od 0  $\mu\text{M}$  (zelená) do 10/120  $\mu\text{M}$  (fialová). b) Detail Q-pásu jednotlivých látek. Převzato a upraveno z publikace.<sup>140</sup>

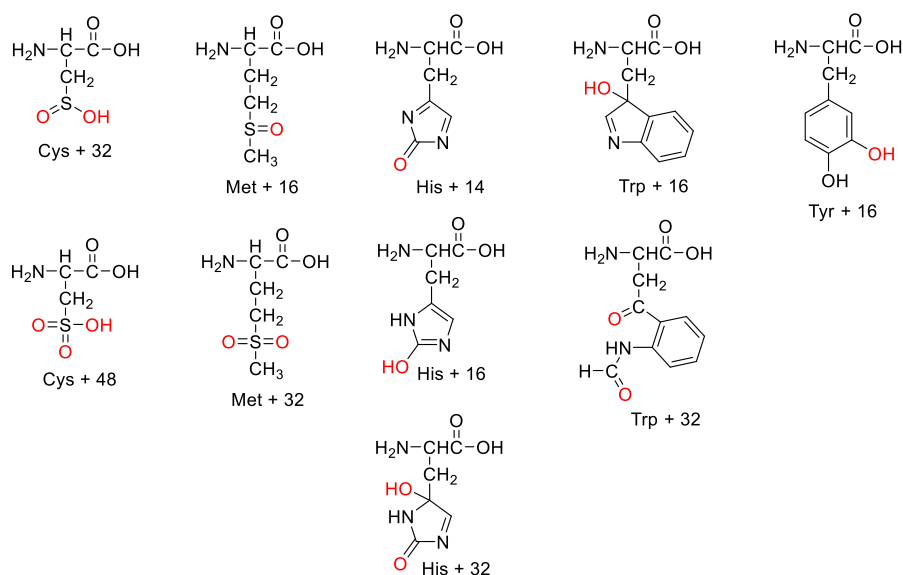




**Obr. 41.** a, e) Změna absorpčních spekter **12** (a) a **16** (e) ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) po přidání BSA v koncentraci začínající od  $0 \mu\text{M}$  (zelená) do finální koncentrace (fialová) (vložený obrázek: detail Q-pásu). b, f) Vazebné izotermy látek **1**, **11**, **12** (b) a **15-18** (f) při vazbě na BSA. c, g) Změna fluorescence látky **12** (c) a **16** (g) ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) po přidání BSA ( $\lambda_{\text{exc}} = 618 \text{ nm}$  a  $612 \text{ nm}$ ). Vložený obrázek: normalizovaná fluorescence. d, h) Změna intenzity fluorescence po přidání BSA vyjádřeno jako  $\Phi_F/\Phi_{F(\text{max})}$  (jako  $\Phi_{F(\text{max})}$  pro **15-18** byla použita hodnota  $\Phi_F$  v PBS s DOPC lipozomy (poměr látka: lipid 1:1200)). Typická koncentrace BSA v sérovém médiu (SCM) ( $35 \mu\text{M}$ ) je znázorněna tečkovanou čarou. Převzato a upraveno z publikace.<sup>140</sup>

V návaznosti na významnou vazbu na BSA a na základě znalostí toho, že cílovou organelou jsou lyzosomy (viz biologická data níže) s kyselým prostředím ( $\text{pH} \sim 4,9$ ), byl proveden experiment na sledování spektrálních a fotofyzikálních změn při nízkém  $\text{pH}$  v přítomnosti BSA ( $20 \mu\text{M}$ ) (Obr. 35b, c, Obr. 36b, c). Pro hydrofilní látky **2**, **11-14** byl efekt změny  $\text{pH}$  v přítomnosti BSA stejný jako v případě bez BSA. V případě látky **1** s TPyzPz jádrem došlo v přítomnosti BSA při  $\text{pH} 7,4$  ke snížení aktivity přibližně na jednu desetinu, ta se však již dále neměnila v závislosti na hodnotě  $\text{pH}$ . Tento jev, popsáný již v předchozím článku,<sup>96</sup> dále zdůrazňuje rozdíl mezi Pc a TPyzPz jádrem v interakci s BSA, což naznačovalo již výrazné zhasnutí excitovaných stavů u TPyzPz zmiňovaného výše. Přidání BSA ( $20 \mu\text{M}$ ) k plně agregovaným amfifilním derivátům **15** a **16** vedlo k částečné nebo úplné monomerizaci při  $\text{pH} 7,4$ . Při nízkém  $\text{pH}$  však došlo k agregaci spojené pravděpodobně s protonizací karboxylátových skupin, a tím ke snížení interakce mezi Pc a bazickými skupinami BSA (Obr. 35b, c). V případě kationických amfifilních sloučenin **17** a **18** byla interakce s BSA nižší, látky byly výrazně agregovány při  $\text{pH} 7,4$  a agregace se prohloubila v případě nízkého  $\text{pH}$ . V tomto případě by mohlo docházet k protonizaci karboxylátových skupin aminokyselin v BSA, jejichž negativní náboje mohou podporovat slabé interakce s amfifilními kationickými Pc při  $\text{pH} 7,4$  (Obr. 36b,c).

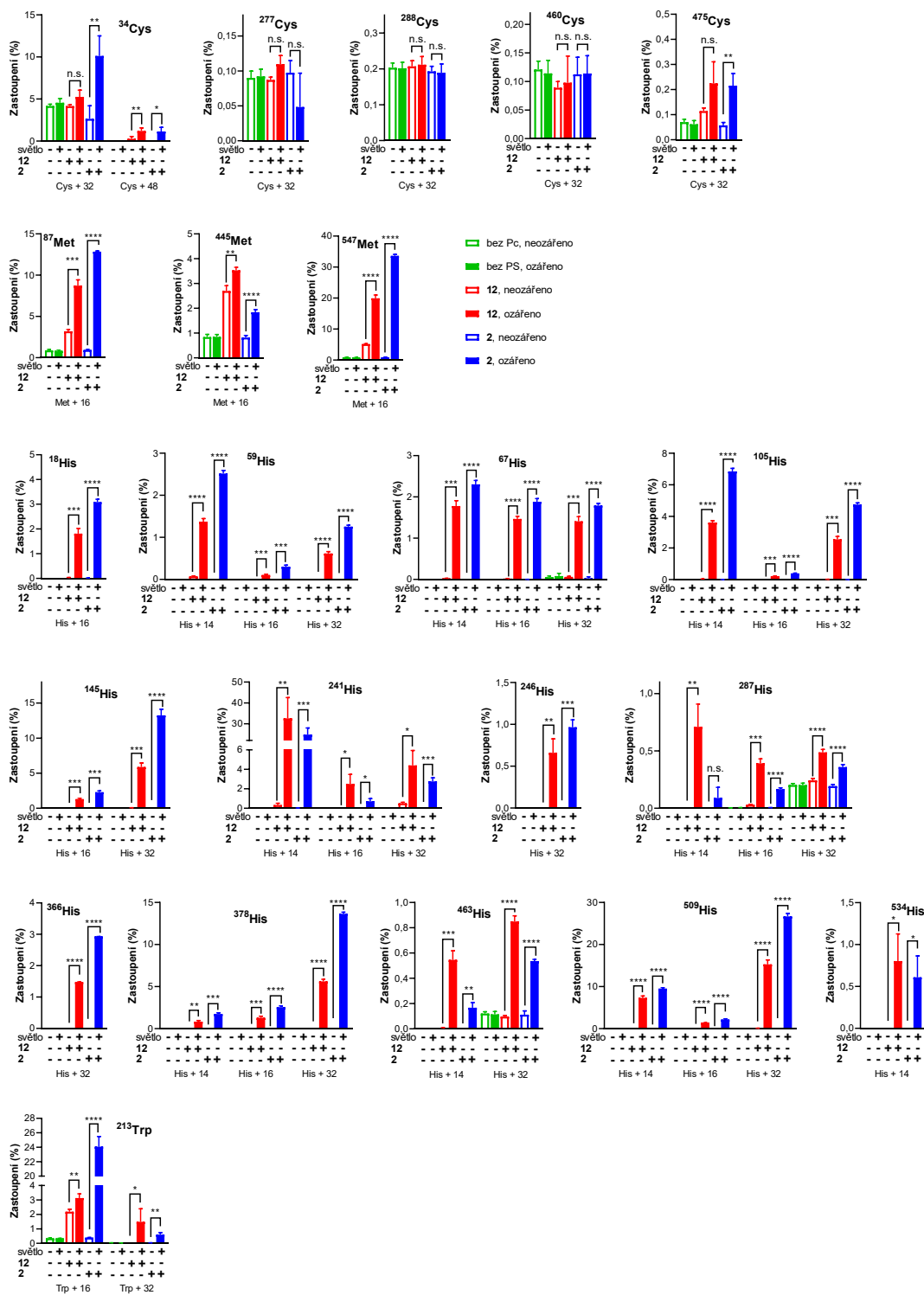
**LC-MS analýza vlivu singletového kyslíku na BSA.** Proteiny jsou obecnými cíli pro singletový kyslík. Z tohoto důvodu byl zkoumán vliv oxidativního poškození BSA při PDT ( $\lambda > 570$  nm,  $12,4 \text{ mW cm}^{-2}$ , 15 min,  $11,2 \text{ J cm}^{-2}$ ) v přítomnosti látek **11** a **2** jako zástupců anionických a kationických derivátů s pomocí LC-MS a následnou kvantitativní analýzou identifikovaných proteinů. Data byla porovnáována s výsledky kontrolních experimentů s neozářeným BSA s PS, ozářeným BSA bez PS a nakonec s neozářeným BSA. Screening byl zaměřen na aminokyseliny, u kterých bylo v minulosti popsáno, že mohou být napadány singletovým kyslíkem např. Cys (cystein), His (histidin), Met (methionin), Tyr (tyrozin) a Trp (tryptofan).<sup>144-147</sup> V ozářených vzorcích obsahujících PS bylo nalezeno množství peptidů s oxidativními změnami (His + 14, His + 16, His + 32, Met + 16, Met + 32, Cys + 32, Cys + 48, Trp + 16, Trp + 32) (Obr. 42).



**Obr. 42.** Modifikace aminokyselin sledované v molekule BSA.

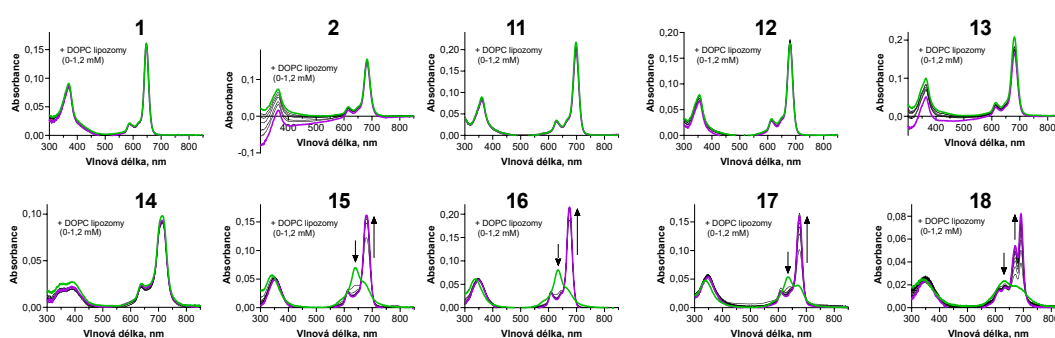
Výskyt těchto modifikací byl výrazně vyšší než v kontrolních vzorcích bez ozáření, ozářených vzorcích bez PS nebo v neozářeném vzorku BSA (Obr. 43). His byl nejcitlivější aminokyselinou, protože téměř všechny His byly oxidativně modifikovány. Ze všech His v molekule BSA jsou <sup>145</sup>His, <sup>241</sup>His, <sup>378</sup>His a <sup>509</sup>His aminokyseliny nejdostupnější pro oxidativní působení singletového kyslíku (Obr. 43), s výskytem modifikací i přes 30 %. Byla pozorována také typická oxidace sulfidu na sulfoxid u Met zbytků (<sup>87</sup>Met, <sup>445</sup>Met, <sup>547</sup>Met). V případě <sup>547</sup>Met byl výskyt této modifikace okolo 35 % (Obr. 43). Další oxidace Met na sulfon byla zanedbatelná a nepřesáhla 0,5 % výskytu

v Met zbytcích. Oxidace Cys na sulfinovou a sulfonovou kyselinu byla signifikantní pouze pro  $^{34}\text{Cys}$ , který je pouze jediným volným Cys v BSA. U ostatních Cys stabilizujících složitou strukturu BSA disulfidickými můstky, nebyla oxidace vůbec pozorována nebo hojnost výskytu byla pod 0,5 % bez signifikantního rozdílu mezi ozářenými a neozářenými vzorky. Hydroxylace Trp (Trp + 16) a následná tvorba formylkynureninu (Trp + 32) byla detekována pouze v případě  $^{213}\text{Trp}$ , ostatní Trp zbytky zůstaly nezměněny. Na rozdíl od literatury<sup>144, 146</sup> nebyly pozorovány žádné změny na Tyr.



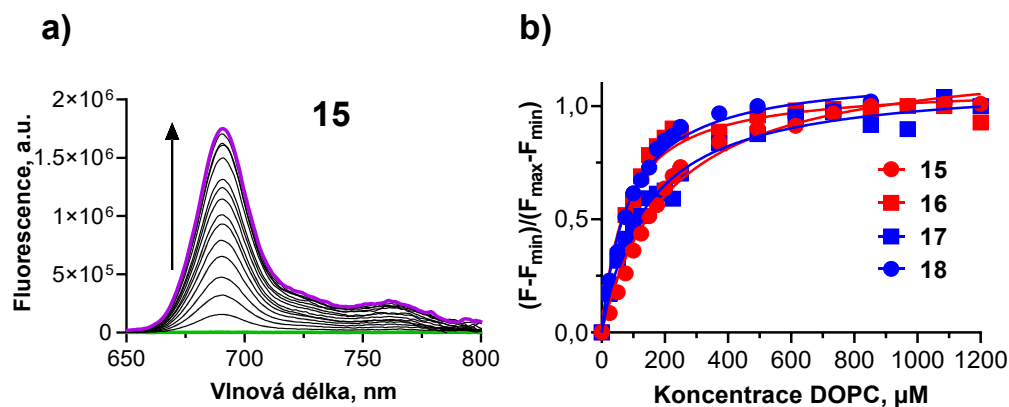
**Obr. 43.** Oxidativní změny na Cys, Met His, Trp aminokyselinových zbytcích v BSA po ozáření s Pc 12 a 2. Byly provedeny čtyři opakovaní experimentu, data byla analyzována Welchovým t-testem. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ . Převzato a upraveno z publikace.<sup>140</sup>

**Interakce s lipozomy.** Lipozomy jsou často používány jako jednoduchý model biomembrány, která může být cílem mnoha lipofilních a amfifilních PS nebo jiných léčiv.<sup>148</sup> V této práci nebyly pozorovány žádné změny v absorpčních nebo fluorescenčních spektrech po přidání DOPC lipozomů k hydrofilním sloučeninám **1**, **2**, **11-14** v PBS, což naznačuje prakticky žádnou interakci (Obr. 44). Na druhou stranu, přidání lipozomů k PBS roztoku agregovaných Pc **15-18** (1  $\mu\text{M}$ ) jednoznačně indukuje monomerizaci, která byla sledována na absorpčních spektrech. Po plném navázání těchto látek do lipozomů došlo také k plnému obnovení fluorescenčních vlastností. Na rozdíl od vazby na BSA, došlo i v případě kationických amfifilních látek **17** a **18** po přidání lipozomů k plné monomerizaci.



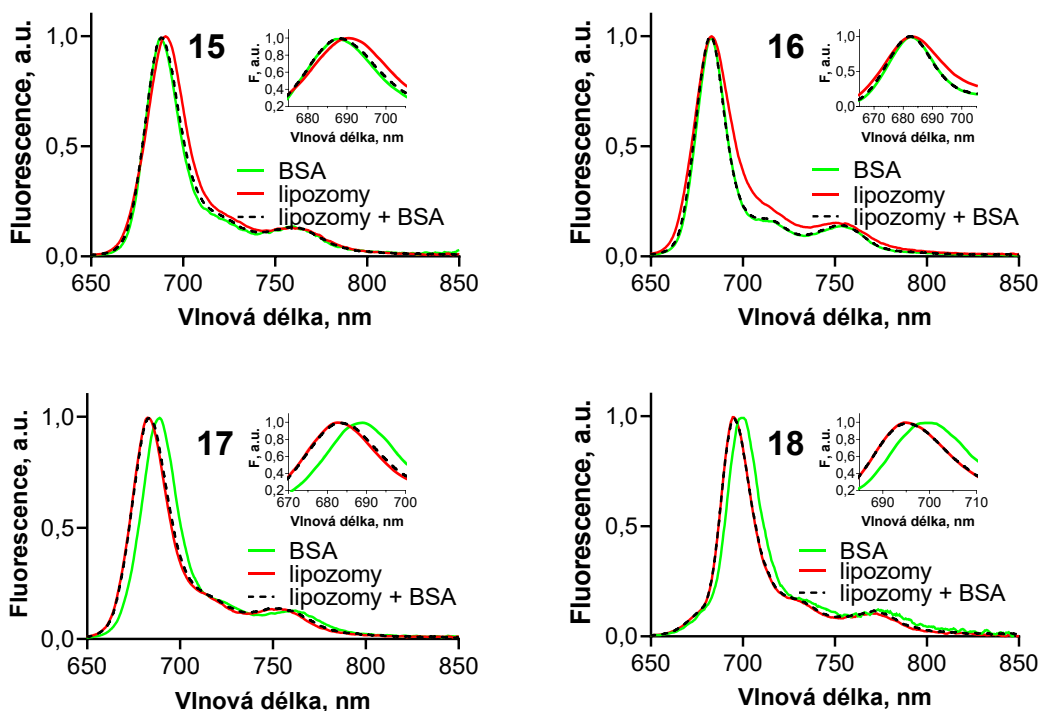
**Obr. 44.** Změna absorpčních spekter pro látky **1**, **2**, **11-18** v PBS (1  $\mu\text{M}$ ) po přidání DOPC lipozomů v koncentraci od 0 mM (zelená) do 1,2 mM (fialová). Změna pozadí u látek **2** a **13** je dána rozdílným rozptylem světla v lipozomální suspenzi. Převzato a upraveno z publikace.<sup>140</sup>

Fluorescenční data z titrací byla poté použita pro výpočet asociačních konstant těchto Pc s DOPC lipidy ( $K_L$ ), které byly určeny jako  $K_L = 4,76 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ,  $1,32 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ,  $7,07 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  a  $1,16 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  pro látky **15**, **16**, **17** a **18** (Obr. 45, Tabulka 3). Ve srovnání s publikovanými údaji jsou tyto hodnoty typické pro asociaci zinečnatých Pc s lipozomy.<sup>149, 150</sup> Hodnoty  $K_L$  nekorelují zcela s hodnotami  $\log P$ , což naznačuje, že i jiné faktory (např. agregační síly v agregátech) mohou ovlivnit interakci s lipozomy.<sup>149, 151</sup>



**Obr. 45.** a) Změna emisních spekter **15** ( $c = 1 \mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$ ) po přidání DOPC lipozomů. b) Vazebné izotermie látek **15-18** ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) při interakci s DOPC lipozomy. Převzato a upraveno z publikace.<sup>140</sup>

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že amfifilní molekuly **15-18** mohou interagovat jak s BSA, tak s lipozomy, proto bylo zajímavé určit jejich preferenci pro daný typ biomolekuly. Pozice emisního maxima látek **15**, **17** a **18** se mírně lišily v případě interakce s BSA nebo s lipozomy (v případě látky **16** emisní spektrum bylo mnohem širší v lipozomech než v BSA), což umožnilo identifikovat, se kterou biomolekulou jsou látky asociované. Emisní spektra Pc v PBS byla měřena nejprve po přidání lipozomů ( $c_{\text{(DOPC)}} = 1,2 \text{ mM}$ , koncentrace, při které byly všechny Pc **15-18** plně spojené s DOPC jako ve výše uvedeném experimentu) a poté byl přidáván roztok BSA ( $35 \mu\text{M}$ , odpovídající množství BSA v SCM používaném při *in vitro* testech). Tato spektra byla následně porovnána se spektry měřenými pouze po přidání BSA (Obr. 46). V dalším experimentu byly přidávány biomolekuly inverzně (první BSA a poté lipozomy), ale výsledný efekt byl stejný. Z výsledků (Obr. 46) je patrné, že anionické Pc **15** a **16** preferují vazbu na BSA. V případě, že byl k lipozomální suspenzi přidán BSA, došlo k navázání těchto látek na BSA. V případě opačného experimentu nedošlo k odstranění z BSA po přidání lipozomů. Opačné chování bylo pozorováno u kationických Pc **17** a **18**, které preferovaly lipozomy před BSA; tj. zůstávaly spojeny s lipidy bez ohledu na přítomnost nebo nepřítomnost BSA. Toto bylo v souladu s jejich poněkud nižší afinitou k BSA a současně vyšší lipofilitou stanovenou jako  $\log P$ , jak bylo ukázáno výše.



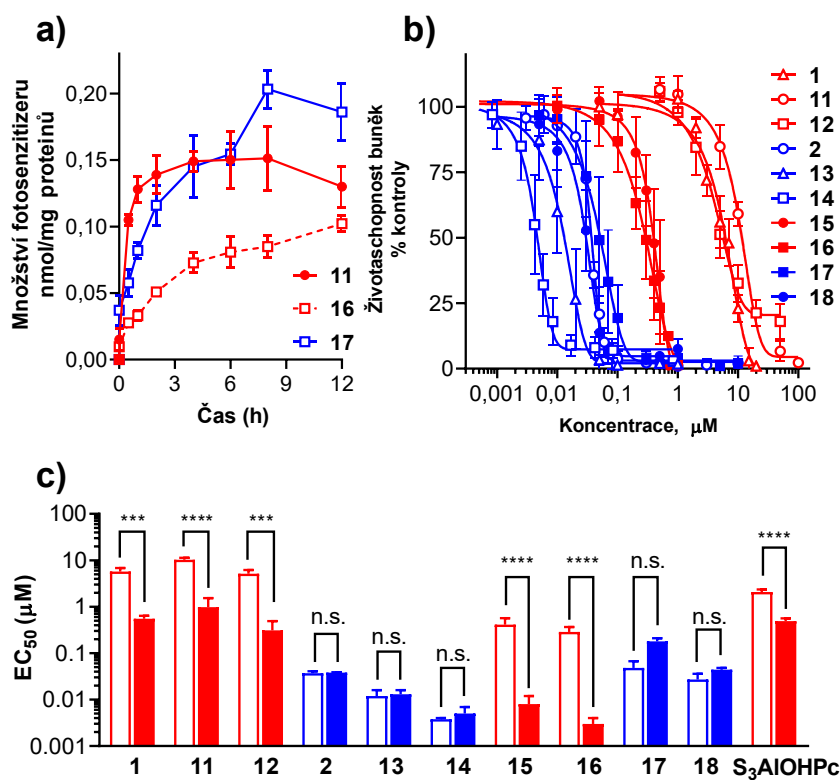
**Obr. 46.** Normalizovaná emisní spektra ( $\lambda_{exc} = 608 \text{ nm}$ ,  $c = 1 \mu\text{M}$  in PBS) Pc **15**, **16**, **17** a **18** v BSA ( $35 \mu\text{M}$ , zelená), v DOPC lipozomech ( $1,2 \text{ mM}$ , červená), a v přítomnosti DOPC po přidání BSA (černá čárkovaně). Vložený obrázek: detail emisního maxima. Převezato a upraveno z publikace.<sup>140</sup>

**Fotodynamická aktivita.** Nejprve byl testován prostup zkoumaných Pc do HeLa buněk v závislosti na čase (Obr. 47a). Závislost měla typický profil dosahující ustáleného stavu přibližně po 12 hodinách. Tento čas byl použit také jako inkubační čas při hodnocení fotodynamické aktivity. Celkové množství látek se obvykle pohybovalo mezi  $0,1$  a  $0,2 \text{ nmol}$  na  $\text{mg}$  proteinu (Tabulka 4) a nemělo významný vztah ke struktuře Pc. Následně byla vyhodnocena fotodynamická aktivita (vyjádřená jako  $\text{EC}_{50}$ ) všech Pc po aktivaci světlem ( $\lambda > 570 \text{ nm}$ ,  $11,2 \text{ J cm}^{-2}$ ) na HeLa buňkách (Obr. 47b), buňkách lidského kolorektálního karcinomu (HCT 116) a buněčné linii lidského karcinomu prsu (MCF-7) (Tabulka 4). Anionické hydrofilní Pc **1**, **11**, **12** byly nejméně aktivní v této sérii, s hodnotami  $\text{EC}_{50}$  (HeLa) přibližně  $5\text{-}10 \mu\text{M}$ , zatímco hydrofilní kationické Pc **2**, **13**, **14** měly o tři řády nižší hodnotu  $\text{EC}_{50}$  v rozmezí  $3,8\text{-}38 \text{ nM}$  (HeLa). Podobně anionické amfifilní sloučeniny **15** a **16** ( $\text{EC}_{50} \sim 350 \text{ nM}$ ) byly přibližně řádově méně aktivní než odpovídající kationické deriváty **17** a **18** ( $\text{EC}_{50} \sim 38 \text{ nM}$ ), což potvrzuje obecný trend vyšší aktivity pro kationické Pc (Obr. 47b). Fotodynamická aktivita získaná na HeLa buňkách byla také potvrzena stejnými tendencemi i na jiných buněčných liniích (MCF-7 a HCT 116). Vlastní toxicita látek, tzn. bez aktivace Pc světlem, byla stanovena na HeLa

buňkách. Tato toxicita všech sloučenin byla velmi nízká a byl pozorován obecný trend nižší toxicity pro anionické Pc ( $TC_{50} > 1\ 000\ \mu\text{M}$ ) než pro kationické Pc ( $TC_{50} \sim 500\ \mu\text{M}$ ). Přestože kationické látky jsou o něco toxičtější bez ozáření než anionické, tak mají vyšší fotodynamickou aktivitu a také mnohem lepší terapeutický poměr  $TC_{50}/EC_{50}$ , který dosáhl hodnoty vyšší než 100 000 pro nejlepší sloučeninu **14** (Tabulka 4). Pro porovnání aktivity hydrofilních anionických Pc **1**, **11**, **12** byl testován také **S<sub>3</sub>AlOHPc** (Photosens<sup>®</sup>, sulfonovaný Pc klinicky používaný pro PDT) za stejných podmínek. Fotodynamická aktivita i toxicita **S<sub>3</sub>AlOHPc** byla srovnatelná s fotodynamickou aktivitou hydrofilních anionických Pc **1**, **11**, **12**, což dobře koreluje s jeho hydrofilní anionickou povahou.

S ohledem na silnou vazbu některých studovaných Pc na BSA byla fotodynamická aktivita všech Pc stanovena také v SFM na HeLa buňkách. Přibližně 10× lepší aktivita v SFM než v SCM byla pozorována pro anionické hydrofilní deriváty **1**, **11**, **12** a téměř o dva řády lepší aktivita byla nalezena u anionických amfifilních látek **15** a **16**. (Obr. 47c, Tabulka 4). Na druhou stranu nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly u kationických látek (**2**, **13**, **14**, **17**, **18**) při použití SCM nebo SFM.





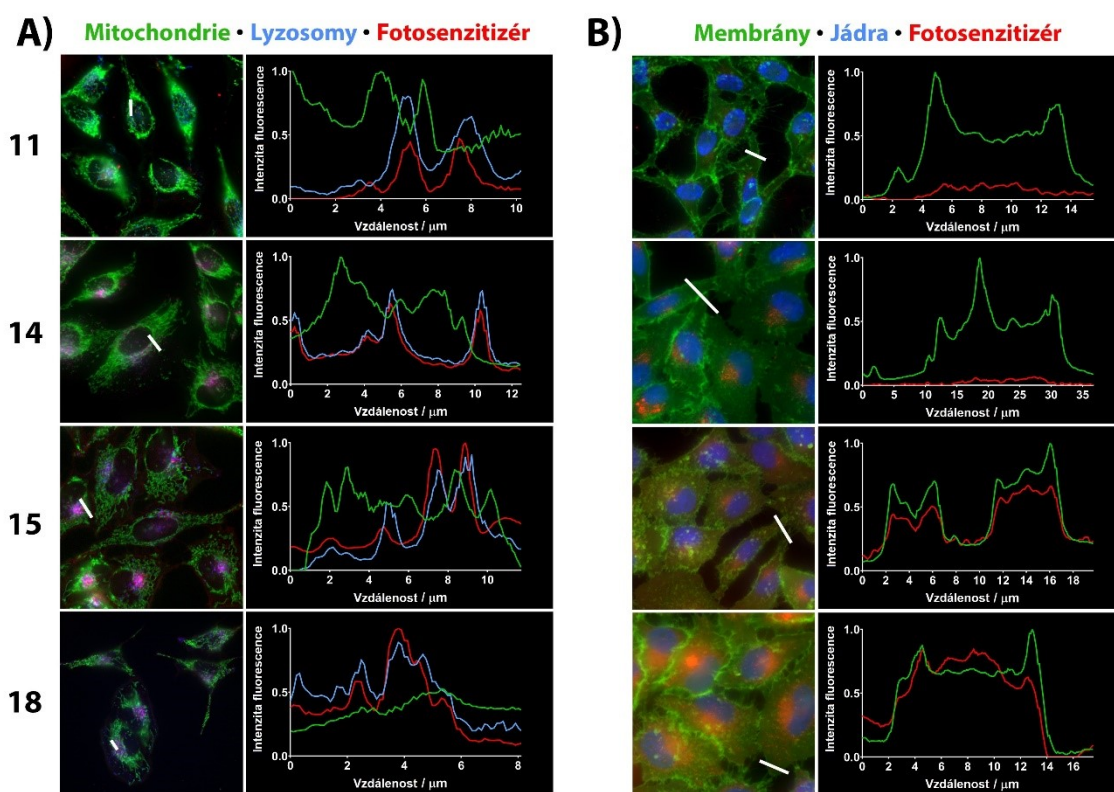
**Obr. 47.** a) Příklad časových profilů prostupu Pc 11, 16 a 17 do HeLa buněk po inkubaci s 4  $\mu\text{M}$  PS. b) Fotodynamická aktivita sloučenin 1, 2, 11-18 na HeLa buňkách v SCM ( $\lambda > 570 \text{ nm}$ ,  $12,4 \text{ mW cm}^{-2}$ , 15 min,  $11,2 \text{ J cm}^{-2}$ ). c)  $\text{EC}_{50}$  hodnoty pro 1, 2, 11-18 a  $\text{S}_3\text{AIOHPc}$  na HeLa buňkách v SCM (prázdný sloupec) a v SFM (plný sloupec). Byly provedeny nejméně 4 nezávislé experimenty, každý ve čtyřech provedeních. n.s.,  $p > 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ . Kationické deriváty jsou nakresleny modře, anionické deriváty jsou nakresleny červeně ve všech grafech. Převzato a upraveno z publikace.<sup>140</sup>

**Tabulka 4** Porovnání toxicity bez ozáření světlem (TC<sub>50</sub>) a fotodynamické aktivity (EC<sub>50</sub>) studovaných Pc na rozdílných buněčných liniích<sup>a</sup>

Sloučenina	Množství PS (nmol/mg proteinu) HeLa	EC <sub>50</sub> (μM)				TC <sub>50</sub> (μM)	TC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub>
		HeLa <sup>b</sup>	Poměr SCM/SFM	HCT 116	MCF-7	HeLa	HeLa
<b>1</b>	0,07	5,7 ± 1,1 (0,55 ± 0,09) <sup>c</sup>	10,36	4,04 ± 0,59	3,01 ± 0,74	> 1500	> 263
<b>2</b>	0,29	0,037 <sup>e</sup> (0,038 ± 0,013)	0,97	0,014 ± 0,001	0,011 ± 0,003	628 <sup>d</sup>	16 972
<b>11</b>	0,15	10,31 ± 1,02 (0,98 ± 0,56)	10,52	16,7 ± 2,65	5,09 ± 1,24	1043 ± 169	101
<b>12<sup>c</sup></b>	0,027	5,16 ± 1,03 (0,31 ± 0,18)	16,49	6,35 ± 0,45	3,47 ± 0,67	> 1500	> 291
<b>13</b>	0,20	0,012 ± 0,004 <sup>f</sup> (0,013 ± 0,005)	0,92	0,0087 ± 0,0002 <sup>f</sup>	0,0053 ± 0,0008 <sup>f</sup>	369 ± 50 <sup>f</sup>	29 916
<b>14</b>	0,20	0,0038 ± 0,0002 <sup>g</sup> (0,0049 ± 0,0019)	0,76	0,0068 ± 0,0035	0,0028 ± 0,00008 <sup>g</sup>	435 ± 26 <sup>g</sup>	114 473
<b>15</b>	0,09	0,41 ± 0,156 (0,0077 ± 0,0036)	51,5	0,615 ± 0,078	0,584 ± 0,088	> 1000	> 2 427
<b>16</b>	0,10	0,29 ± 0,078 (0,0032 ± 0,0009)	95,67	0,453 ± 0,019	0,453 ± 0,026	> 1000	> 3 484
<b>17</b>	0,18	0,048 ± 0,019 (0,12 ± 0,029)	0,27	0,082 ± 0,005	0,021 ± 0,008	> 150 <sup>h</sup>	> 3125
<b>18</b>	0,48	0,027 ± 0,009 (0,044 ± 0,004)	0,61	0,042 ± 0,002	0,035 ± 0,002	> 100 <sup>h</sup>	> 3 703
<b>S<sub>3</sub>AlOHPc</b>	0,11	2,07 ± 0,29 <sup>g</sup> (0,49 ± 0,07)	4,24	1,61 ± 0,12	2,04 ± 0,31	> 1500	> 725

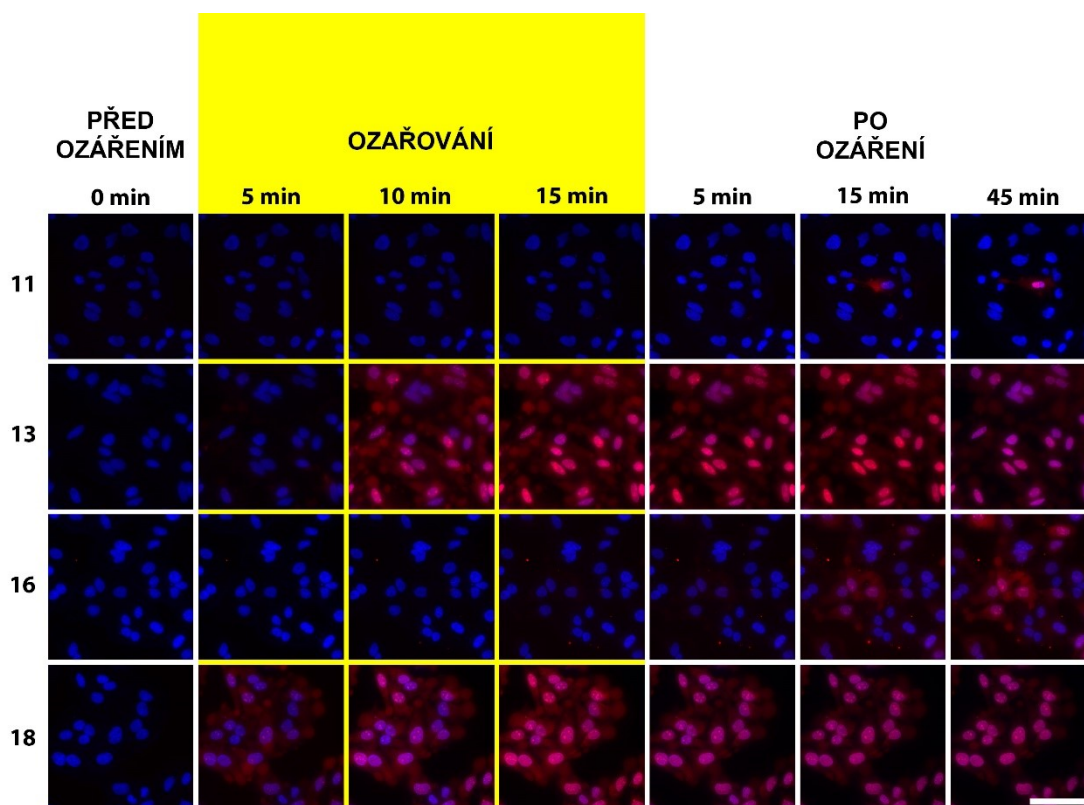
<sup>a</sup>Data jsou prezentovaná jako hodnoty TC<sub>50</sub> nebo EC<sub>50</sub> ± standartní odchylka. Podmínky ozařování: λ > 570 nm, 12,4 mW cm<sup>-2</sup>, 15 min, 11,2 J cm<sup>-2</sup>. Všechna data jsou stanovena v SCM. <sup>b</sup>Hodnoty EC<sub>50</sub> v závorce jsou v SFM. <sup>c</sup>Data z ref. <sup>96</sup>. <sup>d</sup>Data z lit. <sup>48</sup>. <sup>e</sup>Další data získaná pro tuto sloučeninu v literatuře: EC<sub>50</sub> ~ 1 μM (J774 buňky, λ > 600 nm, 48 J cm<sup>-2</sup>, lit. <sup>142</sup>), EC<sub>50</sub> = 4,5 μM (Hep2 cells, λ > 610 nm, 1 J cm<sup>-20</sup>, lit. <sup>47</sup>), TC<sub>50</sub> > 400 μM (V79, Hep2 buňky, lit. <sup>47</sup>). <sup>f</sup>Data z lit. <sup>49</sup>. <sup>g</sup>Data z lit. <sup>129</sup>. <sup>h</sup>Limit rozpustnosti. Sloučeniny precipitovaly nad touto koncentrací.

Po určení aktivity byl za pomoci fluorescenční mikroskopie sledován osud studovaných PS uvnitř HeLa buněk. Všechny studované sloučeniny byly po 12 hodinové inkubaci nalezeny lokalizované v endolyzozomálních váčcích, což je v souladu s dříve publikovanými studiemi zaměřenými na *in vitro* hodnocení PS na bázi Pc.<sup>49, 51, 96, 136</sup> Zatímco anionické a kationické hydrofilní sloučeniny byly lokalizovány v lyzosomech, amfifilní látky byly lokalizovány také v buněčné membráně. Po ozáření byly hydrofilní kationické Pc **2**, **13** a **14** relokalizovány do cytoplazmy a poškodily jadernou membránu již po krátké době od začátku ozařování (Obr. 48). Fluorescenční signál pro anionické hydrofilní látky **1**, **11**, **12** byl v buňkách slabý v porovnání se signálem kationických hydrofilních látek z důvodu vazby na BSA a zhášení excitovaných stavů (pro látku **1**) a také nízkého pH v těchto kyselých organelách vedoucího k protonizaci karboxylátových skupin a agregaci (pro látky **1**, **11**, **12**). Vliv kyselého prostředí byl dobře patrný u látky **11** při sledování v čase, kde signál v buňkách byl zpočátku velmi nízký, ale během prvních minut ozařování došlo k nárůstu červené fluorescence z důvodu prasknutí lyzozomů a zvýšení pH v lokálním prostředí tohoto Pc.



**Obr. 48.** Subcelulární lokalizace látek **11**, **14**, **15** a **18**. Buňky byly obarveny specifickými fluorescenčními sondami: A) mitochondrie a lyzomy B) membrány a jádra. Pruhy na fotografiích označují měřené části příslušných snímků pro profily intenzity. Převzato a upraveno z publikace.<sup>140</sup>

Z důvodu amfifilního charakteru látek **15-18** byly tyto detekovány nejen v endolyzosomech, ale také v buněčné membráně. Během a po ozařování se subcelulární lokalizace amfifilních kationických látek nezměnila, a i po ozáření byly látky **17** a **18** lokalizovány primárně v membranózních strukturách (jako tenká vrstva). Toto bylo plně v souladu s jejich výše nalezenou vysokou afinitou k lipozomálním membránám. Pro látky **15** a **16** byl po ozáření fluorescenční signál nalezen kromě membranózních struktur také difundovaně v cytoplazmě (po jejich uvolnění z lyzosomů). Díky výše popsané silné interakci s BSA (silnější než s lipidy) předpokládáme, že tyto látky jsou uvnitř lyzosomů lokalizovány primárně na BSA, a tím pádem po rozbití lyzosomů nemají tak velkou afinitu k lipofilním membranózním strukturám. Po delším ozařování vzorku docházelo k blednutí signálu díky rozkladu světlem. Propidium jodid, fluorescenční interkalační činidlo, které neprostupuje buněčnou membránou, bylo použito pro vyhodnocení rychlosti a rozsahu poškození ozářených buněk v průběhu ozařování a během prvních minut po ozáření (Obr. 49). Anionický hydrofilní Pc **11** nezpůsobil dostatečné poškození buněčných membrán, protože PI neobarvil buňky ani jádra ve většině buněk ani 45 minut po ozáření. Mnohem vyšší poškození bylo pozorováno u anionického amfifilního Pc **16**. Barvení propidium jodidem bylo detekováno po 15 minutách od ozáření buněk. V důsledku zpoždění výskytu signálu je tento účinek pravděpodobně způsoben procesy indukované buněčné smrti nikoli přímým účinkem singletového kyslíku. Na druhou stranu poškození vyvolané kationickými látkami bylo rychlejší a závažnější. Hydrofilní Pc **13** a amfifilní **18** vyvolaly oxidační poškození membrány, které umožnilo propidium jodidu proniknout do cytoplazmy během prvních 5 minut ozařování s následným barvením jader během dalších 5 minut ozařování. To ukazuje na důsledek přímého významného fotodynamického efektu.



**Obr. 49.** Časový průběh barvení HeLa buněk propidium jodidem v důsledku poškození membrán po aktivaci látek **11**, **13**, **16**, **18** ozářením. Všechna jádra buněk jsou obarvena modrým barvivem Hoechst 33342. Cytoplazma a následně také jádra v buňkách s narušenými membránami jsou barvena červeně propidium jodidem. Měřítko je 100  $\mu\text{m}$ . Převzato a upraveno z publikace.<sup>140</sup>

**Zavěr.** V rámci této druhé části disertační práce byla porovnávána fotodynamická aktivita několika skupin anionických a kationických Pc in vitro. Aktivita mezi těmito skupinami látek se lišila, což je způsobeno několika faktory. Kationické Pc mají mírně vyšší produkci singletového kyslíku než anionické Pc. Negativní náboj u anionických látek není stabilní, karboxylátové skupiny mohou být v kyselém pH protonizovány, a tím dochází k potlačení monomerizace na základě elektrostatických odpuzivých sil. Při pH 4,9, které je typické pro lyzosity, byly všechny anionické Pc agregovány s výrazným snížením fotodynamické aktivity bez ohledu na to, zda byly navázány nebo nenavázány na BSA. To bylo potvrzeno i slabou fluorescencí v lyzosomech in vitro, kdy zvýšení fluorescence nastalo až po ruptuře lyzozomu, čímž došlo ke změně pH v důsledku neutralizace přítokem cytoplazmy. Kationické deriváty se stabilním nábojem nebyly nijak signifikantně ovlivněny změnou pH.

Vazba testovaných Pc na BSA velmi významně ovlivnila aktivitu. Silná vazba s vysokou vazebnou konstantou byla primárně přítomna u anionických hydrofilních látek **1**, **11**, **12**, o něco nižší vazba na BSA byla pozorována u anionických amfifilních látek **15**

a **16**. Naopak nebyla nalezena žádná interakce mezi BSA a kationickými hydrofilními Pc **2**, **13**, **14** a jen velmi slabá interakce byla u amfifilních kationických Pc **17** a **18**. Navíc poslední dvě látky měly mnohem větší preferenci k biomembránám než k BSA, a proto se dalo očekávat že se budou primárně lokalizovat v biomembránách než interagovat s BSA v biologickém prostředí. To bylo také potvrzeno *in vitro*, kdy se signál kationických amfifilních látek **17** a **18** po ozáření relokalizoval z lyzozomů do membrán. Na druhou stranu, signál pro anionické amfifilní Pc **15** a **16** difundoval po uvolnění z lyzozomů do cytoplazmy. Z toho vyplývá, že anionické amfifilní látky zůstaly stále navázány na BSA. Vazba na BSA vedla k výrazně nižší aktivitě všech anionických derivátů **1**, **11**, **12**, **15**, **16** na buňkách, kdy výrazně vyšší hodnoty  $EC_{50}$  byly pozorovány v SCM (obsahujícím 35  $\mu$ M BSA) než v SFM. Tento rozdíl v aktivitě je dán několika faktory. Zaprvé při vazbě na BSA dochází ke zhášení excitovaných stavů anionických Pc. Významně lze tento jev pozorovat u anionického TPyzPz **1**. Zadruhé vazba na BSA může stericky bránit difuzi kyslíku v základním stavu na excitovaný makrocyklus a vede k nižšímu zhášení tripletových stavů kyslíku, jak bylo popsáno na sulfonovaném TPyzPz **5**, na TPPS<sup>136</sup> nebo na dalších Pc a porfyrinech.<sup>98</sup> Při navázání Pc na BSA může také dojít ke zhášení singletového kyslíku molekulou BSA, která je v nejbližším okolí.<sup>98</sup> Fyzikální zhášení singletového kyslíku molekulou BSA bylo také dobře popsáno v literatuře.<sup>146, 152</sup> Z toho důvodu se singletový kyslík neuvolňuje do okolí v dostatečném množství, a tím pádem dochází k redukci poškození biomolekul a organel v buňce. Tento jev lze prokázat omezeným oxidačním poškozením buněčné membrány anionickými Pc, což je potvrzeno pomalým prostupem propidium jodidu do buňky/buněčného jádra. Ve chvíli, kdy bylo BSA eliminováno z inkubačního média (např. u SFM) došlo ke zvýšení množství a schopnosti difuze singletového kyslíku, čímž se stal fotodynamický efekt mnohem destruktivnější. To lze také podpořit dobrými vazebnými vlastnostmi anionických derivátů **15** a **16** na biomembránu v nepřítomnosti BSA, kdy singletový kyslík může ničit přímo biomolekuly v nejbližším okolí a po delší dobu – doba života singletového kyslíku je ve vodě  $\tau_{\Delta} = 3,5 \mu$ s,<sup>153</sup> zatímco v dimyristoylfosfatidylcholinu a v lecitinu (složkách biomembrán), je uváděna přibližně o jeden řád delší ( $\tau_{\Delta} = 36,4 \mu$ s, nebo  $12,2 \mu$ s)<sup>154</sup>. Touto úvahou lze vysvětlit extrémně vyšší fotodynamickou aktivitu látek **15** a **16** *in vitro* na buňky v SFM, než v SCM. Navíc u kationických látek může dojít ke zdvojení účinku – poškození biomembrán, včetně poškození jader. Po rychlém uvolnění z lyzozomů jsou tyto Pc relokalizovány do cytoplazmy a dalších organel, a dochází

k poškození jaderné membrány, což bylo dokázáno barvením jader pomocí propidium jodidu.

Výsledky této práce byly sepsány do publikace: **Kollar, J.**; Machacek. M.; Halaskova, M.; Lenco, J.; Kucera, R.; Demuth, J.; Stekla, M.; Hasonova, K.; Miletin, M.; Novakova, V.; Zimcik; P., Cationic versus anionic phthalocyanines for photodynamic therapy: what a difference the charge makes. *J. Med. Chem.* **2020**, která v době odevzdání disertační práce měla status „revision“.

## 7. ZÁVĚR

Tato disertační práce navazuje na mou diplomovou práci, která se zabývala přípravou anionického TPyzPz **1** s 16 karboxylátovými skupinami na periférii. V průběhu disertační práce pak byly připraveny nové anionické Pc s karboxylátovými skupinami a sulfonovaný TPyzPz. Současně byly v této práci zkoumány různé vlastnosti (fotofyzikální, fyzikálně-chemické, vazebné a biologické), které mohou způsobovat rozdílnou fotodynamickou aktivitu u hydrofilních a amfifilních anionických a kationických PS.

Všechny anionické látky v této disertační práci se vyznačovaly silnou vazbou na sérové proteiny – BSA. Při vazbě na protein dochází ke zhášení excitovaných stavů makrocyklu, a to zejména pokud se jedná o TPyzPz makrocyklus. Navíc vazba na BSA stericky brání difuzi kyslíku v základním stavu k excitovanému makrocyklu, a to vede k nižšímu zhášení tripletových stavů kyslíku. Při navázání makrocyklu na BSA může také dojít ke zhášení singletového kyslíku (ať již fyzikálně nebo chemicky) molekulou BSA, která je v nejbližším okolí. Z tohoto důvodu se singletový kyslík nemusí uvolňovat do okolí v dostatečném množství, a tím pádem dochází k redukci poškození biomolekul a organel v buňce.

Fotodynamická aktivita *in vitro* na HeLa buňkách byla u všech anionických Pc a TPyzPz silně negativně ovlivněna přítomností sérových proteinů v buněčném médiu. V případě použití SFM se fotodynamická aktivita u anionických látek zvýšila o jeden až dva řády oproti aktivitě v SCM. Naopak aktivita kationických látek nebyla nijak ovlivněna přítomností sérových proteinů. Všechny hydrofilní anionické i kationické látky se lokalizovaly v lyzosomech. Pouze amfifilní látky se nacházely jak v lyzosomech, tak v buněčné membráně, a proto byla jejich aktivita mnohem vyšší než u hydrofilních. Dalším faktorem, který ovlivňuje fotodynamickou aktivitu, je vliv pH prostředí. Všechny látky nesoucí na periférii karboxylátové skupiny byly plně agregovány při pH nižším než 5 (odpovídá intralyzomálnímu pH), čímž došlo k potlačení vynikajících fotofyzikálních vlastností. Jedině sulfonovaný TPyzPz **5** nebyl negativně ovlivněn pH prostředí v lyzosomech, k agregaci u něj totiž dochází až při pH okolo 2, což je mimo fyziologické rozmezí. U kationických Pc nedošlo změnou pH prostředí k žádnému ovlivnění fotofyzikálních vlastností.

V obou dílčích částech disertační práce jsme viděli silný negativní vliv vazby anionických látek na sérové proteiny, který se projevil jak na úrovni fotofyzikálních



vlastností (zhášením excitovaných stavů), tak i nižší fotodynamickou aktivitou *in vitro* v porovnání s kationickými látkami. Přestože naše výsledky ukázaly jasně negativní vliv vazby PS na sérové proteiny, v literatuře byly sérové proteiny velmi často diskutovány spíše jako nosiče PS vedoucí ke zvýšení fotodynamické aktivity. Negativní vliv této vazby však prozatím nebyl popsán detailněji.

V budoucích pracích je proto potřeba zohlednit při hledání nových účinných PS nejen jejich strukturní a fotofyzikální vlastnosti, ale také vazebné vlastnosti na endogenní biomolekuly např. na sérové proteiny, které mohou významně ovlivnit fotodynamickou aktivitu jak pozitivně, tak i negativně. Pro hodnocení fotodynamické aktivity je důležité v budoucnu provést také testování fotodynamické aktivity na úrovni *in vivo*, a tím potvrdit závěry, které jsme získali pro anionické látky v *in vitro* studiích.

## 8. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH VĚDECKÝCH A ODBORNÝCH PRACÍ

### Články v impaktovaných časopisech

**Kollar, J.;** Machacek, M.; Jancarova, A.; Kubat, P.; Kucera, R. Miletin, M.; Novakova, V.; Zimcik, P., Effect of bovine serum albumin on the photodynamic activity of sulfonated tetrapyrazinoporphyrazine. *Dyes Pigm.* **2019**, 162, 358-366. IF<sub>2018</sub> = 4,018

*Podíl autora: Příprava cílové struktury TPyzPz fotosenzitizéru, charakterizace fotofyzikálních vlastností a studium vazby TPyzPz na hovězí serový albumin, příprava DOPC lipozomů. Podíl na přípravě textu publikace.*

**Kollar, J.;** Machacek, M.; Halaskova, M.; Lenco, J.; Kucera, R.; Demuth, J.; Stekla, M.; Hasonova, K.; Miletin, M.; Novakova, V.; Zimcik, P., Cationic versus anionic phthalocyanines for photodynamic therapy: what a difference the charge makes. *J. Med. Chem.* **2020** – manuscript submitted, major revisions requested. IF<sub>2018</sub> = 6,054

*Podíl autora: Syntéza nových Pc s karboxylovými skupinami na periferii, charakterizace fotofyzikálních vlastností, studium vazby na BSA, příprava lipozomů a jejich interakce, stanovení časového profilu prostupu látek do buněk, vyhodnocení dat. Podíl na přípravě textu publikace.*

Machacek, M.; **Kollar, J.;** Miletin, M.; Kucera, R.; Kubat, P.; Simunek, T.; Novakova, V.; Zimcik, P., Anionic hexadeca-carboxylate tetrapyrazinoporphyrazine: synthesis and in vitro photodynamic studies of a water-soluble, non-aggregating photosensitizer. *RSC Advances* **2016**, 6 (12), 10064-10077. IF<sub>2018</sub> = 3,049

*Podíl autora: Syntéza cílové struktury TPyzPz fotosenzitizéru, charakterizace fotofyzikálních vlastností. Tato práce vznikla z větší části během přípravy mé diplomové práce, a proto její výsledky nemohou sloužit jako řádný podklad pro udělení titulu Ph.D.*

## **Prezentace vědeckých výsledků formou ústních prezentací a posterů**

**Kollár J.,** Zimčík P., Ústní prezentace: „Synthesis of azaphthalocyanine containing anionic groups.“ *6. Postgraduální a 4. postdoktorandská konference, Hradec Králové, Česká republika, 9. – 10. 2. 2016*

**Kollár J.,** Nováková V., Zimčík P. Poster: „Příprava prekurzorů a ftalocyaninů nesoucích anionické skupiny.“ *Syntéza a analýza léčiv (SAL), Hradec Králové, Česká republika, 22. – 24. 6. 2016*

**Kollár J.,** Macháček M., Miletín M., Nováková V., Zimčík P., Poster: „Synthesis of anionic tetrapyrizinoporphyrazine as photosensitizer for photodynamic therapy” *9<sup>th</sup> International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-9), Nanjing, Čínská lidová republika, 3. – 8. 7. 2016*

**Kollár J.,** Zimčík P. Ústní prezentace: „Synthesis of phthalocyanines containing anionic groups.“ *7. Postgraduální a 5. postdoktorandská konference, Hradec Králové, Česká republika, 7. - 8. 2. 2017*

**Kollár J.,** Macháček M., Miletín M., Nováková V., Zimčík P., Poster: „Synthesis and *in vitro* study of anionic hexadeca-carboxylate tetrapyrizinoporphyrazine as photosensitizer for photodynamic therapy“ *16<sup>th</sup> International Photodynamic Association World Congress-International Photodynamic Association (IPA), Coimbra, Portugalsko 8. – 13. 6. 2017*

**Kollár J.,** Jančárová A., Macháček M., Zimčík P. Poster: „Synthesis and study of photodynamic and photophysical properties of sulfonated azaphthalocyanines.” *Liblice 2017, Lázně Bělohrad, Česká republika, 3. - 5. 9. 2017*

**Kollár J.,** Jančárová A., Macháček M., Zimčík P. Ústní prezentace: „Synthesis of new sulfonated azaphthalocyanine and its photophysical and photodynamic properties.“ *8. Postgraduální a 6. postdoktorandská konference, Hradec Králové, Česká republika, 24. - 25. 1. 2018*

**Kollár J.,** Jančárová A., Macháček M., Miletín M., Nováková V., Zimčík P. Poster: „Synthesis and study of photophysical properties and photodynamic activity of new

sulfonated tetrapyrizinoporphyrazine as photosensitizer.” *10. International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-10), Mnichov, Německo, 1. – 6. 7. 2018*

**Kollár J.,** Zimčík P. Poster: „Synthesis of symmetrical and unsymmetrical anionic phthalocyanines for photodynamic therapy.” *Liblice 2018, Lázně Bělohrad, Česká republika, 2.- 4. 9. 2018*

**Kollár J.,** Macháček M., Zimčík P., Ústní prezentace: „Synthesis of symmetrical and unsymmetrical anionic phthalocyanines for photodynamic therapy.“ *9. Postgraduální a 7. postdoktorandská konference, Hradec Králové, Česká republika, 23. - 24. 1. 2019*

**Kollár J.,** Macháček M., Zimčík P., Poster: „Effect of bovine serum albumin on photodynamic activity of new anionic and cationic phthalocyanines“. *XIII. International Conference "Synthesis and Application of Porphyrins and Their Analogues", Kostroma, Rusko, 24. – 27. 6. 2019*

**Kollár J.,** Macháček M., Halašková M., Demuth J., Zimčík P. Poster: „Effect of bovine serum albumin on photodynamic activity of new symmetrical and unsymmetrical phthalocyanines”. *Liblice 2019, Špindlerův Mlýn, Česká republika, 6. – 8. 11. 2019*

**Kollár J.,** Halašková M., Macháček M., Zimčík P. Ústní prezentace: Anionic and cationic phthalocyanines for photodynamic therapy and their interaction with bovine serum albumin. *10. Postgraduální a postdoktorandská vědecká konference, Hradec Králové, Česká republika, 22. – 23. 1. 2020*

## 9. GRANTY, VÝZKUMNÉ STÁŽE A OCENĚNÍ

Grantová agentura Univerzity Karlovy

Číslo projektu: **1060216**

Hlavní řešitel: Mgr. Jan Kollár

Název projektu: „Syntéza anionických derivátů ftalocyaninů jako potenciálních fotodynamicky aktivních látek.“

Grantová agentura Univerzity Karlovy

Číslo projektu: **1182313**

Hlavní řešitel: Mgr. Antonín Cídlina

Spoluřešitel: Mgr. Jan Kollár

Název projektu: „Studium vlivu strukturálních faktorů na účinnost intramolekulárního přenosu náboje u azaftalocyaninů.“

Grantová agentura Univerzity Karlovy

Číslo projektu: **1620219**

Hlavní řešitel: Mgr. Marie Halašková

Spoluřešitel: Mgr. Jan Kollár

Název projektu: „Komplexní analýza biologických vlastností originálních fotodynamicky aktivních hydrofilních a amfifilních anionických ftalocyaninových derivátů.“

Grantová agentura České republiky

Číslo projektu: **13-27761S**

Hlavní řešitel: prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.

Člen kolektivu: Mgr. Jan Kollár

Název projektu: „Vývoj nových fotosenzitizérů pro fotodynamickou terapii a výzkum jejich mechanismu působení na buněčné úrovni.“

Grantová agentura České republiky

Číslo projektu: **17-19094S**

Hlavní řešitel: prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.

Člen kolektivu: Mgr. Jan Kollár

Název projektu: „Azaftalocyaniny - nefluoreskující zhášedce pro DNA hybridizační sondy.“

Grantová agentura České republiky

Číslo projektu: **19-14758Y**

Hlavní řešitel: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Člen kolektivu: Mgr. Jan Kollár

Název projektu: Nové fotosensitizéry pro fotodynamickou terapii zaměřenou na cévy

Grantová agentura České republiky

Číslo projektu: **20-09212S**

Hlavní řešitel: prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.

Člen kolektivu: Mgr. Jan Kollár

Název projektu: Využití supramolekulárních interakcí ke zlepšení fotodynamických vlastností fotosensitizérů

### Výzkumné stáže

**2018** „Universität Kassel, Institute of Chemistry ” (Kassel, Německo) – Příprava azaftalocyaninů ze skupiny dibenzochinoxalinoporfyrainů s objemnými substituenty na periferii (tri(*p*-tolyl)propynylové skupiny)

Vedoucí práce: Prof. Rüdiger Faust (1. 2. 2018 - 16. 7. 2018 - 5,5 měsíce)

### Ocenění

**2019** - Cena za nejlepší studentský poster na konferenci – *XIII. International Conference "Synthesis and Application of Porphyrins and Their Analogues* v Kostromě, Rusko  
Prezentace výsledků s názvem: „Effect of bovine serum albumin on photodynamic activity of new anionic and cationic phthalocyanines“



## 10. SEZNAM LITERATURY

1. Kwiatkowski, S.; Knap, B.; Przystupski, D.; Saczko, J.; Kedzierska, E.; Knap-Czop, K.; Kotlinska, J.; Michel, O.; Kotowski, K.; Kulbacka, J., Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *106*, 1098-1107.
2. Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Mroz, P.; Nowis, D.; Piette, J.; Wilson, B. C.; Golab, J., Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA-Cancer J. Clin.* **2011**, *61* (4), 250-281.
3. Juarranz, A.; Jaen, P.; Sanz-Rodriguez, F.; Cuevas, J.; Gonzalez, S., Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin. Transl. Oncol.* **2008**, *10* (3), 148-154.
4. Ackroyd, R.; Kelty, C.; Brown, N.; Reed, M., The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74* (5), 656-669.
5. Yano, S.; Hirohara, S.; Obata, M.; Hagiya, Y.; Ogura, S.-i.; Ikeda, A.; Kataoka, H.; Tanaka, M.; Joh, T., Current states and future views in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol., C* **2011**, *12* (1), 46-67.
6. Weishaupt, K. R.; Gomer, C. J.; Dougherty, T. J., Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. *Cancer Res.* **1976**, *36* (7 Part 1), 2326-2329.
7. Zimcik, P.; Miletin, M., Photodynamic therapy. In *Dyes and Pigments: New Research*, Lang, A. R., Ed. Nova Science Publishers, Inc.: New York, 2009; pp 1-62.
8. Gray, M. J.; Lipson, R.; Maeck, J. V. S.; Parker, L.; Romeyn, D., Use of hematoporphyrin derivative in detection and management of cervical cancer: A preliminary report. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1967**, *99* (6), 766-771.
9. Lipson, R. L.; Baldes, E. J.; Olsen, A. M., The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J. Natl. Cancer Inst.* **1961**, *26* (1), 1-11.
10. Dougherty, T. J.; Kaufman, J. E.; Goldfarb, A.; Weishaupt, K. R.; Boyle, D.; Mittleman, A., Photoradiation therapy for treatment of malignant-tumors. *Cancer Res.* **1978**, *38* (8), 2628-2635.

11. Zhang, J.; Jiang, C. S.; Longo, J. P. F.; Azevedo, R. B.; Zhang, H.; Muehlmann, L. A., An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharm. Sin. B* **2018**, *8* (2), 137-146.
12. van Straten, D.; Mashayekhi, V.; de Bruijn, H. S.; Oliveira, S.; Robinson, D. J., Oncologic photodynamic therapy: Basic principles, current clinical status and future directions. *Cancers* **2017**, *9* (2), 1-54.
13. Sternberg, E. D.; Dolphin, D.; Bruckner, C., Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron* **1998**, *54* (17), 4151-4202.
14. Dabrowski, J. M.; Arnaut, L. G., Photodynamic therapy (PDT) of cancer: From local to systemic treatment. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14* (10), 1765-1780.
15. Oleinick, N. L.; Morris, R. L.; Belichenko, I., The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: What, where, why, and how. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1* (1), 1-21.
16. Oniszczyk, A.; Wojtunik-Kulesza, K. A.; Oniszczyk, T.; Kasprzak, K., The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *83*, 912-929.
17. Kelty, C. J.; Brown, N. J.; Reed, M. W. R.; Ackroyd, R., The use of 5-aminolaevulinic acid as a photosensitiser in photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1* (3), 158-168.
18. Battersby, A. R., Tetrapyrroles: The pigments of life. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17* (6), 507-526.
19. Dąbrowski, J. M.; Pucelik, B.; Regiel-Futyra, A.; Brindell, M.; Mazuryk, O.; Kyzioł, A.; Stochel, G.; Macyk, W.; Arnaut, L. G., Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *325*, 67-101.
20. Abrahamse, H.; Hamblin, M. R., New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 347-364.
21. Moriwaki, S. I.; Misawa, J.; Yoshinari, Y.; Yamada, I.; Takigawa, M.; Tokura, Y., Analysis of photosensitivity in Japanese cancer-bearing patients receiving photodynamic therapy with porfimer sodium (Photofrin<sup>TM</sup>). *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2001**, *17* (5), 241-243.
22. Hamblin, M. R., Photodynamic therapy for cancer: What's past is prologue. *Photochem. Photobiol.* **2020**, in press, doi: 10.1111/php.13190.



23. Bryce, R., Burns after photodynamic therapy: Drug point gives misleading impression of incidence of burns with temoporfin (Foscan). *BMJ [Br. Med. J.]* **2000**, *320* (7251), 1731.
24. Scott, L. J.; Goa, K. L., Verteporfin. *Drugs Aging* **2000**, *16* (2), 139-146.
25. Gao, Y.; Yu, T.; Zhang, Y.; Dang, G., Anti-VEGF monotherapy versus photodynamic therapy and anti-VEGF combination treatment for neovascular age-related macular degeneration: A meta-analysis. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **2018**, *59* (10), 4307-4317.
26. Bonnett, R., Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24* (1), 19-33.
27. Wang, S.; Bromley, E.; Xu, L.; Chen, J. C.; Keltner, L., Talaporfin sodium. *Expert Opin. Pharmacother.* **2010**, *11* (1), 133-140.
28. Mazor, O.; Brandis, A.; Plaks, V.; Neumark, E.; Rosenbach - Belkin, V.; Salomon, Y.; Scherz, A., WST11, A novel water - soluble bacteriochlorophyll derivative; Cellular uptake, pharmacokinetics, biodistribution and vascular - targeted photodynamic activity using melanoma tumors as a model. *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81* (2), 342-351.
29. ten Tije, A. J.; Verweij, J.; Loos, W. J.; Sparreboom, A., Pharmacological effects of formulation vehicles: implications for cancer chemotherapy. *Clin. Pharmacokinet.* **2003**, *42* (7), 665-685.
30. European Medicines Agency - Public summary of opinion on orphan designation 5,10,15,20-tetrakis(2,6-difluoro-3-N-methylsulfamoylphenyl)bacteriochlorin for the treatment of biliary tract cancer. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/orphan-designation/eu/3/15/1470-public-summary-positive-opinion-orphan-designation-5101520-tetrakis26-difluoro-3-n\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/orphan-designation/eu/3/15/1470-public-summary-positive-opinion-orphan-designation-5101520-tetrakis26-difluoro-3-n_en.pdf) (staženo 9. 5. 2020).
31. Ali, H.; van Lier, J. E., 16 Porphyrins and Phthalocyanines as Photosensitizers and Radiosensitizers. In *Handbook of Porphyrin Science (Volume 4) With Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine*, World Scientific: 2010; pp 1-119.
32. Morton, C.; Brown, S.; Collins, S.; Ibbotson, S.; Jenkinson, H.; Kurwa, H.; Langmack, K.; McKenna, K.; Moseley, H.; Pearse, A., Guidelines for topical photodynamic therapy: Report of a workshop of the British Photodermatology Group. *Br. J. Dermatol.* **2002**, *146* (4), 552-567.

33. Gomes, A. T.; Neves, M. G.; Cavaleiro, J. A., Cancer, photodynamic therapy and porphyrin-type derivatives. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2018**, *90* (1), 993-1026.
34. U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Metvixia NDA21-415 approval letter. [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2004/021415s000\\_Metvixia\\_Aprov.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2004/021415s000_Metvixia_Aprov.pdf) (staženo 9. 5. 2020).
35. Fargnoli, M. C.; Peris, K., Photodynamic therapy for basal cell carcinoma. *Future Oncol.* **2015**, *11* (22), 2991-2996.
36. U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Cysview NDA 22555 approval letter. [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/applletter/2010/022555s000ltr.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/applletter/2010/022555s000ltr.pdf) (staženo 9. 5. 2020).
37. Moussaron, A.; Arnoux, P.; Vanderesse, R.; Sibille, E.; Chaimbault, P.; Frochot, C., Lipophilic phthalocyanines for their potential interest in photodynamic therapy: Synthesis and photo-physical properties. *Tetrahedron* **2013**, *69* (47), 10116-10122.
38. Donzello, M. P.; Ercolani, C.; Novakova, V.; Zimcik, P.; Stuzhin, P. A., Tetrapyrazinoporphyrazines and their metal derivatives. Part I: Synthesis and basic structural information. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *309*, 107-179.
39. Novakova, V.; Donzello, M. P.; Ercolani, C.; Zimcik, P.; Stuzhin, P. A., Tetrapyrazinoporphyrazines and their metal derivatives. Part II: Electronic structure, electrochemical, spectral, photophysical and other application related properties. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *361*, 1-73.
40. Nevin, W. A.; Liu, W.; Lever, A., Dimerisation of mononuclear and binuclear cobalt phthalocyanines. *Can. J. Chem.* **1987**, *65* (4), 855-858.
41. Lagorio, M. G.; Dicio, L. E.; San Román, E., Visible and near-IR spectroscopic and photochemical characterization of substituted metallophthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol., A* **1993**, *72* (2), 153-161.
42. Zimcik, P.; Malkova, A.; Hrubá, L.; Miletin, M.; Novakova, V., Bulky 2, 6-diphenylphenylsulfanyl substituents efficiently inhibit aggregation in phthalocyanines and tetrapyrazinoporphyrazines and control their photophysical and electrochemical properties. *Dyes Pigm.* **2017**, *136*, 715-723.

43. Lau, J. T. F.; Lo, P.-C.; Fong, W.-P.; Ng, D. K. P., Preparation and photodynamic activities of silicon(IV) phthalocyanines substituted with permethylated  $\beta$ -cyclodextrins. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17* (27), 7569-7577.
44. Silva, E. P. O.; Santos, E. D.; Gonçalves, C. S.; Cardoso, M. A. G.; Soares, C. P.; M. Beltrame, J., Zinc phthalocyanine-conjugated with bovine serum albumin mediated photodynamic therapy of human larynx carcinoma. *Laser Phys.* **2016**, *26* (10), 105601.
45. Çakır, V.; Göksel, M.; Durmuş, M.; Biyiklioglu, Z., Synthesis and photophysicochemical properties of novel water soluble phthalocyanines. *Dyes Pigm.* **2016**, *125*, 414-425.
46. Lau, J. T. F.; Lo, P. C.; Tsang, Y. M.; Fong, W. P.; Ng, D. K. P., Unsymmetrical beta-cyclodextrin-conjugated silicon(IV) phthalocyanines as highly potent photosensitisers for photodynamic therapy. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (34), 9657-9659.
47. Liu, W.; Jensen, T. J.; Fronczek, F. R.; Hammer, R. P.; Smith, K. M.; Vicente, M. G. H., Synthesis and cellular studies of nonaggregated water-soluble phthalocyanines. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (4), 1033-1041.
48. Makhseed, S.; Machacek, M.; Alfadly, W.; Tuhl, A.; Vinodh, M.; Simunek, T.; Novakova, V.; Kubat, P.; Rudolf, E.; Zimcik, P., Water-soluble non-aggregating zinc phthalocyanine and *in vitro* studies for photodynamic therapy. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (95), 11149-11151.
49. Ghazal, B.; Machacek, M.; Shalaby, M. A.; Novakova, V.; Zimcik, P.; Makhseed, S., Phthalocyanines and tetrapyrizinoporphyrazines with two cationic donuts: High photodynamic activity as a result of rigid spatial arrangement of peripheral substituents. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (14), 6060-6076.
50. Li, X.-S.; Guo, J.; Zhuang, J.-J.; Zheng, B.-Y.; Ke, M.-R.; Huang, J.-D., Highly positive-charged zinc(II) phthalocyanine as non-aggregated and efficient antifungal photosensitizer. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (11), 2386-2389.
51. Brilkina, A. A.; Dubasova, L. V.; Sergeeva, E. A.; Pospelov, A. J.; Shilyagina, N. Y.; Shakhova, N. M.; Balalaeva, I. V., Photobiological properties of phthalocyanine photosensitizers Photosens, Holosens and Phthalosens: A comparative *in vitro* analysis. *J. Photochem. Photobiol., B* **2019**, *191*, 128-134.
52. Venkatramaiah, N.; Pereira, P. M. R.; Almeida Paz, F. A.; Ribeiro, C. A. F.; Fernandes, R.; Tome, J. P. C., Dual functionality of phosphonic-acid-appended

phthalocyanines: Inhibitors of urokinase plasminogen activator and anticancer photodynamic agents. *Chem. Commun.* **2015**, 51 (85), 15550-15553.

53. Li, H.; Jensen, T. J.; Fronczek, F. R.; Vicente, M. G., Syntheses and properties of a series of cationic water-soluble phthalocyanines. *J. Med. Chem.* **2008**, 51 (3), 502-511.

54. Silva, A. R. A.; Simioni, A. R.; Tedesco, A. C., Photophysical and complexation studies of chloro-aluminum phthalocyanine with beta-cyclodextrin and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2011**, 11 (5), 4046-4055.

55. Ribeiro, A. O.; Tomé, J. P.; Neves, M. G.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A.; Serra, O. A.; Torres, T., First phthalocyanine- $\beta$ -cyclodextrin dyads. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47 (34), 6129-6132.

56. Do Nascimento, F.; Manieri, T.; Cerchiaro, G.; Ribeiro, A., Synthesis of unsymmetrical phthalocyanine derivatives and their interaction with mammary MCF7 cells. *Dyes Pigm.* **2013**, 99 (2), 316-322.

57. Zhao, Y.; Ying, J.-W.; Sun, Q.; Ke, M.-R.; Zheng, B.-Y.; Huang, J.-D., A novel silicon (IV) phthalocyanine-oligopeptide conjugate as a highly efficient photosensitizer for photodynamic antimicrobial therapy. *Dyes Pigm.* **2020**, 172, 107834.

58. Li, D.; Hu, Q.-Y.; Wang, X.-Z.; Li, X.; Hu, J.-Q.; Zheng, B.-Y.; Ke, M.-R.; Huang, J.-D., A non-aggregated silicon (IV) phthalocyanine-lactose conjugate for photodynamic therapy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, 127164.

59. Li, X.; Jeong, K.; Lee, Y.; Guo, T.; Lee, D.; Park, J.; Kwon, N.; Na, J.-H.; Hong, S. K.; Cha, S.-S.; Huang, J.-D.; Choi, S.; Kim, S.; Yoon, J., Water-soluble phthalocyanines selectively bind to albumin dimers: A green approach toward enhancing tumor-targeted photodynamic therapy. *Theranostics* **2019**, 9 (22), 6412-6423.

60. Claessens, C. G.; Hahn, U.; Torres, T., Phthalocyanines: From outstanding electronic properties to emerging applications. *Chem. Rec.* **2008**, 8 (2), 75-97.

61. Petrik, P.; Zimcik, P.; Kopecky, K.; Musil, Z.; Miletin, M.; Loukotova, V., Protonation and deprotonation of nitrogens in tetrapyrazinoporphyrazine macrocycles. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2007**, 11 (7), 487-495.

62. Solovyov, K. N.; Borisevich, E. A., Intramolecular heavy-atom effect in the photophysics of organic molecules. *Phys.-Usp.* **2005**, 48 (3), 231-253.

63. Tuhl, A.; Makhseed, S.; Zimcik, P.; Al-Awadi, N.; Novakova, V.; Samuel, J., Heavy metal effects on physicochemical properties of non-aggregated azaphthalocyanine derivatives. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2012**, *16* (7-8), 817-825.
64. Novakova, V.; Reimerova, P.; Svec, J.; Suchan, D.; Miletin, M.; Rhoda, H. M.; Nemykin, V. N.; Zimcik, P., Systematic investigation of phthalocyanines, naphthalocyanines, and their aza-analogues. Effect of the isosteric aza-replacement in the core. *Dalton Trans.* **2015**, *44* (29), 13220-13233.
65. Mack, J.; Kobayashi, N., Low symmetry phthalocyanines and their analogues. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (2), 281-321.
66. Cidlina, A.; Pausimova, Z.; Miletin, M.; Zimcik, P.; Novakova, V., The effect of substituents at alkylsulfanyl/arylsulfanyl non-peripherally substituted phthalocyanines: Spectral and photophysical properties, basicity and photostability. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2015**, *19* (10), 1095-1106.
67. Nemykin, V. N.; Lukyanets, E. A., The key role of peripheral substituents in the chemistry of phthalocyanines. In *Handbook of Prophyrin Science*, Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R., Eds. World Scientific: Singapore, 2010; Vol. 3, pp 1-323.
68. Eu, S.; Katoh, T.; Umeyama, T.; Matano, Y.; Imahori, H., Synthesis of sterically hindered phthalocyanines and their applications to dye-sensitized solar cells. *Dalton Trans.* **2008**, (40), 5476-5483.
69. Lochman, L.; Machacek, M.; Miletin, M.; Uhlirova, S.; Lang, K.; Kirakci, K.; Zimcik, P.; Novakova, V., Red-emitting fluorescence sensors for metal cations: The role of counteranions and sensing of SCN<sup>-</sup> in biological materials. *ACS Sens.* **2019**, *4* (6), 1552-1559.
70. Cidlina, A.; Miletin, M.; Fathi-Rasekh, M.; Nemykin, V. N.; Zimcik, P.; Novakova, V., OFF-ON-OFF Red-emitting fluorescent indicators for a narrow pH window. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (8), 1795-1804.
71. Ali, H.; van Lier, J. E., An easy route for the synthesis of pyrazine-2, 3-dicarbonitrile 5, 6-bis-substituted derivatives using a palladium catalyst. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (36), 4824-4827.
72. Zimcik, P.; Novakova, V.; Miletin, M.; Kopecky, K., Azaphthalocyanines containing pyrazine rings with focus on the alkylheteroatom, aryl and heteroaryl substitution and properties important in photodynamic therapy. *Macroheterocycles* **2008**, *1* (1), 21-29.

73. Linstead, R.; Noble, E.; Wright, J., 187. Phthalocyanines. Part IX. Derivatives of thiophen, thionaphthen, pyridine, and pyrazine, and a note on the nomenclature. *J. Chem. Soc.* **1937**, 911-921.
74. Tomoda, H.; Saito, S.; Ogawa, S.; Shiraishi, S., Synthesis of phthalocyanines from phthalonitrile with organic strong bases. *Chem. Lett.* **1980**, *9* (10), 1277-1280.
75. Novakova, V.; Miletin, M.; Kopecky, K.; Franzová, Š.; Zimcik, P., Synthesis of unsymmetrical alkyloxy/aryloxy-azaphthalocyanines based on a transesterification reaction. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011* (29), 5879-5886.
76. Wöhrle, D.; Eskes, M.; Shigehara, K.; Yamada, A., A simple synthesis of 4,5-disubstituted 1,2-dicyanobenzenes and 2,3,9,10,16,17,23,24-octasubstituted phthalocyanines. *Synthesis* **1993**, *1993* (2), 194-196.
77. Ng, A. C. H.; Li, X. Y.; Ng, D. K. P., Synthesis and photophysical properties of nonaggregated phthalocyanines bearing dendritic substituents. *Macromolecules* **1999**, *32* (16), 5292-5298.
78. Stuzhin, P. A.; Khelevina, O. G., Azaporphyrins: Structure of the reaction centre and reactions of complex formation. *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *147*, 41-86.
79. Mørkved, E. H.; Kjösen, H.; Ossletten, H.; Erchak, N., Syntheses of octa (dialkylamino) azaphthalocyanines. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **1999**, *3* (6 - 7), 417-423.
80. Nemykin, V. N.; Dudkin, S. V.; Dumoulin, F.; Hirel, C.; Gurek, A. G.; Ahsen, V., Synthetic approaches to asymmetric phthalocyanines and their analogues. *Arkivoc* **2014**, (i), 142-204.
81. Dahlen, M. A., The phthalocyanines a new class of synthetic pigments and dyes. *Ind. Eng. Chem.* **1939**, *31* (7), 839-847.
82. Nyman, E. S.; Hynninen, P. H., Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol., B* **2004**, *73* (1-2), 1-28.
83. Vlasova, E. A.; Hessenauer-Ilicheva, N.; Salnikov, D. S.; Kudrik, E. V.; Makarov, S. V.; van Eldik, R., Kinetics and mechanism of the Co(II)-assisted oxidation of L-ascorbic acid by dioxygen and nitrite in aqueous solution. *Dalton Trans.* **2009**, (47), 10541-10549.
84. Donzello, M. P.; Ou, Z.; Dini, D.; Meneghetti, M.; Ercolani, C.; Kadish, K. M., Tetra-2,3-pyrazinoporphyrazines with externally appended pyridine rings. 2. Metal

- complexes of tetrakis-2,3-[5,6-di(2-pyridyl)pyrazino]porphyrazine: Linear and nonlinear optical properties and electrochemical behavior. *Inorg. Chem.* **2004**, *43* (26), 8637-8648.
85. Efimova, S. V.; Koifman, O. I.; Bykova, V. V.; Lukyanov, I. Y.; Sotsky, V. V.; Usol'tseva, N. V., Synthesis and mesomorphic properties of substituted pyrazinoporphyrazines. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **2012**, *553*, 66-71.
86. De La Torre, G.; Nicolau, M.; Torres, T., Phthalocyanines: Synthesis, supramolecular organization, and physical properties. In *Supramolecular photosensitive and electroactive materials*, Nalwa, H. S., Ed. Academic Press: New York, 2001; pp 1-111.
87. McKeown, N. B., Phthalocyanine materials: Synthesis, structure and function Cambridge University Press: Cambridge, 1998.
88. Vachova, L.; Novakova, V.; Kopecky, K.; Miletin, M.; Zimcik, P., Effect of intramolecular charge transfer on fluorescence and singlet oxygen production of phthalocyanine analogues. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (38), 11651-11656.
89. Novakova, V.; Zimcik, P.; Miletin, M.; Vachova, L.; Kopecky, K.; Lang, K.; Chábera, P.; Polívka, T., Ultrafast Intramolecular charge transfer in tetrapyrazinoporphyrazines controls the quantum yields of fluorescence and singlet oxygen. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 2555-2563.
90. Karlikova, M.; Cermakova, V.; Demuth, J.; Valer, V.; Miletin, M.; Novakova, V.; Zimcik, P., Magnesium tetrapyrazinoporphyrazines: tuning of the pKa of red-fluorescent pH indicators. *Dalton Trans.* **2019**, *48* (18), 6162–6173.
91. Lochman, L.; Svec, J.; Roh, J.; Novakova, V., The role of the size of aza-crown recognition moiety in azaphthalocyanine fluorescence sensors for alkali and alkaline earth metal cations. *Dyes Pigm.* **2015**, *121*, 178-187.
92. Fanali, G.; Di Masi, A.; Trezza, V.; Marino, M.; Fasano, M.; Ascenzi, P., Human serum albumin: From bench to bedside. *Mol. Aspects Med.* **2012**, *33* (3), 209-290.
93. Kořínek, M.; Dědic, R.; Molnár, A.; Hála, J., The influence of human serum albumin on the photogeneration of singlet oxygen by meso-tetra (4-sulfonatophenyl) porphyrin. An infrared phosphorescence study. *J. Fluoresc.* **2006**, *16* (3), 355-359.
94. Gelamo, E. L.; Silva, C.; Imasato, H.; Tabak, M., Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: Spectroscopy and modelling. *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* **2002**, *1594* (1), 84-99.

95. Li, Y.; Wang, Y.; Wang, A.; Lu, S.; Zhou, L.; Zhou, J.; Lin, Y.; Wei, S., Spectroscopic study on the interaction of bovine serum albumin with zinc (II) phthalocyanine. *Luminescence* **2015**, *30* (8), 1367-1374.
96. Machacek, M.; Kollar, J.; Miletin, M.; Kucera, R.; Kubat, P.; Simunek, T.; Novakova, V.; Zimcik, P., Anionic hexadeca-carboxylate tetrapyrazinoporphyrazine: synthesis and *in vitro* photodynamic studies of a water-soluble, non-aggregating photosensitizer. *RSC Adv.* **2016**, *6* (12), 10064-10077.
97. Majorek, K. A.; Porebski, P. J.; Dayal, A.; Zimmerman, M. D.; Jablonska, K.; Stewart, A. J.; Chruszcz, M.; Minor, W., Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol. Immunol.* **2012**, *52* (3-4), 174-182.
98. Lang, K.; Mosinger, J.; Wagnerova, D. M., Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248* (3-4), 321-350.
99. Lang, K.; Wagnerova, D. M.; Engst, P.; Kubat, P., Quenching of the triplet-state of metallophthalocyanines by dioxygen in the presence of bovine serum-albumin. *Z. Phys. Chemie-Int. J. Res. Phys. Chem. Chem. Phys.* **1994**, *187*, 213-221.
100. Chatterjee, S.; Srivastava, T., Spectral investigations of the interaction of some porphyrins with bovine serum albumin. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2000**, *4* (2), 147-157.
101. Hynek, J.; Koncošová, M.; Zelenka, J.; Křížová, I.; Ruml, T.; Kubát, P.; Demel, J.; Lang, K., Phosphinatophenylporphyrins tailored for high photodynamic efficacy. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (39), 7274-7281.
102. Wang, S. J.; Peng, Y. L.; Zhang, C. G.; Ma, Q. P.; Peng, X. X.; Ren, L. L., Synthesis of tailed metalloporphyrins modified with 2 - chloronicotinic acid and Interactions with human serum albumin. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2017**, *38* (7), 735-743.
103. Chaves, O. A.; Acunha, T. V.; Iglesias, B. A.; Jesus, C. S.; Serpa, C., Effect of peripheral platinum (II) bipyridyl complexes on the interaction of tetra-cationic porphyrins with human serum albumin. *J. Mol. Liq.* **2020**, *301*, 112466.
104. Zhang, L.; Huang, J.; Ren, L.; Bai, M.; Wu, L.; Zhai, B.; Zhou, X., Synthesis and evaluation of cationic phthalocyanine derivatives as potential inhibitors of telomerase. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16* (1), 303-312.



105. Lebedeva, N. S.; Yurina, E. S.; Gubarev, Y. A.; Mayzlish, V. E., Zinc tetra-4-(4'-carboxyphenoxy)phthalocyanine as a new site-specific marker for serum albumin. *Russ. J. Bioorganic Chem.* **2016**, *42* (1), 29-35.
106. Çakır, V.; Çakır, D.; Pişkin, M.; Durmuş, M.; Bıyıklıoğlu, Z., New peripherally and non-peripherally tetra-substituted water soluble zinc phthalocyanines: Synthesis, photophysics and photochemistry. *Journal of Organometallic Chemistry* **2015**, *783*, 120-129.
107. Lan, W. L.; Liu, F. R.; Ke, M. R.; Lo, P. C.; Fong, W. P.; Ng, D. K. P.; Huang, J. D., The effects of formulation and serum albumin on the *in vitro* photodynamic activity of zinc(II) phthalocyanines substituted with sulfonated quinolineoxy groups. *Dyes Pigm.* **2016**, *128*, 215-225.
108. Dezhampanah, H.; Firouzi, R.; Hasani, L., Intermolecular interaction of nickel (ii) phthalocyanine tetrasulfonic acid tetrasodium salt with bovine serum albumin: A multi-technique study. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2017**, *36* (2), 122-138.
109. Ogunsipe, A.; Nyokong, T., Photophysicochemical consequences of bovine serum albumin binding to non-transition metal phthalocyanine sulfonates. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4* (7), 510-516.
110. Wang, Y.; Zheng, K.; Xuan, G. S.; Huang, M. D.; Xue, J. P., Novel pH-sensitive zinc phthalocyanine assembled with albumin for tumor targeting and treatment. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 7681-7695.
111. Zheng, L.; He, Y.; Lin, P.; Liu, L.; Yang, H.; Peng, Y.; Xie, S., Spectroscopic analysis of the interaction between tetra-(p-sulfoazophenyl-4-aminosulfonyl)-substituted aluminum (III) phthalocyanines and serum albumins. *J. Innovative Opt. Health Sci.* **2017**, *10* (2), 1650043.
112. Andrade, S. M.; Costa, S. M., Spectroscopic studies on the interaction of a water soluble porphyrin and two drug carrier proteins. *Biophys. J.* **2002**, *82* (3), 1607-1619.
113. Kubat, P.; Lang, K.; Anzenbacher, P., Modulation of porphyrin binding to serum albumin by pH. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2004**, *1670* (1), 40-48.
114. Xu, H.-N.; Chen, H.-J.; Zheng, B.-Y.; Zheng, Y.-Q.; Ke, M.-R.; Huang, J.-D., Preparation and sonodynamic activities of water-soluble tetra- $\alpha$ -(3-carboxyphenoxy) zinc(II) phthalocyanine and its bovine serum albumin conjugate. *Ultrason. Sonochem.* **2015**, *22*, 125-131.
115. Borissevitch, I. E.; Tominaga, T. T.; Schmitt, C. C., Photophysical studies on the interaction of two water-soluble porphyrins with bovine serum albumin. Effects upon the

porphyrin triplet state characteristics. *J. Photochem. Photobiol., A* **1998**, *114* (3), 201-207.

116. Foley, M. S.; Beeby, A.; Parker, A. W.; Bishop, S. M.; Phillips, D., Excited triplet state photophysics of the sulphonated aluminium phthalocyanines bound to human serum albumin. *J. Photochem. Photobiol., B* **1997**, *38* (1), 10-17.

117. Ambroz, M.; MacRobertl, A.; Morgan, J.; Rumbles, G.; Phillips, D., Time-resolved fluorescence spectroscopy and intracellular imaging of disulphonated aluminium phthalocyanine. *J. Photochem. Photobiol., B* **1994**, *22* (2), 105-117.

118. Phillips, D., Chemical mechanisms in photodynamic therapy with phthalocyanines. *Prog. React. Kinet. Mech.* **1997**, *22* (3-4), 175-300.

119. Lang, K.; Kubat, P.; Mosinger, J.; Wagnerova, D., Photochemical consequences of porphyrin and phthalocyanine aggregation on nucleoprotein histone. *J. Photochem. Photobiol., A* **1998**, *119* (1), 47-52.

120. Kubat, P.; Lang, K.; Mosinger, J.; Wagnerova, D. M., Reactions photosensitized by tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin: Protonation of the triplet states and effect of amino acids. *Z. Phys. Chemie-Int. J. Res. Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, *210*, 243-256.

121. M.Garcia, A.; de Alwis Weerasekera, H.; Pitre, S. P.; McNeill, B.; Lissi, E.; Edwards, A. M.; Alarcon, E. I., Photodynamic performance of zinc phthalocyanine in HeLa cells: A comparison between DPCC liposomes and BSA as delivery systems. *J. Photochem. Photobiol., B* **2016**, *163*, 385-390.

122. Sharman, W. M.; van Lier, J. E.; Allen, C. M., Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56* (1), 53-76.

123. Huang, J.-D.; Lo, P.-C.; Chen, Y.-M.; Lai, J. C.; Fong, W.-P.; Ng, D. K. P., Preparation and *in vitro* photodynamic activity of novel silicon(IV) phthalocyanines conjugated to serum albumins. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100* (5-6), 946-951.

124. Zhu, Y. J.; Huang, J. D.; Jiang, X. J.; Sun, J. C., Novel silicon phthalocyanines axially modified by morpholine: Synthesis, complexation with serum protein and *in vitro* photodynamic activity. *Inorg. Chem. Commun.* **2006**, *9* (5), 473-477.

125. Kollar, J., Syntéza azaftalocyaninů periferně substituovaných zbytkem odvozeným od trimesinové kyseliny. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2015.

126. Jiang, X.-J.; Huang, J.-D.; Zhu, Y.-J.; Tang, F.-X.; Ng, D. K.; Sun, J.-C., Preparation and *in vitro* photodynamic activities of novel axially substituted silicon (IV)

phthalocyanines and their bovine serum albumin conjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16* (9), 2450-2453.

127. Mørkved, E. H.; Afseth, N. K.; Zimcik, P., Azaphthalocyanines with extended conjugation through heteroaryl and aryl substituents. Photochemical and photophysical properties. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2007**, *11* (2), 130-138.

128. Chen, Z.; Xiang, S.; Liao, T.; Yang, Y.; Chen, Y.-S.; Zhou, Y.; Zhao, D.; Chen, B., A new multidentate hexacarboxylic acid for the construction of porous metal-organic frameworks of diverse structures and porosities. *Cryst. Growth Des.* **2010**, *10* (6), 2775-2779.

129. Machacek, M.; Demuth, J.; Cermak, P.; Vavreckova, M.; Hrubá, L.; Jedlickova, A.; Kubat, P.; Simunek, T.; Novakova, V.; Zimcik, P., Tetra(3,4-pyrido)porphyrazines caught in the cationic cage: toward nanomolar active photosensitizers. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (20), 9443-9456.

130. Macháček, M.; Carter, K. A.; Kostelanský, F.; Miranda, D.; Seffouh, A.; Ortega, J.; Šimůnek, T.; Zimčík, P.; Lovell, J. F., Binding of an amphiphilic phthalocyanine to pre-formed liposomes confers light-triggered cargo release. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6* (44), 7298-7305.

131. Zimcik, P.; Novakova, V.; Kopecky, K.; Miletin, M.; Uslu Kobak, R. Z.; Svandrlíkova, E.; Váchová, L.; Lang, K., Magnesium azaphthalocyanines: An emerging family of excellent red-emitting fluorophores. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (7), 4215-4223.

132. Novakova, V.; Miletin, M.; Filandrová, T.; Lenčo, J.; Růžička, A.; Zimcik, P., Role of steric hindrance in the Newman-Kwart rearrangement and in the synthesis and photophysical properties of arylsulfanyl tetrapyrazinoporphyrazines. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (5), 2082-2093.

133. Kaestner, L.; Cesson, M.; Kassab, K.; Christensen, T.; Edminson, P. D.; Cook, M. J.; Chambrier, I.; Jori, G., Zinc octa-n-alkyl phthalocyanines in photodynamic therapy: Photophysical properties, accumulation and apoptosis in cell cultures, studies in erythrocytes and topical application to Balb/c mice skin. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, *2* (6), 660-667.

134. Shishkin, V. N.; Kudrik, E. V.; Shaposhnikov, G. P., Synthesis and some properties of transition metal complexes with octa(sulfophenyl)tetrapyrazinoporphyrazine. *Russ. J. Coord. Chem.* **2005**, *31* (7), 516-520.

135. Kudrik, E. V.; Shishkin, V. N.; Shaposhnikov, G. P., Iron(II) octaphenyltetrapyrazinoporphyrazinate extra complexes: Synthesis and some properties. *Russ. J. Coord. Chem.* **2005**, *31* (7), 501-505.
136. Kollar, J.; Machacek, M.; Jancarova, A.; Kubat, P.; Kucera, R.; Miletin, M.; Novakova, V.; Zimcik, P., Effect of bovine serum albumin on the photodynamic activity of sulfonated tetrapyrazinoporphyrazine. *Dyes Pigm.* **2019**, *162*, 358-366.
137. Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B., Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1993**, *22* (1), 113-262.
138. Khene, S.; Ogunsipe, A.; Antunes, E.; Nyokong, T., Microwave synthesis and photophysics of new tetrasulfonated tin(II) macrocycles. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2007**, *11* (2), 109-117.
139. Lebedeva, N.; Malkova, E.; Vyugin, A.; Koifman, O.; Gubarev, Y., Spectral and hydrodynamic studies of complex formation of tetraalkoxy substituted zinc(II)phthalocyanines with defatted and nondefatted bovine serum albumin. *BioChip J.* **2016**, *10* (1), 1-8.
140. Kollar, J.; Machacek, M.; Halaskova, M.; Lenco, J.; Kucera, R.; Demuth, J.; Stelka, M.; Hasonova, K.; Miletin, M.; Novakova, V.; Zimcik, P., Cationic versus anionic phthalocyanines for photodynamic therapy: what a difference the charge makes. *J. Med. Chem.* **2020**, manuscript submitted, major revisions requested.
141. De La Torre, G.; Claessens, C. G.; Torres, T., Phthalocyanines: The need for selective synthetic approaches. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, (16), 2821-2830.
142. Choi, C. F.; Tsang, P. T.; Huang, J. D.; Chan, E. Y. M.; Ko, W. H.; Fong, W. P.; Ng, D. K. P., Synthesis and *in vitro* photodynamic activity of new hexadeca-carboxy phthalocyanines. *Chem. Commun.* **2004**, (19), 2236-2237.
143. Donzello, M. P.; Ou, Z.; Monacelli, F.; Ricciardi, G.; Rizzoli, C.; Ercolani, C.; Kadish, K. M., Tetra-2,3-pyrazinoporphyrazines with externally appended pyridine rings. 1. Tetrakis-2,3-[5,6-di(2-pyridyl)pyrazino]porphyrazine: A new macrocycle with remarkable electron-deficient properties. *Inorg. Chem.* **2004**, *43* (26), 8626-8636.
144. Klotz, L. O.; Kroncke, K. D.; Sies, H., Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, *2* (2), 88-94.

145. Liu, M.; Zhang, Z.; Cheetham, J.; Ren, D.; Zhou, Z. S., Discovery and characterization of a photo-oxidative histidine-histidine cross-link in IgG1 antibody utilizing  $^{18}\text{O}$ -labeling and mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (10), 4940-4948.
146. Giménez, R. E.; Vargová, V.; Rey, V.; Turbay, M. B. E.; Abatedaga, I.; Morán Vieyra, F. E.; Paz Zanini, V. I.; Mecchia Ortiz, J. H.; Katz, N. E.; Ostatná, V.; Borsarelli, C. D., Interaction of singlet oxygen with bovine serum albumin and the role of the protein nano-compartmentalization. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *94*, 99-109.
147. Gracanin, M.; Hawkins, C. L.; Pattison, D. I.; Davies, M. J., Singlet-oxygen-mediated amino acid and protein oxidation: Formation of tryptophan peroxides and decomposition products. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *47* (1), 92-102.
148. Matos, C.; Moutinho, C.; Lobao, P., Liposomes as a model for the biological membrane: Studies on daunorubicin bilayer interaction. *J. Membr. Biol.* **2012**, *245* (2), 69-75.
149. Zimcik, P.; Miletin, M.; Kopecky, K.; Musil, Z.; Berka, P.; Horakova, V.; Kucerova, H.; Zbytovska, J.; Brault, D., Influence of aggregation on interaction of lipophilic, water-insoluble azaphthalocyanines with DOPC vesicles. *Photochem. Photobiol.* **2007**, *83* (6), 1497-1504.
150. Rodriguez, M. E.; Awruch, J.; Dicio, L., Photophysical properties of Zn(II) incorporated into liposomes. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2002**, *6* (2), 122-129.
151. Kepczynski, M.; Pandian, R. P.; Smith, K. M.; Ehrenberg, B., Do liposome-binding constants of porphyrins correlate with their measured and predicted partitioning between octanol and water? *Photochem. Photobiol.* **2002**, *76* (2), 127-134.
152. Davila, J.; Harriman, A., Photoreactions of macrocyclic dyes bound to human serum albumin. *Photochem. Photobiol.* **1990**, *51* (1), 9-19.
153. Ogilby, P. R., Singlet oxygen: There is indeed something new under the sun. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (8), 3181-3209.
154. Ehrenberg, B.; Anderson, J. L.; Foote, C. S., Kinetics and yield of singlet oxygen photosensitized by hypericin in organic and biological media. *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68* (2), 135-140.

## 11. SEZNAM PŘÍLOH

Jedná se o soubor stěžejních publikovaných prací **P1-2**. Práce jsou řazeny v pořadí, ve kterém jsou uvedeny v kapitole 8. Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací.

**P1**            **Kollar, J.;** Machacek, M.; Jancarova, A.; Kubat, P.; Kucera, R. Miletin, M.; Novakova, V.; Zimcik, P., Effect of bovine serum albumin on the photodynamic activity of sulfonated tetrapyrazinoporphyrazine. *Dyes Pigm.* **2019**, 162, 358-366.

**P2**            **Kollar, J.;** Machacek, M.; Halaskova, M.; Lenco, J.; Kucera, R.; Demuth, J.; Stekla, M.; Hasonova, K.; Miletin, M.; Novakova, V.; Zimcik, P., Cationic versus anionic phthalocyanines for photodynamic therapy: what a difference the charge makes. *J. Med. Chem.* **2020** – manuscript submitted, major revisions requested.



## **Příloha P1**

**Kollar, J.;** Machacek, M.; Jancarova, A.; Kubat, P.; Kucera, R. Miletin, M.; Novakova, V.; Zimcik, P., Effect of bovine serum albumin on the photodynamic activity of sulfonated tetrapyrazinoporphyrazine. *Dyes Pigm.* **2019**, 162, 358-366.





## **Příloha P2**

**Kollar, J.;** Machacek, M.; Halaskova, M.; Lenco, J.; Kucera, R.; Demuth, J.; Stekla, M.; Hasonova, K.; Miletin, M.; Novakova, V.; Zimcik, P., Cationic versus anionic phthalocyanines for photodynamic therapy: what a difference the charge makes. *J. Med. Chem.* **2020** – manuscript submitted, major revisions requested.

