

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY



Příprava neutrálních amfifilních ftalocyaninů

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Barbora Sidorová



Vedúci diplomovej práce: prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Jan Kollár, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ 2023

PREHLÁSENIE AUTORA

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

V HRADCI KRÁLOVÉ 13.8. 2023

POĎAKOVANIE

Rada by som sa na tomto mieste poďakovala vedúcemu diplomovej práce prof. PharmDr. Petrovi Zimčíkovi, Ph.D. za odborné vedenie práce a za cenné rady pri vypracovaní tejto diplomovej práce. Konzultantovi PharmDr. Janovi Kollárovi, Ph.D. a Mgr. Lucii Rychvalskej, za praktickú pomoc, ústretovosť a trpezlivosť. Ďalej by som rada poďakovala členom Výskumnej skupiny azaftalocyanínových farbív za ich rady a príjemné pracovné prostredie. Poďakovanie taktiež patrí kolektívu Katedry organickej a bioorganickej chémie, za zmeranie NMR spektier, ďalej prof. PharmDr. Lucii Novákovej, Ph.D. za zmeranie HRMS spektier. Takisto ďakujem rodine a všetkým blízkym za podporu pri písaní práce.

Taktiež ďakujem Špecifickému vysokoškolskému výskumu SVV 260 666 za finančnú podporu.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra	Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy
Kandidát	Barbora Sidorová
Školiteľ	prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.
Konzultant	PharmDr. Jan Kollár, Ph.D.
Názov diplomovej práce	Příprava neutrálních amfifilních ftalocyaninů

Ftalocyaníny sú syntetické planárne makrocykly, štruktúrou podobné porfyrínom. Obsahujú 18 delokalizovaných π elektrónov, ktoré dávajú týmto látkam jedinečné fotofyzikálne vlastnosti. Tieto látky našli bohaté priemyslové využitie. Jedným z nich je použitie ftalocyanínov ako fotosenzitizérov vo fotodynamickej terapii, na liečbu nádorových, ako aj neonkologických ochorení. Pri aktivácii fotosenzitizéru žiarením o určitej vlnovej dĺžke (v oblasti viditeľného svetla) dochádza k zmene jeho stavu na stav excitovaný. Látka sa potom nadbytočnej energie zbavuje prenosom na molekulu kyslíku za vzniku reaktívnej molekuly singletového kyslíka, ktorá spôsobuje poškodenie tkanív.

Predmetom tejto práce bola syntéza asymetrických derivátov ftalocyanínov s amfifilným charakterom, ktoré by sa vďaka svojej štruktúre dokázali inkorporovať do bunkových membrán a následne mohli fungovať ako fotosenzitizéry. Prvým krokom syntézy bola príprava prekursoru 4,5-bis(3,5-dimetoxyfenoxy)ftalonitrilu nukleofilnou substitúciou. Ftalocyaníny boli potom syntetizované cyklotetramerizáciou, metódou štatistickej kondenzácie dvoch štruktúrne rozdielnych prekursorov: 4,5-bis(3,5-dimetoxyfenoxy)ftalonitrilu a ftalonitrilu v pomere 1:9. Ďalším krokom bola demetylácia metoxy skupín za vzniku ftalocyanínu s voľnou hydroxylovou skupinou.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Pharmaceutical Chemistry and
Pharmaceutical Analysis

Candidate: Barbora Sidorová

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

Consultant: PharmDr. Jan Kollár, Ph.D.

Diploma thesis: **Preparation of neutral amphiphilic phthalocyanines**

Phthalocyanines are synthetic planar macrocycles, with structure similar to porphyrins. They contain 18 delocalized π electrons, which give these substances unique photophysical features. These substances have many industrial applications. One of these applications is the use of phthalocyanines as photosensitizers in photodynamic therapy, for treating both oncological and non-oncological diseases. When photosensitizer is activated by radiation at a specific wavelength (in the visible light range), it enters its excited state. It dissipates the absorbed energy by transferring it to an oxygen molecule, creating thus reactive molecule of singlet oxygen, that causes tissue damage.

The subject of this thesis is synthesis of asymmetric derivatives of phthalocyanines with amphiphilic character, which, due to their structure, could be incorporated into cell membranes and subsequently used as photosensitizers. The first step of this synthesis was preparation of the precursor 4,5-bis(3,5-dimethoxyphenoxy)phthalonitrile by nucleophilic substitution. Phthalocyanines were then synthesized through cyclotetramerization, using a statistical condensation method of two structurally different precursors: 4,5-bis(3,5-dimethoxyphenoxy)phthalonitrile and phthalonitrile in 1:9 ratio. The next step was demethylation of methoxy groups, creating phthalocyanine with free hydroxyl groups.

OBSAH

1	ZOZNAM SKRATIEK.....	6
2	CIEĽ PRÁCE	8
3	TEORETICKÁ ČASŤ	9
3.1.	Ftalocyaníny	9
3.1.1.	Opis štruktúry a štruktúrne modifikácie.....	9
3.1.2.	Vlastnosti.....	12
3.1.3.	Využitie	14
3.2.	Fotodynamická terapia	16
3.2.1.	Fotofyzika a fotochémia.....	17
3.2.2.	Mechanizmus fotodynamickej terapie	19
3.2.3.	Fotosenzitizéry.....	20
3.2.3.1.	Ideálny fotosenzitizér	20
3.2.3.2.	Generácie fotosenzitizérov	21
3.2.3.3.	Príklady klinicky využívaných fotosenzitizérov.....	23
3.2.4.	Výhody a nevýhody terapie.....	25
3.3.	Svetlom spúšťané uvoľnenie liečiva (light triggered release).....	26
3.4.	Fotochemická internalizácia.....	29
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	31
4.1	Syntéza prekurzorov.....	32
4.1.1.	Príprava 4,5-bis(3,5-dihydroxyfenoxy)ftalonitrilu (1)	32
4.1.2.	Príprava 3,5-bis(2-hydroxyetoxy)fenolu (2)	32
4.1.3.	Príprava 5-hydroxy-1,3-fenylen-diacetátu (3)	35
4.1.4.	Príprava [(4,5-dikyano-1,2-fenylen)bis(oxy)]bis(benzén5,1,3triyl)tetraacetátu (4)	36
4.1.5.	Príprava dietyl 2,2'-[(5-hydroxy-1,3-fenylen)bis(oxy)]diacetátu (5)	38
4.1.6.	Príprava 4,5-bis(3,5-dimetoxyfenoxy)ftalonitrilu (6)	38

4.2.	Cyklotetramerizácia	40
4.2.1.	Príprava 2,3-bis(3,5-dimetoxyfenoxy)ftalocyanináto horečnatého komplexu (7Mg).....	40
4.2.2.	Príprava 2,3-bis(3,5-dimetoxyfenoxy)ftalocyanínu (7H2).....	41
4.2.3.	Príprava 2,3- bis(3,5- dimetoxyfenoxy)ftalocyanináto zinočnatého komplexu (7Zn).....	42
4.2.4.	Príprava 2,3-bis(3,5-dihydroxyfenoxy)ftalocyanináto zinočnatého komplexu (8Zn)	43
5	DISKUSIA	44
5.1.	SYNTÉZA PREKURZOROV	44
5.2.	CYKLOTETRAMERIZAČNÉ REAKCIE	50
6	ZÁVER	53
7	POUŽITÁ LITERATÚRA	54

1 ZOZNAM SKRATIEK

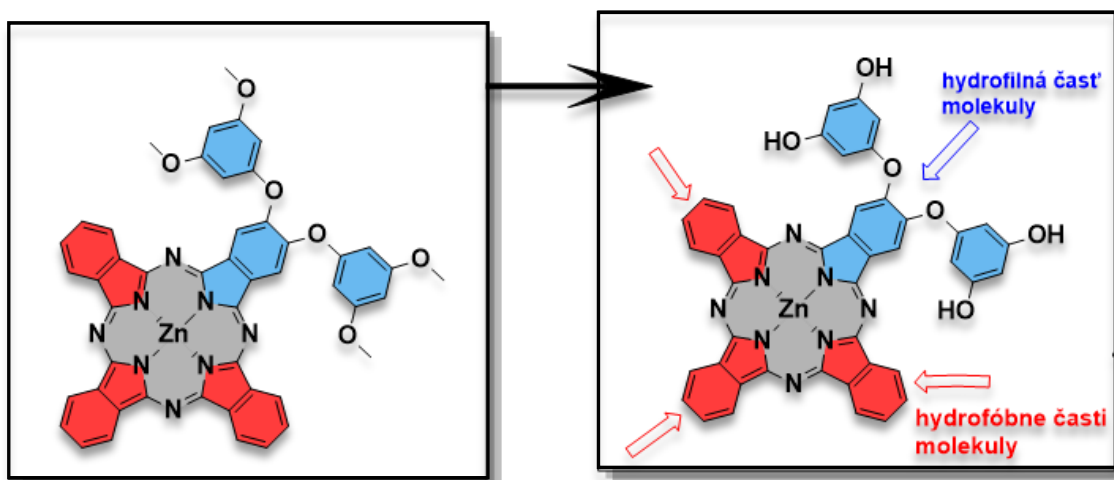
ACN	acetonitril
ALA	kyselina 5-aminolevulová (5-aminolevulinic acid)
AzaPc	azaftalocyanín (azaphthalocyanine)
BuOH	butanol
DCM	dichlórmetán
DMF	<i>N,N</i> -dimetylformamid
DMSO	dimetylsulfoxid
EAC	etyléster kyseliny octovej/etylacetát
EtOH	etanol
HR-MS	hmotnostná spektroskopia s vysokým rozlíšením (high-resolution mass spectroscopy)
CHF	chloroform
ICT	intramolekulárny prenos náboja (intramolecular charge transfer)
LED	elektroluminiscenčná dióda (light-emitting diode)
MeOH	metanol
MS	hmotnostná spektrometria
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
OLED	organická elektroluminiscenčná dióda (organic light-emitting diode)

Pc	ftalocyanín (phthalocyanine)
PCI	fotokemická internalizácia (photochemical internalization)
PDT	fotodynamická terapia (photodynamic therapy)
PS	fotosenzitizér (photosensitizer)
ROS	reaktívne formy kyslíka (reactive oxygen species)
SubPc	subftalocyanín (subphthalocyanine)
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografia (thin layer chromatography)
VR	vibračná relaxácia

2 CIEĽ PRÁCE

Diplomová práca sa zaoberá syntézou nesymetrických derivátov ftalocyanínov, s neutrálnymi hydrofilnými skupinami na periférií, ako možné fotodynamicky aktívne látky. Cieľ tejto práce spočíval v syntéze amfifilných derivátov (Obr.1), ktorých štruktúra by im umožňovala interakciu s bunkovou membránou. Tým by umožnila bližšiu interakciu singletového kyslíka s očakávanými miestami pôsobenia, akými sú napr. membrány lyzozómov. Zároveň sme predpokladali možnosť využiť lipozómy ako nosiče pre takéto látky, čím by sa ďalej zvýšila selektivita terapie.

Táto práca sa zaoberala syntézou prekursorov a následne cyklotetramerizačnými reakciami týchto prekursorov, za vzniku nesymetrických derivátov ftalocyanínov. Do cyklotetramerizačných reakcií sme použili dva prekuzory, ktoré predstavovali hydrofilnú a lipofilnú zložku. Z toho, našou cieľovou štruktúrou bol AAAB kongenér.



Obrázok 1: Prehľad cieľových derivátov po cyklotetramerizačnej reakcii.

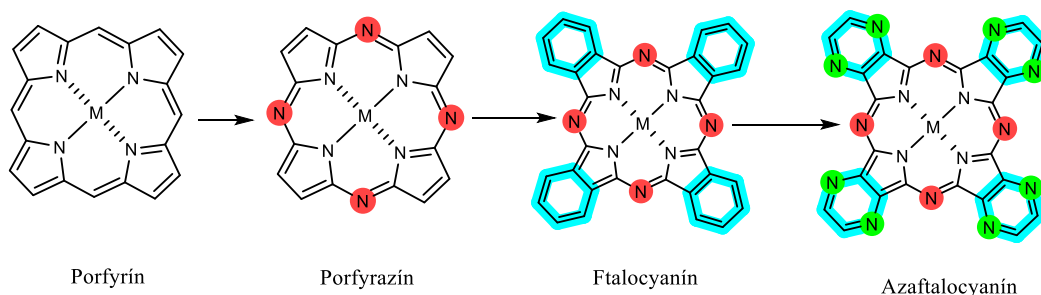
3 TEORETICKÁ ČASŤ

3.1. Ftalocyaníny

3.1.1. Opis štruktúry a štruktúrne modifikácie

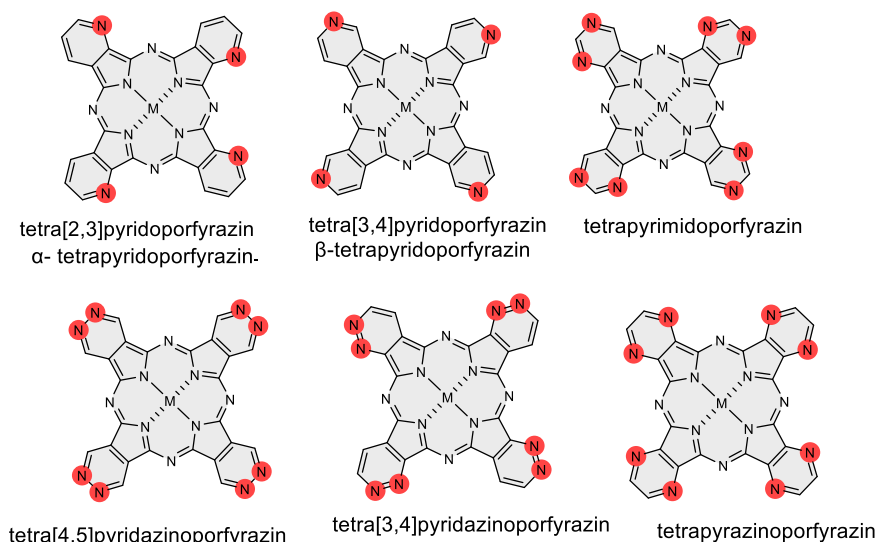
Ftalocyaníny (Pcs, z angl. Phthalocyanines), sú syntetické planárne aromatické makrocykly, štruktúrou podobné porfyrínom. Oproti porfyrínom je ich jadro rozšírené o prikondenzované benzénové jadro. Ich štruktúra obsahuje štyri izoindolové jednotky, ktoré sú spojené v polohách 1 a 3 azamethinovými mostíkmi. Vďaka tomu, že vo svojej štruktúre majú 18 delokalizovaných π -elektrónov majú jedinečné vlastnosti.¹

Modifikácia ich štruktúry, nahradením niektorých uhlíkov v jadre heteroatómami, vedie k špecifickým fyzikálne-chemickým zmenám. Najviac časté sú azaftalocyaníny (AzaPcs, z angl. Azaphthalocyanines), sú to dusíkaté analógy Pcs. Hoci štruktúry modifikované inými heteroatómami, boli tiež opísané (Obr. 2).^{2,3}



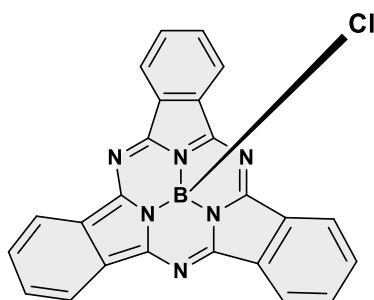
Obrázok 2: Odvodenie štruktúry Pcs a AzaPcs, kde M označuje centrálny kation kovu, polokovu alebo dva atómy vodíku. Prevzaté a upravené z lit.⁴

V závislosti od počtu a polohy dusíkov, vzniká mnoho štruktúrnych podtypov výsledných makroheterocyklov napr. tetrapyrídonporfyrizíny, tetrapyrizínoporfyrizíny, tetrapyrizidazínoporfyrizíny, tetrapyrimidínoporfyrizíny a ďalšie (Obr.3). Pcs a AzaPcs sú schopné koordinovať viac ako 70 kovových a nekovových kationov, čo umožňuje doladenie ich fyzikálne-chemických vlastností.^{1,3}



Obrázok 3: Štruktúrne podtypy AzaPcs. Prevzaté a upravené z lit. ⁵

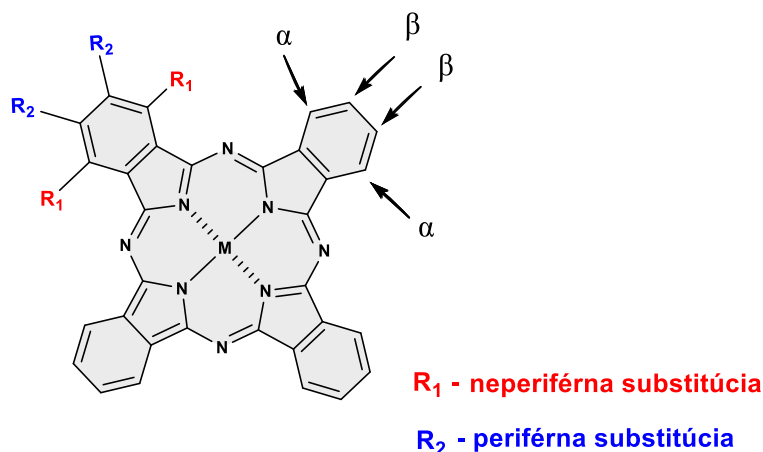
Ďalšiu modifikáciu základnej štruktúry získame odobraním jednej izoindolovej štruktúry, za vzniku menších analógov, subftalocyanínov (SubPcs, z angl. subphthalocyanines) (Obr.4). Skupina makrocyklov SubPcs predstavuje zaujímavú triedu neplanárnych aromatických farbív. SubPcs sú dôležité východiskové látky na prípravu nesymetrických Pcs. Majú jedinečný kónický tvar, ktorý obsahuje aromatický systém so $14-\pi$ elektrónmi, tvorený tromi izoindolovými jednotkami premostenými cez atómy dusíka okolo tetrakoordinovaného atómu bóru. Vďaka tomu majú nižší sklon k agregácii. ^{1,6}



Obrázok 4: Všeobecná štruktúra subftalocyanínu

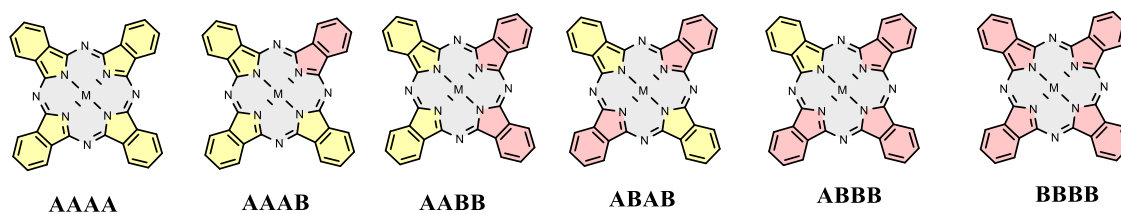
Významnou modifikáciou je substitúcia aromatických jadier. Pcs môžu byť substituované buď v polohe α (R_1 - neperiférna substitúcia) alebo v polohe β (R_2 - periférna substitúcia) (obr.5).⁷ Dôsledok $\pi-\pi$ interakcií makrocyklických jadier obmedzuje ich rozpustnosť v najčastejšie používaných organických rozpúšťadlách a podliehajú tak molekulárnej agregácii, za vzniku dimérov, trimérov až oligomérov. Agregáčnej javy sú bežné v chémii

Pcs a je známe, že spôsobujú významné zmeny ich fyzikálne-chemických a fotofyzikálnych vlastností. Ftalocyanínové zlúčeniny sú rozpustné v rôznych rozpúšťadlách na základe vhodnej periférnej substitúcie.⁸



Obrázok 5: Možnosti substitúcie Pcs. Prevzaté a upravené z lit.⁵

Spôsoby substitúcie aromatických jadier, možno rozdeliť na dva prístupy. Prvým je postsyntetická modifikácia výsledného makrocyklu, druhým prístupom je modifikácia prekursoru a až potom následná cyklotetramerizačná reakcia.^{9,10} Pcs a AzaPcs môžeme rozdeliť z hľadiska symetrie na symetrické a nesymetrické. Existuje niekoľko spôsobov ako pripraviť nesymetrické Pcs a AzaPcs. Najčastejšie používanou metódou je štatistická kondenzácia prekursorov A a B za vzniku šiestich rozdielnych kongenéroov (AAAA, AAAB, AABB, ABAB, ABBB, BBBB), kedy k separácii jednotlivých látok sa výhodne používa stĺpcová chromatografia (Obr.6).^{1, 11}



Obrázok 6: Produkty cyklotetramerizačnej reakcie.

3.1.2. Vlastnosti

Štruktúra Pc, má veľmi stabilnú elektrónovú konfiguráciu, vďaka čomu nemôže poskytovať niektoré druhy reakcií. Adície a otvorenie kruhu, sú veľmi zriedkavé pre Pcs, pretože by vyžadovali drastické podmienky, ktoré vedú väčšinou k narušeniu skeletu Pc. Na druhej strane s reakciami, ktoré nemenia aromatický charakter ako napr. acidobázické reakcie alebo obmeny centrálného atómu, sa stretávame častejšie.¹²

Fyzikálne a chemické vlastnosti Pcs s koordinovaným atómom kovu (metaloftalocyaníny) sa menia podľa štruktúry makrocyclického ligandu, ako aj podľa centrálného kovu. Všetky kovové prvky majú možnosť koordinovať (Obr.7).¹³ Pokiaľ makrocyclus koordinuje s kationom kovu, ktorý má zaplnené všetky molekulové orbitály napr. Zn^{II} , Mg^{II} , Al^{III} , zlúčenina má vhodné fotofyzikálne vlastnosti. Avšak ak makrocyclus koordinuje s kationom prechodného kovu, ktorý nemá úplne zaplnené molekulové orbitály napr. Fe^{II} , Co^{II} , Ni^{II} , neposkytujú fluorescenciu ani produkciu singletového kyslíka.¹⁴

Metaloftalocyaníny, ktoré obsahujú príliš veľké atómy na to aby sa zmestili do ftalocyanínového jadra, sú nerovinné a vedú k zníženiu interakcií π - π a zlepšujú rýchlosť medzisystémového prechodu. Vede to k zlepšeniu fotofyzikálnych a fotochemických vlastností, ako aj k zlepšeniu rozpustnosti, vďaka zníženiu molekulárnej agregácie, vyplývajúcej zo zmien elektrónovej štruktúry molekuly, ako aj z dôvodu dipólového momentu neplanárnej molekuly.^{8,14}

H																			He
Li	Be										B	C	N	O	F				Ne
Na	Mg										Al	Si	P	S	Cl				Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br			Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I			Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At			Rn
Fr	Ra	Ac	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg	Cn	Nh	Fl	Mc	Lv	Ts			Og

Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr

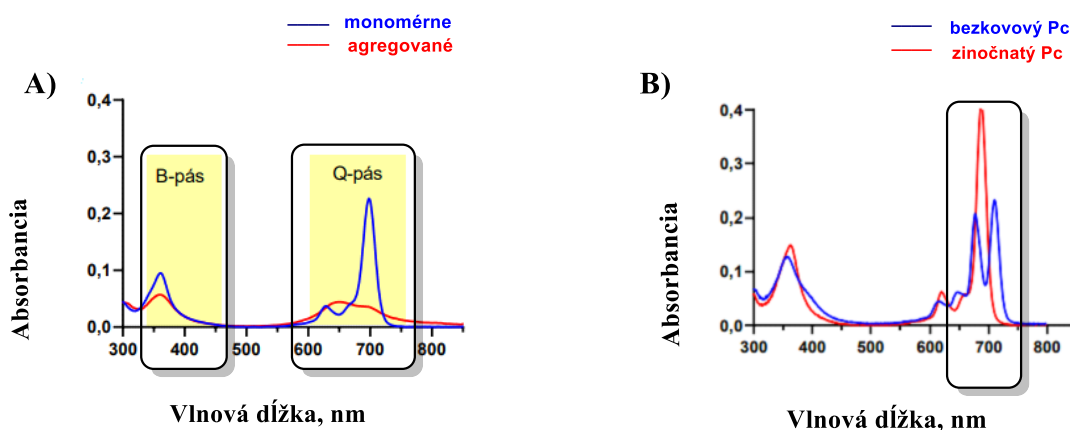
Obrázok 7: Označenie prvkov, ktoré dokážu koordinovať s Pcs. Prevzaté a upravené z lit. ¹²

Ako už bolo uvedené vyššie, Pcs obsahujú rozšírený konjugovaný aromatický systém, vďaka čomu dokážu absorbovať svetlo o určitých vlnových dĺžkach a to spôsobuje ich farebnosť.

Pre Pcs a AzaPcs sú charakteristické dva absorpčné pásy. V oblasti okolo 300-450 nm sa nachádza vysokoenergetický B-pás (Soretov pás) a v oblasti 600-800 nm sa nachádza nízkoenergetický Q-pás.¹⁵

Polohu hlavného absorpčného pásu Pcs (Q- pás) je možné ovplyvniť napr. aneláciou (prikondenzovaním benzénového jadra k Pcs) za vzniku naftalocyanínov. Tieto vyššie homológy sú charakteristické posunom 80-100 nm do červenej oblasti. Vyššie homológy majú silnejšie π - π interakcie a tým je tam aj vyššia šanca agregácie a zníženej rozpustnosti. To v akom stave sa nachádza daná látka, či je agregovaná, alebo neagregovaná, vieme určiť na základe tvaru absorpčného spektra (Obr. 8a). Ak je Q-pás ostrý, tak je látka neagregovaná a ak je ploský, je to charakteristické pre agregáty.¹⁶

Ďalej ho vieme ovplyvniť povahou a polohou periférnych substituentov. U nesymetrických Pcs a AzaPcs pri rozdielnej substitúcii na periférii vidíme rozštiepený Q-pás. A čiastočne aj koordináciou rôznych katiónov do svojho centra. Čo sa týka bezkovových derivátov, tam dochádza taktiež k rozštiepeniu Q-pásu, príčinou je nesymetria molekuly (Obr.8b). Modulácia polohy a charakteru substituentov je najviac efektívny spôsob vylepšovania spektrálnych vlastností.^{16,17}



Obrázok 8: A) Príklad monoméneho a agregovaného spektra Pcs. B) Príklad spektra, kde sa porovnáva bezkovový Pc a zinočnatý Pc. Prevzaté a upravené z lit.⁵

Typickým problémom Pcs, je ich hydrofóbny planárny makrocyklus, vďaka ktorému majú tendenciu silno agregovať. Agregácia sa považuje za nežiadúcu, pretože znižuje produkciu singletového kyslíka a robí Pcs neaktívnymi. Spôsobuje problémy pri čistení a charakterizácii látok. Agregácia závisí od povahy rozpúšťadla a substituentov, iónu kovu, ktorý je koordinovaný v Pc makrocykle, teploty, od koncentrácie Pc v roztoku atď. S cieľom znížiť agregáciu sa používajú vo vode solubilizujúce substituenty, napr. kationické (obsahujúce kvartérne amóniové skupiny) alebo anionické (obsahujúce karboxy a sulfo skupiny), ktoré pôsobia na základe elektrostatických odpudivých síl. Ďalšími možnosťami ako znížiť agregáciu je použitie objemných substituentov na periférii alebo zavedenie axiálneho ligandu.^{18,19}

3.1.3. Využitie

Záujem o Pcs vyplýva z ich zaujímavých vlastností ako sú elektronické, fotonické a fotovoltaičné, ktoré už našli priemyselné využitie v plynových senzoch, solárnych článkoch, materiáloch generujúcich náboj, aktívne maticové displeje, farbivá, atď.⁸

Solárne články

V dnešnej dobe sa tieto komplexy považujú za vynikajúce chromofóry. Oblasť fotovoltaiky zaznamenala rýchly pokrok vo výskume využívania obnoviteľných zdrojov energie.²⁰ Vďaka využitiu ich aplikácie v dizajne solárnych článkov citlivých na farbivo (DSC, Dye-sensitized solar cells).²¹ DSC sú zložené z nanokryštalického solárneho článku na báze TiO₂, ktorý je nanosený na priehľadnom vodivom substráte ďalej z PS a redoxného elektrolytu. Ich výkon je regulovaný absorpciou svetla a dynamikou prenosu náboja.²⁰

Katalyzátory

Pcs sa využívajú sa ako elektrokatalyzátory pri redukcii kyslíka. Elektrokatalytické alebo fotosenzibilizačné (fotokatalytické) vlastnosti komplexov metaloftalocyanínov závisia od centrálného kovu. Elektrokatalytické správanie sa pozoruje v prítomnosti kovu ako je Co, Mn, Fe. Zatiaľ čo fotosenzibilizačné správanie sa pozoruje pri diamagnetických kovoch ako je Al, Zn, Si.²²

Farbivá

Pcs sú veľmi dôležitou skupinou farbív, majú pozoruhodnú chemickú stabilitu a stálosť voči svetlu. Oproti prírodným farbivám ako sú chlorofyl a hemín, ktoré sú vysoko citlivé zlúčeniny, ľahko zničiteľné svetlom, teplom a sú to mierne chemické činidlá. Najviac využívané Pcs farbivá sú modré a zelené pigmenty. Mnoho Pcs pigmentov, vrátane Cu^{II} Pcs vykazujú polymorfizmus, t.j. látky môžu existovať vo viacerých kryštalických formách. Využitie našli ako nátery pre plasty, farbivá pre tonery alebo ako materiály na generovanie náboja pre laserové tlačiarne.²³

Plynové senzory

Pcs sú organické polovodiče, ktoré boli identifikované ako sľubní kandidáti pre plynové senzory. Sú schopné pôsobiť ako chemicky citlivé filmy, vďaka rôznym fyzikálnym efektom, ktoré sú v nich indukované interakciou s veľkým množstvom plynov. Konkrétne môžu byť použité ako polovodičové plynové senzory na detekciu halogénov ako je chlór alebo na detekciu oxidu dusičitého, prípadne aj organických výparov.²⁴

Kvapalné kryštály

Ďalším využitím Pcs je vo forme kvapalných kryštálov. Funkčné materiály s takýmto usporiadaním preukázali veľký potenciál ako aktívne komponenty v rôznych optoelektronických zariadeniach. LED (z angl. light-emitting diode) alebo OLED (z angl. organic light-emitting diode) sú elektroluminiscenčné zariadenia, ktoré sú zložené z viacerých organických vrstiev. Rýchly rozvoj posledných desaťročí už umožnil úspešnú komercializáciu OLED displejov. Flexibilný tvar a nízka spotreba energie robia OLED displeje výhodnejšími ako konvenčné LCD displeje.²⁵

Veľký potenciál Pcs je možné ilustrovať ich mnohými priemyselnými, klinickými a biologickými aplikáciami. V posledných desaťročiach sa Pcs využívali okrem vyššie zmieneného aj ako materiály na degradáciu znečisťujúcich látok a prirodzených toxínov. Taktiež ako látky inhibujúce proliferáciu nádorových buniek a rast baktérií alebo húb.²⁶ Využitiu vo fotodynamickej terapii je venovaná samostatná kapitola (kap. 3.2.).

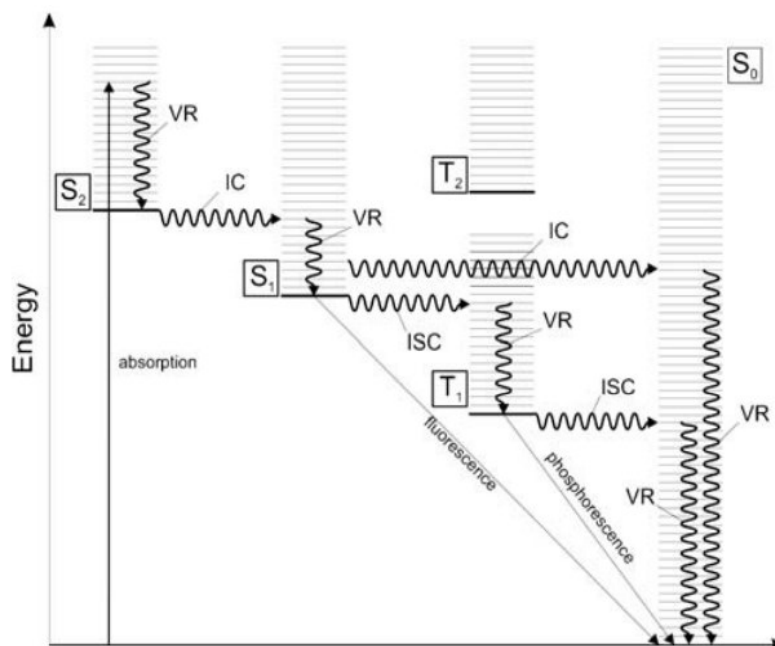
3.2. Fotodynamická terapia

Počiatky fotodynamickej terapie (PDT, z angl. Photodynamic therapy) možno vystopovať v starovekých egyptských a indických zdrojoch.²⁷ Fotosenzibilizačné rastlinné extrakty sa aplikovali priamo na kožu a vystavili sa slnečnému žiareniu za vytvorenia terapeutického účinku.²⁸ Prvý seriózný vedecký dôkaz, že látky ako fotosenzitívne syntetické farbivá v kombinácii so zdrojom svetla a kyslíkom môžu mať potenciálny terapeutický účinok bol v 20. storočí.²⁹

PDT je moderná neinvazívna forma terapie, využívaná pri liečbe neoncologických, ako aj nádorových ochorení rôzneho typu a lokalizácie. Dobré terapeutické výsledky a možnosť paralelnej aplikácie s rôznymi terapeutickými protokolmi, ju robia bežnejšou v mnohých oblastiach medicíny. Pri PDT sa zlúčenina s fotosenzibilizačnými vlastnosťami (fotosenzitizér, PS) selektívne akumuluje v malígnych tkanivách. Následná aktivácia PS viditeľným svetlom, prednostne v červenej oblasti viditeľného svetla, kde sú tkanivá priepustnejšie pre svetlo, vytvára reaktívne formy kyslíka, hlavne singletový kyslík. Ten je zodpovedný za cytotoxicitu neoplastických buniek.^{30, 32}

PDT možno považovať za účinnú a bezpečnú možnosť pri liečbe niekoľkých dermatologických stavov napr. prevencia a liečba nemelanómvej rakoviny kože, aktinická keratóza, Bowenova choroba, akné vulgaris atď.³¹ Používajú ju taktiež pneumológovia, urológovia, oftalmológovia a iné medicínske obory. Antibakteriálne a fungicídne vlastnosti PS sú využívané k dosiahnutiu lepších výsledkov pri liečbe koreňových kanálikov, paradontálnej terapii a eradikácii kandidózy v protetike.³²

3.2.1. Fotofyzika a fotochémia



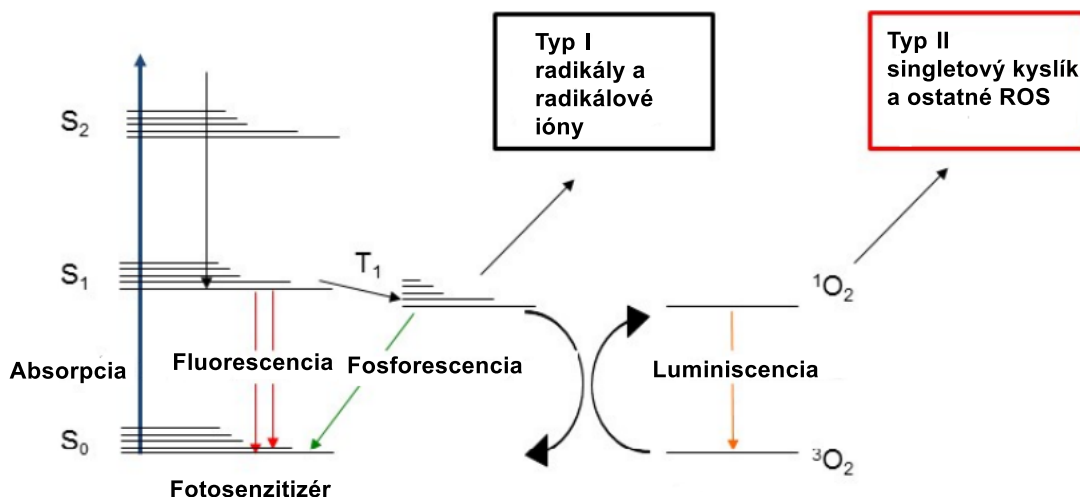
Obrázok 9: Jablonského diagram primárnych fotofyzikálnych procesov. Os Y znázorňuje rastúcu energiu elektrónických stavov, ktoré sú združené na osi X, podľa spinovej multiplicity. IC (internal conversion) – vnútorná konverzia, ISC (intersystem crossing) – medzisystémový prechod, S_n (singlet states) – singletové stavy, T_x (triplet state) – tripletové stavy, VR (vibrational relaxation) – vibračná relaxácia. Prevzaté z lit.³³

Fotofyzikálne procesy v rámci PDT najlepšie popisuje Jablonského diagram (Obr.9). Molekula PS je vo svojom základnom stave charakterizovaná spárovanými elektrónmi s celkovým spinom $S=0$ a spinovou multiplicitou 1. Táto konfigurácia sa nazýva singletový stav. Je to konfigurácia so všetkými elektrónmi v ich najnižšom energetickom stave S_0 . Po absorpcii svetelného kvanta s príslušnou energiou, sa jeden z týchto elektrónov posunie na predtým neobsadený orbitál s vyššou energiou. V závislosti od odovzdanej energie PS prechádza do excitovaného singletového stavu S_n ($n = 1, 2, 3, \dots$). Akýkoľvek excitovaný stav je energeticky menej výhodný ako základný stav. Molekula sa po krátkom čase vráti do S_0 . Táto deaktivácia môže nastať viacerými mechanizmami. Elektrón vo vysokej vibračnej hladine excitovaného stavu, rýchlo klesá na energeticky najnižšiu hladinu. Tento proces sa nazýva vibračná relaxácia (VR) a energia sa rozptýli ako teplo. Molekulová relaxácia na S_0 nastane buď emisiou sekundárneho fotónu (florescenčnou emisiou) alebo rozptylom tepla. Florescenčná emisia bude vždy od

najnižšej vibračnej úrovne S_1 . Z S_1 môže PS prejsť na izoenergetickú úroveň tripletového stavu T_1 , kde dva elektróny nie sú spárované a majú rovnaký spin. Tento neradiačný proces sa nazýva medzisystémový prechod (ICS). Väčšina PS má vysokú kvantovú účinnosť v tomto prechode. Po rýchlej vibračnej relaxácii v rámci energetickej hladiny T_1 , môže dôjsť k radiačnej relaxácii na S_0 , procesom nazývaným fosforescencia (emisia elektromagnetického kvanta). Tripletové stavy sú však vo všeobecnosti charakterizované dlhou životnosťou (niekoľko stoviek nanosekúnd až milisekundy).³³

Molekuly PSs majú vysokú pravdepodobnosť vzniku tripletového stavu po excitácii. Aktivovaný PS v stave excitovaného tripletu môže vyvolať chemické zmeny na susedných molekulách prostredníctvom dvoch konkurenčných dráh, nazvanými typ I a typ II fotochemickej reakcie (Obr. 10). Reakcia typu I je radikálový proces a zahŕňa excitovaný stav PS v procesoch prenosu elektrónov. Táto reakcia znamená prenos elektrónov alebo protónov na kyslík alebo iné susedné molekuly, za vzniku radikálového aniónu alebo katiónu. Tieto radikály pravdepodobne reagujú s molekulárnym kyslíkom za vzniku reaktívnych foriem kyslíka (ROS, z angl. Reactive Oxygen Species). Fotochemické reakcie typu I vedú často k tvorbe superoxidových aniónov prenosom elektrónu z PS na molekulárny kyslík. Superoxidové anióny nie sú v biologických systémoch veľmi reaktívne, ale môžu reagovať za vzniku peroxidu vodíka, ktorý môže ľahko prechádzať biologickými membránami. Reakcia typu II nie je radikálovým procesom, ale zahŕňa prenos energie z excitovaného tripletu PS na základný tripletový dikyslík, pričom vzniká singletový kyslík. Fotochemické reakcie typu I aj II prebiehajú paralelne a ich vzájomný pomer závisí od viacerých parametrov, pričom najdôležitejší je použitý PS a koncentrácia kyslíka.^{34, 35}

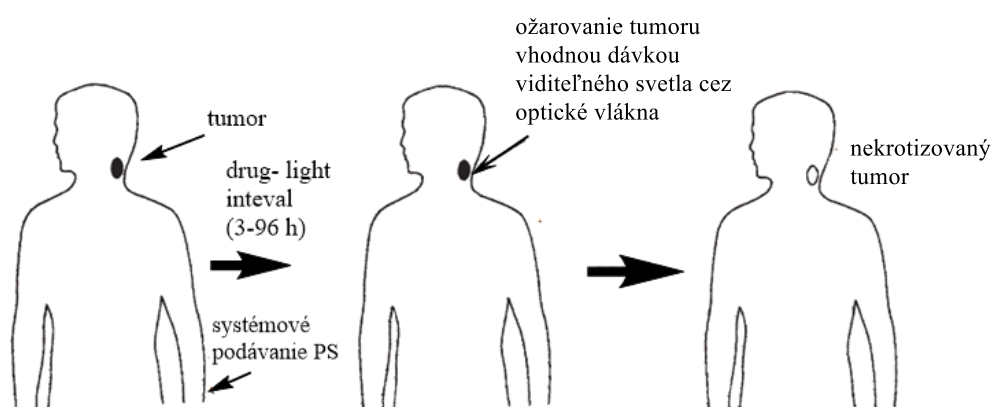
Singletový kyslík 1O_2 , je označenie pre molekulu kyslíka v jeho excitovanom stave, kedy sú všetky jeho elektróny spárované a multiplicita spinu je 1 (singlet). V základnom energeticky najnižšom stave, má molekula kyslíka multiplicitu 3 (triplet). Všetky reakcie singletového kyslíka majú veľmi vysokú aktivačnú energiu. Reakcie, ktoré generujú singletový kyslík (nazývané ako fotodynamický efekt), ponúkajú široké uplatnenie.³⁶



Obrázok 10: Schematické znázornenie reakcií typu I a typu II po aktivácii PS pri osvetlení. Prezaté a upravené z lit. ³⁵

3.2.2. Mechanizmus fotodynamickej terapie

PDT spočíva v aplikácii PS obvykle intravenóznou formou, ale aj topickou či intraperitoneálnou. Po uplynutí doby k selektívnej akumulácii PS v tumore, je oblasť jeho lokalizácie ožiarená viditeľným svetlom. Singletový kyslík, prípadne ďalšie reaktívne častice vznikajú priamo v tumore a spôsobujú jeho oxidatívnu deštrukciu, bez toho aby boli poškodené zdravé tkanivá (Obr.11).²⁹



Obrázok 11: Schéma nádorovej PDT. Prezaté a upravené z lit. ³⁴

Molekulárny mechanizmus PDT je založený na troch netoxických zložkách ako je PS, svetlo (žiarovky, lasery, svetelné diódy atď.) a kyslík (O₂ rozpustený v cytoplazme).²⁷ Poškodenie tkaniva súvisí s koncentráciou PS a kyslíka v tkanivách, ktoré sa ožarujú. Priamy fotodynamický účinok na nádorové bunky je výsledkom interakcie ROS s rôznymi biologickými cieľmi, ktoré sú náchylné na deštrukciu v dôsledku oxidácie, narušenia homeostázy a zmien metabolizmu.³⁸

Kľúčové je, v ktorom kompartmente sa PS hromadí. V závislosti od štruktúry PS to môže byť na makroskopickej úrovni napr. pečeň, nádor alebo koža. A na úrovni bunkovej to môže byť napr. plazmatická membrána, lyzozómy alebo mitochondrie. Špecifická lokalizácia a kinetika intracelulárnej distribúcie každého PS závisí od jeho lipofility, typu a počtu nábojov, od typu makrocyclického jadra a substituentov. Podľa toho budú vstupovať do bunky mechanizmom difúzie alebo endocytózy. Následná bunková smrť môže byť výsledkom bunkovej nekrózy, apoptózy alebo autofágiou spojená bunková smrť.^{32, 37}

3.2.3. Fotosenzitizéry

PSs sú farbivá definované ako látky schopné absorbovať svetlo so špecifickou vlnovou dĺžkou, spúšťajú fotochemické alebo fotofyzikálne reakcie.²⁷ Väčšina syntetických PSs skúmaných, za účelom PDT nádorových ochorení, sú porfyríny, chloríny, baktério-chloríny, alebo Pcs.³⁸

3.2.3.1. Ideálny fotosenzitizér

Ako v každej skupine liečiv, možno rozlíšiť súbor charakteristík a podmienok, ktoré popisujú ideálny PS.

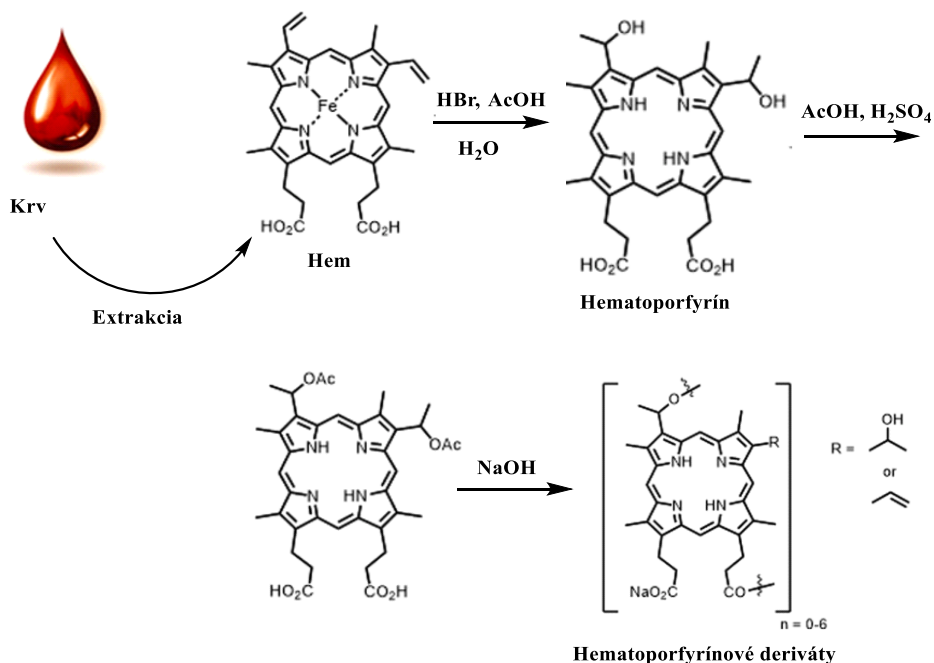
Nižšie uvedené teoretické úvahy umožňujú definovať ideálne fotosenzibilizačné činidlo. Skutočne používaná látka, nemusí spĺňať všetky podmienky.³³

- Vysoký stupeň chemickej čistoty
- Stabilita pri izbovej teplote
- Fotosenzitivita iba v prítomnosti špecifickej vlnovej dĺžky

- Vysoká fotochemická reaktivita, pričom maximálna absorpcia svetla by mala byť pri vlnových dĺžkach od 600 nm do 800 nm. Absorpcia svetla pri vlnovej dĺžke nad 800 nm neposkytuje dostatok energie, na produkciu reaktívnych foriem kyslíka.
- Absorpčné minimum v rozsahu od 400 nm do 600 nm. Predchádza sa tak možnej nadmernej fotosenzitivite spôsobenej slnečným žiarením. Absorpčné pásy by sa nemali prekrývať s absorpčným pásom iných látok v tele, vrátane endogénnych farbív ako melatonín, hemoglobín atď.
- Minimálna cytotoxicita v tme
- Ľahká rozpustnosť v tkanivách tela
- Vysoká selektivita pre neoplastické tkanivá
- Lacná a jednoduchá syntéza
- Ľahká dostupnosť²⁷

3.2.3.2. Generácie fotosenzitizérov

Prvá generácia PSs sa opiera o rôzne formy derivátov hematoporfyrínu, ktoré sa používajú u tisícok pacientov v klinických štúdiách viac ako 30 rokov. Hematoporfyrínový derivát je zmes obsahujúca veľké množstvo zlúčenín (monoméry, diméry a oligoméry), ktorá sa extrahuje zo sušenej krvi, nasledujúcimi syntetickými krokmi (Obr. 12). Prvý klinicky schválený PS bol porfimer sodný, komerčne známy ako Photofrin[®], ktorý sa využíva na liečbu niekoľkých typov nádorových ochorení ako je rakovina močového mechúra, pažeráka, mozgu. Napriek širokému využitiu majú PSs prvej generácie radu nevýhod. Majú nízku chemickú čistotu a môžu byť účinne aktivované iba s použitím vlnových dĺžok pod 640 nm, čo obmedzuje penetráciu svetla tkanivom. Navyše dlhý biologický polčas PSs spôsobuje, že pokožka je citlivá na svetlo až niekoľko týždňov, čo vyžaduje aby pacienti, ktorí sú nimi liečení, zostali v tmavej miestnosti až 6-týždňov. Na prekonanie týchto obmedzení sa vývoj novej generácie stal nevyhnutnou.^{32, 39}



Obrázok 12: Všeobecná syntetická metodológia pre hematoporfyrínový derivát. Prevzaté a upravené z lit.³⁹

PSs druhej generácie pozostávajú z čistých syntetických zlúčenín s aromatickým makrocyklom (porfyríny, benzoporfyríny, chloríny, bakteriochloríny a Pcs). Na rozdiel od prvej generácie PSs tieto porfyrinoidné zlúčeniny umožňujú lepšiu špecifickosť k nádoru a penetráciu svetla do hlboko umiestnených tkanív, pretože ich absorpčné spektrum je v rozsahu 650-800 nm. Navyše sa rýchlejšie vylučujú z tela, čo má za následok menej nežiadúcich účinkov. Ich hlavná nevýhoda, však spočíva v ich často zlej rozpustnosti vo vode. Táto vlastnosť spôsobuje ich agregáciu za fyziologických podmienok, čím sa znižuje výtlačok produkcie ROS. Hydrofóbná povaha, je tiež limitujúcim faktorom pre *i.v.* (intravenóznou) aplikáciu, čo núti hľadať nové spôsoby podávania liečiv. Preto bolo potrebné vyvinúť ďalšiu generáciu PSs.^{27, 32}

Vývoj tretej generácie PSs sa primárne zameriava na syntézu štruktúr s vyššou afinitou k cieľovým bunkám. Tieto PSs sa zvyčajne skladajú z PS druhej generácie alebo fotoaktivovateľného liečiva konjugovaného s biomolekulou alebo zapuzdreného v biodegradovateľných alebo biokompatibilných nanočasticiach (Obr.13). Zvyšuje sa stabilita, hydrofilnosť PS a zlepšuje sa farmakokinetika, farmakodynamika a biodistribúcia *in vivo*. Znižujú sa vedľajšie nežiadúce účinky.³² Vývoj budúcich PS tretej generácie je stále v počiatkovom štádiu. PS novej generácie by mal spĺňať: selektívnu akumuláciu v nádorových bunkách, mal by sa rýchlo metabolizovať a byť

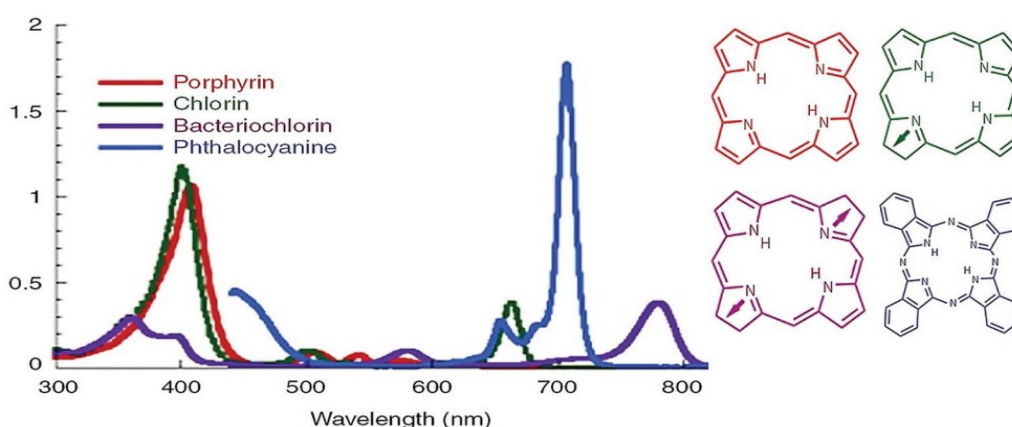
vylúčený z tela, mal by mať optimálnu vlnovú dĺžku pre excitáciu dlhšiu ako 650 nm, čo umožňuje hlbší prienik svetla do tkaniva a mal by byť hydrofilný, čo je lepšie pre klinické využitie.⁴⁰



Obrázok 13: Všeobecný návrh PS tretej generácie: A) konjugácia PS druhej generácie s cieľovou skupinou; B) zapuzdrenie PS druhej generácie do nosičov (lipozómy, micely, nanočastice). Prezaté a upravené z lit.³⁹

3.2.3.3. Príklady klinicky využívaných fotosenzitizérov

Klinicky používané PSs patria chemicky do rôznych skupín (porfyríny, chloríny, bakteriochloríny, Pcs) (Obr.14).



Obrázok 14: Absorpčné spektrá zobrazujúce porfyríny, chloríny, bakteriochloríny, Pcs. Prezaté z lit.⁴¹

PSs, ktoré sú bežne používané v terapii rakoviny, majú svoju štruktúru založenú na tetrapyrrolovom jadre (kostra simulujúca protoporfyrín nachádzajúci sa v hemoglobíne).

Prirodzene sa vyskytujúce tetrapyrolové štruktúry sa nachádzajú v heme, chlorofyle a baktério-chlorofyle. Syntetizované tetrapyroly zahŕňajú Pcs.⁴¹

Porfimer sodný (Photofrin®) je derivát hematoporfyrínu. Bol to prvý senzitizer, schválený americkým Food and Drug Administration (FDA). Priniesol povzbudivé výsledky pre liečbu určitých druhov nádorových ochorení, ale lekárska obec to nevnímala prelomovo. Nedostatočné výsledky môžu súvisieť s niektorými jeho vlastnosťami, ako je nízky molárny absorpčný koeficient pri 630 nm, ktorý znižuje pravdepodobnosť excitácie a vyžaduje pomerne vysoké dávky, aby dosiahol terapeutické účinky. Ďalej sa objavuje nízka selektivita medzi nádorovým a zdravým tkanivom a dlhý polčas eliminácie (21,5 dňa), ktorý spôsobuje 6-týždňovú kožnú fototoxicitu.^{38,42}

Temoporfin (Foscan®) má intenzívne absorpčné pásy pri dlhších vlnových dĺžkach, čím preniká svetlo do väčšej hĺbky. Terminálny plazmatický polčas temoporfinu je 65 hodín, čo vedie k 15-dňovej karanténe bez denného svetla. Klinické protokoly predpisujú dávky liečiva 0,1-0,15 mg/kg a osvetľovanie nádorov červeným svetlom (652 nm) s celkovou dávkou 10-20 J/cm² po 4-6 dňoch. Vo všeobecnosti sa syntetické deriváty porfyrínu eliminujú z nádoru pomalšie ako zo zdravých tkanív. Je to jeden z najstarších príkladov PS, používaných na liečbu rakoviny hlavy a krku.³⁸

Verteporfin (Visudyne®) bol pripravený reakciou esteru protoporfyrínu a esteru acetyléndikarboxylovej kyseliny. Je vysoko hydrofóbny, je približne štyrikrát aktívnejší *in vitro* ako hematoporfyrín, pri absorpcii svetla vo vlnových dĺžkach, ktoré najlepšie prenikajú tkanivom okolo 700 nm. Liečba verteporfinom selektívne ničí oblasti neovaskularizácie v oku. Verteporfin je indikovaný v prípadoch rakoviny kože, pankreasu a strate zraku vekom podmienenou makulárnou degradáciou.^{34,43}

5-aminolevulová kyselina (Levulan®, 5-ALA) je prírodná aminokyselina, nachádzajúca sa v živočíchoch a rastlinách. Je súčasťou syntézy hemu ako jeho endogénny prekursor. Je prekursorom PS protoporfyrínu IX, na ktorý sa konvertuje ako súčasť endogénneho hemového cyklu. Dodaním exogénnej ALA sa protoporfyrín IX špecificky akumuluje v nádorových bunkách. Pri akumulácii protoporfyrínu IX sú molekuly excitované špecifickými vlnovými dĺžkami svetla od 450-740 nm. Perorálne podávaná vykazuje vysokú nádorovú selektivitu a úspešne sa používa na fluorescenciou riadenú resekciu malígnych gliómov.⁴⁴ Ako liečivo PDT je ALA schopná ničiť povrchové lézie napr.

bazocelulárny karcinóm, spinocelulárny karcinóm a používa sa taktiež pri aktinickej keratóze.^{31,45}

Metylester kyseliny aminolevulovej (Metvix®) je v porovnaní s 5-aminolevulovou kyselinou jej lipofilnejší prekursor protoporfyrínu IX. Metvix® je registrovaný v EU aj v USA. Používa sa na liečbu aktinickej keratózy, povrchového alebo nodulárneho bazaliómu a Bowenovej choroby.⁴⁶

Talaporfín (Laserphyrin®) je PS druhej generácie, ktorý sa vyznačuje rýchlejšim vylučovaním z tela. Bol vyvinutý na zníženie fototoxicity kože a môže byť excitovaný dlhšími vlnovými dĺžkami v porovnaní s konvenčným PS. Endoskopická PDT s použitím sodnej soli talaporfínu bola pôvodne vyvinutá na kuratívnu liečbu včasnej rakoviny pľúc v Japonsku a bola schválená začiatkom 21. storočia. Podľa priaznivých výsledkov klinických štúdií bol schválený na rakovinu pažeráka, ako endoskopická liečba pre pacientov po chemoterapii.⁴⁷

Padeliporfín (Tookad®) je lipofilný komplex s paládiom odvodený od baktériochlorofylu. Padeliporfín je PS druhej generácie. Svetlo absorbuje v blízkej infračervenej oblasti 763 nm, čo umožňuje hĺbkový prienik do tkaniva. PS sa rýchlo vylučuje z obehu v priebehu niekoľkých hodín a nehromadí sa v tkanivách. V súčasnosti je registrovaný na klinické použitie v Mexiku.^{48,49}

Sulfónovaný hlinitý ftalocyanín (Photosens®) je zmes hlinitých Pcs, ktoré nesú dva alebo tri zvyšky kyseliny sulfónovej. Bol vyvinutý v Rusku k terapii karcinómu pľúc, prsníkov, hlavy, krku, krčka maternice atď. Absorbuje svetlo s vlnovou dĺžkou 675 nm.⁵⁰

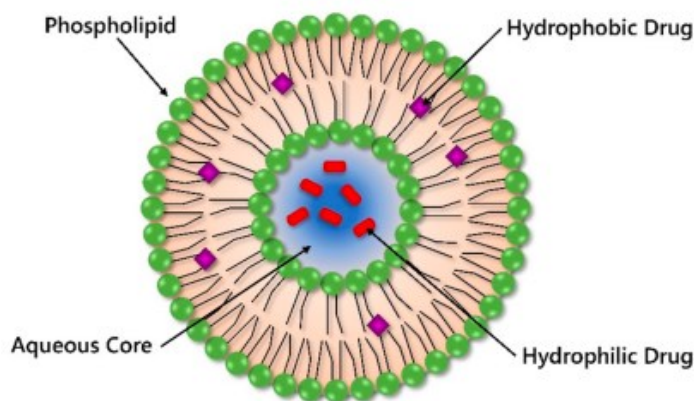
3.2.4. Výhody a nevýhody terapie

Hlavnou výhodou PDT je jej vysoká účinnosť, minimálna invazívnosť a žiadne závažne nežiadúce účinky v porovnaní s chemoterapiou alebo rádioterapiou. Obvykle je však vyžadovaná opakovateľnosť tejto liečby. Medzi hlavné nežiadúce účinky patrí bolesť a opuch v mieste ošetrovania, najčastejšie sa objavuje do 24-48 hod od ukončenia pôsobenia svetla. Ďalším častým nežiadúcim účinkom je zostatková fotosenzitivita, ktorá môže trvať až 6-týždňov v závislosti na použítom PS.^{51,52}

3.3. Svetlom spúšťané uvoľnenie liečiva (light triggered release)

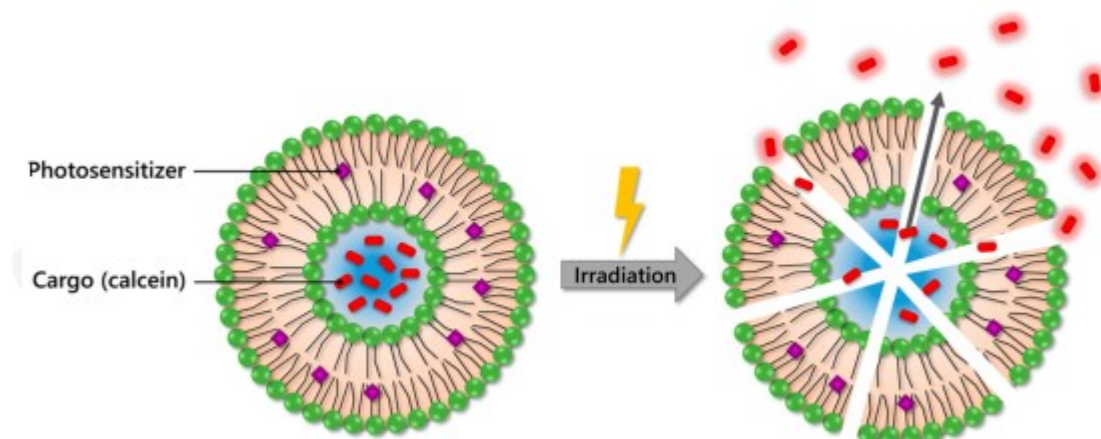
Systémy podávania liekov (Drug delivery systems) môžu nielen špecificky transportovať liečivá do nádorových miest, môžu taktiež niesť diagnostické a zobrazovacie činidlá pre kombinačnú terapiu, ktorá zlepšuje bezpečnosť a účinnosť. Lipozómy sú jednou z mála schválených platforiem nanočastíc pre klinickú liečbu rakoviny. Vodný lumen a lipidová dvojvrstva umožňujú enkapsuláciu hydrofilných a hydrofóbných molekúl (Obr.15). Vo všeobecnosti lipozómy dodávajú protirakovinové činidlá do nádorového tkaniva pasívnym cielením pomocou efektu zvýšenej permeability a retencie (EPR efekt, z angl. Enhanced permeability and retention effect).⁵³

Cieľom je kontrola času a miesta uvoľneného terapeutického činidla na dosiahnutie vysokej lokálnej koncentrácie, čím znížime celkovú dávku a systémovú toxicitu. V súčasnosti sa aktívne skúmajú rôzne vnútorne a vonkajšie spúšťače uvoľnenia ako je pH, špecifické enzýmy, magnetické pole. Svetlo je obzvlášť atraktívne, pretože ho možno aplikovať na diaľku. Okrem toho je možné upraviť široký rozsah parametrov (vlnová dĺžka, intenzita svetla, trvanie expozície atď.) na moduláciu profilov uvoľňovania. Svetlom spúšťané uvoľňovanie liečiva z lipozómov, generovaním singletového kyslíka PSs, je jedným z perspektívnych prístupov ako obmedziť toxicitu cytostatických chemoterapeutík.⁵⁴



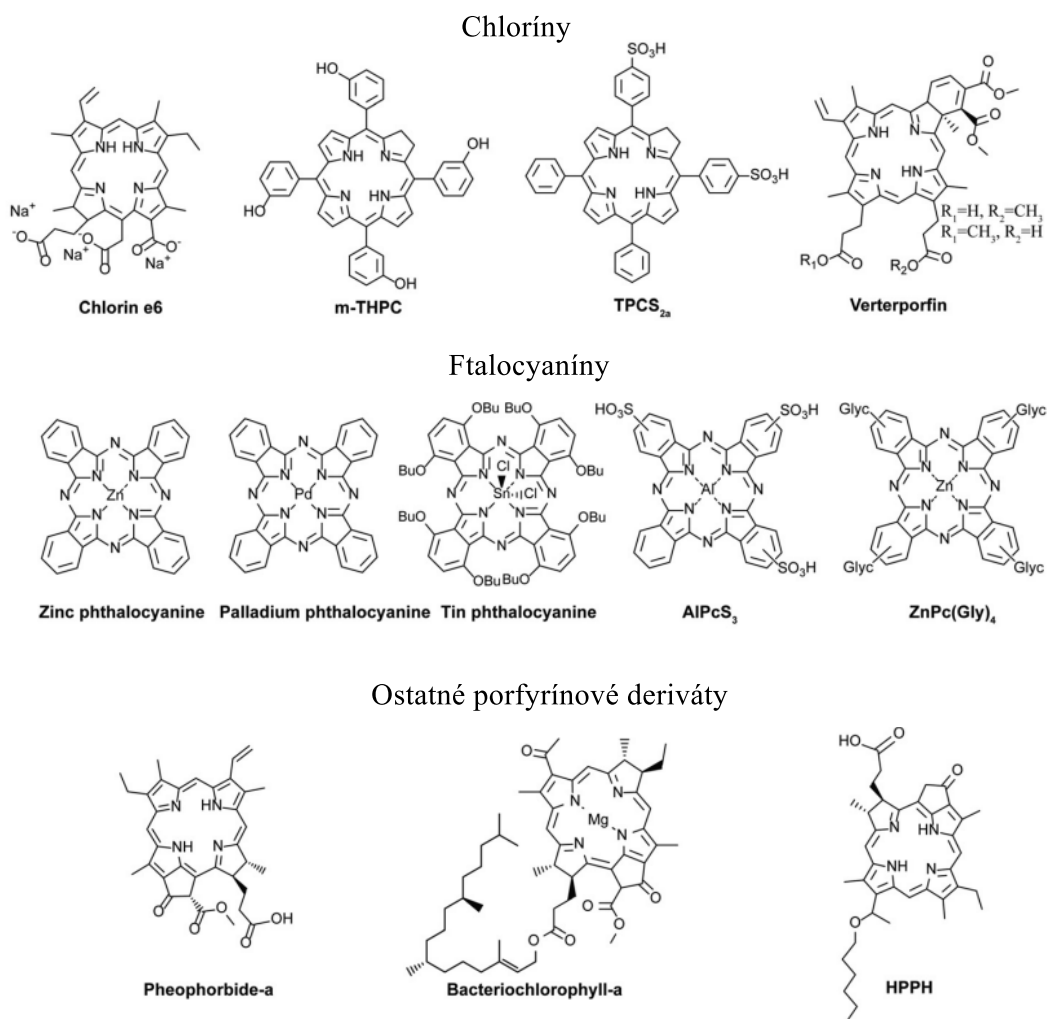
Obrázok 15: Schéma lipozómov citlivých na svetlo. Fosfolipidová dvojvrstva obklopuje vodné jadro, ktoré môže enkapsulovať hydrofilné liečivá. Lipofilný priestor je zapuzdrený lipidovou dvojvrstvou a umožňuje príjem hydrofóbných liečiv. Prevzaté z lit.⁵⁵

Lipozómy boli široko študované ako vehikulá na dodávanie liečiv a nedávny výskum začína ukazovať potenciál svetlom riadeného otvárania lipozómov. Lipozómy s fotoaktívnymi molekulami môžu uvoľniť svoj „náklad“ po ožiarení svetlom v mieste, kde sa má dané liečivo uvoľniť (Obr.16).⁵⁵



Obrázok 16: Schematicky znázornený proces uvoľňovania kalceínu po ožiarení. PS je zapuzdrený v hydrofóbnej časti lipozómu a excitovaný viditeľným svetlom. Kalceín je umiestnený do lipozómov v samozhášajúcich koncentráciách. Excitáciou PS vzniká singletový kyslík, ktorý vedie k deštrukcii lipozomálnej membrány. S uvoľňovaním enkapsulovaného kalceínu sa intenzita fluorescence zvyšuje. Prevzaté z lit.⁵⁵

Vloženie PSs do lipozómových dvojvrstiev umožňuje svetlom spúšťané uvoľnenie veľkého množstva rôznych látok. Na iniciáciu uvoľnenia bola skúmaná rada rôznych PS (Obr.17). Vzniknutý singletový kyslík v dvojvrstve môže oxidovať nenasýtené lipidy, čo vedie k membránovej permeabilizácii. Hydrofilné zlúčeniny môžu byť inkorporované buď pasívne alebo aktívne pomocou koncentračného spádu. Inkorporácia hydrofóbných molekúl prebieha počas formovania lipozómov, kde sa začlenia ako súčasť hydrofóbnej dvojvrstvy, tento proces môže byť časovo náročný.⁵⁶



Obrázok 17: Chemické štruktúry niektorých porfyrínových derivátov, ktoré sú inkorporované do lipozómu pre svetlom spúšťané uvoľňovanie liečiva. Prevzaté a upravené z lit.⁵⁷

Foto-spúšťané lipozómy možno vo všeobecnosti rozdeliť na dve hlavné skupiny v závislosti od mechanizmu interakcie medzi porfyrínovým derivátom a lipozómovou dvojvrstvou. Prvá skupina pozostáva z lipozómov, ktoré uvoľňujú svoje enkapsulované látky fotochemickou reakciou (medzi osvetleným PS a lipidovou dvojvrstvou), druhá skupina na základe procesu fotofyzikálnej aktivácie.⁵⁷

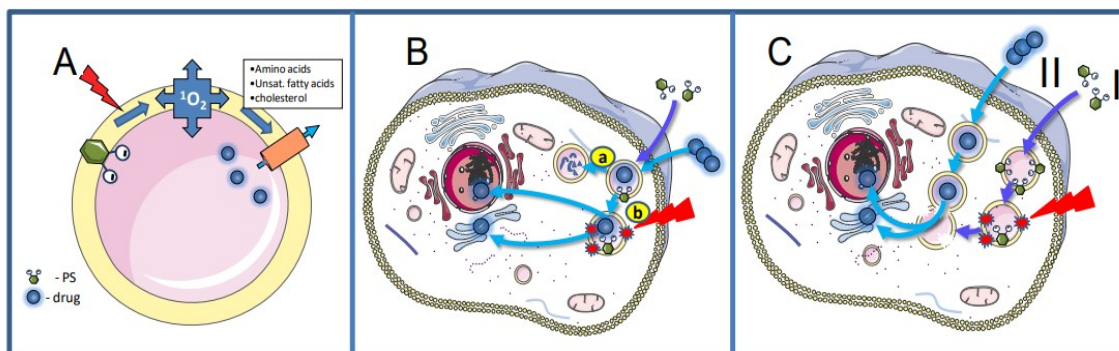
Mechanizmus uvoľňovania je potrebný pre funkčný systém dodávania liečiv. Fotochemická aktivácia uvoľňovania obsahu z lipozómov využíva napr. destabilizáciu lipidovej membrány pomocou svetlom indukovanej lipidovej peroxidácie, fotoštiepenia alkylových reťazcov, oxidatívnej depegylácie a.i.⁵⁸

Fotofyzikálne uvoľňovanie z lipozómov nezávisí na chemických zmenách štruktúr, ktoré sú vo vnútri alebo asociované s membránou. Princíp fotofyzikálneho uvoľňovania

využíva konverziu absorbovaného svetla s následnými tepelnými a/alebo mechanickými procesmi v lipidovej membráne a okolitom médiu s následným uvoľnením „nákladu“.^{57, 58}

3.4. Fotochemická internalizácia

Fotochemická internalizácia (PCI, z angl. Photochemical Internalization) je technologický postup, ktorý sa používa k uľahčeniu dodávania biologických aktívnych látok do cytosolu bunky. PCI je založená na použití PSs, napr. disulfónovaný hlinitý ftalocyanín (AlPcS_{2a}), umiestnených do endocytovaných vezikúl. Po aktivácii svetlom sa tvoria ROS, čo vedie k prasknutiu vezikúl a uvoľneniu obsahu do cytoplazmatickej matrice. Princíp mechanizmu PCI je opísaný na (Obr.18).^{59,60}



Obrázok 18: Schematicky popis technológie PCI. **A)** Obrázok ukazuje endocytickú vezikulu s PS umiestneným v membráne vezikuly, ktorý po vystavení svetlu vytvára reaktívne formy kyslíka, predovšetkým singletový kyslík, ktorý oxiduje biomolekuly v membráne, čím ju robí permeabilnou pre liečivá v matrici endocytovaných vezikúl. **B)** Liečivá, ktoré sú endocytované sa môžu akumulovať v lyzozómoch. Ak budú podrobené enzymatickej hydrolyze, nebudú uvoľnené tak nebudú schopné uplatniť žiadny terapeutický účinok (cesta a na obrázku). Alternatívne môžu byť liečivá uvoľnené do cytosolu pomocou PCI (cesta b na obrázku). **C)** V postupe „light first“ sa PS najskôr podáva do buniek (krok I) a potom nasleduje vystavenie svetlu. Po ukončení expozície svetlu sa podá liečivo, ktoré sa transportuje do endolyzozomálnej časti buniek (krok II) a fúzuje s fotochemicky roztrhnutými endolyzozómami a tým sa uvoľní do cytosolu.⁶⁰

PCI ako liečba závislá od svetla je atraktívnym prístupom k cieľnému dodávaniu liečiva, pretože v zásade iba miesta, ktoré budú vystavené svetlu o špecifickej vlnovej dĺžke napr. nádory, budú vystavené účinkom liečiva. Umožňuje dodávanie širokej škály zlúčenín a vďaka tomu je technika PCI všestranným nástrojom. Využíva sa hlavne pre molekuly,

ktoré majú nevýhodné farmakokinetické a biodistribučné vlastnosti a sú vysoko náchylné k enzymatickej degradácii.⁶¹

Dodávanie liečiva pomocou PCI je obmedzené na zónu osvetleného tkaniva a preto je technika špecifická pre danú lokalitu. Vývoj PCI ako techniky podávania liečiv čiastočne pochádza z PDT, ktorá zahŕňa aj podávanie PS. Excitácia vedie k produkcii ROS, najmä singletového kyslíka, ktorý môže oxidovať dôležité subcelulárne substráty vrátane membránových zložiek, ako sú nenasýtené lipidy a cholesterol. Ako PDT tak PCI sa pri tvorbe ROS spolieha na prítomnosť molekulárneho kyslíka. Avšak tieto dve liečby sa v kľúčových aspektoch líšia. Fotooxidačné poškodenie pri PCI, je navrhnuté tak, aby bolo subletálne, ale dostatočné, na uvoľnenie endozomálne zachytených liečiv, aby mohli dosiahnuť svoje zamýšľané intracelulárne ciele. Na rozdiel od PDT sa PSs, používané v PCI nepoužívajú k priamej bunkovej smrti. Zámerom PCI je totiž usmrtiť nádorové bunky, podávaným makromolekulárnym liečivom a nie fotochemickou reakciou.^{61,62}

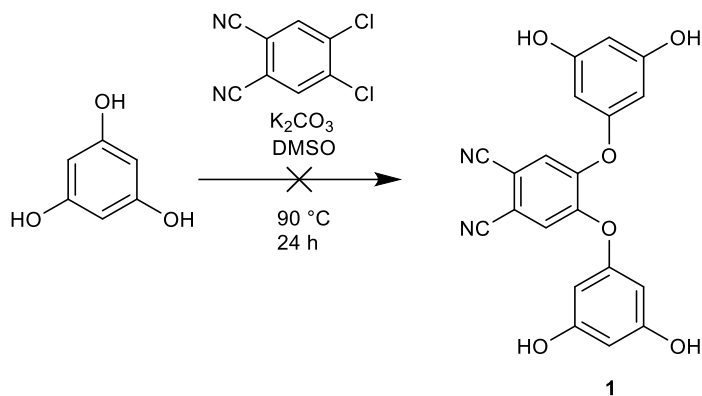
Terapeutické činidlá pre fotochemické dodávanie liečiv môžeme rozdeliť do štyroch hlavných skupín: proteíny, nukleové kyseliny, syntetické polyméry pre chemoterapeutické látky a iné molekuly, ktoré sa ťažko dostávajú cez bunkovú membránu. Predpokladom pre PCI je, že sa molekula hromadí v endocytických vezikulách. Prostredie vezikul môže stanoviť limity terapeutického účinku PCI v tom zmysle, že hydrolytické enzýmy v endocytických vezikulách môžu degradovať terapeutické činidlo. Ďalej ROS vytvorené fotochemickým ošetrovaním môžu inaktivovať terapeutické činidlo oxidačným procesom a taktiež to závisí od endocytickej aktivity cieľových buniek.⁶³

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Všetky organické rozpúšťadla, použité pre syntézu boli v analytickej kvalite. Bezvodý butanol (BuOH) pre cyklotetramerizáciu bol sušený horčíkom a pod spätným chladičom bol oddestilovaný v čase potreby. Všetky východiskové látky a rozpúšťadlá boli zakúpené od certifikovaných dodávateľov napr. Sigma-Aldrich, Penta, Acros, TCI Europe alebo Merck a boli použité, tak ako boli dodané. Teplota topenia látok bola nameraná pomocou digitálneho prístroja ELECTROTHERMAL IA9200. Priebeh reakcií a čistota produktov boli monitorované na doskách 60 F254 (Merck), pomocou chromatografie na tenkej vrstve. Čistenie výsledných produktov reakcií bolo uskutočnené pomocou stĺpcovej chromatografie na stacionárnej fáze Merck Kieselgel 60 (0,040 - 0,063 mm). Použité mobilné fázy sú uvedené pri jednotlivých reakciách. Pri odparovaní rozpúšťadiel bola používaná vákuová rotačná odparka Hei-VAP Value od firmy Heidolph. Detekcia pod UV lampou prebiehala pri vlnovej dĺžke 366 nm, prípadne 254 nm, UV lampa bola od firmy A.KRÜSS Optronik GmbH. ¹H NMR a ¹³C NMR spektrá boli merané na prístroji VNMR S 500 NMR. IČ spektrá boli merané na IČ spektrofotometri Nicolet 6700 v ATR móde. Hmotnostné spektrá s vysokým rozlíšením (HR-MS) boli merané pomocou UHPLC systému Acquity UPLC 1-class (Waters, Millford, USA) v spojení s hmotnostným spektrometrom s vysokým rozlíšením Synapt G2Si (Waters, Manchester, UK) pracujúcim na princípe detektoru Q-TOF (Quadrupole Time-of-Flight). Chromatografia pre toto HR-MS meranie bola vykonaná s využitím kolóny Acquity UPLC Protein BEH C4 (2,1 × 50 mm; 1,7 μm, 300 Å) s gradientovou elúciou acetonitrilom (ACN) a 0,1% kyselinou mravčiou pri prietoku 0,4 ml/min. K detekcii bola použitá ionizácia elektrosprejom (ESI) v pozitívnom móde, pričom spektrá boli zaznamenané v rozmedzí 500-5000 m/z s využitím leucín-enkefalínu ako referenčnej zlúčeniny a jodidu sodného k externej kalibrácii, alebo v rozmedzí 50- 2000 m/z s využitím leucín-enkefalínu ako referenčnej zlúčeniny a mravenčanu sodného pre externú kalibráciu.

4.1 Syntéza prekurzorov

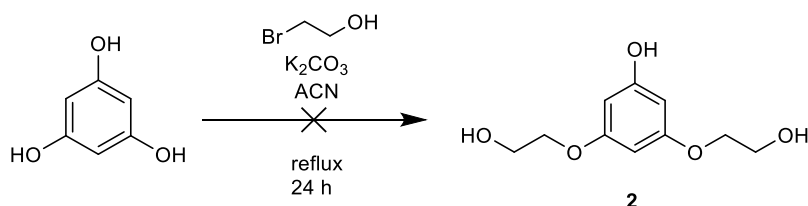
4.1.1. Príprava 4,5-bis(3,5-dihydroxyfenoxy)ftalonitrilu (1)



Benzén-1,3,5-triol (0,2 g; 1,59 mmol) bol s 4,5-dichlórftalonitrilom (0,082 g; 0,4 mol) rozpustený v bezvodom dimetylsulfoxide (DMSO, 20 ml). Postupne po častiach bol pridávaný bezvodý uhličitan draselný (0,436 g; 3,17 mmol). Zmes bola zahrievaná (90 °C) pod spätným chladičom v argónovej atmosfére za stáleho miešania počas 24 h. Po ukončení reakcie bol DMSO z reakčnej zmesi oddestilovaný na vákuovej rotačnej odparke. Po oddestilovaní DMSO bol pridaný etylester kyseliny octovej (EAC, 30 ml) a voda (50 ml). Zmes bola vytrepaná celkom trikrát s EAC (30 ml) a bola zbieraná organická vrstva. Organické frakcie boli spojené a odparené do sucha. Produkt bol vyčistený pomocou stĺpcovej chromatografie. Ako mobilná fáza bola použitá sústava EAC a kyselina octová v pomere 20:1. Produkt bol týmto spôsobom zbavený hrubých nečistôt. Bolo získaných 17 mg zeleno-hnedej práškovitej látky. Nukleárna magnetická rezonancia (NMR) ani hmotnostná spektrometria (MS) však nepotvrdili prítomnosť požadovaného produktu.

4.1.2. Príprava 3,5-bis(2-hydroxyetoxy)fenolu (2)

- **Nukleofilná substitúcia s využitím 2-brómetanolu**



Reakcia prebiehala v bezvodom prostredí pod plynným argónom. Do dvojhrdlej reakčnej banky s benzén-1,3,5-triolom (0,2 g; 1,59 mmol) bol pridaný bezvodý acetonitril (ACN, 20 ml) zmes bola zahrievaná pod spätným chladičom k teplote varu rozpúšťadla. Potom cez vzduchotesný uzáver za pomoci injekčnej striekačky bol pridaný 2-brómetanol (0,59 g; 4,76 mmol; 0,33 ml), za stáleho miešania. Postupne po častiach bol pridávaný bezvodý uhličitan draselný (1,31 g; 9,51 mmol) proti argónu. Pre nerozpustnosť uhličitanu draselného v ACN bol pridaný prídavok bezvodého DMSO (2,5 ml).

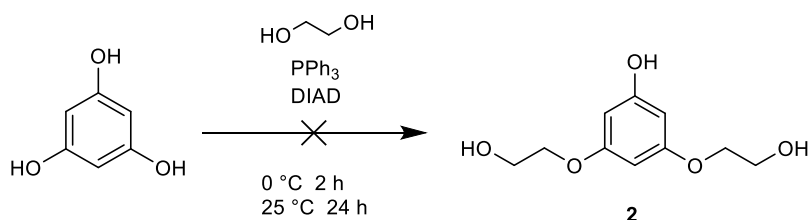
Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou chromatografie na tenkej vrstve (TLC), ako mobilná fáza bola použitá sústava EAC a kyselina octová v pomere 10:1. Reakcia prebiehala 24 h. Pomocou analytickej metódy MS-TLC boli detegované hmotnosti, ktoré zodpovedali východiskovej látke a substituovaným derivátom.

Po ukončení reakcie bol DMSO z reakčnej zmesi oddestilovaný na vákuovej rotačnej odparke. Po oddestilovaní DMSO bol pridaný EAC (30 ml) a destilovaná voda (50 ml) s kvapkou 5% HCl.

Zmes bola vytrepaná celkom trikrát s EAC (30 ml) a bola zbieraná organická vrstva. Organické frakcie boli spojené, vysušené pomocou bezvodého Na₂SO₄, prefiltrované a odparené do sucha. Produkt bol vyčistený pomocou stĺpcovej chromatografie. Ako mobilná fáza bola použitá sústava EAC a kyselina octová v pomere 20:1. Produktom reakcie bolo 30 mg hnedej látky. Na základe TLC, bolo vidno zvyšky východiskovej látky a tri-substituovaný derivát, ani NMR analýza nepotvrdila očakávanú štruktúru.

Reakcia bola skúšaná druhýkrát so zmenou v použitej báze, pričom bol použitý 1M vodný roztok NaOH (15 ml), zvyšný postup reakcie nebol menený. Produktom reakcie bolo 25 mg bledo-hnedej látky. NMR analýza taktiež nepotvrdila očakávanú štruktúru.

• *Syntéza podľa Mitsunobu*

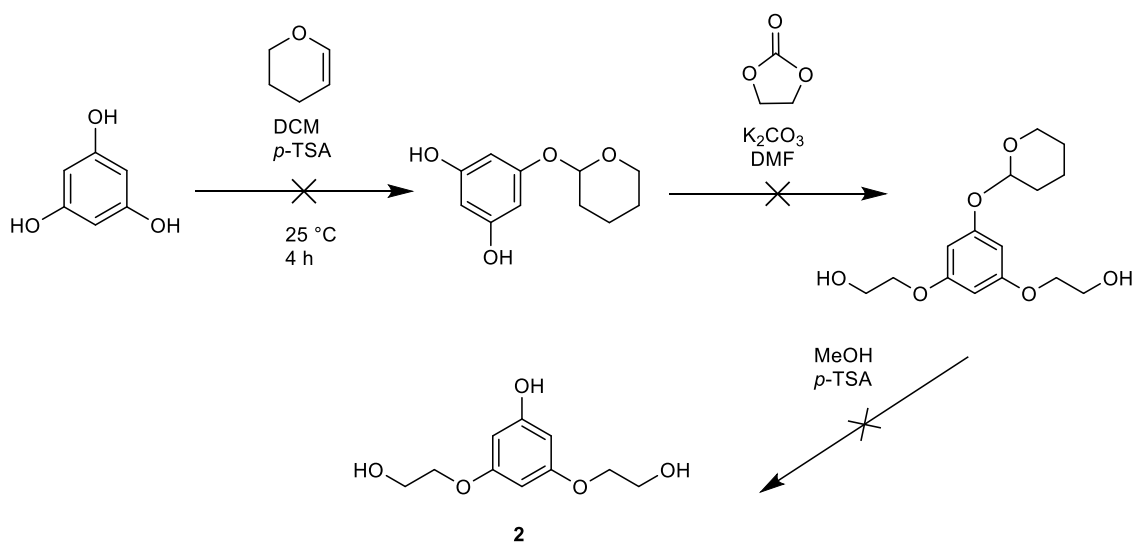


Reakcia prebiehala v bezvodom prostredí, pod argónom. Banka s benzén-1,3,5-triolom (0,2 g; 1,59 mmol) a trifenyľfosfínom (PPh₃, 0,85 g; 3,18 mmol) bola vzduchotesne

uzavretá a bol v nej vymenený vzduch za argón. Striekačkou s ihlou cez vzduchotesný uzáver bol pridaný etylénglykol (0,5 ml; 3,18 mmol). Reakcia prebiehala za stáleho miešania a bola chladená pomocou ľadu na 0 °C. V druhej banke bol pripravený roztok diizopropylazodikarboxylátu (DIAD, 0,323 g; 3,18 mmol) v bezvodom tetrahydrofuráne (THF, 10 ml), banka bola vzduchotesne uzavretá a opäť bol vymenený vzduch za argón. Pomocou injekčnej striekačky bol roztok DIAD v THF postupne po kvapkách pridávaný do reakčnej zmesi pri teplote 0 °C (kvôli minimalizácii tvorby vedľajších produktov), po roztopení ľadu reakcia prebiehala pri laboratórnej teplote. Priebeh reakcie bol monitorovaný, reakcia prebiehala 24 h.

Po odparení rozpúšťadla na vákovej odparke, bola pridaná destilovaná voda (40 ml). Vodný roztok bol trikrát vytrepáný s EAC (20 ml). Organické frakcie boli spojené, vysušené pomocou bezvodého Na₂SO₄, prefiltrované a odparené do sucha. Produkt bol vyčistený pomocou stĺpcovej chromatografie. Ako mobilná fáza bola použitá sústava EAC a kyselina octová v pomere 20:1. Výsledným produktom bol 1 g bledo-hnedej látky. Na základe TLC bolo vidieť že reakcia neprebehla. Boli viditeľné intenzívne škvrny pre východiskovú látku a pre stále ešte veľké množstvo PPh₃.

- **Syntéza s využitím 3,4-dihydro-2H-pyranu ako chrániacej skupiny**



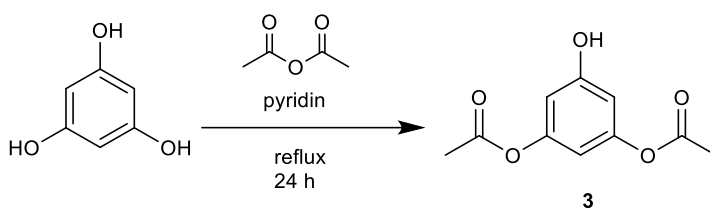
Reakčná aparatúra spolu s miešadlom bola sušená za pomoci teplovzdušnej pištole, za účelom minimalizovania prítomnej vlhkosti. Reakcia prebiehala v bezvodom prostredí pod inertnou argónovou atmosférou. Benzén-1,3,5-triol (1 g; 7,9 mmol) bol rozpúšťaný

v bezvodom dichlórmetáne (DCM, 10 ml), za stáleho miešania, pri laboratórnej teplote. Pridala sa *p*-toluénsulfónová kyselina (*p*-TSA, 0,16 g; 0,65 mmol) a potom bol po kvapkách pomocou injekčnej striekačky pridaný 3,4-dihydro-2*H*-pyran (0,5 ml; 6,5 mmol). Pre zlú rozpustnosť vychádzajúcej látky bol do reakcie ako kosolvent pridaný bezvodý THF (10 ml). Priebeh reakcie bol kontrolovaný pomocou TLC, ako mobilná fáza bola použitá sústava hexán a EAC v pomere 1:1. Reakčná zmes sa miešala pri laboratórnej teplote počas 4 h.

Rekčná zmes bola premytá nasýteným roztokom hydrogénuhličitanu sodného (10% roztok) a extrahovala sa trikrát DCM. Organické frakcie boli spojené, vysušené pomocou bezvodého Na₂SO₄ a odparené do sucha na vákuovej rotačnej odparke.

Produkt reakcie bol vyčistený pomocou stĺpcovej chromatografie, za použitia mobilnej fáze hexán a EAC v pomere 1:1. Výsledkom bolo 58,4 mg bielej práškovanej látky. Látka bola stále znečistená, analýza MS-TLC nepotvrdila očakávanú hmotnosť produktu, NMR analýza nepotvrdila očakávanú štruktúru. Pre neúspešnosť prvého kroku reakcie sa zamýšľaným spôsobom ďalej nepokračovalo.

4.1.3. Príprava 5-hydroxy-1,3-fenylen-diacetátu (3)



K roztoku benzén-1,3,5-triolu (1,04 g; 8,25 mmol) v pyridíne (15 ml) bol za miešania pridávaný acetanhydrid (2,12 g; 20 mmol). Zmes bola zahrievaná pod spätným chladičom k teplote varu rozpúšťadla. Reakcia prebiehala 24 h. Po ukončení reakcie bol pyridín odparený za zníženého tlaku. Následne bola pridaná destilovaná voda (50 ml).

Vodný roztok bol trikrát vytrepáný s EAC (30 ml). Organické frakcie boli spojené, vysušené pomocou bezvodého Na₂SO₄, prefiltrované a odparené do sucha. Produkt bol vyčistený pomocou stĺpcovej chromatografie, ako mobilná fáza bola použitá sústava

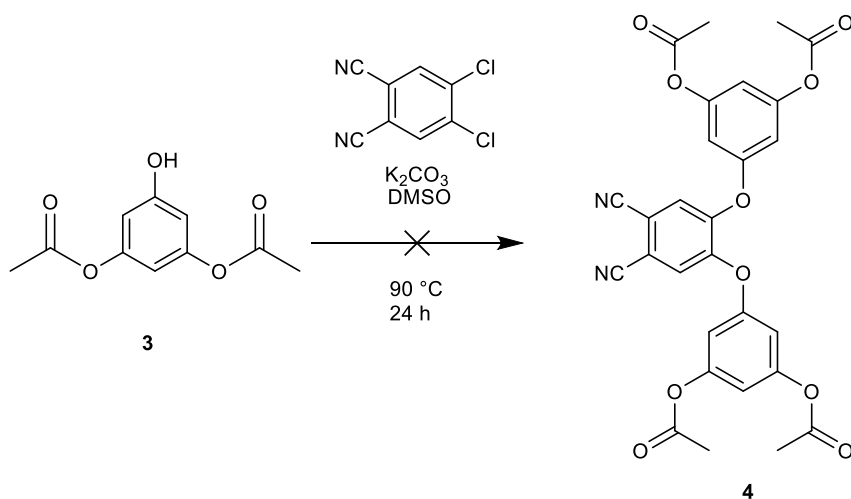
hexán a EAC 5:1. Bolo získaných 1,5 g (88 %) bielej látky. NMR analýza potvrdila štruktúru.

Dáta pre látku **3**:

t.t.: 116-120 °C. IČ (ATR): $\nu_{\max} = 3350, 1750, 1726, 1618, 1600, 1494 \text{ cm}^{-1}$. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.44 (s, 3H), 2.28 (s, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 169.63, 168.79, 159.39, 151.45, 151.04, 107.04, 104.02, 58.57, 21.08, 21.02. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ vypočítané pre $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_5$, 211,0601; namerané: 211,0600.

4.1.4. Príprava [(4,5-dikyano-1,2-fenylen)bis(oxy)]bis(benzén5,1,3triyl) tetraacetátu (4)

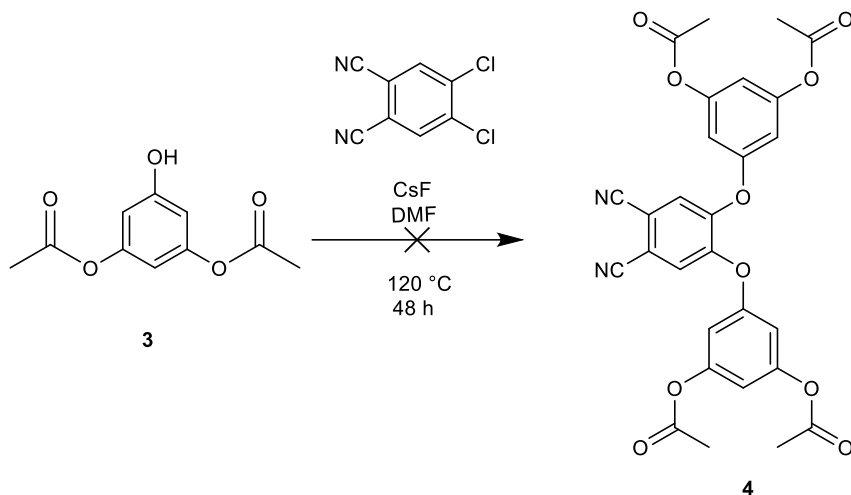
- *Za použitia uhličitanu draselného*



Látka **3** (0,133 g; 0,63 mmol) bola s 4,5-dichlórfalónitriľom (0,05 g; 0,25 mmol) rozpustená v bezvodom DMSO (20 ml). Postupne po častiach bol pridávaný uhličitan draselný (0,088 g; 0,63 mmol). Zmes bola zahrievaná (90°C) pod spätným chladičom v inertnej argónovej atmosfére za stáleho miešania počas 24 h. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou TLC, ako mobilná fáza bola použitá sústava EAC a kyselina octová 20:1. Po ukončení reakcie bol DMSO z reakčnej zmesi oddestilovaný na vákuovej rotačnej odparke. Potom bola pridaná destilovaná voda (30 ml) a chloroform (30 ml). Zmes bola vytrepaná trikrát s chloroformom (30 ml) bola zbieraná dolná vrstva a bola odparená do sucha. Produkt bol vyčistený pomocou stĺpcovej chromatografie, bola

použitá mobilná fáza EAC a kyselina octová v pomere 20:1. Výsledkom bolo 120 mg hnedej látky, avšak NMR spektrum, ani MS nepotvrdili štruktúru konečného produktu.

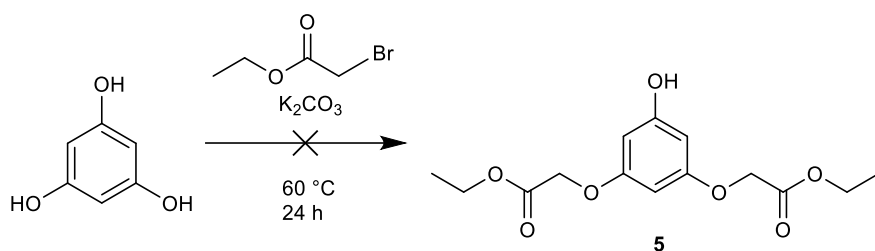
- **Za použitia fluoridu cezného**



Reakčná aparatúra spolu s miešadlom bola sušená pomocou teplovzdušnej pištole za účelom zbavenia sa vlhkosti. Reakcia prebiehala v bezvodom prostredí pod inertnou argónovou atmosférou. Do banky s 5-hydroxy-1,3-fenylen-diacetátom (0,133 g; 0,63 mmol) a 4,5-dichlórflalonitrilom (0,05 g; 0,25 mmol) bol pridaný bezvodý *N,N*-dimetylformamid (DMF, 10 ml). Reakčná zmes bola zahrievaná pod spätným chladičom za stáleho miešania (120 °C). Po 30 min bol pridávaný 0,5 ekvivalentu CsF po dobu 90 min. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou TLC, ako mobilná fáza bola použitá sústava hexán a EAC v pomere 1:1. Reakcia bola zahrievaná 48 h.

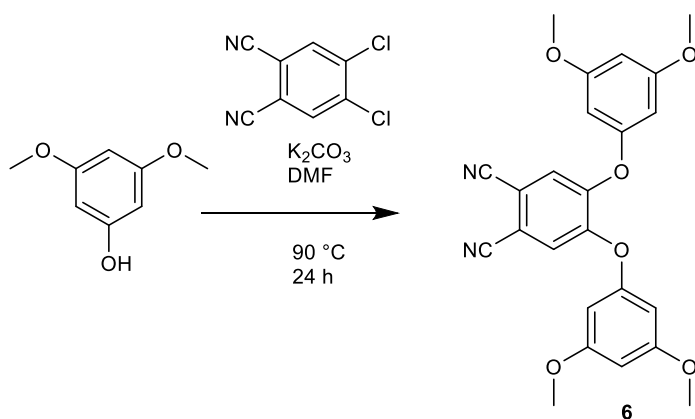
Po ukončení reakcie bol DMF z reakčnej zmesi oddestilovaný pomocou vákuovej rotačnej odparky. Následne bola pridaná destilovaná voda (50 ml). Vodný roztok bol trikrát vytrepaný s EAC (30 ml). Produkt bol zbavený rozpustných solí a nadbytku fenolátu. Organické frakcie boli spojené, vysušené pomocou bezvodého Na₂SO₄, prefiltrované a odparené do sucha. Produkt bol vyčistený pomocou stĺpcovej chromatografie, pričom ako mobilná fáza bola použitá sústava hexán a EAC 3:1. Výsledok reakcie bol posudzovaný pomocou TLC, avšak ani po 48 hodinách nebol pozorovaný vznik zamýšľaného produktu, pričom MS taktiež nepotvrdila hmotnosť, ktorá by zodpovedala očakávanej látke.

4.1.5. Príprava dietyl 2,2'-[(5-hydroxy-1,3-fenylen)bis(oxy)]diacetátu (5)



Reakčná aparatúra spolu s miešadlom bola sušená pomocou teplovzdušnej pištole za účelom zbavenia sa vlhkosti. Do banky s benzén-1,3,5-triolom (0,25 g; 1,98 mmol) bol pridaný bezvodý ACN (5 ml) a štipka KI. Reakcia prebiehala v bezvodom prostredí pod inertnou argónovou atmosférou, pod spätným chladičom za zahrievania na teplotu ($60\text{ }^\circ\text{C}$). Potom bol do reakcie pridaný etylbromacetát (0,76 ml; 4,55 mmol) a po častiach bol pridávaný uhličitan draselný (1,09 g; 7,92 mmol) za stáleho miešania a zahrievania. Reakcia bola zahrievaná na $60\text{ }^\circ\text{C}$ a prebiehala 24 h. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou TLC. Produkt bol vyčistený pomocou stĺpcovej chromatografie ako mobilná fáza bola použitá sústava hexán a EAC v pomere 2:1. Na základe NMR analýzy nebol potvrdený náš očakávaný produkt, ale štruktúra zodpovedala tri-substituovanému derivátu. Reakcia bola optimalizovaná použitím polovičného množstva K_2CO_3 , skrátením reakčnej doby, znížením teploty, avšak štruktúra stále nezodpovedala očakávanému produktu.

4.1.6. Príprava 4,5-bis(3,5-dimetoxyfenoxy)ftalonitrilu (6)



Reakčná aparatúra spolu s miešadlom bola sušená pomocou teplovzdušnej pištole za účelom zbavenia sa vlhkosti. Reakcia prebiehala v bezvodom prostredí pod inertnou argónovou atmosférou. Do banky s 4,5-dichlórfalonitrilom (1,02 g; 5,17 mmol) s

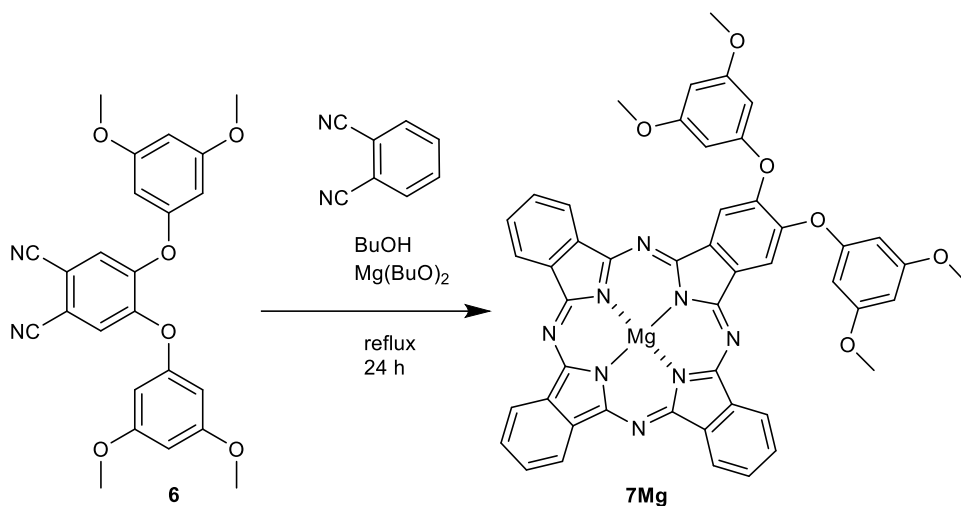
3,5- dimetoxyfenolom (2,5 g; 15,51 mmol) bol pridaný bezvodý DMF (20 ml) . Reakčná zmes bola zahrievaná pod spätným chladičom za stáleho miešania na teplotu 90 °C, po dobu 24 h. Po ukončení reakcie bol DMF pomocou vákuovej rotačnej odparky oddestilovaný a do odparku bola pridaná voda za vzniku suspenzie. Produkt bol z reakčnej zmesi vákuovo odsatý na frite a dôkladne premytý etanolom (EtOH). Priebeh a čistota reakcie bola monitorovaná pomocou TLC ako mobilná fáza bola použitá sústava hexán a etyl-acetát v pomere 2:1. Látka ešte stále nebola čistá, tak sa produkt rozpustil zahrievaním v DMSO (20 ml), po ochladení bolo pridaných 25 ml EtOH a banka sa dala na noc do chladničky. Zo zmesi bola potom odsávaná biela kryštalická látka, za sústavného premývania EtOH. Výsledným produktom bolo 1,9 g bielej látky. Reakcia bola opakovaná s priemerným výťažkom 86 %.

Dáta pre látku 6:

t.t.: 268- 273,3 °C. ĪĀ (ATR): ν_{\max} = 3545, 3045, 2945, 2840, 2232, 1748, 1748, 1713, 1697,1681, 1670, 1621, 1573, 1503 cm^{-1} . ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆, 90 °C) δ 7.74 (s, 2H), 6.37 (t, *J* = 2.2 Hz, 2H), 6.24 (d, *J* = 2.1 Hz, 4H), 3.74 (s, 12H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆, 90°C) δ 161.26, 156.33, 150.49, 124.83, 114.73, 110.62, 97.13, 96.93, 55.14. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ vypočítané pre C₂₄H₂₀N₂O₆, 433,1394; namerané: 433,1401.

4.2. Cyklotetramerizácia

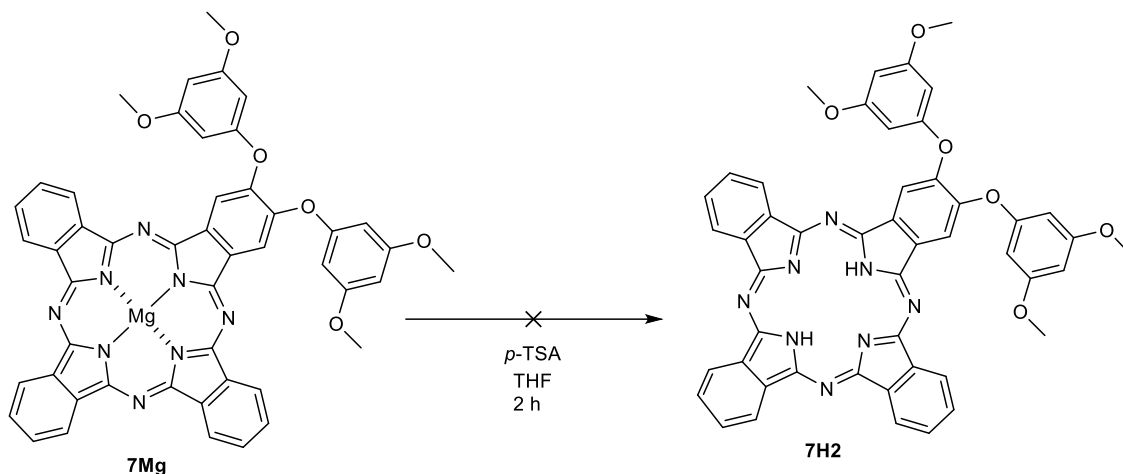
4.2.1. Príprava 2,3-bis(3,5-dimetoxyfenoxy)ftalocyaninátu horečnatého komplexu (7Mg)



Do destilačnej banky bol k bezvodému BuOH (20 ml) pridaný horčiek (0,3 g; 12,48 mmol) a pár kryštálov jódu. Zmes bola miešaná a zahrievaná pod spätným chladičom na teplotu varu rozpúšťadla, pokiaľ všetok horčiek nezreagoval na butanolát horečnatý (reakcia trvala približne 4 h). Po 4 h bol do destilačnej banky pridaný prekurzor **6** (0,2 g; 0,45 mmol) a ftalonitril (0,17 g; 1,34 mmol). Reakcia prebiehala 24 h za rovnakých podmienok.

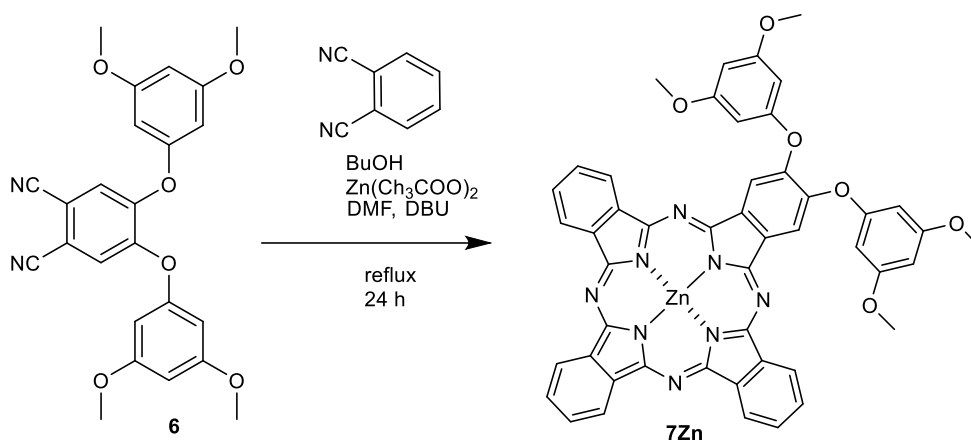
Po 24 h bola banka ochladená a po ukončení reakcie bol BuOH oddestilovaný na vákuovej rotačnej odparke a bola pridaná zmes voda:metanol (MeOH):kyselina octová (20:4:1, 125 ml). Suspenzia bola miešaná 1 h pri laboratórnej teplote. Po premiešaní sa produkt prefiltroval, premyl vodou a MeOH. Pevná látka bola následne rozpustená v chloroforme. Bolo získaných 0,58 g látky, ktorá bola pomocou stĺpcovej chromatografie vyčistená od hrubých nečistôt, za použitia mobilnej fázy chloroform a MeOH v pomere 50:1. Avšak nepodarilo sa nájsť takú mobilnú fázu, vďaka ktorej by sa od seba dobre odseparovali jednotlivé kongenéry.

4.2.2. Príprava 2,3-bis(3,5-dimetoxyfenoxy)ftalocyanínu (7H2)



Ďalším krokom bola snaha zlúčeninu odkovíť, pre lepšiu separáciu. Horečnatý komplex (0,29 g; 0,34 mmol) bol rozpustený v THF (5 ml). Následne bol pridaný monohydrát kyseliny *p*-toluénsulfónovej (0,05 g; 0,24 mmol) a zmes bola miešaná 2 h za účelom odkovenia zmesi. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou TLC, chloroform a MeOH v pomere 80:1. Podľa TLC reakcia neprebehla dostatočne a bola pridaná ďalšia *p*-toluénsulfonová kyselina (0,05 g; 0,24 mmol) a zmes bola stále miešaná. Potom bola reakcia odparená na vákuovej odparke. Do odpareného zbytku, bola pridaná voda, zmes bola prefiltrovaná a vyextrahovaná pomocou chloroformu (3×30 ml). Organická fáza bola pozbieraná, vysušená pomocou bezvodého Na₂SO₄, opäť prefiltrovaná a potom odparená na vákuovej odparke. Zmes bola čistená pomocou stĺpcovej chromatografie, použila sa mobilná fáza chloroform a MeOH v pomere 80:1. Podľa TLC sa nepodarilo odseparovať kongenéry a bola detegovaná iba jedna veľká škvrna.

4.2.3. Príprava 2,3- bis(3,5- dimetoxifenoxy)ftalocyanináto zinočnatého komplexu (7Zn)



Do destilačnej banky bol k bezvodému BuOH (20 ml) pridaný prekursor **6** (1 g; 2,23 mmol) a ftalonitril (2,58 g; 20,07 mmol). Zmes bola miešaná a zahrievaná pod spätným chladičom na teplotu varu rozpúšťadla. Do reakčnej zmesi bol pridaný DMF (5 ml), katalytické množstvo DBU (1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en) a octan zinočnatý (4 g; 22,3 mmol). Reakcia bola zahrievaná po dobu 24 h.

Po 24 h bola banka ochladená a po ukončení reakcie bol BuOH oddestilovaný na vákuovej rotačnej odparke, potom bola pridaná destilovaná voda (50 ml) a reakčná zmes bola rozsuspodovaná, prefiltrovaná a následne rozpustená v THF.

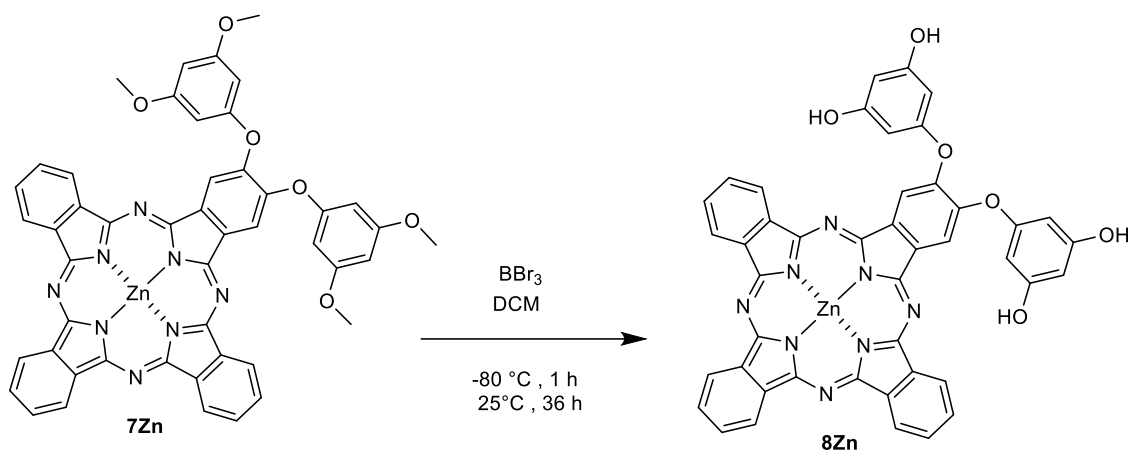
Reakčná zmes bola prečistená stĺpcovou chromatografiou v sústave toluén, THF a pyridín v pomere 25:1:2,5, čím sa podarilo vyseparovať očakávanú látku. Produkt bol následne rozpustený v chloroforme (3 ml), prekvapkaný do hexánu (150 ml) a bol uschovaný v chlade. Vyzrážaný produkt bol odsatý na frite a vysušený.

Bolo získaných 0,8 g modrej práškovanej látky. Reakcia bola opakovaná viackrát s 40% priemerným výťažkom.

Dáta pre látku **7Zn**:

IČ (ATR): ν_{\max} = 3524, 3502, 3205, 1867, 1773, 1724, 1697, 1682, 1669, 1647, 1555, 1542, 1522, 1508 cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃/pyridin-d₅ 3:1) δ 9,50-9,27 (m, 6H); 9,23-9,13 (m, 2H); 8,21-8,11 (m, 6H); 6,65-6,62 (m, 4H); 6,44 (t, J = 2,2 Hz, 2H); 3,82 (s, 12H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃/pyridin-d₅ 3:1) δ 161,65; 159,80; 149,64; 149,57; 138,27; 135,66; 135,46; 129,05; 129,01; 123,50; 115,00; 96,93; 95,56; 55,20. HRMS (m/z): [M+H]⁺ vypočítané pre C₄₈H₃₂N₈O₆Zn, 881,1809; namerané: 881,1804.

4.2.4. Príprava 2,3-bis(3,5-dihydroxyfenoxy)ftalocyaninátu zinočnatého komplexu (8Zn)



Do destilačnej banky s prekuzorom **7Zn** (0,1 g; 0,11 mmol) bol pridaný bezvodý DCM (10 ml) pomocou injekčnej striekačky cez vzduchotesný uzáver. Do reakcie bol pridaný bromid boritý (1 ml; 0,9 mmol), ktorý bol pomaly prikvapkovaný, reakcia prebiehala za stáleho miešania pri teplote $-80\text{ }^\circ\text{C}$ počas 1 h, potom za laboratórnej teploty 36 h. Do vzduchotesného uzáveru bol pridaný balónik s ihlou pre unikajúci plyn.

Po ukončení reakcie bola reakčná zmes prevedená do destilovanej vody, ktorá bola ochladená za použitia ľadu a NaCl (150 ml). Vzniknutá suspenzia bola prefiltrovaná a následne rozpustená v MeOH a vysušená na vákuovej rotačnej odparke. Produkt bol ďalej čistený pomocou stĺpcovej chromatografie, kde sa na začiatku použila mobilná fáza toluén, THF a pyridín v pomere 25:1:2,5, čím sme odseparovali vychádzajúcu látku, potom sa mobilná fáza zrýchlila použitím zmesi toluén, THF, pyridín a MeOH v pomere 5:1:20:1 a nakoniec bola látka vymytá pyridínom. Výsledným produktom bolo 0,03 g modrej látky, reakcia bola skúšaná opakovane, s priemerným výťažkom 30 %.

Dáta pre látku **8Zn**:

$\bar{\nu}$ (ATR): $\nu_{\text{max}} = 3502, 3270, 2929, 1868, 1771, 1716, 1698, 1681, 1671, 1647, 1601\text{ cm}^{-1}$. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 9,55 (s, 4H); 9,40 – 9,35 (m, 4H); 9,32 (d, $J = 7,0\text{ Hz}$, 2H); 8,96 (s, 2H); 8,27 – 8,17 (m, 6H), 6,21 (d, $J = 2.1\text{ Hz}$, 4H), 6,15 (t, $J = 2.1\text{ Hz}$, 2H). HRMS sa nepodarilo namerať, preto nie je uvedené v tejto práci.

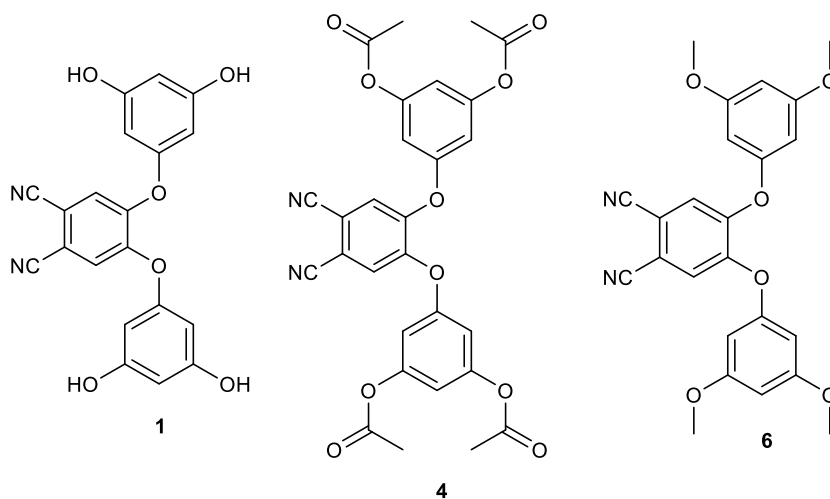
5 DISKUSIA

Cieľom mojej diplomovej práce bola príprava neutrálnych amfifilných Pcs. Ako cieľové zlúčeniny boli navrhnuté neionogénne nesymetrické zinočnaté deriváty Pcs, ktoré by mali na svojej periférii hydrofilné skupiny. Vo všeobecnosti syntéza ftalocyanínových látok vychádza z cyklotetramerizácie vhodných prekursorov, aromatických *ortho*-dikarbonitrilov. Preto bola táto práca založená na príprave vhodných prekursorov, následne ich tetramerizácií a izolácií nesymetrického Pc typu AAAB.

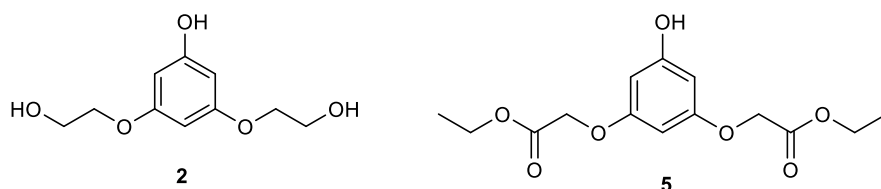
5.1. SYNTÉZA PREKURZOROV

Syntéza prekursorov vychádzala z komerčne dostupného 4,5-dichlórfталонitrilu, ktorý bol v elektróndeficientných polohách 4 a 5 modifikovaný pomocou aromatickej nukleofilnej substitúcie. Vďaka zápornému mezomérenmu efektu nitrilových skupín a zápornému indukčnému efektu chlóru, bol uľahčený priebeh reakcie.

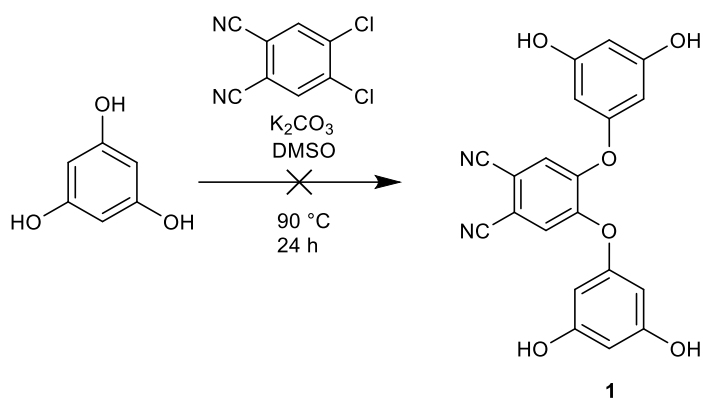
Syntéza zamýšľaných prekursorov bola rozdelená na dve skupiny. V prvej skupine látka podliehala hneď v prvom kroku reakcie nukleofilnej substitúcie so 4,5-dichlórfталонitrilom (Obr. 19). Do druhej skupiny potom patrili látky, ktoré bolo treba najskôr upraviť a potom by podliehali nukleofilnej substitúcie (Obr. 20).



Obrázok 19: Schéma zamýšľaných prekursorov, ktoré boli pripravované nukleofilnou substitúciou so 4,5-dichlórfталонitrilom.



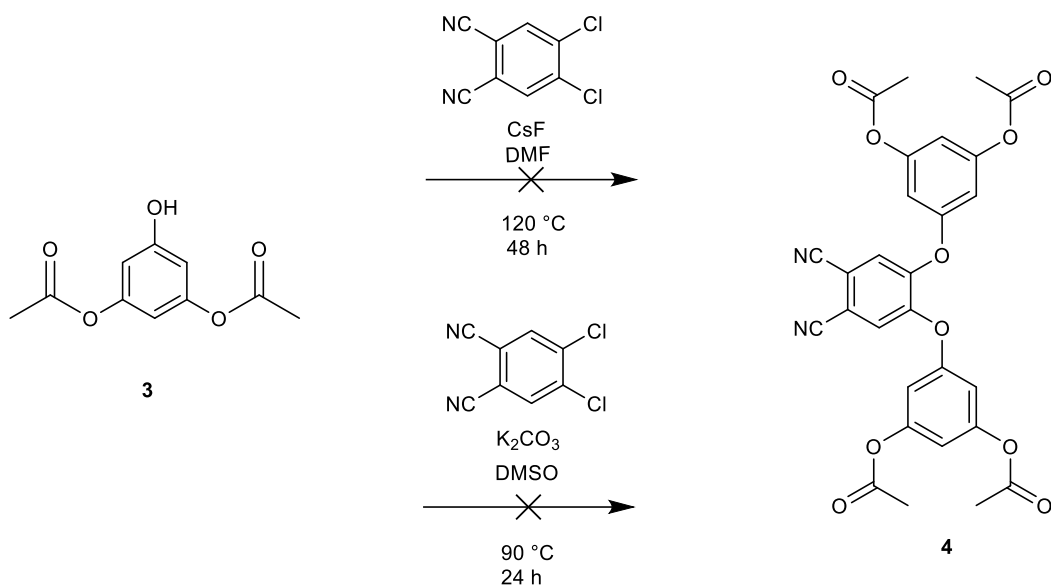
Obrázok 20: Schéma zamýšľaných prekursorov, ktoré boli pripravované z benzén-1,3,5-triolu.



Obrázok 21: Schéma prípravy zlúčeniny 1.

Ako prvú reakciu sme skúšali nukleofilnú substitúciu priamo s benzén-1,3,5-triolom (Obr. 21). Benzén-1,3,5-triol bol s 4,5-dichlórfalonitrilom rozpustený v bezvodom DMSO (vznikajúci fenolát je stabilnejší v bezvodom prostredí). Po častiach bol pridávaný bezvodý uhličitan draselný, zmes bola zahrievaná na 90 °C pod spätným chladičom v argónovej atmosfére za stáleho miešania 24 h. Po vyčistení stĺpcovou chromatografiou, sme výsledný produkt analyzovali pomocou NMR, ktoré však nepotvrdilo požadovanú štruktúru. Príčina neúspechu reakcie mohla byť nukleofilná substitúcia za vzniku éterového mostíka medzi voľnými hydroxylovými skupinami.

Ďalšími reakčnými prístupmi sme chceli nasyntetizovať prekuzory, ktoré by mali dve hydroxylové skupiny chránené, tým zamedziť ich nechcenej reaktivite. Odchránenie by prebehlo až po tetramerizačnej reakcii s možnosťou postsyntetickej modifikácie na ďalšie deriváty.

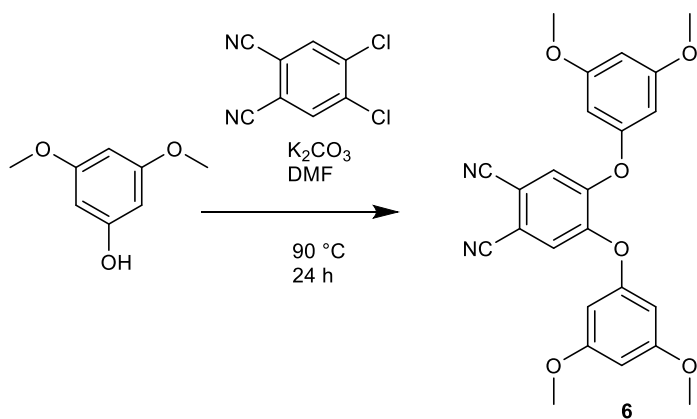


Obrázok 22: Schéma prípravy zlúčeniny 4.

Prvým krokom reakcie bola príprava látky **3** (5-hydroxy-1,3-fenylen-diacetátu). Príprava látky **3** prebiehala acetyláciou benzén-1,3,5-triolu acetanhydridom v pyridíne. Od ostatných substituovaných derivátov bola látka odseparovaná pomocou stĺpcovej chromatografie s finálnym výťažkom 88 %.

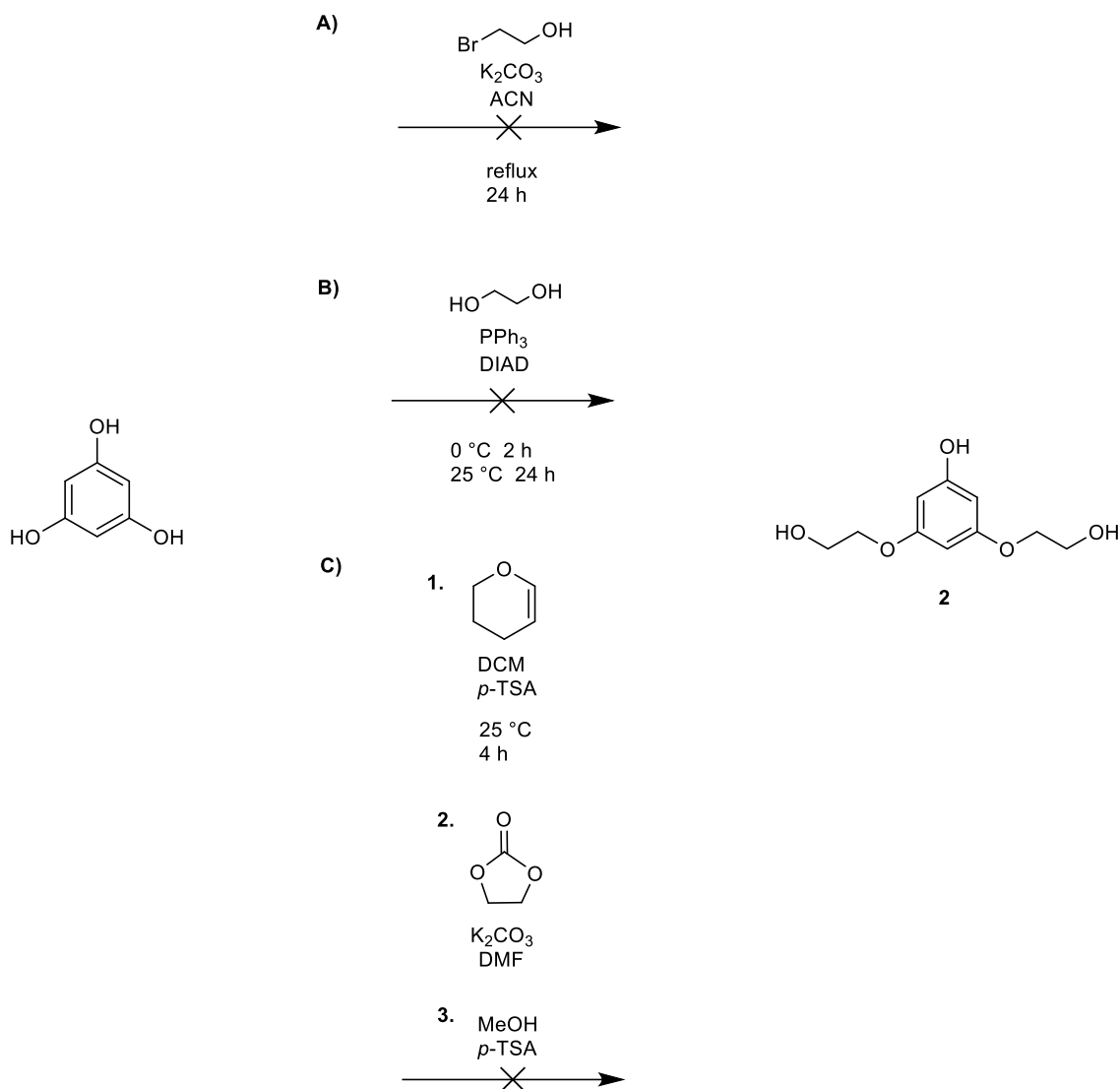
Druhým krokom bola reakcia látky **3** s 4,5-dichlórfthalonitrilom (Obr. 22). Látky boli rozpustené v DMSO postupne po častiach bol pridaný uhličitan draselný. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou TLC. Zmes bola zahrievaná na 90 °C pod argónovou atmosférou 24 h. Produkt reakcie bol vyčistený pomocou stĺpcovej chromatografie. Na základe TLC bolo vidieť veľké množstvo nezreagovanej vychádzajúcej látky. Túto reakciu sme sa snažili optimalizovať ešte predĺžením reakčného času, žiaľ bez pozitívneho výsledku.

V druhom prípade reakcie sme zvolili dlhší reakčný čas a zmenili sme bázu. V tomto prípade sme použili ako bázu CsF (vďaka nízkej nukleofilite fluoridu predstavuje užitočnú bázu v organickej syntéze). Výsledok reakcie bol posudzovaný pomocou TLC a MS-TLC, avšak nebola potvrdená očakávaná hmotnosť, pričom tam bolo stále prítomné veľké množstvo vychádzajúcej látky. Nukleofilná substitúcia medzi látkou **3** a 4,5- dichlórfthalonitrilom neprebehla.



Obrázok 23: Schéma prípravy zlúčeniny 6.

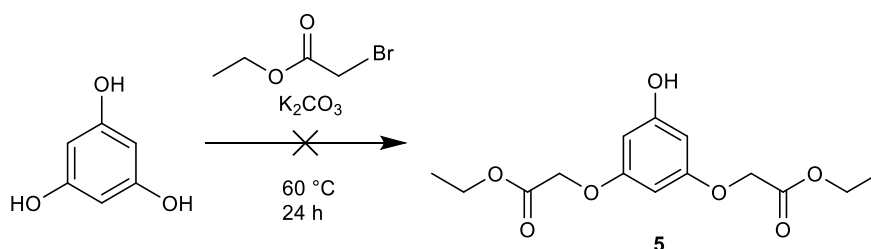
Ako ďalšiu možnosť sme vyskúšali metyláciu ako možné chránenie hydroxylových skupín (Obr. 23). Ako reaktant bol využitý komerčne dostupný 3,5-dimetoxyfenol. Nukleofilná substitúcia s týmto fenolom prebiehala v bezvodom prostredí v DMF, pod inertnou atmosférou za použitia K_2CO_3 ako báze. Reakcia prebehla podľa TLC celkom úspešne ale problémom látky 6 je zlá rozpustnosť, ktorá neumožnila stĺpcovú chromatografiu. Látku sme preto rozpustili zahrievaním v DMSO, po ochladení bol pridaný EtOH a látka sa dala na noc do chladu. Zo zmesi bola potom odsávaná biela kryštalická látka, za sústavného premývania EtOH. Reakcia bola skúšaná opakovane s priemerným výťažkom 86 %.



Obrázok 24: Schéma prípravy zlúčeniny 2.

Ako ďalšiu možnú substitúciu pre budúci Pc sme zvolili 2-hydroxyetoxy substituenty na fenole, čo vyžadovalo najskôr prípravu odpovedajúceho fenolu **2** (Obr. 24). Reakcie A), B), C) mali viesť k zamýšľanému produktu látky **2**. Ako prvá bola použitá nukleofilná substitúcia s využitím 2-brómetanolu (reakcia A). K benzén-1,3,5-triolu bol pridaný pomocou injekčnej striekačky 2-brómetanol, za stáleho miešania, po častiach bol pridávaný uhličitan draselný. Problémom tejto reakcie bola nízka selektívnosť voči disubstituovanému produktu. Túto reakciu sa nepodarilo optimalizovať v prospech očakávaného produktu. Ďalšou reakciou bola syntéza podľa Mitsunobu, ktorá prebiehala v bezvodom prostredí za použitia etylénglykolu (reakcia B). Pomocou MS-TLC boli po reakcii zanalyzované hmotnosti, ktoré patrili vychádzajúcej látke a trifenyfosfínu. V tomto prípade reakcia žiaľ nevyšla. Na priebeh Mitsunobovej reakcie má veľký vplyv to v akom poradí sú do reakcie pridávané jednotlivé reaktanty. Reakcia bola vyskúšaná

druhýkrát v inom poradí pridávania reagensí, avšak neúspešne. Ďalším postupom sme chceli jednu fenolickú skupinu ochrániť pomocou 3,4-dihydro-2*H*-pyranu ako chrániacej skupiny (reakcia C). Produkt prvého kroku reakcie po vyčistení pomocou stĺpcovej chromatografie bol analyzovaný pomocou MS-TLC, ktorá nepotvrdila očakávanú hmotnosť. Zamýšľaným postupom sa ďalej nepokračovalo.

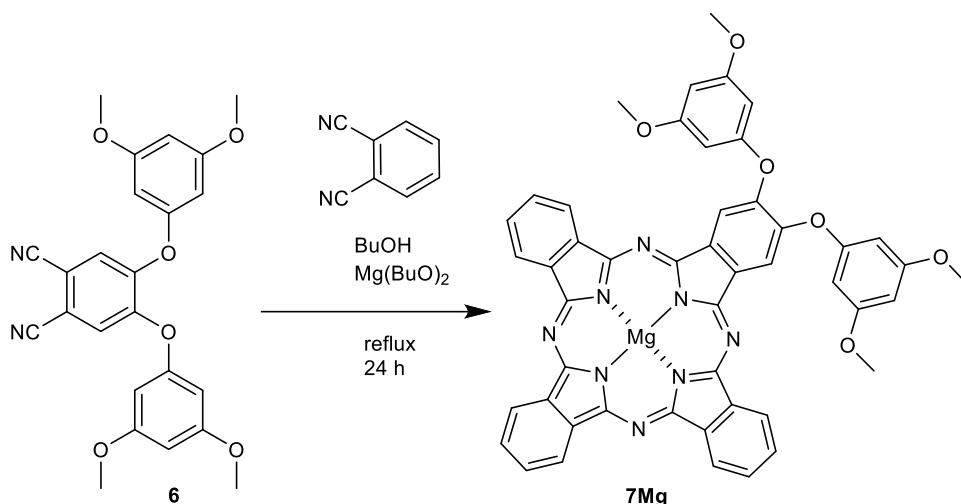


Obrázok 25: Schéma prípravy zlúčeniny 5.

Ako ďalší prekursor sme si zvolili karboxylovú skupinu na fenole, ktorú sme sa pokúsili na fenol naviazať pomocou etylbromacetátu v prítomnosti K_2CO_3 (Obr. 25). Nevýhodou tejto reakcie bola nízka selektivita voči disubstituovanému produktu a nukleofilná substitúcia prebieha kompletne. Reakcia bola optimalizovaná v prospech očakávaného produktu polovičným množstvom uhličitanu, ďalej znížením teploty (teplota reakcie bola laboratórna teplota) a kombináciou oboch možností. Žiaľ ani optimalizácia reakcie nepriniesla zamýšľaný produkt.

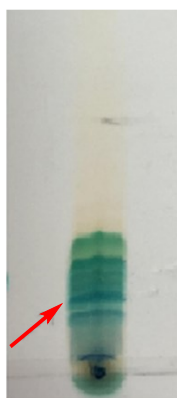
5.2. CYKLOTETRAMERIZAČNÉ REAKCIE

Na cyklotetramerizáciu bola použitá metóda štatistickej kondenzácie dvoch prekursorov, pričom štatisticky vzniká vždy šesť produktov. Naším požadovaným produktom bol ftalocyanín typu A₃B so zinočnatým centrálnym katiónom.

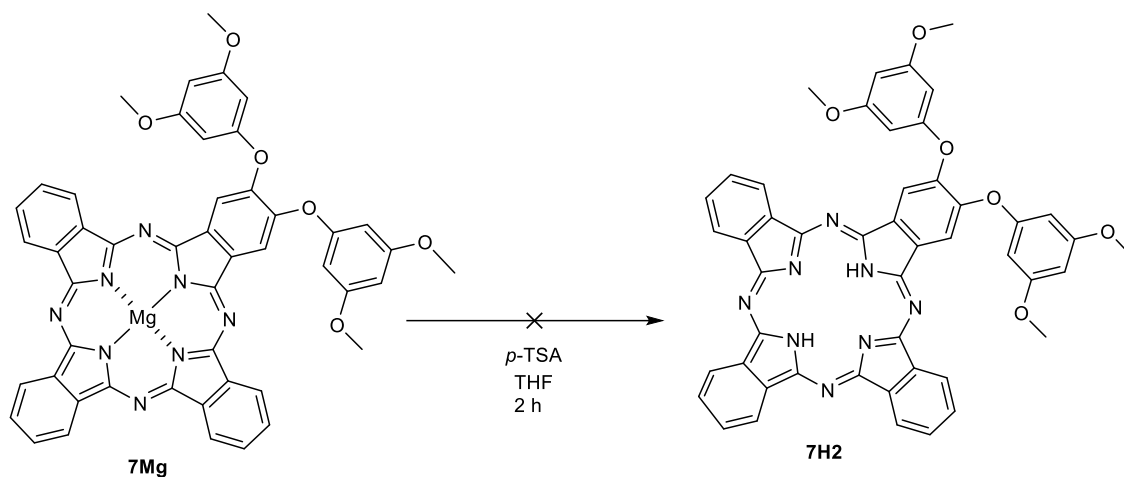


Obrázok 26: Schéma prípravy zlúčeniny **7Mg**.

Najskôr sme začali prípravou horečnatého derivátu, ktorý je možné potom previesť na zinočnatý Pc (Obr. 26). V reakcii bol použitý ftalonitril a látka **6** za iniciácie pomocou butanolátu horečnatého. Po reakcii bol produkt prečistený pomocou stĺpcovej chromatografie, ktorá ho zbavila hrubých nečistôt. Avšak zmes kongenérovovala veľmi malé rozdiely v retenčných faktoroch (Obr. 27). A po niekoľkonásobnom čistení sa nepodarilo nájsť vhodnú mobilnú fázu na oddelenie jednotlivých kongenérovo.

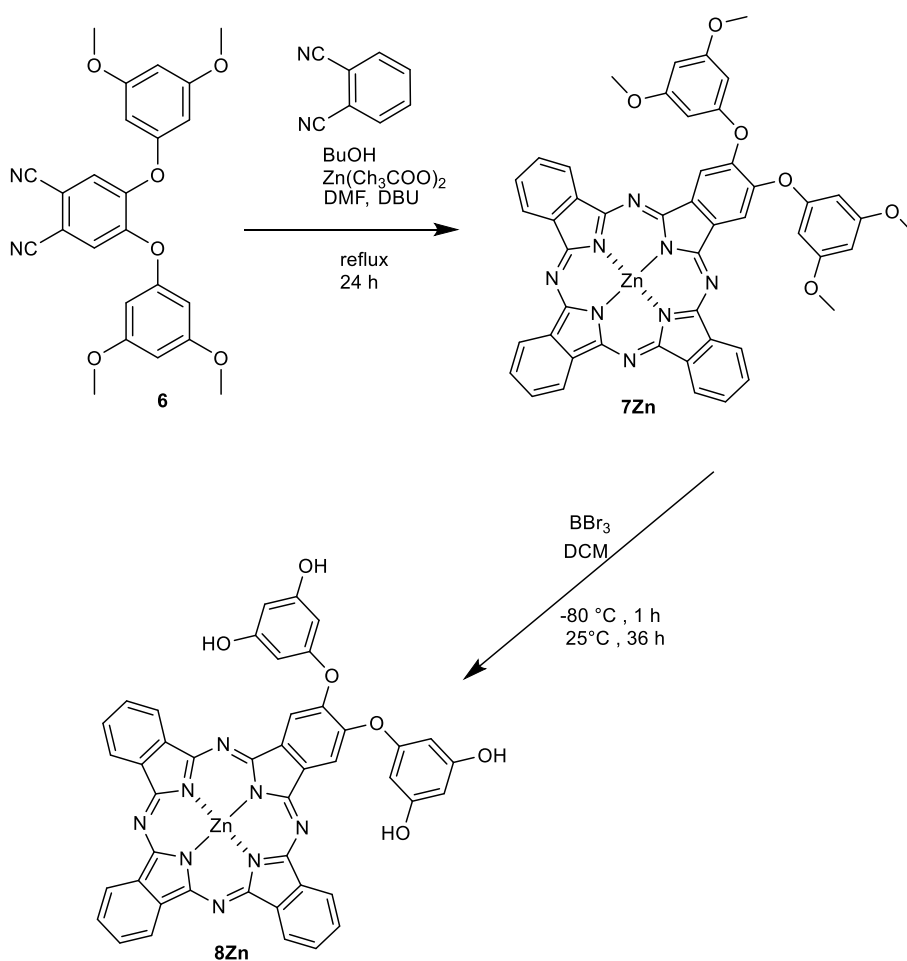


Obrázok 27: TLC látky **7Mg**. Vyznačený AAAB kongenér.



Obrázok 28: Schéma prípravy zlúčeniny **7H2**.

Pre lepšiu separáciu zlúčeniny bola ďalším krokom snaha zlúčeninu odkovíť (Obr. 28). Horečnatý komplex bol rozpustený v THF, bola pridaná *p*-TSA a zmes bola miešaná 2 h. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou TLC. Na TLC bolo vidieť iba jednu škvrnu, nebolo možné kongenéry odseparovať vôbec. Očakávaný produkt nebol preto izolovaný.

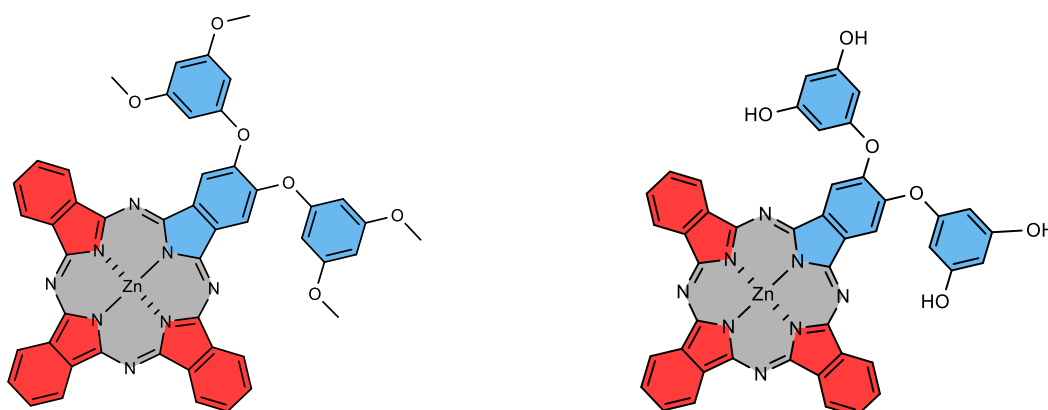


Obrázok 29: Schéma prípravy látok **7Zn** a **8Zn**.

Ako ďalšiu možnosť sme sa pokúsili pripraviť priamo zinočnatý komplex **7Zn** (Obr. 29). K bezvodému BuOH bol pridaný prekurzor **6** a ftalonitril a následne bol pridaný DMF, katalytické množstvo DBU a octan zinočnatý. Vzhľadom od predošlých reakcií sme sa rozhodli zmeniť pomer prekurzorov z 1:3 na 1:9, pre lepšiu separáciu AAAB látky. Po ukončení reakcie bol produkt prečistený opakovanou stĺpcovou chromatografiou, kde sa podarilo odseparovať chcenú štruktúru. Reakcia bola pripravovaná opakovane s priemerným výťažkom 40 %. Reakcia ďalej pokračovala postsyntetickou modifikáciou látky **7Zn** (odchránenie metyléru) pomocou BBr₃. Problémom produktu **8Zn** bolo čistenie, pretože pre svoje hydroxylové skupiny sa nachádzal stále na štarte pri stĺpcovej chromatografii. Tak na začiatku bol čistený pomocou mobilnej fáze pre látku **7Zn** a potom sme za pomalého zrýchľovania mobilnej fáze vymyli látku zo silikagélu. Výsledkom bola látka **8Zn**. Reakcia bola skúšaná opakovane s priemerným výťažkom 30 %.

6 ZÁVER

Táto diplomová práca si kládla za cieľ syntetizovať amfifilné Pcs, obsahujúce neionogénne polárne skupiny. Pomocou nukleofilnej substitúcie bol syntetizovaný prekurzor 4,5-bis(3,5-dimetoxyfenoxy)ftalonitril. Amfifilný charakter Pc závisí od výberu prekurzorov, ktoré budú vstupovať do cyklotetramerizačnej reakcie. Do cyklotetramerizačnej reakcie vstupovali prekurzory, ktoré reprezentujú hydrofilnú zložku 4,5-bis(3,5-dimetoxyfenoxy)ftalonitril a hydrofóbnu zložku ftalonitril v pomere 1:9. Ďalším krokom bola postsyntetická úprava demetyláciou za vzniku voľnej hydroxylovej skupiny na periférii. Táto zlúčenina môže byť v budúcnosti použitá na syntézu ďalších neutrálnych amfifilných derivátov Pcs. Boli syntetizované dva amfifilné ftalocyaníny vo forme zinočnatých komplexov (Obr. 30).



Obrázok 30: Syntetizované ZnPc.

7 POUŽITÁ LITERATÚRA

- ¹ DE LA TORRE, G.; CLAESSENS, C. G. The phthalocyanines: the need for selective synthetic approaches. *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, *16*, 2821–2830.
- ² KANTAR, G. K. et al. Phtalocyanine and azaphtalocyanines containing eugenol: synthesis, DNA interaction and comparison of lipase. *J. Chem. Sci.*, **2017**, *129*(8), 1247-1256.
- ³ MILETIN, M.; ZIMCIK, P.; NOVAKOVA, V. Photodynamic properties of aza-analogues of phthalocyanines. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2018**, *17*(11), 1749-1766.
- ⁴ DEMUTH, J. Studium azaftalocyaninů jako zhášečů fluorescence v oligodeoxynukleotidových sondách. Dizertačná práca. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové **2020**.
- ⁵ KOLLÁR, J. Syntéza anionických derivátů ftalocyaninů jako potenciálních fotodynamicky aktivních látek. Dizertačná práca. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové **2020**.
- ⁶ WINCKEL, E. et al. Dual role of subphthalocyanine dyes for optical imaging and therapy of cancer. *Adv. Funct. Mater.*, **2018**, *28*(24), 1705938.
- ⁷ GEORGE, R. D. et al. The alpha substitution effect on phthalocyanine aggregation. *J. Porphyrins Phtalocyanines*, **1998**, *2*(1), 1-7.
- ⁸ KUBIAK, R.; JANCZAK, J. Synthesis, structure, and UV–Vis characterization of antimony(III) phthalocyanine: [(SbPc)₂(Sb₂I₈)(SbBr₃)]₂. *Molecules*, **2022**, *27*, 1839.
- ⁹ MACHACEK, M. et al. Anionic hexadeca-carboxylate tetrapyrazinoporphyrine: synthesis and in vitro photodynamic studies of a watersoluble, non-aggregating photosensitizer. *RSC Adv.*, **2016**, *6*(12), 10064-10077.
- ¹⁰ KOLLAR, J. et al. Effect of bovine serum albumin on the photodynamic activity of sulfonated tetrapyrazinoporphyrine. *Dyes Pigm.*, **2019**, *162*, 358-366.
- ¹¹ NOVAKOVA, V. et al. Ultrafast intramolecular charge transfer in tetrapyrazinoporphyrines controls the quantum yields of fluorescence and singlet oxygen. *Phys. Chem.*, **2010**, *12*(11), 2555.
- ¹² KADISH, K. M.; SMITH, K. M.; GUILARD R. (Eds) *The porphyrin handbook*, Vol. 16. 1st Ed. Academic press, Massachusetts. **2003**. ISBN 978-0-08-092390-1.
- ¹³ BAYO, K. et al. Preparation and analysis by UV-Vis of zinc phthalocyanine complexes, *Spectrochim. Acta, Part A.*, **2004**, *60*, 653-657.

-
- ¹⁴ NOVAKOVA, V. et al. Tetrapyrazinoporphyrazines and their metal derivatives. Part II: Electronic structure, electrochemical, spectral, photophysical and other application related properties. *Coord. Chem. Rev.*, **2018**, *361*, 1-73.
- ¹⁵ CIDLINA, A. et al. The effect of substituents at alkylsulfanyl/arylsulfanyl non-peripherally substituted phthalocyanines: Spectral and photophysical properties, basicity and photostability. *J. of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2015**, *19*(10), 1095–1106.
- ¹⁶ CLAESSENS, C. G.; HAHN U., TORRES, T. Phthalocyanines: from outstanding electronic properties to emerging applications. *Chem Rec.*, **2008**; *8*(2):75-97.
- ¹⁷ PETRIK, P. et al. Protonation and deprotonation of nitrogens in tetrapyrazinoporphyrazine macrocycles. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2007**, *11*(7), 487-495.
- ¹⁸ KOLLAR, J. et al. Cationic versus anionic phthalocyanines for photodynamic therapy: What a difference the charge makes. *J. Med. Chem.*, **2020**, *63*(14), 7616–7632.
- ¹⁹ LIU, W. et al. Synthesis and cellular studies of nonaggregated water-soluble phthalocyanines. *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*(4), 1033-1041.
- ²⁰ FERDOWSI, P. et al. Molecular engineering of simple metal-free organic dyes derived from triphenylamine for dye-sensitized solar cell applications. *ChemSusChem.*, **2019**.
- ²¹ ZARATE, X.; SCHOTT, W.; ARRATIA-PEREZ, R. A DFT/TDDFT study of porphyrazines and phthalocyanine oxo-titanium derivatives as potential dyes in solar cells. *Int. J. Quantum Chem.*, **2011**, *111*(15), 4186–4196.
- ²² NYOKONG, T. Electrocatalytic and photosensitizing behavior of metallophthalocyanine complexes. *J. Porphyrins and Phthalocyanines*, **2008**, *12*(09), 1005–1021.
- ²³ GREGORY, P. Industrial applications of phthalocyanines. *J. Porphyrins and Phthalocyanines*, **2000**. *04*(04), 432–437.
- ²⁴ ÖZTÜRK, Z. Z. et al. Recent studies chemical sensors based on phthalocyanines. *J. Porphyrins and Phthalocyanines*, **2009**, *13*(11), 1179-1187.
- ²⁵ FATEMEH, A. et al. Investigating the effect of (mCP: CuPc) host–guest layer on the production of near-infrared organic light-emitting diodes. *Opt. Laser Technol.*, **2023**, *167*, 109712.
- ²⁶ JANCULA, D. et al. Photodynamic effects of 31 different phthalocyanines on a human keratinocyte cell line. *Chemosphere*, **2013**, *9*(6), 870-874.

-
- ²⁷ KWIATKOWSKI, S. et al. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed. Pharmacother.*, **2018**; *106*, 1098-1107.
- ²⁸ DOPSON, J.; Queiroz G. F.; GOLDING, J. P. Photodynamic therapy and diagnosis: Principles and comparative aspects. *Vet. J.*, **2018**, *233*, 8-18.
- ²⁹ RKEIN, A. M.; OZOG, D. M. Photodynamic therapy. *Dermatol. Clin.*, **2014**, *32*(3), 415-25.
- ³⁰ JUARRANZ, A. et al. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin. Transl. Oncol.*, **2008**, *10*, 148-154.
- ³¹ CHOUDHARY, S. et al. Photodynamic therapy in dermatology: a review. *Lasers Med. Sci.*, **2009**, *24*(6), 971-980.
- ³² NICULESCU, A. G.; GRUMEZESCU, A. M. Photodynamic therapy an up to date review. *Appl. Sci.*, **2021**, *11*, 3626.
- ³³ PLAETZER, K. et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med. Sci.*, **2009**, *24*, 259–268.
- ³⁴ BONNETT, R. *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*. 1. vyd., Gordon and Breach Science Publishers. London **2000**, ISBN: 90-5699-248-1.
- ³⁵ VAN STRATEN, D. et al. Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions. *Cancers*, **2017**, *9*(12), 19.
- ³⁶ LANG, K.; MOSINGER, J.; WAGNEROVÁ, M. Pokroky ve fotochemii singletového kyslíku, *Chem. Listy*, **2005**, *99*, 211–221.
- ³⁷ OLEINICK, N. L.; EVANS, H. H. The photobiology of photodynamic therapy: Cellular targets and mechanisms. *J. Radiat. Res.*, **1998**, *150*(5), 146.
- ³⁸ DĄBROWSKI, J.M.; LUIS ,G.; ARNAUT, J.L. Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2015**, *14*(10), 1765–1780.
- ³⁹ MFOUO-TYNGA, I. S. et al. Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy: Review. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2021**, *34*, 102091.
- ⁴⁰ KATAOKA, H. et al. New photodynamic therapy with next-generation photosensitizers. *Ann. Transl. Med.*, **2017**, *5*(8), 183–183.
- ⁴¹ TORRES, A. F. C. (Eds) *Lung cancer - Strategies for diagnosis and treatment*, Vol. 2. 1st Ed. IntechOpen, London **2018**, ISBN 978-1-78984-350-7.

-
- ⁴² LI, L. et al. Clinical study of photofrin photodynamic therapy for the treatment of relapse nasopharyngeal carcinoma. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2016**, 3(4), 266–271.
- ⁴³ KEAM, S. J. et al. Verteporfin. *Drugs*, **2003**, 63, 2521–2554.
- ⁴⁴ JOHANSSON, A. et al. 5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX levels in tissue of human malignant brain tumors. *Photochem. Photobiology*, **2010**, 86(6), 1373–1378.
- ⁴⁵ INOUE, K. 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy for bladder cancer. *Int. J. Urol.*, **2017**, 24(2), 97–101.
- ⁴⁶ MORTON, C. Methyl aminolevulinate (Metvix[®]) photodynamic therapy - practical pearls. *J. Dermatol. Treat.*, **2003**, 14, 23–26.
- ⁴⁷ YANO, T. et al. Clinical practice of photodynamic therapy using talaporfin sodium for esophageal cancer. *J. Clin. Med.*, **2021**, 10(13), 2785.
- ⁴⁸ KOUDINOVA, N. V. et al. Photodynamic therapy with Pd-bacteriopheophorbide (TOOKAD): Successful in vivo treatment of human prostatic small cell carcinoma xenografts. *Int. J. Cancer.*, **2013**, 104(6), 782–789.
- ⁴⁹ HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy for cancer: What's past is prologue. *Photochem. Photobiol.*, **2020**, 96(3), 506-516.
- ⁵⁰ LI, X. et al. Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: developments in the last five years. *Coord. Chem. Rev.*, **2019**, 379, 147–160.
- ⁵¹ BARTUSIK-AEBISHER, D. et al. The use of photodynamic therapy in the treatment of brain tumors-a review of the literature. *Molecules*, **2022**, 27(20), 6847.
- ⁵² BORGIA, F. et al. Early and late onset side effects of photodynamic therapy. *Biomedicines*, **2018**, 6, 12.
- ⁵³ ZHENG, K. et al. Photo-triggered release of doxorubicin from liposomes formulated by amphiphilic phthalocyanines for combination therapy to enhance antitumor efficacy. *J. Mater. Chem.*, **2020**, 8, 8022-8036.
- ⁵⁴ FORMINA, N.; et al. Photochemical mechanisms of light-triggered release from nanocarriers. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2012**, 64(11), 1005–1020.
- ⁵⁵ ENZIAN, P. et al. Optically controlled drug release from light-sensitive liposomes with the new photosensitizer 5,10-DiOH. *Mol. Pharmaceutics*, **2020**, 17(8), 2779-2788.
- ⁵⁶ MACHACEK, M. et al. Binding of an amphiphilic phthalocyanine to pre-formed liposomes confers light-triggered cargo release. *J. Mater. Chem.*, **2018**, 6, 7298-7305.

-
- ⁵⁷ MASSIOT, J. et al. Photo-triggerable liposomal drug delivery systems: from simple porphyrin insertion in the lipid bilayer towards supramolecular assemblies of lipid–porphyrin conjugates. *J. Mater. Chem. B.*, **2019**, *7*, 1805-1823.
- ⁵⁸ LEUNG, S. J.; ROMANOWSKI, M. Light-activated content release from liposomes. *Theranotics*, **2012**, *2*(10), 1020-1036.
- ⁵⁹ ANIOGO, E. C. et al. The role of photodynamic therapy on multidrug resistant breast cancer. *Cancer Cell Int.*, **2019**, *19*, 91.
- ⁶⁰ JERJES, W. et al. Photochemical internalization for intracellular drug delivery. From basic mechanisms to clinical research. *J. Clin. Med.*, **2020**, *9*(2), 528.
- ⁶¹ PRASMICKAITE, L. et al. Photochemical disruption of endocytic vesicles before delivery of drugs: a new strategy for cancer therapy. *Br. J. Cancer*, **2002**, *12*, 86(4), 652- 7.
- ⁶² MARTINEZ DE PINILLOS BAYONA, A. et al. Enhancing the efficacy of cytotoxic agents for cancer therapy using photochemical internalisation. *Int. J. Cancer*, **2015**, *138*(5), 1049–1057.
- ⁶³ BERG, K.; SELBO, P. et al. Photochemical internalization (PCI) in cancer therapy: From bench towards bedside medicine. *J. Photochem. Photobiol., B.* **2009**, *96*(2), 83–92.