

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



**Syntéza fotoaktívnych derivátov ftalocyanínov a štúdium ich
biologickej aktivity**

Dizertačná práca



Mgr. Lucia Rychvalská

Vedúci dizertačnej práce

Hradec Králové 2024

prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne (pod vedením svojho školiteľa). Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri písaní práce čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola využitá na získanie iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové, február 2024

.....
Mgr. Lucia Rychvalská

Na tomto mieste by som sa veľmi rada poďakovala svojmu školiteľovi prof. PharmDr. Petrovi Zimčíkovi, Ph.D. za odborné vedenie počas môjho postgraduálneho štúdia. Taktiež by som sa rada poďakovala Doc. PharmDr. Veronike Novákovej za cenné a podnetné rady.

Veľká vďaka patrí aj všetkým súčasným, aj minulým členom výskumnej skupiny AzaPc Group, a to hlavne PharmDr. Honzovi Kollárovi, Ph.D., Mgr. Miške Beranovej, PharmDr. Jurovi Demuthovi, Ph.D. a PharmDr. Filipovi Kostelanskému, Ph.D., ale aj ďalším členom katedry, a to Mgr. Ondrovi Horáčkovi a PharmDr. Lukášovi Lochmanovi, Ph.D., ktorí tu boli so mnou počas môjho štúdia a vďaka ktorým tu bola výborná pracovná atmosféra. Taktiež ďakujem aj všetkým ďalším kolegom z Katedry farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy za spoluprácu a odbornú pomoc.

Chcela by som sa tiež poďakovať kolegom z Katedry biochemických vied, RNDr. Miloslavovi Macháčkovi, Ph.D. a Mgr. Majde Kozlíkovej, za biologické testovanie látok. Za zmeranie dát ďakujem doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. a PharmDr. Jane Křoustkovej, Ph.D. (NMR spektra), Ive Vencovskej (IČ spektra), doc. PharmDr. Radimovi Kučerovi, Ph.D. (HPLC čistota) a prof. PharmDr. Lucii Novákovej, Ph.D. (HRMS spektra).

Ďakujem aj profesorovi Tomasovi Torresovi a docentke Marii Victorii Martínéz-Diaz, že som u nich mohla stráviť niekoľko mesiacov v rámci zahraničnej stáže na Universidad Autónoma deMadrid.

Veľké poďakovanie patrí mojim rodičom, sestre a hlavne manželovi Matúšovi, ktorí ma počas celého štúdia podporovali.

Táto dizertačná práca vznikla za finančnej podpory týchto grantov a programov:

Grantová agentura Univerzity Karlovy (GAUK: 1606119)

Grantová agentura České Republiky (GAČR: 20-09212S)

Primus, Univerzita Karlova (PRIMUS/20/SCI/013)

Specifický vysokoškolský výskum (SVV 260 666)

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra:	Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy
Kandidát:	Mgr. Lucia Rychvalská
Školiteľ:	prof. PharmDr. Petr Zimčík, PhD.
Dizertačná práca:	Syntéza fotoaktívnych derivátov ftalocyanínov a štúdium ich biologickej aktivity

Ftalocyaníny (Pc) sú makrocyclické látky s konjugovaným systémom dvojitých väzieb, vďaka ktorému absorbujú svetlo z oblasti 650 – 750 nm. Vyznačujú sa aj vysokou produkciou singletového kyslíka, a preto sú vhodné na použitie pri fotodynamickej terapii ako fotosenzitizéry. Majú ale planárne aromatické jadro, a preto tvoria vo vodnom prostredí neúčinné agregáty. Existuje niekoľko stratégií na zamedzenie agregácie Pc, pričom táto dizertačná práca je zameraná na zamedzenie agregácie pomocou supramolekulárnych interakcií s kukurbiturilom (CB). Subftalocyaníny (SubPc) sú podobné makrocyclické látky zložené z troch (namiesto štyroch) izoindolových podjednotiek s centrálnym atómom bóru, ktorý viaže aj axiálny substituent. Vďaka ich kužeľovitému tvaru a axiálnej substitúcii sú síce vo vode menej agregované, ale často nerozpustné a interakcia s CB by mala spôsobiť zlepšenie týchto vlastností.

Prvá časť dizertačnej práce je venovaná syntéze Pc s aminoadamantylovými substituentmi na makrocyclickom jadre v α alebo β polohe, pretože 1-aminoadamantán tvorí veľmi stabilné supramolekulárne komplexy s CB[7]. Nasledovalo štúdium interakcie najprv ftalonitrilových prekursorov a následne aj Pc s CB[7]. Ftalonitrilový prekursor tvorí s CB[7] stabilný komplex v pomere 1 : 1 s asociačnou konštantou okolo 10^{12} M^{-1} . Tvorba tejto interakcie bola viditeľná aj pomocou NMR, kde bol viditeľný posun signálov adamantánu pri tvorbe komplexu s CB[7]. Interakcia Pc a CB[7] bola sledovaná taktiež pomocou NMR a následne aj pomocou sledovania zmien absorpčných a fluorescenčných spektier. Všetky Pc boli vo vode agregované (β substituované Pc viac ako α) a po postupnom pridávaní CB[7] dochádzalo k čiastočnej monomerizácii Pc. Komplex Pc-CB[7] mal nižšie hodnoty log P v porovnaní so samotným Pc, čo znamená zvýšenie jeho hydrofility. Biologické *in vitro* testovanie ale nepotvrdilo zvýšenie fotodynamickej aktivity, ktorú mala spôsobiť zvýšená monomerizácia Pc. Bolo to spôsobené nízkym vstupom Pc-CB[7] komplexu do buniek, keďže tento komplex je príliš objemný a hydrofilný.

Druhá časť dizertačnej práce je venovaná syntéze SubPc s aminoadamantylovými substituentmi na makrocyclickom jadre a objemným lipofilným substituentom v axiálnej polohe, ktorý je dôležitý pre vnorenie SubPc do membrány buniek. Výsledky štúdia vlastností SubPc-CB[7] pomocou fluorescenčných spektier boli nekonzistentné a aj keď pri jednej látke boli pozorované zmeny po pridaní CB[7], nebolo možné jasne určiť za akých podmienok sa tvorí supramolekulárny komplex. Biologické testovanie bolo neúspešné, pretože ani jeden pripravený SubPc nevykazoval žiadnu fotodynamickú aktivitu, či už samostatne alebo po pridaní CB[7].

Tretia časť dizertačnej práce je venovaná syntéze α -aminoftalocyanínov, ktoré majú absorpčné maximum v blízkej IČ oblasti a následne štúdiu ich vlastností v kyslom prostredí.

V prítomnosti kyseliny dochádza k protonizácii dusíkov periférnych amínov a následne aj azometínových dusíkov makrocyklického jadra.

Posledná časť dizertačnej práce je venovaná štúdiu uvoľňovania látok z lipozómov po aktivácii svetlom. Systémy na dodávanie liečiv, ako napríklad lipozómy alebo nanočastice, zlepšujú vlastnosti liečiv a sú stále častejšie využívané. Uvoľnenie liečiva do organizmu je ale často nešpecifické, preto sú vyvíjané také systémy, ktoré by liečivo uvoľnili na podnet, ako napríklad svetlo, pH alebo teplota. V mojej dizertačnej práci boli testované 2 typy lipozómov (EYPC a DOPC) a 2 látky, ktoré boli z nich uvoľňované (akridínová oranž (AO) a doxorubicín (DOX)). V membráne lipozómov boli inkorporované rôzne amfifilné Pc, ktoré po ožiarení svetlom produkujú singletový kyslík, ktorý spôsobuje narušenie lipozómov a uvoľnenie AO/DOX. Bolo zistené, že okrem množstva produkovaného kyslíka závisí rýchlosť uvoľnenia látky z lipozómov aj na agregácii Pc a na hodnote absorpcie pri excitačnej vlnovej dĺžke. Obidve látky sa rýchlejšie uvoľňovali z DOPC lipozómov, ktoré obsahujú viac dvojité väzby, ktoré sú tak náchylnejšie na oxidáciu singletovým kyslíkom.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Author: Mgr. Lucia Rychvalská

Supervisor: prof. PharmDr. Petr Zimčík, PhD.

Doctoral Thesis: Synthesis of photoactive derivatives of phthalocyanines and study of their biological activity

Phthalocyanines (Pc) are macrocyclic compounds with conjugated system of double bonds with absorption maximum around 650 – 750 nm. They are characterized by high singlet oxygen production which makes them suitable candidates for photosensitizers in photodynamic therapy. However, they form inactive aggregates in water environment because of their planar hydrophobic aromatic core. There are many strategies to solve this problem, and this thesis is focused on fighting aggregation of Pc by their supramolecular interactions with cucurbiturils (CB). Subphthalocyanines (SubPc) are similar macrocyclic compounds composed of only three (instead of four) isoindol units with boron as a central atom, which has also axial substituent. Because of their cone-shape and axial substituent they are less aggregated in water but usually not very soluble, which could also be solved by interaction with CB.

First part of this thesis was focused on synthesis of Pc with aminoadamantyl substituents on macrocyclic core in α or β position, because 1-aminoadamantane forms strong supramolecular complexes with CB[7]. It was followed by study of interaction of phthalonitrile precursors and also Pc with CB[7]. Phthalonitrile precursors formed stable complex with CB[7] in ratio 1 : 1 with association constants around 10^{12} M^{-1} . This interaction was detected by NMR titrations where signals of adamantane hydrogens were significantly shifted upon complexation. Interaction between Pc and CB[7] was monitored by NMR and by changes in absorption and fluorescence spectra. All Pc were aggregated in water (β substituted were more aggregated compared to α substituted Pc) and significant improvement in monomerization of Pc was observed after gradual addition of CB[7]. Pc-CB[7] complex had lower log P values compared to just Pc, which indicated higher hydrophilicity of the complex. Biological *in vitro* studies did not confirm higher photodynamic activity expected as a result of improved monomerization of Pc-CB[7] complex. It was due to highly hydrophilic Pc-CB[7] complex which was not able to go into cells.

Second part of this thesis was focused on synthesis of SubPc with aminoadamantyl substituents on macrocyclic core and bulky lipophilic substituent in axial position, which was expected to help in intercalation of SubPc-CB[7] complex into cell membrane. Results of fluorescence spectroscopic studies of SubPc-CB[7] complex were inconsistent and even though with one compound there were some changes in its fluorescence spectrum, it was not possible to determine under what conditions the complex is formed. *In vitro* biological testing was not successful, because only no SubPc had any activity against cells, either alone or after addition of CB[7].

Third part of this thesis was focused on synthesis of α -aminophthalocyanines with absorption maximum in near IR region and then study of their properties in acid environment.

In the presence of acid there is a protonation of nitrogens of peripheral amines and then also protonation of azomethine nitrogens of the macrocycle.

The last part of this thesis was focused on light-triggered release of cargo from liposomes. Drug delivery systems, such as liposomes or nanoparticles, can improve drug properties and they are being used more and more frequently. Release of the drug from these systems is often non-specific, therefore new drug delivery systems are developed which could release drugs after initial impulse such as light, pH or temperature. In this work, two types of liposomes (EYPC, DOPC) were tested, with two different cargos (basic orange 14 and doxorubicin). Different amphiphilic Pc intercalated into liposomal membrane were tested. They produced singlet oxygen after irradiation, which was responsible for disruption of liposomes and subsequent cargo release. Apart from amount of singlet oxygen, also other factors contributed to rate of release, such as level of aggregation or absorbance in excitation wavelength of Pc. Both cargos were released faster from DOPC liposomes due to more double bonds in lipid structure which are more susceptible to oxidation by singlet oxygen.

Obsah

1 Zoznam použitých skratiek.....	15
2 Cieľ práce.....	17
3 Prehľad súčasného stavu riešenej problematiky	19
3.1 Fotodynamická terapia	19
3.1.1 Princíp PDT	19
3.1.2 Mechanizmus PDT.....	20
3.1.3 Faktory ovplyvňujúce účinnosť PDT	21
3.1.4 Ďalšie možnosti využitia fotodynamického efektu	22
3.1.5 Fotosenzitizéry	23
3.2 Svetlom aktivované uvoľnenie liečiva.....	28
3.2.1 Lipozómy	28
3.2.2 Mechanizmus uvoľňovania liečiv po aktivácii svetlom	28
3.2.3 Výhody liečiv inkorporovaných v lipozómoch.....	31
3.3 Ftalocyaníny	32
3.3.1 Syntéza ftalocyanínov	33
3.3.2 Agregácia ftalocyanínov	35
3.4 Subftalocyaníny	39
3.4.1 Syntéza subftalocyanínov.....	39
3.4.2 Vlastnosti subftalocyanínov	40
3.4.3 Reaktivita subftalocyanínov	40
3.5 Kukurbit[n]urily	43
4 Výsledky a diskusia.....	46
4.1 Štúdium supramolekulárnych interakcií ftalocyanínov.....	47
4.1.1 Návrh štruktúry	47
4.1.2 Syntéza	48
4.1.3 Štúdium interakcie s CB[7]	55
4.1.4 In vitro biologické hodnotenie	66
4.1.5 Záver.....	70
4.2 Štúdium supramolekulárnych interakcií subftalocyanínov.....	71
4.2.1 Návrh štruktúry	71
4.2.2 Syntéza	71
4.2.3 Štúdium interakcie SubPc a CB[7]	74
4.2.4 Fotofyzikálne parametre SubPc	77
4.2.5 In vitro biologické hodnotenie	78
4.2.6 Záver.....	79
4.3 Príprava α -substituovaných aminoftalocyanínov	80
4.3.1 Syntéza ftalonitrilových prekursorov	80
4.3.2 Syntéza ftalocyanínov	83
4.3.3 Štúdium spektrálnych a fotofyzikálnych vlastností aminoftalocyanínov.....	84
4.3.4 Protonizácia aminoftalocyanínov.....	85

4.3.5 Záver	89
4.4 Svetlom aktivované uvoľňovanie liečiv	90
4.4.1 Fotofyzikálne vlastnosti PS	92
4.4.2 Charakterizácia lipozómov	93
4.4.3 Interakcia PS s lipozómami	94
4.4.4 Fotostabilita PS v lipozómoch	97
4.4.5 Tvorba singletového kyslíka v lipozómoch	101
4.4.6 Svetlom aktivované uvoľnenie liečiv z lipozómov	103
4.4.7 Záver	107
5 Záver	109
6 Experimentálna časť	111
6.1. Syntéza prekurzorov a medziproduktov ftalocyanínov	111
6.1.1 4-(2hydroxyetylsulfanyl)ftalonitril (1)	111
6.1.2 4-(2-tosyloxyetylsulfanyl)ftalonitril (2a)	111
6.1.3 4-(2-mesyloxyetylsulfanyl)ftalonitril (2b)	112
6.1.4 4-(2-jodoetylsulfanyl)ftalonitril (2c)	112
6.1.5 2-[(3,4-dikyanofenyl)sulfanyl]etyl trifluorometán sulfonát (2x)	112
6.1.6 4-[2-(aminoadamantan-1-yl)etylsulfanyl]ftalonitril (3)	113
6.1.7 N-(adamantan-1-yl)-2-bromoacetamid (4)	113
6.1.8 N-(2-bromoetyl)adamantan-1-amín (5)	114
6.1.9 N-(adamantan-1-yl)-2-merkptoacetamid (6)	114
6.1.10 2-merkptoacetaldehyd (7)	114
6.1.11 2-((adamantan-1-yl)amino)etáne-1-tiol (8)	114
6.1.12 2-((bis(4-metoxifenyl)(fenyl)metyl)tio)etán-1-ol (9)	115
6.1.13 (bis(4-metoxifenyl)(fenyl)metyl)(2-tosyletyl)sulfán (10)	115
6.1.14 (bis(4-metoxifenyl)(fenyl)metyl)(2-jodoetyl)sulfán (11)	115
6.1.15 2(adamantan-1-yl)etan-1-ol (12)	115
6.1.16 S-(2-((adamantan-1-yl)amino)etyl)ester tiooctovej kyseliny (13)	115
6.1.17 (3s,5s,7s)-N-(2-tosylethyl)adamantan-1-amine (14)	116
6.1.18 2-(((3s,5s,7s)-adamantan-1-yl)amino)ethane-1-thiol (15)	116
6.1.19 2(adamantan-1-yl-metylamino)etan-1-ol (16)	116
6.1.20 4-{2-[(adamantan-1-yl)amino]etoxy}ftalonitril (17)	117
6.1.21 4-{2-[(adamantan-1-yl)N-metylamino]etoxy}ftalonitril (18)	117
6.1.22 3-{2-[(adamantan-1-yl)amino]etoxy}ftalonitril (19)	117
6.1.23 3-{2-[(adamantan-1-yl)-N-metylamino]etoxy}ftalonitril (20)	118
6.1.24 4-{2-[(adamantan-1-yl)-N,N-dimetylamónium]etoxy}ftalonitril jodid (21)	118
6.1.25 3-{2-[(adamantan-1-yl)-N,N-dimetylamónium]etoxy}ftalonitril jodid (22)	118
6.2 Syntéza ftalocyanínov	119
6.2.1 Obecný postup A	119
6.2.2 Obecný postup B	119
6.2.3 2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis{2-(adamant-1-yl)amino}etylsulfanyl}ftalocyanináto zinočnatého komplexu (23)	119
6.2.4 2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis{2-(adamant-1-yl)amino}etoxy}ftalocyanináto zinočnatého komplexu (24)	120

6.2.5 2,9(10),16(17),23(24)-Tetrakis{2-[(adamantan-1-yl)-N-metylamino]etoxy}ftalocyanináto zinočnatého komplexu (25)	120
6.2.6 1,8(11),15(18),22(25)-tetrakis{2-[(adamantan-1-yl)amino]etoxy}ftalocyanináto zinočnatého komplexu (26).....	120
6.2.7 1,8(11),15(18),22(25)-tetrakis{2-[(adamantan-1-yl)-N-metylamino]etoxy}ftalocyanináto zinočnatý komplex (27)	121
6.2.8 Obecný postup kvarternizácie ftalocyanínov.....	121
6.2.9 2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis{2-[(adamantan-1-yl)-N,N-dimethylammónium]etoxy}ftalocyanináto zinočnatý komplex tetrajodidu (28)	121
6.2.10 1,8(11),15(18),22(25)-tetrakis{2-[(adamantan-1-yl)-N,N-dimethylammónium]etoxy}ftalocyanináto zinočnatý komplex tetrajodidu (29)	121
6.3 Syntéza subftalocyanínov.....	122
6.3.1 Metyl-3,4,5-tris(dodecyloxy)benzoát (30)	122
6.3.2 (3,4,5-tris(dodecyloxy)fenyl)metanol (31)	122
6.3.3 3,4,5-tris(dodecyloxy)benzaldehyde (32)	122
6.3.4 3,4,5-tris(dodecyloxy)phenol (33).....	123
6.3.5 1-(prop-2-yn-1-yloxy)adamantán (34)	123
6.3.6 N-(prop-2-yn-1-yl)adamantán-1-amín (35).....	123
6.3.7 N-metyl-N-(prop-2-yn-1-yl)adamantán-1-amín (36).....	124
6.3.8 Chlorid 2,9,16(17) trijódosubftalocyanín bóru (37)	124
6.3.9 B-[tris(3,4,5-dodecyloxy)fenoxy]-2,9,16(17) trijódosubftalocyanín bóru (38)	124
6.3.10 B-[tris(3,4,5-dodecyloxy)fenoxy]-2,9,16(17)-tris[3-(adamantan-1-yl)oxy]prop-1-yn-1-yl] subftalocyanín bóru (39).....	124
6.3.11 B-[tris(3,4,5-dodecyloxy)fenoxy]-2,9,16(17)-tris[3-(adamantan-1-yl)(N-metyl)amino]prop-1-yn-1-yl] subftalocyanín bóru (40).....	125
6.3.12 B-[tris(3,4,5-dodecyloxy)fenoxy]-2,9,16(17)-tris[3-(adamantan-1-yl)(N,N-dimetyl)amino]prop-1-yn-1-yl] subftalocyanín bóru trijodid (41)	125
6.4 Syntéza α -aminoftalocyanínov.....	125
6.4.1 2,3-dikyano-1,4-fenylén bis(trifluorometánsulfonát) (42).....	125
6.4.2 2,3-dikyano-1,4-fenylén bis(4-metylbenzénsulfonát) (43)	125
6.4.3 3,6-dibrómftalonitril (44)	125
6.4.4 Metóda nukleofilnej substitúcie	126
6.4.5 Buchwald-Hartwig coupling	126
6.4.6 Kvantifikácia látok 45 a 46	126
6.4.7 1,4,8,11,15,18,22,25-oktakis(dietylamino)ftalocyanináto horečnatý komplex (47) 127	
6.4.8 1,8(11),15(18),22(25)-tetrabromo-4,11(8),18(15),25(22)-tetrakis(dietylamino)ftalocyanín (48H).....	127
6.4.9 1,8(11),15(18),22(25)-tetrabromo-4,11(8),18(15),25(22)-tetrakis(dietylamino)ftalocyanináto zinočnatý komplex (48Zn).....	127
6.5 Fotofyzikálne štúdium vlastností Pcs	128
6.5.1 Skúmanie interakcie Pcs a CB[7] pomocou UV-vis a fluorescencie	128
6.5.2 UV-vis skúmanie interakcie Pcs a β -CD	128
6.5.3 Stanovenie log P.....	128
6.5.4 Kvantové výťažky.....	128
6.6 Fotofyzikálne štúdium vlastností SubPc.....	129
6.6.1 Skúmanie interakcie vo vode	129

6.6.2 Skúmanie interakcie vo vode s prídavkom organického rozpúšťadla	129
6.6.3 Skúmanie interakcie vo vode s 30 % THF	129
6.6.4 Určenie log P.....	130
6.6.5 Meranie fotofyzikálnych vlastností	130
6.7 Fotofyzikálne štúdium aminoftalocyanínov	130
6.8 Biologické experimenty	130
6.8.1 Bunkové kultúry a príprava vzoriek.....	130
6.8.2 Cytotoxické experimenty.....	131
6.8.3 Časový profil vstupu látok do buniek	131
6.8.4 Subcelulárna lokalizácia.....	131
6.9 Lipozómy	131
6.9.1 Príprava lipozómov.....	131
6.9.2 Charakterizácia lipozómov	132
6.9.3 Interkalácia PS do lipozómov	132
6.9.4 Fotostabilita PS v lipozómoch	132
6.9.5 Rozklad ADPA	133
6.9.6 Svetlom aktivované uvoľnenie AO/DOX z lipozómov	133
7 Zoznam vedeckých a publikovaných prác	134
8 Granty a výskumné stáže.....	136
9 Zoznam použitej literatúry	137
10 Zoznam príloh.....	145

1 Zoznam použitých skratiek

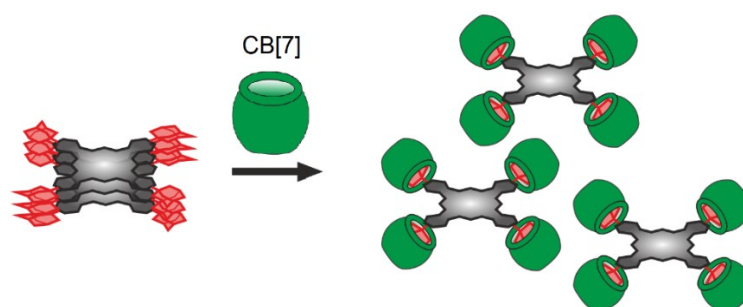
ACN	acetonitril
ADA	1-adamantylamín
ADPA	antracén-9,10-dipropiónová kyselina (z angl. anthracene-9,10-dipropionic acid)
ADT	1-adamantyl(trimetyl)amónium
AO	akridínová oranž
CB	kukurbit[n]uril (z angl. cucurbit[n]uril)
CD	cyklodextrín
DCM	dichlórmetán
DDS	systém dodávania liečiv (z angl. drug delivery system)
DMF	dimetylformamid
DMSO	dimetylsulfoxid
DOPC	1,2-dioleoyl-glycerol-3-fosfatidylcholín (z angl. 1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycerol-3-phosphatidylcholine)
DOX	doxorubicín
DPBF	1,3-difenylbenzofurán (z angl. 1,3-diphenylisobenzofuran)
DPPP	difenyl-1-pyrenylfosfín (z angl. diphenyl-1-pyrenylphosphine)
DTT	ditiotreitól
EtOH	etanol
EYPC	fosfatidylcholín z vaječného žĺtka (z angl. egg yolk phosphatidylcholine)
FDA	správa potravín a liečiv (z angl. Food and Drug Administration)
HeLa	bunkové línie nádoru krčka maternice
ICT	intramolekulárny prenos náboja (z angl. intramolecular charge transfer)
LDL	lipoproteín s nízkou hustotou (z angl. low density lipoprotein)
MeOH	metanol
NIR	oblasť blízkeho infračerveného spektra (z angl. near infra-red)
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
PBS	pufrovaný fyziologický roztok (z angl. phosphate buffered saline)
Pc	ftalocyanín (z angl. phthalocyanine)
PDT	fotodynamická terapia (z angl. photodynamic therapy)
PS	fotosenzitizér (photosensitizer)

SK-MEL-28	bunkové línie ľudského melanómu
SubPc	subftalocyanín (z angl. subphthalocyanine)
TEA	trietylamín
TFA	kyselina trifluóroctová (z angl. trifluoroacetic acid)
THF	tetrahydrofurán
TLC	tenkovrstvová chromatografia (thin layer chromatography)
t.t.	teplota topenia

2 Cieľ práce

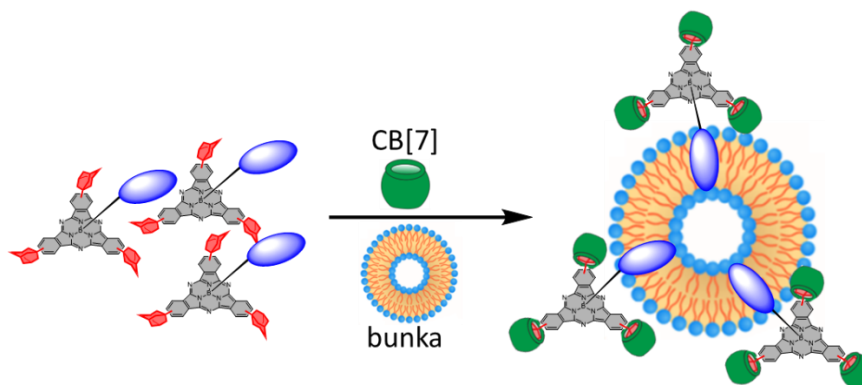
Cieľom tejto dizertačnej práce bola príprava rôznych derivátov ftalocyanínov (Pc) a následne štúdium ich fotofyzikálnych a biologických vlastností. Jednalo sa o 4 projekty:

- 1) Príprava Pc ktoré sú na periférii substituované aminoadamantylom. Vďaka tomuto substituentu je možná ich interakcia s kukurbiturilom (CB). Pc sú vo vodnom prostredí často agregované a touto interakciou by mala byť zaistená ich monomerizácia (Obrázok 1). Interakcia medzi Pc-CB bola študovaná pomocou absorpčných a fluorescenčných spektier predovšetkým vo vode, pomocou fotofyzikálnych parametrov. Následne boli tieto látky testované aj *in vitro* na bunkových líniách HeLa a SK-Mel-28.



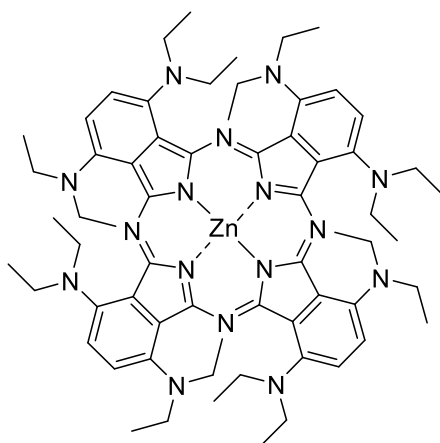
Obrázok 1. Obecná schéma projektu Pc-CB[7].

- 2) Príprava subftalocyanínov taktiež substituovaných aminoadamantylom na periférii, ich interakcia s CB nie len vo vode, ale aj v kombinácii vody s prídavkom organického rozpúšťadla, a s následným *in vitro* testovaním (Obrázok 2).



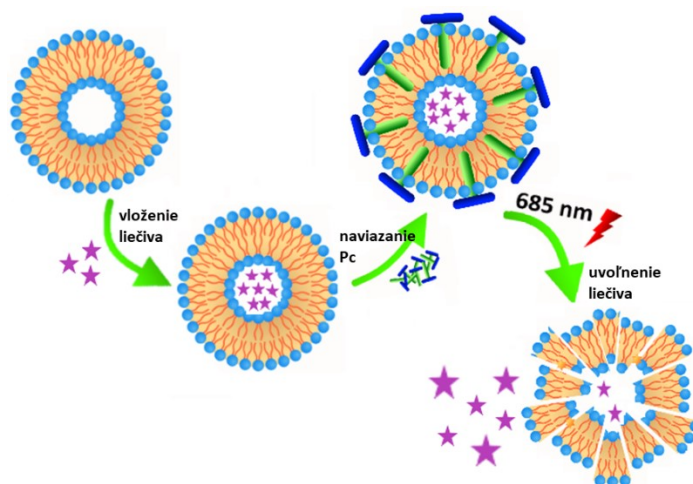
Obrázok 2. Obecná schéma projektu SubPc-CB[7].

- 3) Príprava α -substituovaných aminoftalocyanínov (Obrázok 3), ktoré majú maximum absorpcie posunuté k infračervenej oblasti spektra



Obrázok 3. Pripravovaný α -aminoftalocyanín

- 4) Štúdium vplyvu rôznych amfifilných Pc na uvoľnenie liečiv z lipozómov po aktivácii svetlom (Obrázok 4).



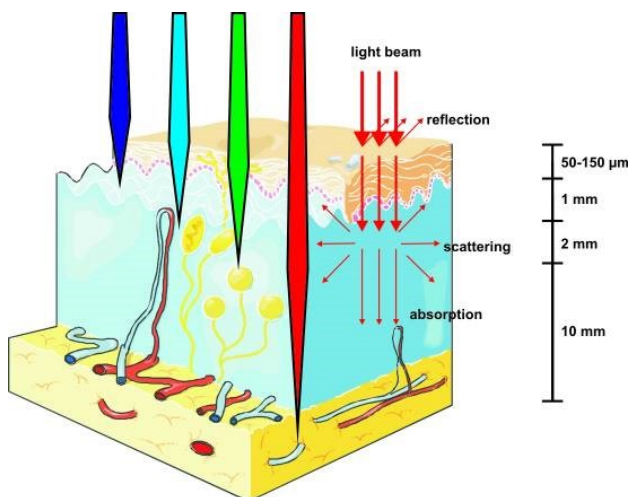
Obrázok 4. Schéma uvoľňovania liečiv po aktivácii svetlom.

3 Prehľad súčasného stavu riešenej problematiky

3.1 Fotodynamická terapia

Fotodynamická terapia (PDT) je moderná neinvazívna metóda využívaná predovšetkým na terapiu rakoviny. Konvenčná terapia rakoviny (chemoterapia, rádioterapia, chirurgické odstránenie nádoru) sa spája s veľkým množstvom nežiaducich účinkov, preto je kladený dôraz na nové terapeutické postupy.¹ Jednou z takýchto nových možností je aj PDT. PDT zahŕňa 3 samostatne netoxické zložky: fotosenzitizér (PS), svetlo (so špecifickou vlnovou dĺžkou) a kyslík. Ak sa však tieto zložky skombinujú, tak sa tvoria toxické produkty, ako napríklad singletový kyslík alebo radikály, ktoré spôsobujú smrť buniek.

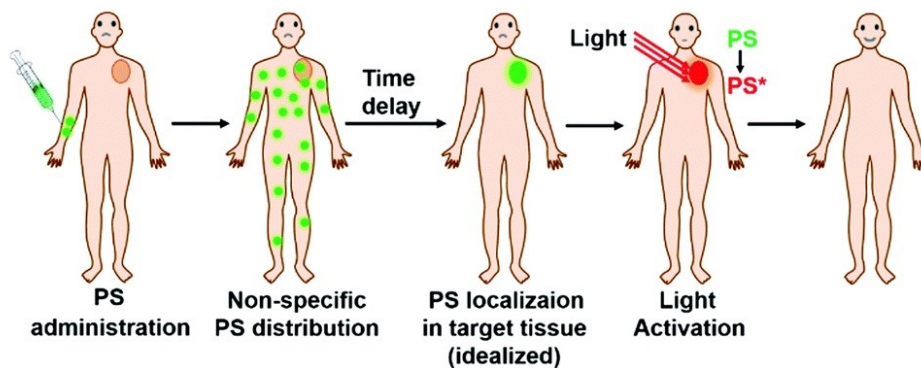
Modré svetlo preniká do kože len minimálne, naopak červené a infračervené svetlo preniká hlbšie (Obrázok 5), ale maximálne len do hĺbky 1 cm. Preto je potrebné pripraviť PS, ktoré absorbujú v červenej a infračervenej oblasti, a to aj tak limituje použitie PDT len na povrchovo lokalizované nádory.



Obrázok 5. Penetrácia svetla v závislosti na vlnovej dĺžke do kože. Prevzaté z ref.²

3.1.1 Princíp PDT

Fotosenzitizér (PS) je podaný pacientovi lokálne alebo intravenózne a časom sa kumuluje v nádorovom tkanive.³ Následne je ožiarené len miesto, kde sa nachádza nádor pomocou svetla o špecifickej vlnovej dĺžke, čo vedie k selektívnej aktivácii PS v nádore a k produkcii reaktívnych foriem kyslíka, ktoré spôsobujú apoptózu a/alebo nekrózu, zničenie ciev a imunitnú odpoveď (Obrázok 6).⁴

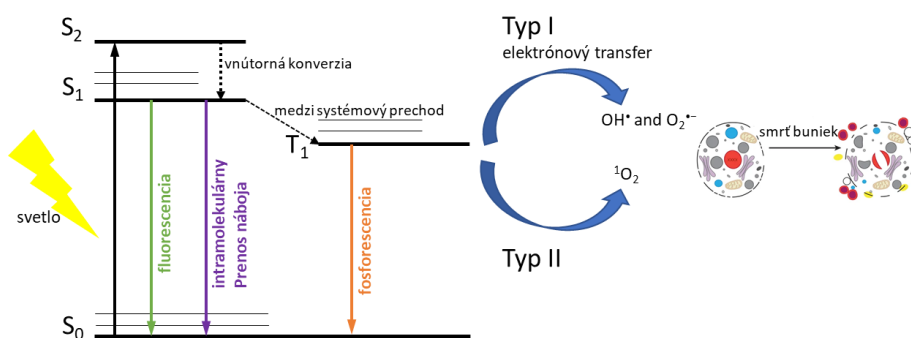


Obrázok 6. Princíp PDT. Prevzaté a upravené z ref.⁴

3.1.2 Mechanizmus PDT

PS absorbuje fotón s vhodnou vlnovou dĺžkou a prechádza zo základného stavu (S_0) do excitovaného singletového stavu (S_1) alebo do sekundárneho excitovaného stavu (S_2). S_2 sa rýchlo deaktivuje cez vnútornú konverziu do S_1 stavu.⁵ Takto excitovaný PS sa môže zbaviť energie emitovaním fluorescencie alebo sa dostáva cez medzisystémový prechod do tripletového stavu (T_1). Čím je dlhšia životnosť tohto tripletového stavu, tým môže excitovaný PS interagovať s okolitými molekulami, keďže cytotoxické látky produkované počas PDT vznikajú práve počas tripletového stavu PS.¹

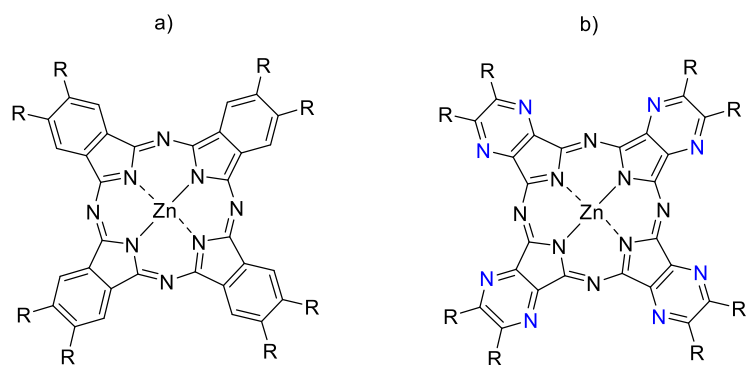
Excitovaný PS môže z T_1 stavu prejsť dvoma typmi reakcií. Počas reakcie typu I reaguje PS s okolitými bio molekulami (nukleové kyseliny, bielkoviny, lipidy) a formou elektrónového prenosu sa vytvárajú voľné radikály, ktoré sú veľmi reaktívne a následne reagujú s molekulárnym kyslíkom alebo vodou za tvorby radikálov OH^\bullet and $O_2^{\bullet-}$, ktoré spôsobujú smrť buniek.^{1,5} Reakcia typu II je založená na prenose energie medzi excitovaným tripletovým stavom PS a molekulovým kyslíkom v základnom tripletovom stave, čím sa vytvára vysoko toxická forma kyslíka, singletový kyslík (1O_2), ktorý spôsobuje smrť buniek (Obrázok 7).¹ Predpokladá sa, že pre funkčnosť PDT je dôležitejšia reakcia typu II, ale pomer akým prispievajú oba typy reakcií k bunkovej smrti závisí na viacerých faktoroch: koncentrácia kyslíka, pH alebo štruktúra PS. Ak nie je v prostredí dostatok kyslíka, začína prevažovať reakcia typu I.³



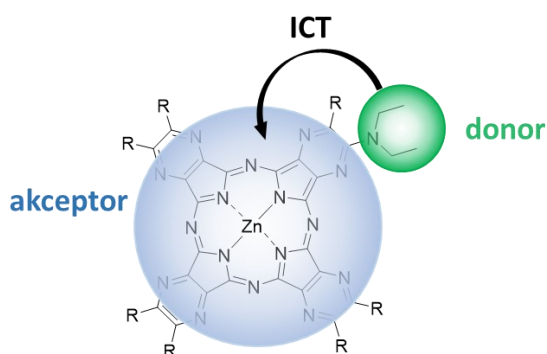
Obrázok 7. Mechanizmus PDT.

To, či sa PS zbavuje excitovanej energie emitovaním fluorescencie alebo tvorbou singletového kyslíka, vyjadrujú ich kvantové výťažky. Kvantový výťažok fluorescencie je (Φ_F) udáva pomer počtu emitovaných fotónov k počtu absorbovaných fotónov. Kvantový výťažok singletového kyslíka (Φ_Δ) vyjadruje počet vzniknutých molekúl singletového kyslíka na počet absorbovaných fotónov. Pomer jednotlivých kvantových výťažkov sa líši v závislosti na štruktúrnych parametroch PS.

Excitovaný PS sa môže zbavovať energie aj prostredníctvom intramolekulárneho prenosu náboja (ICT). Deje sa to predovšetkým u tetrapyrázoporfyrázínov (TPyzPz, derivátov ftalocyanínov), ktoré majú v makrocyclickej jadre viac atómov dusíka v porovnaní s ftalocyanínami (Obrázok 8). TPyzPz majú preto výrazne elektrón-deficitné makrocyclické jadro, a ak sú substituované elektrón donorovými skupinami (napr. alkylamíny), tak dochádza k rýchlemu ICT, ktorý spôsobuje zhášanie excitovaného stavu molekuly (Obrázok 9).^{6,7} To je možné využiť napríklad pre vývoj rôznych senzorov alebo aktivovateľných PS.⁸



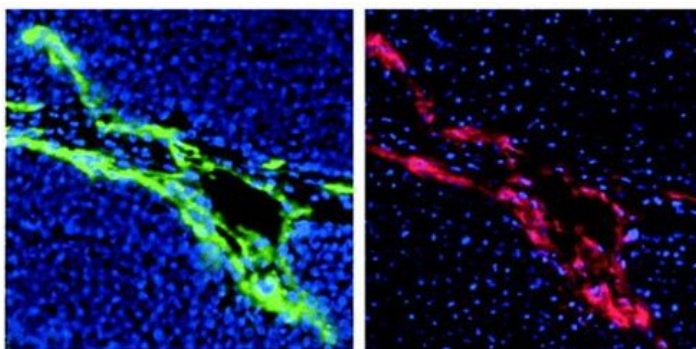
Obrázok 8. a) štruktúra ftalocyanínu, b) štruktúra tetrapyrázínoporfyrazínu.



Obrázok 9. Princíp ICT.

3.1.3 Faktory ovplyvňujúce účinnosť PDT

Dôležitým faktorom účinnosti PDT je lokalizácia PS. V posledných rokoch boli vyvinuté rôzne PS, ktoré boli selektívne lokalizované, napríklad do nádorových ciev (Obrázok 10).⁹ Lokalizácia PS závisí na veľkosti, náboji a hydrofilitite/lipofilitite PS, a taktiež na fyziologických vlastnostiach ciev ako je ich permeabilita.¹⁰ Ďalším faktorom, ktorý ovplyvňuje účinnosť PDT je čas medzi podaním PS pacientovi a následným ožiarovaním svetla. Ak je interval kratší (cca 15 min), tak sa PS akumuluje predovšetkým v cievach, ale ak je interval dlhší (rádovo v hodinách), tak sa PS akumuluje extravazálne (pokiaľ nie je silno hydrofilný).¹¹ Taktiež naviazanie niektorých PS na bunkové štruktúry/fyziologické molekuly ovplyvňuje účinnosť PDT, napríklad aniónovo substituované Pc sa viažu na hovädzí sérový albumín, a tým sa modeluje účinnosť PDT.¹²



Obrázok 10. Vaskulárne endotelové bunky (zelené), nevaskulárne bunky (modré), PS lokalizovaný vo vaskulárnych bunkách (červené). Prevzaté a upravené z ref.¹¹

3.1.4 Ďalšie možnosti využitia fotodynamického efektu

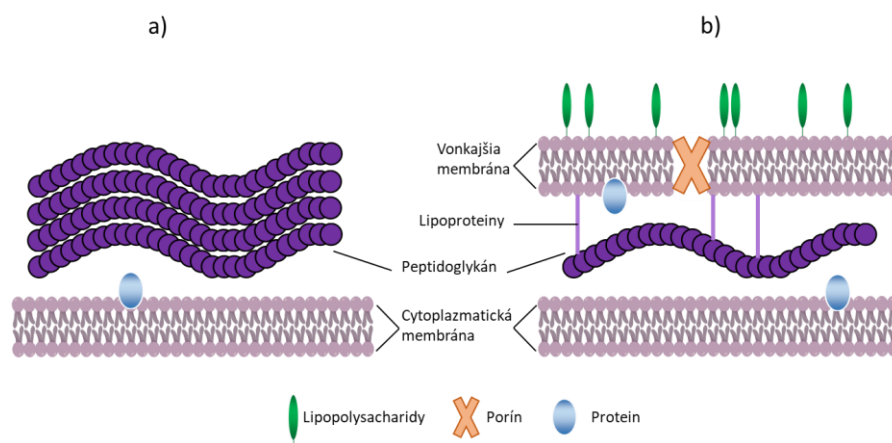
Aj keď je PDT využívaná predovšetkým u nádorových ochorení, existujú aj ďalšie oblasti, kde by sa fotodynamický efekt mohol uplatniť.

3.1.4.1 Antimikrobiálna liečba

S nárastom rezistencie viacerých bakteriálnych kmeňov v posledných desiatkach rokov a nedostatkom nových antibiotík a antibakteriálnych chemoterapeutík, sa zvýšil záujem o alternatívne liečebné postupy, medzi ktoré patrí aj antimikrobiálna fotodynamická terapia.

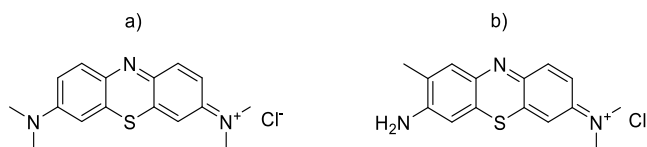
Keďže princípom fotodynamického efektu je tvorba reaktívnych foriem kyslíka po aktivácii svetom, je málo pravdepodobné, že by si baktérie mohli vytvoriť rezistenciu.¹³ Fotodynamický efekt taktiež neovplyvňuje citlivosť klasických konvenčných antibiotík a antibakteriálnych chemoterapeutík.¹⁴

Antimikrobiálna PDT viac účinkuje na grampozitívne baktérie, keďže ich vonkajšia bunková stena (obsahujúca peptidoglykán) je viac pórovitá a preto môže PS prejsť jednoduchšie do cytoplazmatickej membrány. Na druhej strane gramnegatívne baktérie (napr. *Escherichia coli* alebo *Pseudomonas aeruginosa*) sú menej citlivé na tento typ terapie, pretože majú zložitejšiu a komplexnejšiu morfológiu. Ich bunková stena obsahuje okrem peptidoglykánu aj vonkajšiu membránu s negatívne nabitými molekulami lipopolysacharidov a lipoproteinov, ktoré predstavujú fyzickú a funkčnú bariéru, ktorá bráni inkorporácii PS (Obrázok 11).¹⁵ Medzi najúčinnšie PS preto patria tie, ktoré majú vo svojej štruktúre kladný náboj (katiónové PS)¹⁶ a ktoré čiastočne účinkujú aj na gramnegatívne baktérie.¹⁷



Obrázok 11. Štruktúra bunkovej steny a) grampozitívnych, b) gramnegatívnych baktérií. Prevzaté a upravené z ref.¹⁸

Medzi najviac využívané PS v antimikrobiálnej PDT sú kladne nabité látky zo skupiny fenotiazínov (Obrázok 12). Tieto látky sú ale významným substrátom efluxných transportérov, ktoré sa nachádzajú v bakteriálnych bunkách, a tým sa znižuje ich účinnosť.¹⁹ Napriek tomu je možné použitie inhibítorov efluxných transportérov pred podaním fenotiazínu a zvýšiť tak účinnosť terapie.²⁰



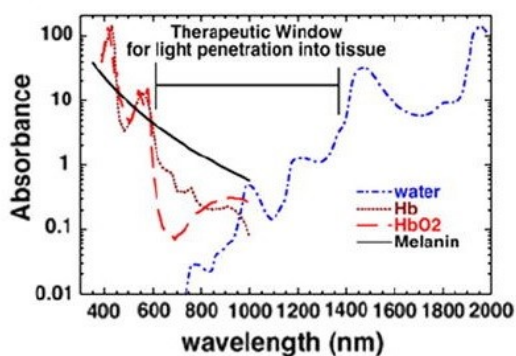
Obrázok 12. Štruktúry fenotiazínových fotosenzitizérov a) metylénová modrá, b) toluidinová modrá.

3.1.4.2. Antivirová PDT

PDT bola testovaná aj na niektorých vírusoch, ako napríklad herpes vírus alebo papilomavírus. Ako PS boli použité neutrálna červená, riboflavín či proflavín. Ide o deriváty akridínu, takže majú absorpčné maximum v oblasti 500 nm, teda svetlo neprechádza veľmi hlboko do tkaniva. Na bežné vírusové ochorenia už máme ale lepšie a účinnejšie antivirotiká, takže sa pravdepodobne antivírusová PDT nerozšíri na použitie jednoduchých infekcií.²¹

3.1.5 Fotosenzitizéry

PS sú látky definovanej štruktúry, ktoré absorbujú svetlo o špecifickej vlnovej dĺžky a následne spúšťajú fotochemické a fotofyzikálne reakcie, ktoré vedú k deštrukcii buniek.³ Ideálny PS by mal spĺňať viaceré charakteristiky, ako napríklad vysoká chemická čistota, stabilita pri laboratórnej teplote. Mali by byť lacné, jednoducho syntetizovateľné a ľahko dostupné. Mali by byť cytotoxické len v prítomnosti svetla a mali by mať vysokú rozpustnosť vo vode a relatívne rýchly clearance z tkaniva na minimalizovanie nežiadúcich účinkov. Maximum absorpcie by mali mať pri vlnovej dĺžke 630 – 800 nm (svetlo s vlnovou dĺžkou nad 800 nm už nemá dostatok energie na tvorbu dostatočného množstva singletového kyslíka a ďalších reaktívnych molekúl). Toto rozmedzie vlnovej dĺžky je v oblasti terapeutického optického okna (Obrázok 13), v ktorom nedochádza k absorpcii endogénnych molekúl melatonínu, hemoglobínu a oxyhemoglobínu.³

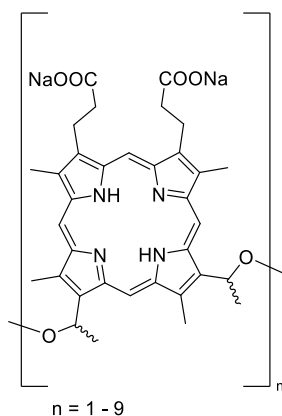


Obrázok 13. Terapeutické optické okno. Prevzaté a upravené z ref.²²

3.1.5.1 Prvá generácia fotosenzitizérov

Prvý PS zavedený do praxe terapie rakoviny bola zmes vo vode rozpustných hematoporfyrínových derivátov (Obrázok 14), pričom táto zmes sa neskôr stala známou pod označením porfimer sodný (nazývaný aj ako Photofrin®). Napriek tomu, že sa používa veľmi často, má viaceré nevýhody, ako napríklad nízka chemická čistota, keďže ide o zmes viacerých derivátov, dlhá fototoxicita (6 – 10 týždňov po terapii je nutné vyhýbať sa slnečnému žiareniu),²³ maximum absorpcie má len pri 630 nm, takže svetlo prejde do kože len do hĺbky niekoľko mm.^{2,3}

Preto nastal dopyt po nových molekulách PS druhej generácie, ktoré by mali lepšie vlastnosti a menej nežiadúcich účinkov ako Photofrin®.



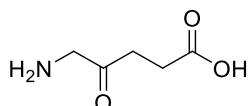
Obrázok 14. Štruktúra porfimeru sodného.

3.1.5.2 Druhá generácia fotosenzitizérov

Látky, ktoré patria do tejto skupiny PS, majú vyššiu chemickú čistotu, sú charakterizované vysokými kvantovými výťažkami singletového kyslíka, maximum absorpcie majú v rozsahu 650 – 800 nm, a tým pádom dané svetlo preniká hlbšie do kože. Majú tiež menej nežiaducich účinkov, keďže sa často selektívnejšie hromadia v nádorovom tkanive a sú rýchlejšie eliminované z tela.³

Ich najväčšou nevýhodou je ale často nízka rozpustnosť vo vode, čo limituje ich intravenózne použitie, preto sa hľadajú a vyvíjajú nové metódy na doručenie liečiv na miesto účinku.

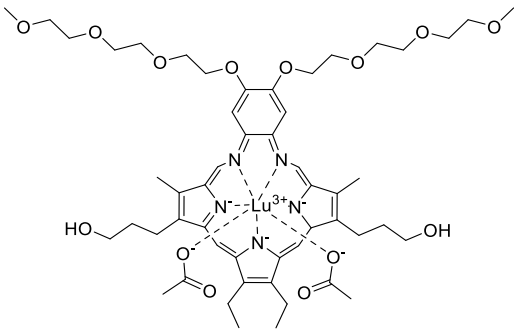
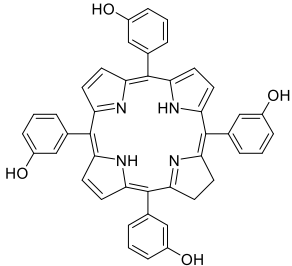
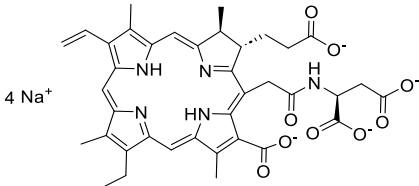
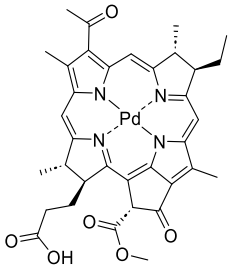
Významným zástupcom druhej generácie PS je kyselina 5-aminolevulová (ALA, Obrázok 15). Ide o proliečivo, keďže po transformácii v organizme sa z neho stáva protoporfyrín IX. ALA je pomerne hydrofilná, a tak sa v terapii používa často vo forme esteru (metyl alebo hexylester).²

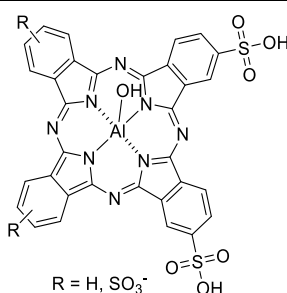
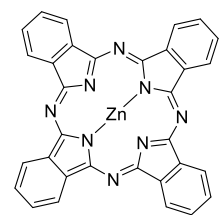
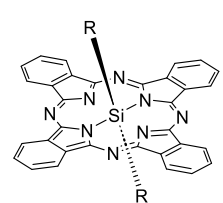


Obrázok 15. Štruktúra ALA.

Medzi ďalších zástupcov druhej generácie PS patria deriváty chlorínu, bakteriochlorínu, texafyrínu a ftalocyanínu. Konkrétne príklady derivátov sú uvedené v Tabuľke 1.

Tabuľka 1. Štruktúry druhej generácie fotosenzitizérov.

<p>Texafyríny</p>	 <p>texafyrín lutecitý</p>
<p>Chloríny</p>	 <p>temoporfín</p>  <p>talaporfín sodný</p>
<p>Bakteriochloríny</p>	 <p>padeliporfín</p>

Ftalocyaníny	 <p>R = H, SO₃⁻</p> <p>Photosens® (zmes di-, tri- a tetrasulfonovaného hlinitého ftalocyanínu)</p>
	 <p>zinočnatý ftalocyanín</p>
	 <p>kremitý ftalocyanín (s axiálnou substitúciou)</p>

3.1.5.3 Tretia generácia fotosenzitizérov

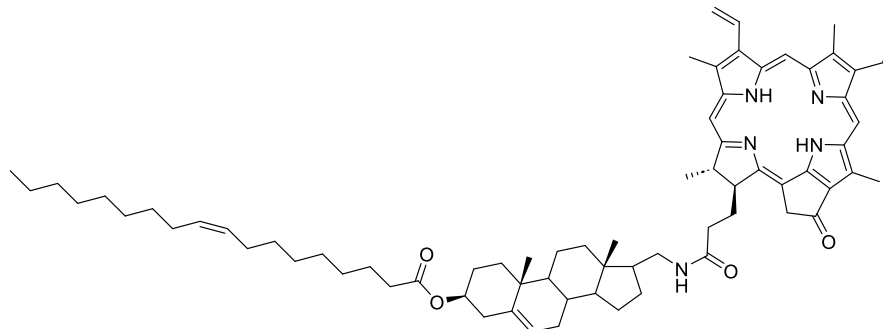
Vývoj tretej generácie PS je založený na syntéze látok s vyššou afinitou k nádorovému tkanivu. Takéto látky poškodzujú menej zdravé okolité tkanivo a taktiež je možné znížiť podávané dávky PS, pričom je zachovaný dostatočný terapeutický efekt.³

Molekula PS je najčastejšie konjugovaná s ďalšou molekulou, vďaka ktorej sa daný PS dostane špecificky do nádorového tkaniva. Najčastejšie sa ako konjugované molekuly používajú napríklad monosacharidy,²⁴ peptidy,²⁵ LDL častice,^{26, 27} protilátky,²⁸ nanočastice,²⁹ a polyméry.³⁰

Konjugácia PS a peptidu má dvojaký účinok. V prvom rade nastáva významné zvýšenie rozpustnosti a zníženie agregácie vo vode po konjugácii s hydrofilnými peptidovými ligandami. V druhom rade peptidové ligandy majú schopnosť naviazať sa na určité receptory v nádorových bunkách.²⁵

LDL častice (low density lipoprotein) sa skladajú z nepolárneho jadra, ktoré tvoria neutrálne lipidy, ako napríklad estery cholesterolu a triglyceridy. Toto jadro je obklopené polárnymi časťami fosfolipidov a neesterifikovaného cholesterolu. Receptory pre LDL častice sú v nádorových bunkách vysoko exprimované, pretože nádorové bunky sa rýchlo množia

a potrebujú veľa cholesterolu na syntézu bunkových membrán. Na konjugáciu s LDL časticami bol použitý napríklad PS pyrofeoforbid *a* (ide o stabilný analóg prírodného chlorofylu *a*) substituovaný cholesteryl oleátom pomocou primárneho amínu ako spojovacej časti (Obrázok 16). Cholesteryl oleát slúži na ukotvenie PS do LDL častice. Takto modifikovaný PS sa prednostne akumuluje v nádorových bunkách.²⁷



Obrázok 16. Štruktúra modifikovaného fotosenzitizéru tretej generácie. Prevzaté a upravené z ref.²⁷

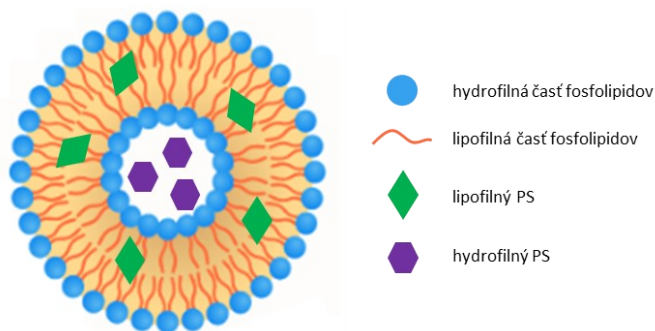
3.2 Svetlom aktivované uvoľnenie liečiva

V posledných rokoch začal byť kladený dôraz na systémy dodávania liečiv (Drug delivery systems, DDS) v terapii rakoviny, pretože látky používané v protinádorovej terapii sú často toxické aj pre zdravé bunky. Pomocou DDS by sa znížila ich toxicita, zlepšila by sa rozpustnosť a znížili by sa ich ďalšie nežiadúce účinky. Ako DDS sa najčastejšie využívajú lipozómy, prípadne organické alebo anorganické nanočastice.³¹ Aj keď samotné DDS zlepšili niektoré vlastnosti podávaných liečiv, stále majú nejaké nevýhody, a to napríklad nešpecifickú distribúciu v organizme a nekontrolovateľné uvoľnenie liečiva. Tieto nedostatky minimalizujú DDS reagujúce na rôzne podnety.³² Môže sa jednať o vnútorné podnety, ako napríklad pH,³³ teplota³⁴ alebo redoxný potenciál,³⁵ alebo vonkajšie podnety ako napríklad svetlo.³⁶

3.2.1 Lipozómy

Jednými z najčastejších molekúl používaných ako DDS sú lipozómy. Sú to sférické vezikuly o veľkosti 50 – 500 nm. Ideálna veľkosť lipozómov by mala byť 50 – 100 nm, pretože menšie molekuly by mohli náhodne prechádzať cez cievné steny. Na druhej strane lipozómy s veľkosťou 200 nm a viac sú rýchlejšie vychytávané pomocou RES (retikuloendoteliárny systém).³⁷

Lipozómy sú zložené z hydrofóbnej lipidovej dvojvrstvy (napr. fosfatidylcholín alebo syntetické dialkyl a trialkyl lipidy) a vnútornej hydrofilnej dutiny (Obrázok 17). Okrem fosfolipidov sa do štruktúry lipozómov často pridáva cholesterol, ktorý zlepšuje vlastnosti lipozómov, ako napríklad zvyšuje ich stabilitu v krvi alebo v plazme, znižuje permeabilitu vo vode rozpustných molekúl skrz membránu alebo znižuje interakciu s proteínmi v krvi (napríklad albumínom).³⁸ Vďaka svojej dvojakej štruktúre môžu lipozómy inkorporovať makrocyclické látky do hydrofóbnej membrány alebo do hydrofilnej dutiny v závislosti na štruktúre inkorporovanej látky (Obrázok 17). Lipozómy sa vo veľkom využívajú v nanomedicíne hlavne vďaka ich biokompatibilite, stabilite, jednoduchej príprave a vysokej biodostupnosti.³⁹ V závislosti na type a vlastnostiach môže byť PS inkorporovaný v lipofilnej membráne alebo v hydrofilnej dutine lipozómov.



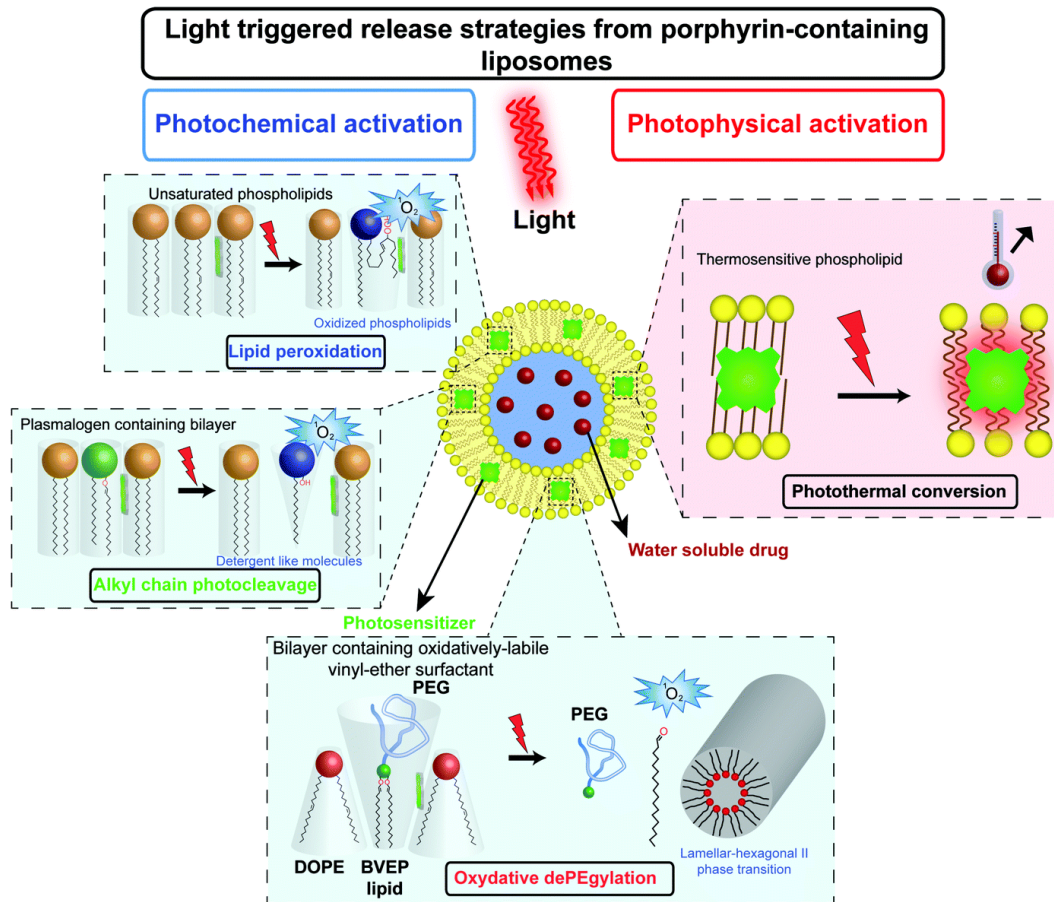
Obrázok 17. Štruktúra lipozómu s inkorporovanými lipofilnými alebo hydrofilnými PS.

3.2.2 Mechanizmus uvoľňovania liečiv po aktivácii svetlom

3.2.2.1 Fotochemická reakcia

Fotochemické reakcie sú chemické reakcie, ktoré nastávajú po absorpcii svetla, čím dochádza k modifikácii integrity lipozomálnej membrány a uvoľneniu liečiva. V závislosti na chemickej štruktúre fosfolipidov môže svetlom vyvolaná oxidácia spôsobiť ich rôzne

chemické modifikácie, ako je peroxidácia lipidov, fotoštiepenie alkylových reťazcov alebo oxidatívna depeglyácia (Obrázok 18).



Obrázok 18. Mechanizmy uvoľňovania liečiv z lipozómov, prevzaté z ref. ³¹

3.2.2.1.1 Peroxidácia lipidov

Najčastejším mechanizmom po aktivácii svetlom je peroxidácia lipidov. Po ožiarení PS (inkorporovaného v lipozómoch) vzniká singletový kyslík, ktorý oxiduje dvojité väzby nenasýtených fosfolipidov. Vytvárajú sa hydroperoxy, ktoré destabilizujú lipidové reťazce lipozómov, a tým dochádza k zvýšenej permeabilite membrány, čo spôsobuje uvoľnenie liečiva z lipozómu.⁴⁰ Na Schéme 1 je zobrazená peroxidácia lipidov DOPC (1,2-dioleoyl-glycerol-3-fosfatidylcholín) lipozómov. Singletový kyslík má dlhšiu životnosť v lipidových membránach ako vo vodnom roztoku, preto lepšie reaguje s lipidovou membránou.

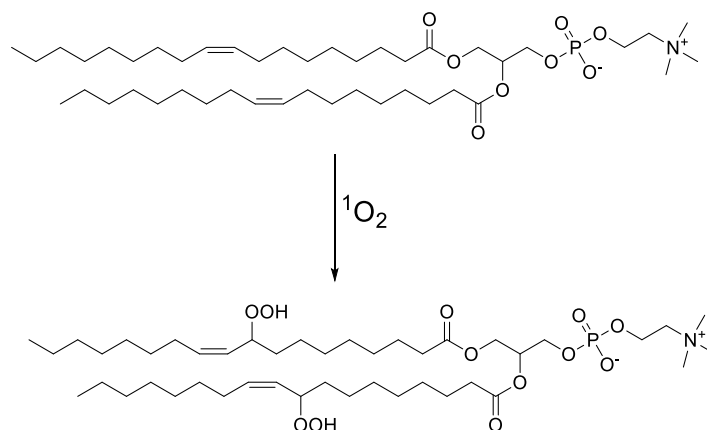


Schéma 1. Peroxidácia lipidov DOPC lipozómov.

Medzi najznámejšie ciele oxidácie singletovým kyslíkom patria mononenasýtené/polynenasýtené fosfolipidy⁴⁰ a cholesterol,⁴¹ ktoré sa vyskytujú v membránach lipozómov v rôznom pomere, čím je možné meniť rýchlosť uvoľnenia liečiva z lipozómov.

3.2.2.1.2 Fotoštiepenie alkylových reťazcov

Tento typ chemickej reakcie je možný ak sú v štruktúre lipozómov prítomné štiepateľné fosfolipidy, ako napríklad plazmalogén. Plazmalogény obsahujú labilné vinyl éterové skupiny, ktoré je možné jednoducho odštiepiť pomocou singletového kyslíka (Schéma 2).⁴² Rozštiepením plazmalogénu dochádza k strate jeho amfifilného charakteru a následnej destabilizácii lipozómu.³¹

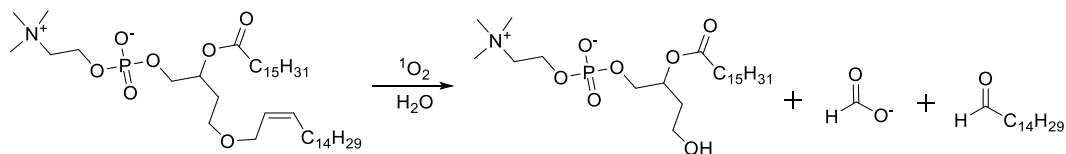
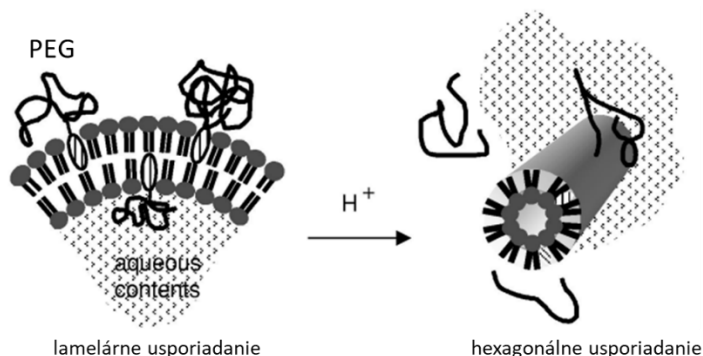


Schéma 2. Fotooxidácia singletovým kyslíkom éteru plazmalogénu.

Tento mechanizmus je ale nešpecifický, pretože vinyl éterová funkčná skupina je citlivá na kyslé pH⁴³ a k uvoľneniu liečiva môže dôjsť už v endozóme. Môže to predstavovať problém pre liečivá (inkorporované v lipozómoch), ktoré sú citlivé na kyslé pH.

3.2.2.1.3 Oxidatívna depegylácia

Tento typ oxidácie je založený na lipozómoch, zložených z kombinácie PEG-konjugovaných lipidov, ktoré obsahujú vinyl éterovú väzbu a DOPE fosfolipidov (1,2-dioleoyl-sn-glycerolo-3-fosfoetanolamín). Odštiepenie pegylových reťazcov spôsobuje zmenu usporiadania lipidov z lamelárneho na hexagonálne (Obrázok 19), a to spôsobuje narušenie membrány a uvoľnenie liečiva.⁴⁴



Obrázok 19. Odštiepenie pegylových reťazcov a zmena usporiadania lipidov. Prevzaté a upravené z ref. ⁴⁴

3.2.2.2 Fotofyzikálna reakcia

Uvoľnenie látky z lipozómov nie je spôsobené chemickými zmenami lipidov lipozómov. Dochádza k fototermickej konverzii absorbovaných fotónov svetla, čo spôsobuje teplotný alebo mechanický stres lipidovej membrány a následne dochádza k uvoľneniu látky z lipozómov.⁴⁵ Tento typ mechanizmu uvoľnenia liečiva vyžaduje prítomnosť PS s nízkym kvantovým výťažkom singletového kyslíka, pretože v tom prípade dochádza k relaxácii excitovaných molekúl PS predovšetkým emitovaním fluorescencie vibráciami, ktoré spôsobujú fototerminálne rozloženie membrán lipozómov.⁴⁶

3.2.3 Výhody liečiv inkorporovaných v lipozómoch

Vďaka štruktúre lipozómov je možné do nich inkorporovať hydrofilné (do dutiny) alebo hydrofóbne liečivá (do membrány).³⁷ Inkorporácia oboch typov liečiv sa deje už počas formulovania lipozómov. Hydrofóbne liečiva je síce možné inkorporovať aj do už formulovaných lipozómov, ale tento proces trvá oveľa dlhšie.⁴⁷

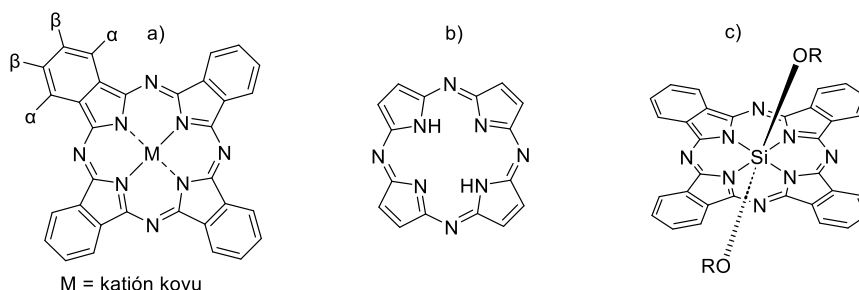
Liečivá inkorporované v lipozómoch sú chránené pred enzymatickou degradáciou, nie sú metabolizované skôr ako dosiahnu miesto účinku a nepôsobia na zdravé tkanivo kým cirkulujú v krvnom obeh. Týmto sa zvyšuje terapeutický efekt liečiv a znižujú sa jeho nežiaduce účinky.

Príklady používaných liečiv inkorporovaných v lipozómoch:

- protinádorové antracyklínové látky (doxorubicín, daunorubicín a epirubicín) – v porovnaní s voľnými liečivami boli inkorporované liečivá účinnejšie, mali nižšiu kardiotoxicitu⁴⁸ a mali menej nežiadúcich účinkov (alopécia, nevoľnosť, zvracanie).⁴⁹
- Vinkristín – jeho lipozomálna forma cirkuluje dlhšie v plazme a umožňuje použitie vyšších dávok liečiva v porovnaní s jeho voľnou formou.⁵⁰
- Amfotericín B – používa sa na liečbu bakteriálnych infekcií a jeho lipozomálna forma sa vyznačuje vyššou toleranciou a vyššou účinnosťou.⁵¹

3.3 Ftalocyaníny

Ftalocyaníny (Pc) sú makrocyclické zlúčeniny (Obrázok 20a) štruktúrne odvodené od porfyrínu (Obrázok 20b), ktorý sa vyskytuje napríklad v štruktúre hému. Majú konjugovaný systém dvojitych väzieb a planárne aromatické jadro, kvôli ktorému tvoria často nežiadúce nerozpustné a neúčinné agregáty. Používajú sa ako farbivá,⁵² v solárnych článkoch,⁵³ fluorescenčné sondy⁵⁴ a taktiež ako fotosenzitizéry vo fotodynamickej terapii.⁵⁵



Obrázok 20. (a) Základná štruktúra Pc, (b) štruktúra porfyrínu.

Pc majú konjugovaný systém dvojitych väzieb s 18π elektrónmi, vďaka ktorému majú absorpčné maximum okolo 670 nm.⁵² Vhodnou substitúciou Pc jadra predovšetkým v neperiférnej α polohe (Obrázok 20a) je možné posunúť maximum ich absorpcie až do oblasti infračerveného spektra. Okrem polohy substituentu taktiež záleží na heteroatóme, cez ktorý je substituent napojený na makrocyclické jadro Pc. Najviac ovplyvňujú absorpčné maximum prvky ako O, S, N, Se a Te (Tabuľka 2).^{56,57} Najviac posúvajú absorpčné maximá substituenty naviazané v α polohe cez selén a telúr, u ktorých je maximum viac ako 800 nm.⁵⁸ Niektoré substitúcie na Pc jadre sú synteticky problematické, napríklad disubstitúcia alkyl/arylamínov v α aj β polohe, aj keď sa tieto látky vyznačujú vyšším posunom absorpčných maxím do červenej oblasti svetla, ktorá je výhodná pre PDT. Niektoré centrálny katióny, ako napríklad Si(IV), má ešte aj axiálne substituenty, ktoré sú orientované nad a pod rovinu makrocyclického jadra (Obrázok 20c).

Tabuľka 2. Absorpčné maximá substituovaných Pc. Prevzaté z ref⁵⁷⁻⁵⁹

Spojovací atóm	α poloha		β poloha	
	monosubstitúcia	disubstitúcia	monosubstitúcia	disubstitúcia
O	723 nm	762 nm	703 nm	698 nm
S	733 nm	804 nm	713 nm	729 nm
N	770 nm		721 nm	
Se		811 nm		
Te		835 nm		

Centrálny katión Pc ovplyvňuje aj jeho vlastnosti. Katióny ako Mg(II), Al(III), Si(IV) spôsobujú vysoký kvantový výťažok fluorescence⁶⁰ a takéto Pc sa môžu využívať ako fluorofory v zobrazovacích technikách.⁶¹ Na druhej strane Pc so Zn(II), Pd(II), Pt(II) ako centrálnym atómom sa používajú ako PS v PDT, pretože na základe efektu ťažkého atómu⁶² produkujú vyššie množstvo singletového kyslíka, čo je v prípade PDT žiadúce. Kvantové výťažky ovplyvňujú aj substituenty naviazané na makrocyclické jadro, ako napríklad jód, ktorý na základe efektu ťažkého atómu zvyšuje kvantové výťažky singletového kyslíka. Na druhej strane dialkylamino tetrapyrazinoporfyríny majú takmer nulové kvantové výťažky fluorescence a používajú sa ako zhášače fluorescence.⁶³

3.3.1 Syntéza ftalocyanínov

3.3.1.1 Symetrické ftalocyaníny

Syntéza Pc je možná viacerými spôsobmi. Najčastejšie ide o cyklotetramerizačné reakcie ich ftalonitrilových prekursorov Linsteadovou alebo templátovou metódou (Schéma 3). V prvom prípade ide o cyklizáciu pomocou alkoholátov (napr. lítny, horečnatý),⁶⁴ ktoré pôsobia ako iniciátory reakcie. Lítium ako centrálny kation je veľmi slabo viazaný v centre makrocyklu a aj veľmi mierne kyslé podmienky, dokonca aj voda pri spracovaní reakcie, stačia na to, aby vznikol bezkovový derivát, do ktorého je následne vložený kation iného kovu, ktorý je v centre chelatovaný. Druhým spôsobom cyklotetramerizácie je templátová metóda pomocou solí zvolených kovov (najčastejšie octany) vo vysoko vriacom rozpúšťadle (napr. pyridín, DMF, chinolín), pričom okolo kationu kovu sa postupne spájajú ftalonitrilové prekursorov do makrocyklu.

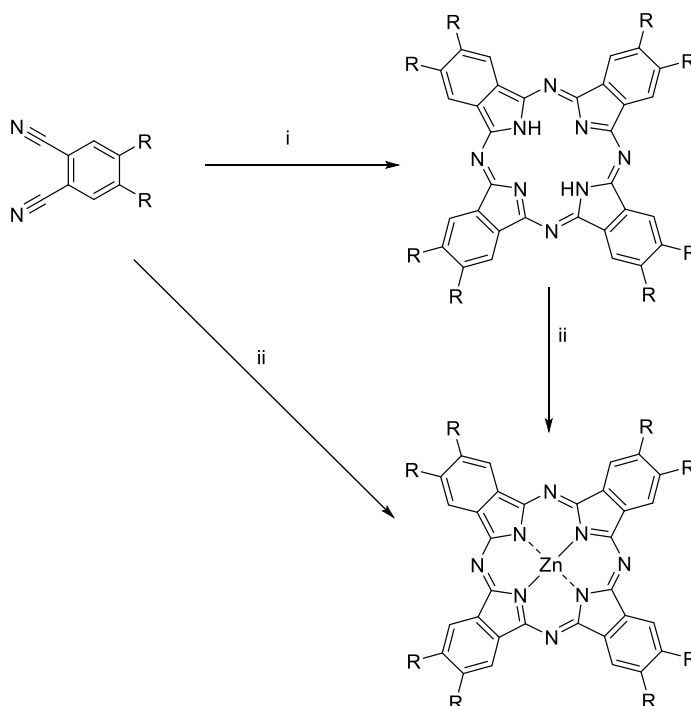


Schéma 3. Cyklotetramerizácia ftalonitrilov za vzniku Pc, príklad reakčných podmienok: i) Li, BuOH, reflux, 2 h, ii) Zn(CH₃COO)₂, pyridín, reflux, 16 h.

3.3.1.2 Asymetrické ftalocyaníny

Asymetrické Pc majú aspoň dva rozdielne substituenty. Ich najčastejším spôsobom prípravy je metóda štatistickej kondenzácie, pričom sa použijú 2 ftalonitrilové prekursorov a môže vzniknúť 6 rôznych kongenéroov (Schéma 4), ktoré je potrebné od seba rozdeliť chromatografickými metódami.

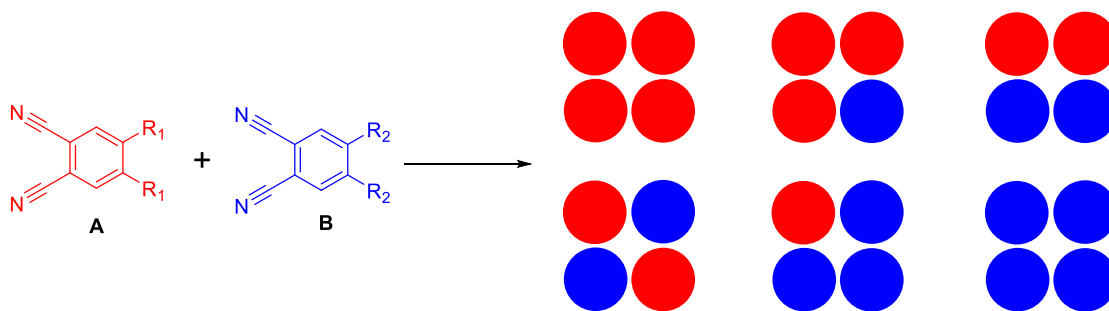


Schéma 4. Štatistická kondenzácia syntézy asymetrických Pc.

Ďalším spôsobom prípravy nesymetrických Pc je rozšírenie subftalocyanínového makrocyclu reakciou so substituovaným 1,3-diiminoizolindolínom (Schéma 5).⁶⁵ Týmto spôsobom je možné pripraviť A₃B ftalocyanín.

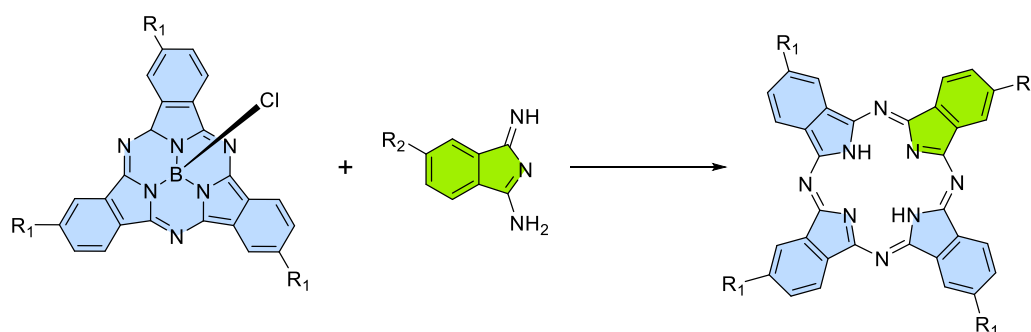


Schéma 5. Príprava asymetrického Pc rozšírením cyklu SubPc.

Ďalším spôsobom prípravy asymetrického Pc typu A₃B je metóda založená na použití polymérnej pevnej fázy, na ktorú je naviazaný ftalonitril B. Tento prekursor naviazaný na polymér môže reagovať s inak substituovaným ftalonitrilom A za vzniku Pc typu A₃B, ktorý je naviazaný na pevnú fázu a symetrický Pc A₄ je jednoducho vymytý z pevnej fázy. Následne je daný asymetrický Pc uvoľnený z polymérnej pevnej fázy (Schéma 6).⁶⁶ Tento spôsob má ale viaceré nevýhody, ako napríklad časová náročnosť čistenia a izolácie požadovaného Pc a ftalonitril B musí reagovať s polymérnou pevnou fázou.⁶⁷

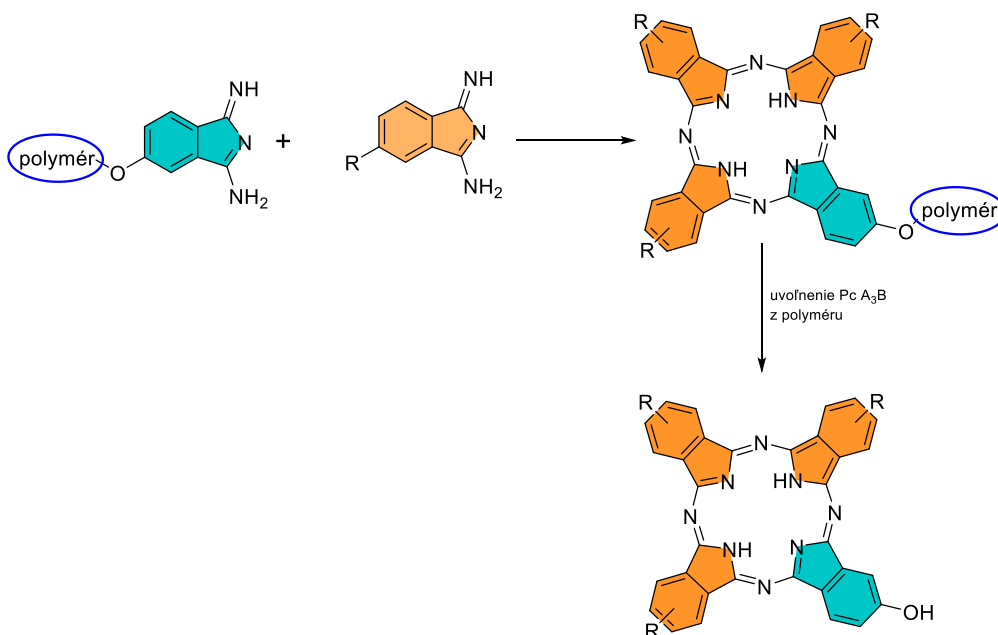


Schéma 6. Príprava asymetrického Pc pomocou polymérnej pevnej fázy.

Okrem asymetrického Pc typu A₃B je možné aj selektívne pripraviť Pc typu A₂B₂ pomocou lítia. Ftalonitril s objemnými substituentmi v α polohe reaguje s lítium hexyloxidom pri 150 °C za vzniku „polovičného“ ftalcynínu (Schéma 7). Tetramerizácia prekursoru za tvorby symetrického Pc nie je preferovaná kvôli stérickemu bráneniu objemných substituentov. Následná reakcia s druhým typom ftalonitrilového prekursoru dochádza k selektívnej tvorbe asymetrického Pc typu A₂B₂.⁶⁷

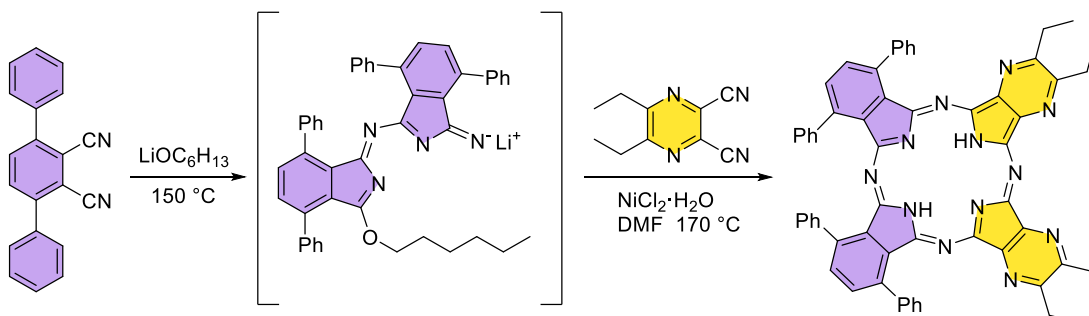
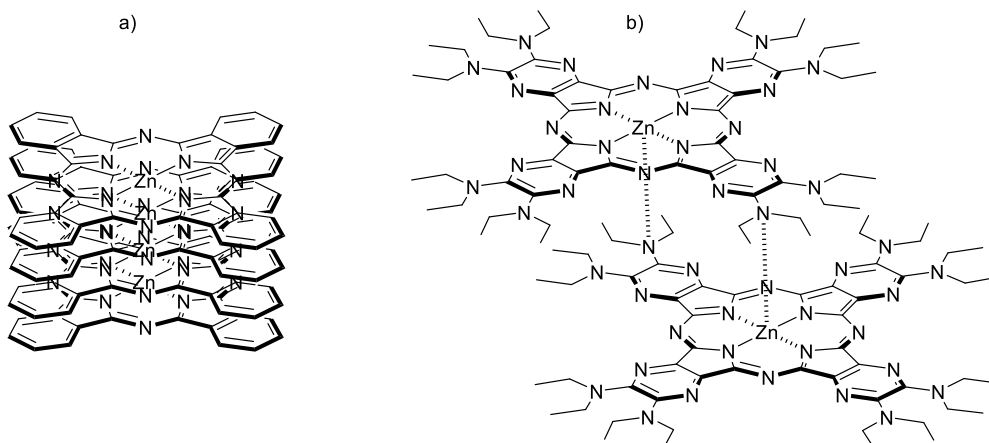


Schéma 7. Príprava asymetrického Pc typu A₂B₂.

3.3.2 Agregácia ftalocyanínov

Pc majú planárnu štruktúru, preto často agregujú, a tým sa stávajú neúčinnými, keďže fluorescencia je zhášaná a produkcia singletového kyslíka je znížená. Pc, prípadne ich aza-analógy (tetrapyrazinoporfyrázíny, Obrázok 21b) tvoria 2 typy agregátov. H-agregáty, ktoré sa tvoria na základe π - π interakcií (Obrázok 21a) a veľmi výnimočne J-diméry,^{63,68} ktoré sa tvoria na základe koordinácie centrálneho kationu s periférnym substituentom, ktorým je dusík v alifatickom amíne (Obrázok 21b).

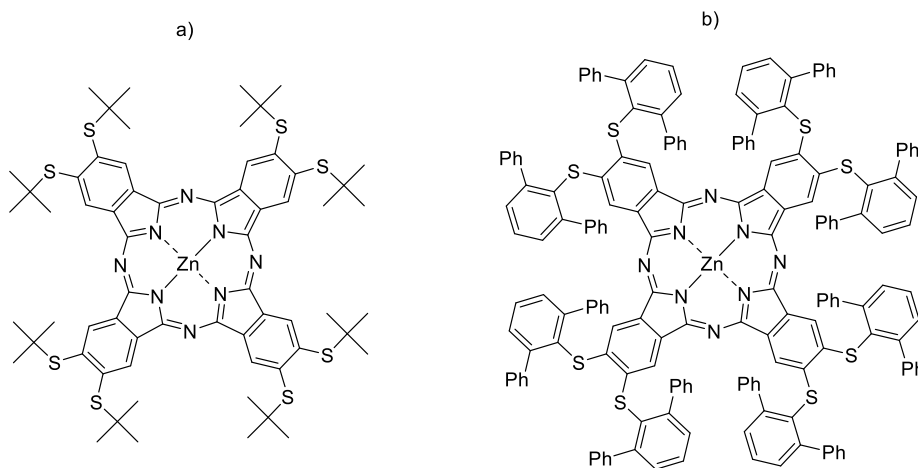


Obrázok 21. (a) H-agregáty, (b) J-diméry.

Jednoznačne u Pc ale prevažuje H-agregácia, ktorá je zodpovedná za inaktiváciu fotofyzikálnych vlastností. Existuje viacero účinných spôsobov ako zabrániť H-agregácii Pc.

a) Objemné substituenty

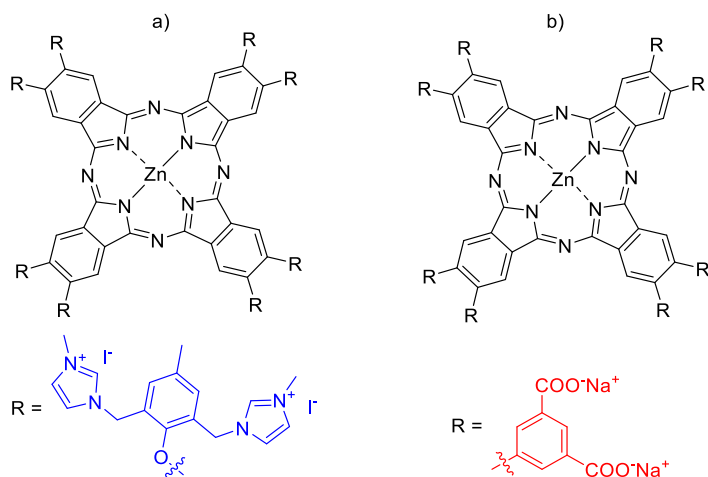
Pc môžu byť substituované na periférii rôznymi objemnými substituentmi, vďaka ktorým je stéricky znemožnená agregácia molekúl Pc. Ako objemné substituenty sa používajú napríklad *tert*-butylsulfanyl (Obrázok 22a),⁶⁹ 2,6-di(*tert*-butyl)fenoxy,⁷⁰ 2,6-diizopropylfenoxy⁷¹ alebo napríklad 2,6-difenylfenylsulfanyl (Obrázok 22b).⁷² Tento spôsob je využívaný hlavne na potlačenie agregácie v organických rozpúšťadlách.



Obrázok 22. Príklady štruktúr s objemnými substituentmi a) *tert*-butylsulfanyl, b) 2,6-difenylfenylsulfanyl

b) Substituenty s nábojom

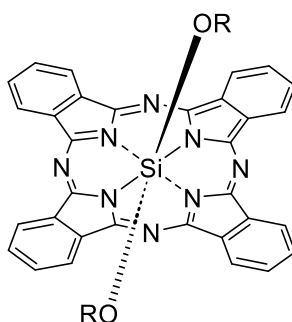
Kladne⁷³⁻⁷⁵ alebo záporne⁷⁶⁻⁷⁹ nabité substituenty taktiež bránia agregácii Pc, na základe elektrických odpudzujúcich síl (Obrázok 23). Často tú tieto nabité funkčné skupiny naviazané na objemné substituenty, čím sa kombinujú 2 rôzne princípy a zamedzenie agregácie je ešte účinnejšie. Toto je jedna z najúčinnejších metód ako zabrániť agregácii vo vodnom prostredí.



Obrázok 23. Príklady štruktúr s (a) kladne alebo (b) záporne nabitými substituentmi.

c) Axiálna substitúcia

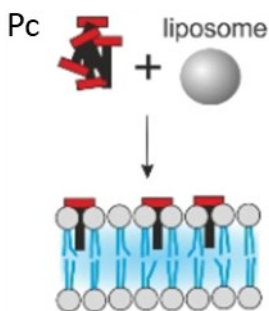
Pc s kremičitým centrálnym kationom, môžu mať okrem periférnych substituentov aj axiálne substituenty (Obrázok 24) orientované nad a pod rovinu makrocyklu, ktoré taktiež účinne zamedzujú ich agregácii.



Obrázok 24. Kremičité Pc s axiálnou substitúciou.

d) Lipozómy

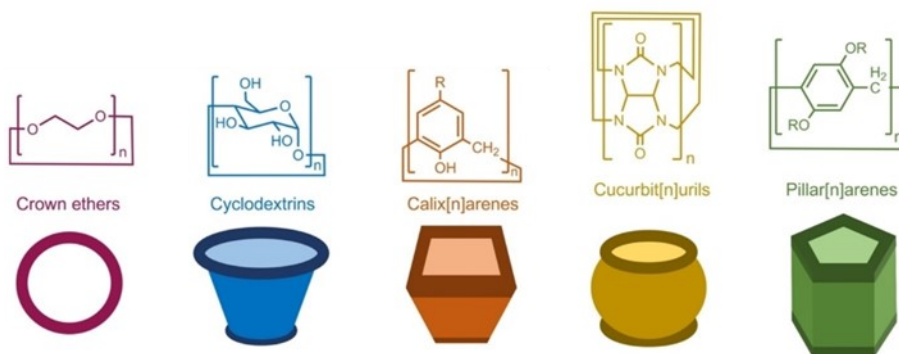
Planárne Pc sa môžu interkalovať do membrány lipozómov, čím sa zamedzí ich agregácii a zvýši sa množstvo jeho monomérskej formy (Obrázok 25). Pre interkaláciu sú vhodné asymetrické Pc typu A₃B, ktoré majú 3 podjednotky buď úplne bez substituentov, alebo len s malými substituentmi, pretože inak by sa Pc interkaloval do lipozómu veľmi ťažko a pomaly. Podjednotka B má naopak hydrofilné substituenty na zlepšenie rozpustnosti vo vode, keďže táto časť Pc ostáva mimo lipozómu.



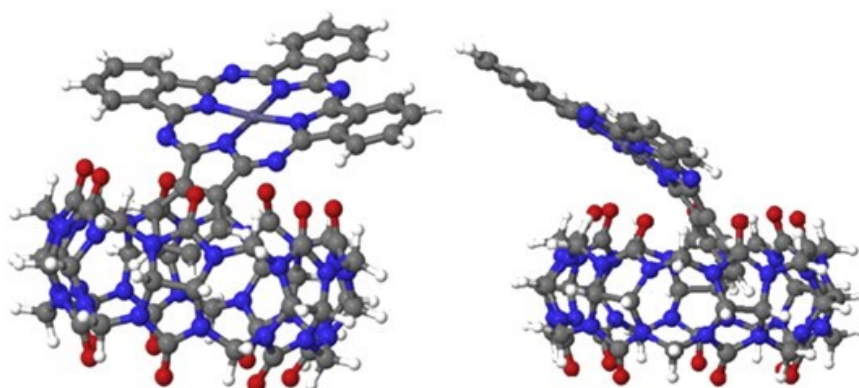
Obrázok 25. Interkalácia Pc do membrány lipozómu. Prevzaté a upravené z ref. ⁵⁵

e) Supramolekulárne interakcie

Vytvorením komplexu hostiteľ-hosť je možné zvýšiť rozpustnosť hosťa a zamedziť jeho agregácii. Supramolekulárne interakcie sú tvorené hlavne π - π interakciami, elektrostatickými interakciami alebo vodíkovými väzbami.⁸⁰ Ako hostiteľské molekuly sú využívané predovšetkým cyklodextríny, pilar[n]arény, kalix[n]arény, crownétery a kukurbit[n]urily (Obrázok 26), ktoré vytvárajú komplexy s rôznymi hosťovskými molekulami a môžu tak zvýšiť podiel monomérskej zložky jednotlivých Pc napr. pomocou tzv. „inclusion“ komplexov (Obrázok 27).



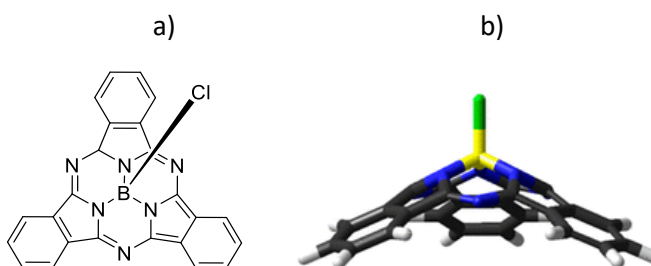
Obrázok 26. Štruktúry hostiteľských molekúl. Prevzaté a upravené z ref.⁸¹



Obrázok 27. Tzv. „inclusion“ komplex CB[7] a ZnPc. Prevzaté z ref.⁸²

3.4 Subftalocyaníny

Subftalocyaníny (SubPc) sú makrocyclické zlúčeniny zložené z troch izoindolových podjednotiek spojených azometínovými mostíkmi na rozdiel od ftalocyanínov, ktoré majú štyri podjednotky. Jedná sa teda o nižšie homológy ftalocyanínov. SubPc majú aromatický systém so 14 π elektrónmi, vďaka ktorému majú špeciálne charakteristiky, ako napríklad, že môžu mať v centre cyklu atóm bóru, ktorý je možné substituovať aj v axiálnej polohe (Obrázok 28a). SubPc nie sú planárne molekuly, ale majú kužeľovitý tvar (Obrázok 28b), vďaka ktorému nie sú v rozpúšťadlách úplne agregované a majú aj vyššiu rozpustnosť v porovnaní s Pc.⁸³ Substitúciou na periférii makrocyklu alebo v axiálnej polohe je možné ovplyvniť ich fyzikálne a chemické vlastnosti.



Obrázok 28. a) Štruktúra subftalocyanínu, b) kužeľovitý tvar SubPc, prevzaté a upravené z ref. ⁸⁴

3.4.1 Syntéza subftalocyanínov

Syntéza SubPc je založená na cyklotrimerizačnej reakcii (Schéma 8) ftalonitrilového prekursoru a bór trihalogenidu (typu BX_3), pričom najčastejšie sa používa BCl_3 v rozpúšťadle s vysokou teplotou varu (1-chlórnaftalén, *p*-xylén) v inertnom prostredí.⁸⁵

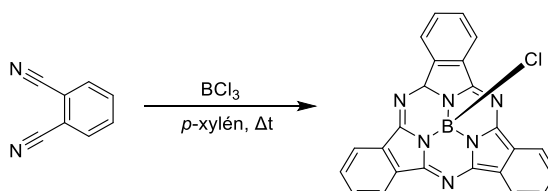
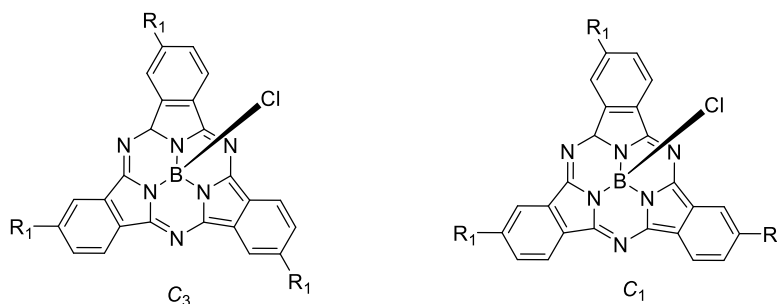


Schéma 8. Syntéza SubPc.

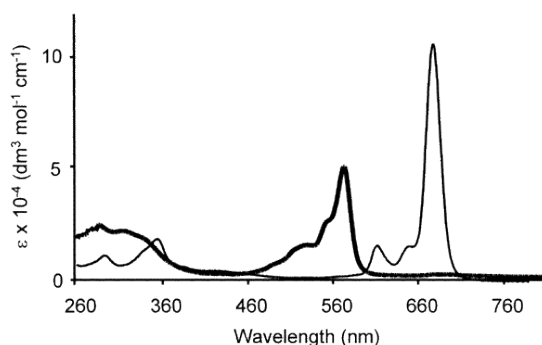
Pri použití monosubstituovaného ftalonitrilu dochádza k syntéze dvoch konštitučných izomérov C_1 a C_3 (Obrázok 29). Tieto izoméry je možné v niektorých prípadoch od seba oddeliť pomocou HPLC⁸⁶ alebo aj pomocou stĺpcovej chromatografie na silikageli.



Obrázok 29. Konštitučné izoméry SubPc.

3.4.2 Vlastnosti subftalocyanínov

SubPc sa vyznačujú slabšou absorpciou v oblasti 260 – 370 nm, čo zodpovedá Soretovmu pásu Pc, a silnejšou absorpciou v oblasti 460 – 560 nm, ktorá tvarom zodpovedá Q-pásu Pc (Obrázok 30).⁸⁷ Absorpčné maximum nesubstituovaných SubPc v oblasti okolo 570 nm⁸⁸ je možné vhodnou substitúciou na periférii (napr. aryl-sulfanyly) posunúť vyššie až do oblasti viac ako 620 nm,⁸⁹ čo sa už blíži k maximu absorpcie niektorých Pc.



Obrázok 30. Absorpčné spektrum SubPc (hrubá čiara) a Pc (tenká čiara). Prevzaté z ref.⁸⁷

SubPc sa vyznačujú aj dobrými fytofizikálnymi vlastnosťami. Kvantový výťažok singletového kyslíka Φ_{Δ} dosahuje hodnoty až 0,5 – 0,8 vďaka čomu sú vhodnými kandidátmi na PS v PDT.^{90, 91} Kvantový výťažok fluorescence Φ_F dosahuje hodnoty až 0,4 – 0,6⁹². Vďaka týmto výhodným vlastnostiam je možné použiť SubPc súčasne aj ako PS v PDT a súčasne aj ako fluorescenčné sondy v rámci diagnostiky.⁸⁸

3.4.3 Reaktivita subftalocyanínov

SubPc môžu reagovať viacerými spôsobmi, a to reakciou v axiálnej polohe, periférnej polohe a rozšírením marocyklu.

3.4.3.1 Axiálna reaktivita

Reaktivita atómu bóru nie je veľmi vysoká, keďže je stéricky chránený izoindolovými podjednotkami a axiálnym halogénom (Schéma 9). Preto reakcie s nukleofilmi vyžadujú väčšinou vyššiu teplotu, ktorá ale môže na druhej strane spôsobiť aj otvorenie kruhu a rozloženie SubPc.⁹³ Chlór- a bróm- SubPc reagujú s veľkým množstvom nukleofilov najčastejšie s alkoholmi, fenolmi a karboxylovými kyselinami za tvorby novej väzby B–O. Pričom fenoly^{90, 94, 95} sú reaktívnejšie ako alkoholy.^{96, 97} SubPc s brómom v axiálnej polohe reagujú ochotne, no chlór deriváty SubPc potrebujú drastickjšie podmienky, aby došlo k axiálnej substitúcii, ako napríklad vysokú teplotu.⁸⁷

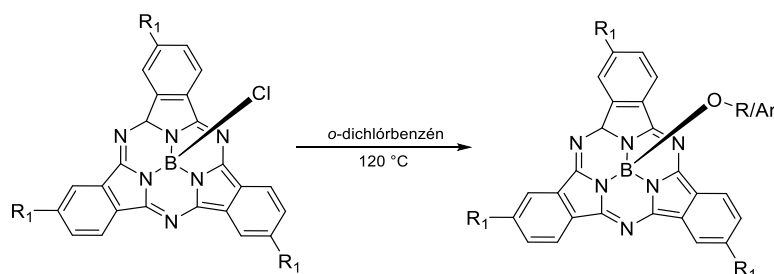


Schéma 9 Axiálna substitúcia SubPc

Pri použití slabších nukleofilov, je najprv nutné aktivovať väzbu B–X, a to pomocou triflátu strieborného/trimetylsilylu alebo pomocou Lewisovej kyseliny (Schéma 10), pričom aktivovaný medziprodukt nie je izolovaný.

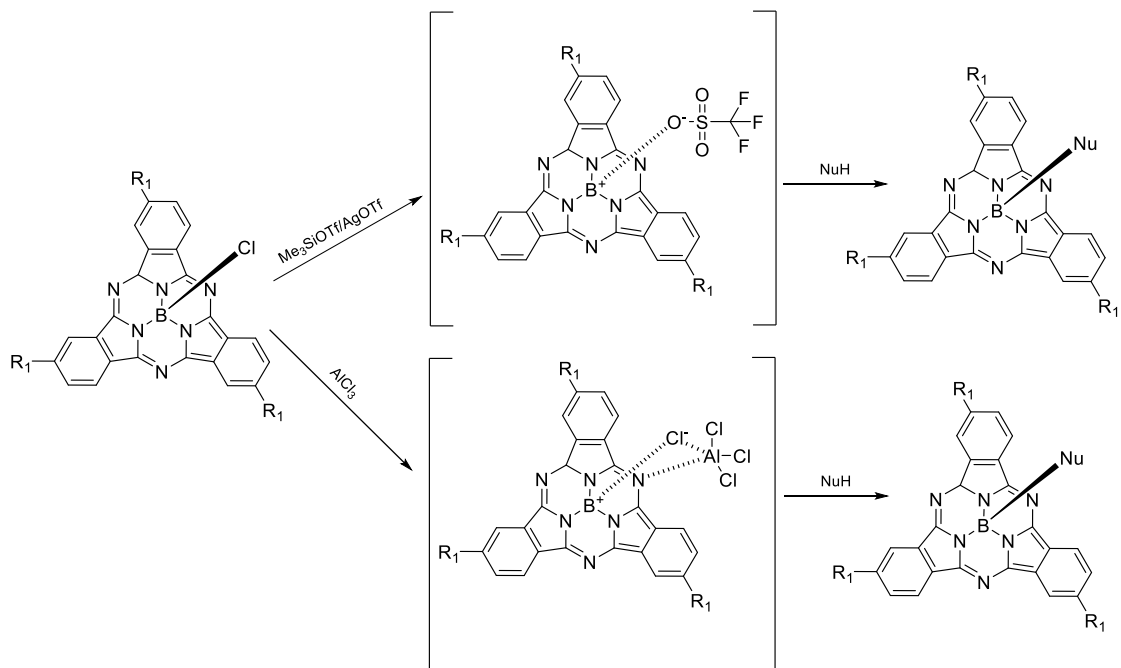


Schéma 10. Axiálna substitúcia SubPc cez aktivovanie väzby B–X.

Tvorba väzby B–C nie je až taká častá. Pri jej syntéze sa využívajú Grignardove činidlá.⁹⁸ Pri tvorbe väzby B–N a B–S sa využíva aktivácia axiálneho halogénu najčastejšie pomocou triflátu strieborného (Schéma 10), pričom amín alebo tiol sa pridá priamo k aktivovanému medziproduktu SubPc a reakcia je hotová za niekoľko hodín pri mierne zvýšenej teplote 20 – 50 °C. Aromatické amíny a tioly sú oproti alifatickým reaktívnejšie a výsledný SubPc je aj stabilnejší.⁹³

3.4.3.2 Periférna reaktivita

Do tejto skupiny reakcií patria všetky chemické modifikácie, ktoré sa dejú na makrocyclickom jadre SubPc. Ide o reakcie, ktoré nie sú charakteristické len pre SubPc, ale keďže SubPc sú menej stabilné, niektoré reakčné postupy musia byť upravené. Niektoré funkčné skupiny, ako napríklad amíny, alkyl étery, tioétery, sulfoxidy alebo nenasýtené dvojné väzby, rýchlo reagujú s halogénmi na atóme bóru, preto je ich použitie v periférnej substitúcii SubPc veľmi obmedzené.⁹³ Najčastejšie používané reakcie sú kovom katalyzované couplingové reakcie. Najčastejšie je východiskovým SubPc trijodosubftalocyanín (Schéma 11), z ktorého je následne možné pomocou paládiom-katalyzovaných reakcií (Sonogashira, Suzuki a Stille reakcie), Buchwald-Hartwigovej aminácie alebo borylácie pripraviť substituované SubPc.

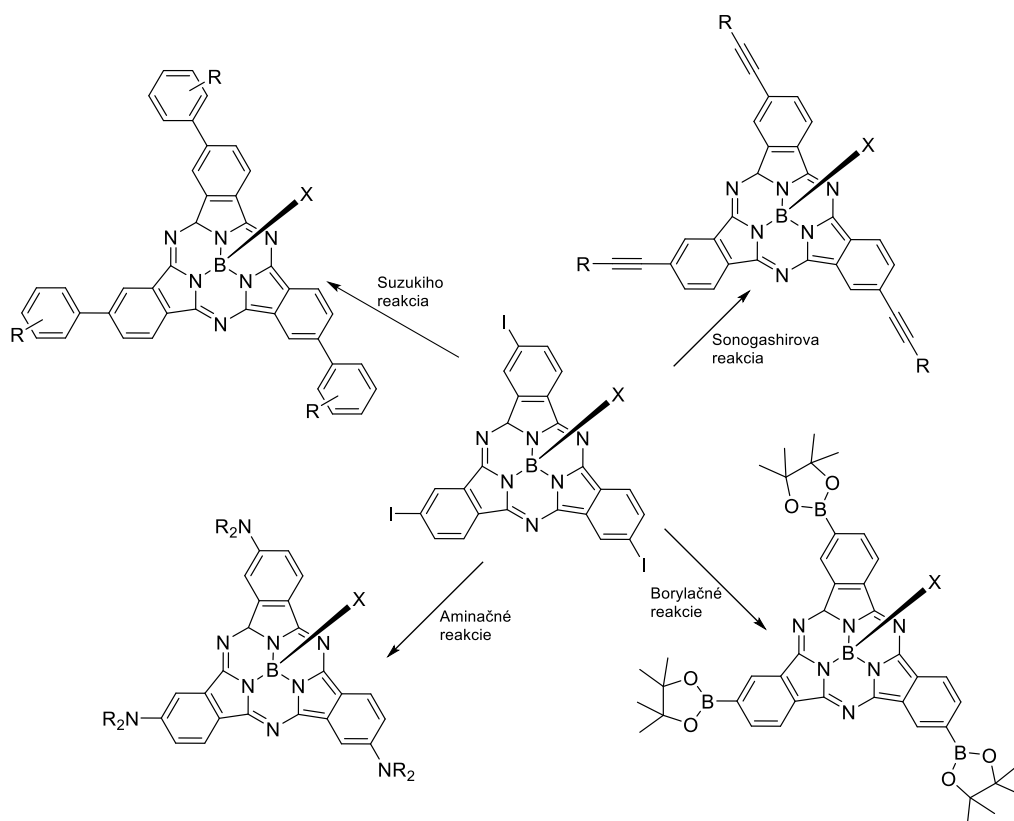


Schéma 11. Možnosti periférnej reaktivity. Prevzaté a upravené z ref.⁹³

3.4.3.3 Rozšírenie kruhu

Ide o prípravu asymetrických Pc (Schéma 5) typu A₃B, ktorá bola diskutovaná už vyššie v kapitole 3.3.1.2. Reakcia prebieha v polárnych rozpúšťadlách, ako napríklad DMSO alebo dimethylaminoetanol, pričom v niektorých prípadoch sa používa v malom množstve aj 1-chlórnaftalén alebo *o*-dichlórbenzén na zlepšenie rozpustnosti reaktantov. Ako nukleofil sa používa substituovaný diiminoizoindolín, prípadne ftalonitrilový prekurzor aktivovaný *in situ* pomocou DBU (1,8-diazabicyklo-[5,4,0]undek-7-én).⁹⁹ Často je nutná vyššia reakčná teplota (okolo 100 °C), čo môže viesť k rozpadu SubPc makrocyklu a zníženiu výťažnosti reakcie. SubPc substituované na periférii elektrón odťahujúcimi funkčnými skupinami reagujú s diiminoizoindolínmi už pri laboratórnej teplote, pričom výsledný Pc typu A₃B vzniká v prijateľnom výťažku 30 – 40 %.¹⁰⁰

3.5 Kukurbit[n]urily

Kukurbit[n]urily (CB) sú makrocyclické látky tvorené glykolurilovými monómerni, ktoré sú spojené methylenovými mostíkmi. Po prvýkrát boli syntetizované už pred vyše 100 rokmi¹⁰¹ kyslo katalyzovanou kondenzáciou glykolurilu a formaldehydu (Schéma 12). Presná štruktúra CB nebola známa až do roku 1981, kedy Mock¹⁰² zverejnil neobyčajnú makrocyclickú štruktúru, ktorá pozostávala zo šiestich glykolurilových jednotiek a dvanástich metylenových mostíkov. Keďže táto molekula pripomínala tekvicu, ktorá patrí do čeľade tekvicovité (lat. cucurbitaceae), pomenoval ju kukurbituril.

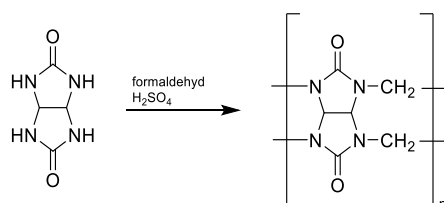
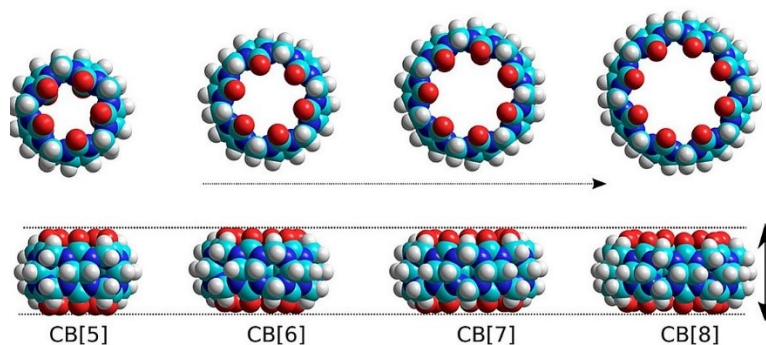


Schéma 12. Príprava CB.

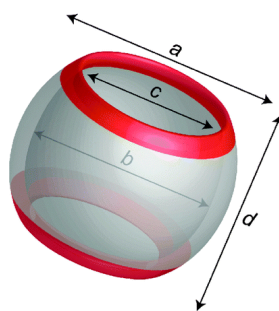
Najčastejším produktom kondenzácie je CB s 5 – 8 monómerni, ale boli izolované aj vyššie homógy CB.¹⁰³ Karbonylové skupiny lemujúce portál CB znižujú priemer dutiny, ale s rastúcim počtom monomérov sa priemer dutiny zväčšuje (Obrázok 31). Výška CB pritom ostáva rovnaká.¹⁰⁴ Konkrétne štruktúrne parametre CB hodnoty sú zobrazené v Tabuľke 3. Vysvetlenie parametrov a – d sú na Obrázku 32.



Obrázok 31. Zväčšovanie dutiny CB s rastúcim počtom monomérov. Prevzaté a upravené z ref.⁵⁴

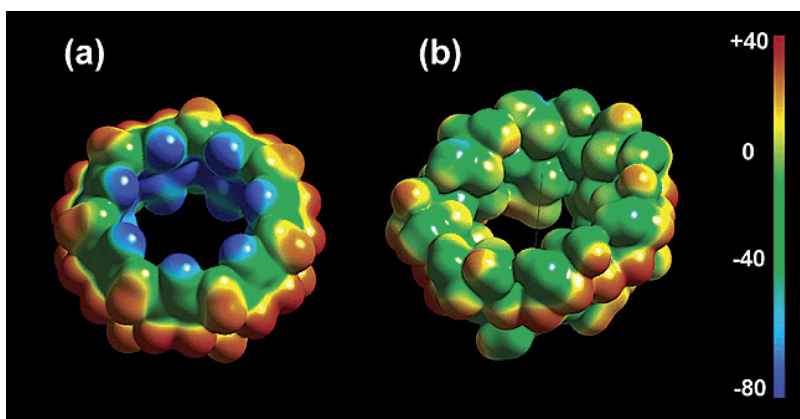
Tabuľka 3. Štruktúrne parametre CB[n] (n = 5 – 8).

	CB[5]	CB[6]	CB[7]	CB[8]
Vonkajší priemer a (Å)	13,1	14,4	16,0	17,5
Priemer dutiny b (Å)	4,4	5,8	7,3	8,8
Priemer portálu c (Å)	2,4	3,9	5,4	6,9
Výška d (Å)	9,1	9,1	9,1	9,1
Objem dutiny (Å ³)	82	164	279	479



Obrázok 32. Vysvetlenie štruktúrnych parametrov. Prevzaté a upravené z ref.¹⁰⁴

CB majú hydrofóbnu dutinu a polárne portály tvorené karbonylovými funkčnými skupinami, vďaka ktorým CB ochotne tvoria ión-dipól interakcie a taktiež vodíkové väzby. Preto CB preferujú hosťovské molekuly, ktoré sú kladne nabité. Na druhej strane cyklodextríny (CD), staršie a taktiež často využívané hosťovské molekuly preferujú neutrálne molekuly.¹⁰³ Tieto rozdiely v štruktúre CB a CD je možné vidieť na ich profile elektrostatického potenciálu (Obrázok 33).



Obrázok 33. Elektrostatická potenciál na povrchu (a) CB[7] a (b) β -CD. Prevzaté z ref.¹⁰³

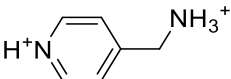
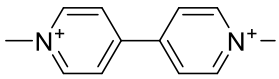
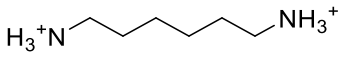
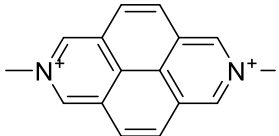
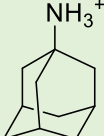
CB s rôznym počtom monomérnych podjednotiek môže viazať do svojej dutiny rozdielne hosťovské molekuly s rozdielnou afinitou (Tabuľka 4).

Tabuľka 4 Príklady vybraných hosťovských molekúl ktoré sa dobre viažu s daným CB

CB[5]	CB[6]	CB[7]	CB[8]
NH_4^+ Na^+ , K^+ Ca^{2+} , Ba^{2+} Cu^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+}	$\text{H}_3^+\text{N}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_3^+$ $n = 4-7$ 		

V Tabuľke 5 sú uvedené príklady niektorých hosťovských molekúl a ich asociačné konštanty s CB[6], CB[7] a CB[8]. Hodnoty asociačných konštant sa pohybujú od slabých 10^2 M^{-1} až po veľmi silné interakcie 10^{12} M^{-1} . Jedna z najsilnejších interakcií reportovaných interakcií je medzi CB[7] a 1-aminoadamantanom, až 10^{12} M^{-1} .¹⁰⁵

Tabuľka 5 Hodnoty asociačných konštant (v M^{-1}) vybraných hosťovských molekúl s CB. Prevzaté a upravené z ref.¹⁰⁵

	CB[6]	CB[7]	CB[8]
	3000 ± 150	$(3,58 \pm 0,57) \times 10^5$	
		$(1,32 \pm 0,21) \times 10^7$	
	$(4,49 \pm 0,84) \times 10^8$	$(8,97 \pm 1,43) \times 10^7$	
		$(3,81 \pm 0,61) \times 10^7$	$(6,37 \pm 1,20) \times 10^8$
		$(4,23 \pm 1,00) \times 10^{12}$	$(8,19 \pm 1,75) \times 10^8$

4 Výsledky a diskusia

V rámci mojej dizertačnej práce som sa venovala štyrom rôznym projektom:

1. **Ftalocyaníny** (Pc) majú výhodné fotofyzikálne vlastnosti pre použitie v PDT. Ich veľkou nevýhodou je ale agregácia vo vodnom prostredí, keďže ide o planárne molekuly. Agregované molekuly strácajú svoje výhodné fotofyzikálne vlastnosti a tým aj fotodynamickú aktivitu. V rámci mojej dizertačnej práce sme sa snažili zamedziť agregácii Pc pomocou tvorby supramolekulárnych komplexov s CB[7]. Vďaka tejto komplexácii Pc a CB[7] sú ftalocyaníny takmer monoméne vo vodnom prostredí.
2. **Subftalocyaníny** (SubPc) sú nižšie homológy Pc a vďaka axiálnej substitúcii sú síce menej agregované, ale často vo vodnom prostredí nerozpustné a interakcia s CB[7] by mala spôsobiť zlepšenie týchto vlastností.
3. Príprava a štúdium vlastností **α -substituovaných aminoftalocyanínov**, ktoré majú výhodne posunuté absorpčné maximum do blízkej IČ oblasti.
4. **Svetlom aktivované uvoľňovanie** látok z lipozómov v prítomnosti amfifilného PS. Liečiva sa inkorporujú do lipozómov na zlepšenie účinnosti a zníženie nežiaducich účinkov. Aktivácia svetlom zaistí uvoľnenie liečiva a jeho pôsobenie až v požadovanom momente. Po ožiarení svetlom špecifickej vlnovej dĺžky dochádza k tvorbe singletového kyslíka, ktorý spôsobuje peroxidáciu lipidov lipozómov a následné uvoľnenie liečiva.

4.1 Štúdium supramolekulárnych interakcií ftalocyanínov

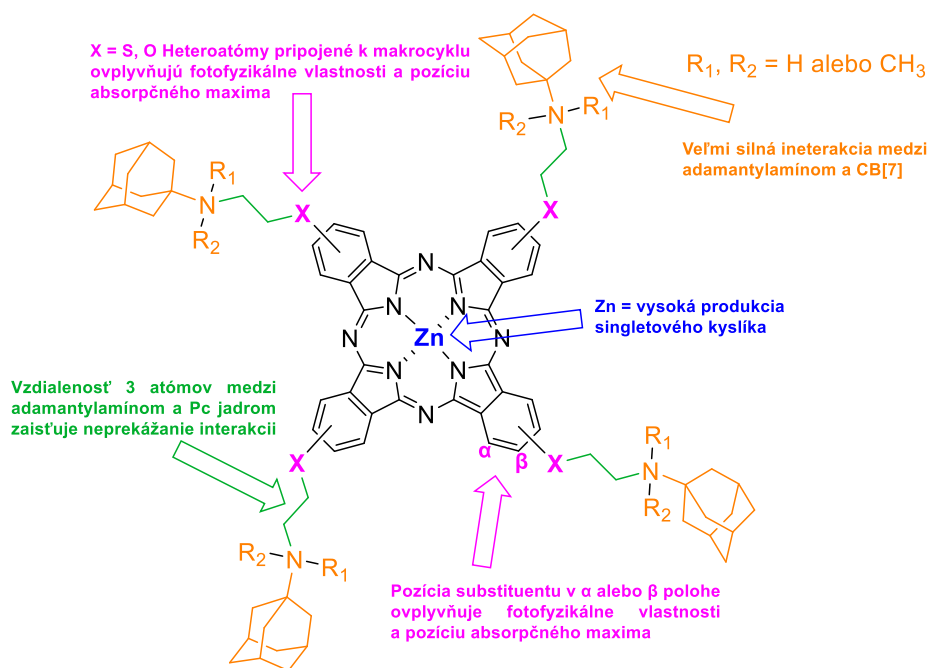
Výsledky tohto projektu boli publikované v recenzovanom časopise s impakt faktorom: Kocisakova L, Rando C, Kozlikova M, Machacek M, Novakova V, Sindelar V, Zimcik P, Monomerization of Phthalocyanines in Water via Their Supramolecular Interactions with Cucurbiturils, *The Journal of Organic Chemistry*, **2023**, 88, 2, 988–1002. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.2c02413>. IF₂₀₂₂ = 3,6, Q1(AIS₂₀₂₂).

Podiely autorov

Lucia Rychvalská nasyntetizovala, vyčistila a charakterizovala všetky látky. Vykonala všetky experimenty štúdia interakcie Pc s CB[7] pomocou absorpčných a fluorescenčných spektier, určila kvantové výťažky fluorescencie a singletového kyslíka, namerala hodnoty log *P*. Taktiež vyhodnocovala niektoré dáta a spolupodielala sa na príprave textu článku. Carola Rando mala na starosti NMR experimenty pri študovaní interakcie ftalonitrilov aj Pc s CB[7]. Magdaléna Kozlíková robila *in vitro* biologické testovanie. Miloslav Macháček sa podieľal na vyhodnocovaní biologických testov a na písaní článku. Veronika Nováková sa podieľala na písaní článku a stanovení produkcie singletového kyslíka fosforescenčnou metódou. Vladimír Šindelář sa podieľal na vyhodnocovaní NMR experimentov a na písaní článku. Petr Zimčík koncipoval projekt, podieľal sa na vyhodnocovaní všetkých dát a predovšetkým na písaní článku.

4.1.1 Návrh štruktúry

Návrh štruktúry pripravovaných Pc bol založený na racionálnom základe a na predchádzajúcich skúsenostiach so syntézou a vlastnosťami Pc (Obrázok 34). Pôvodné Pc mali obsahovať síru ako heteroatóm spájajúci makrocyklus a substituent, keďže síra oproti kyslíku posúva maximum absorpcie k vyšším vlnovým dĺžkam a zvyšuje produkciu singletového kyslíka.¹⁰⁵ Ale po vyše roku a mnohých neúspešných pokusoch na optimalizovanie komplikovanej syntézy s nízkymi výťažkami sme štruktúru Pc čiastočne obmenili a ako heteroatóm sme zvolili kyslík. Substituenty sme naviazali v α alebo β polohe. Ako substituent na periférii makrocyklu sme zvolili aminoadamantyl, pretože spolu s CB[7] tvorí vysoko stabilný komplex s asociačnou konštantou okolo 10^{12} M^{-1} .¹⁰⁵ Aminoadamantyl bol od jadra vzdialený 3 atómy, čím bolo zaistené, aby CB[7] mal dostatok miesta na interakciu. Ako centrálny atóm v makrocykle bol zvolený zinočnatý kation, keďže oproti iným prvkom má vysokú produkciu singletového kyslíka, čo je výhodné pre PDT.



Obrázok 34. Návrh štruktúry Pc.

4.1.2 Syntéza

V rámci syntetickej časti sme pripravili 7 finálnych Pc, ktorým predchádzala syntéza ftalonitrilových prekurzorov. V prvom rade sme sa venovali príprave prekurzorov so sírou ako spojovacím atómom a optimalizácii jeho syntézy, ktorá priniesla mnoho neúspešných pokusov. Následne pre zjednodušenie syntézy sme sa venovali príprave prekurzorom s kyslíkom ako spojovacím atómom. Síce výsledné Pc budú mať maximum absorpcie pri nižších vlnových dĺžkach, ich syntéza ale bude prebiehať s vyšším výťažkom a s nižším počtom syntetických krokov.

4.1.2.1 Syntéza prekurzorov so sírou ako spojovacím heteroatómom

Syntéza týchto prekurzorov (Schéma 13) začala nukleofilnou substitúciou 4-nitroftalonitrilu a 2-merkptoetanolu za tvorby látky **1**. Následne bola hydroxy skupina substituovaná za dobre odstupujúcu funkčnú skupinu. Ako prvá odstupujúca skupina bol zvolený tosylát (látka **2a**), ale výťažok tejto reakcie bol len okolo 27 % (Tabuľka 6), preto sme hľadali iné dobre odstupujúce funkčné skupiny, ktoré by mali vyšší výťažok. Následne bol zvolený mesylát (látka **2b**), ktorého výťažok už bol vyše 70 %, a do tretice bol ešte pripravený iodovaný derivát (látka **2c**), ktorý mal najvyšší výťažok 92 %. Ako poslednú odstupujúcu funkčnú skupinu sme skúsili pripraviť triflát. Táto reakcia ale nebola úspešná, keďže produktom reakcie bola látka **2x**.

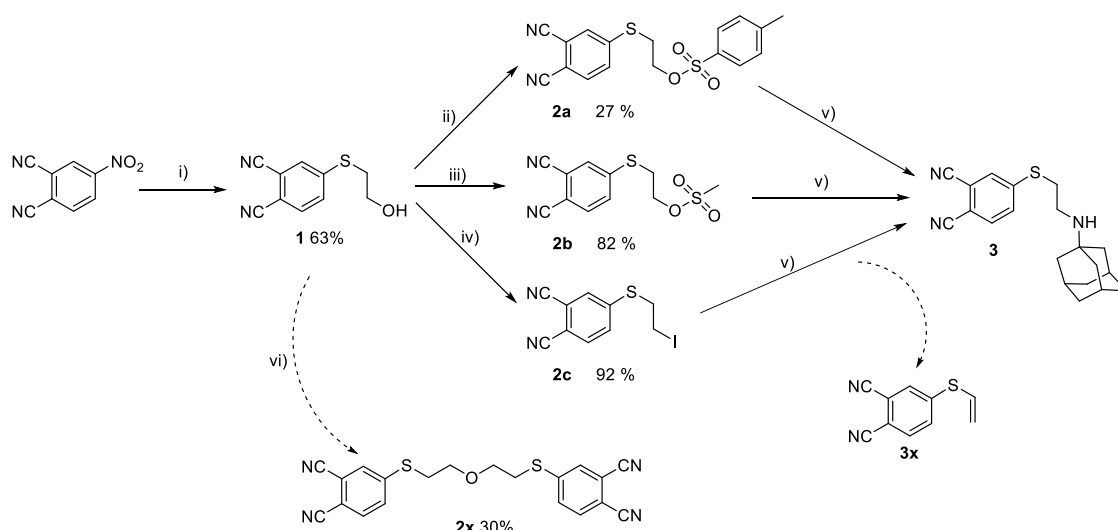


Schéma 13. Syntéza ftalonitrilu so sírou ako spojovacím atómom. Reakčné podmienky: i) 2-merkptoetanol, K_2CO_3 , DMSO, lab. teplota; 24 h; ii) *p*-toluénsulfonyl chlorid, K_2CO_3 , acetón, 60 °C, 2 h, iii) metánsulfonyl chlorid, TEA, DCM, lab. teplota, 1 h; iv) jód, trifenyľfosfín, pyridín, THF, 70 °C 3 h, potom lab. teplota cez noc; v) 1-aminoadamantán, K_2CO_3 , DMF, lab. teplota, 24 h; vi) trifluorometánsulfonyl anhydrid, TEA, -20°C (1 h), potom lab. teplota (cez noc).

Tabuľka 6 Výťažky jednotlivých reakcií

	Odstupujúca skupina	2	3	3x	Celkový výťažok látky 3 z látky 1
a	-Tos	27 %	29 %	51 %	8 %
b	-Mes	82 %	4,5 %	69 %	4 %
c	-I	92 %	16 %	70 %	15 %

Posledným krokom prípravy ftalonitrilu bola nukleofilná substitúcia s 1-aminoadamantánom za vzniku látky **3**. Výťažok tejto reakcie sa pohyboval v závislosti od odstupujúcej funkčnej skupiny v rozmedzí 4,5 – 29 %. Tento nízky výťažok bol spôsobený eliminačným produktom **3x**, ktorý vo všetkých prípadoch dosahoval výťažok nad 50 % (Tabuľka 6). Celkový výťažok látky **3** bol maximálne 15 %, a to v prípade jódu ako odstupujúcej funkčnej skupiny.

V rámci optimalizácie syntézy a minimalizácie eliminačného produktu **3x** sme skúsili rôzne podmienky nukleofilnej substitúcie. Ako východiskovú látku sme použili látku **2c**, keďže práve táto látka poskytovala najviac žiadaného produktu **3**. V Tabuľke 7 sú uvedené podmienky nukleofilnej substitúcie, ktoré sme vyskúšali. Výmena rozpúšťadla za acetonitril nebola úspešná, keďže výťažky látky **3** aj **3x** boli takmer rovnaké. Taktiež sme skúsili reakciu bez 1-aminoadamantánu v DMF s K_2CO_3 , aby sme zistili, či aj v tomto prípade bude prebiehať eliminačná reakcia. V tomto prípade sme taktiež pozorovali tvorbu látky **3x** v podobnom výťažku. Posledným pokusom bola nukleofilná substitúcia bez K_2CO_3 , ale v tomto prípade sa síce znížilo množstvo látky **3x**, ale výrazne sa znížil aj výťažok látky **3**. Pokusy o optimalizáciu syntézy teda boli neúspešné.

Tabuľka 7. Reakčné podmienky optimalizácie syntézy látky 3.

Východisková látka	Rozpúšťadlo	1-aminoadamantán	K ₂ CO ₃	3	3x
2c	acetonitril	✓	✓	14 %	77 %
2c	DMF	x	✓	x	76 %
2c	DMF	✓	x	1,5 %	65 %

Kvôli nízkym výťažkom sme sa snažili nájsť alternatívny postup syntézy prípravy prekursoru so sírou ako spojovacím atómom. Preto sme zvolili opačný postup syntézy a zamerali sme sa na prípravu 2-((adamantan-1-yl)amino)etán-1-tiolu (Schéma 14), ktorý by následne s rôzne substituovaným ftalonitrilom vznikol požadovaný prekursor. Tento prístup ešte navyše umožňuje vyššiu flexibilitu v príprave ftalonitrilov substituovaných v rôznych polohách a do budúca by výrazne zjednodušil návrh nových látok.

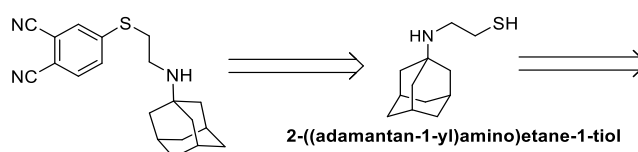


Schéma 14. Alternatívna syntéza prekursoru.

V prvom rade bola pripravená látka 4 reakciou 1-aminoadamantánu a brómacetyl bromidu vo vysokom výťažku vyše 80 %. Následnou redukciou amidu sme sa snažili získať látku 5, v ktorej by sa bróm následne vymenil za tiol (Schéma 15). Najprv sme ako redukčné činidlo použili borán-tetrahydrofuránový komplex, pričom reakcia prebiehala v DCM v argónovej atmosfére. Táto reakcia ale nebola úspešná, keďže na TLC (thin layer chromatography, tenkovrstvová chromatografia) bola predovšetkým len nezreagovaná východisková látka. V druhom prípade sme skúsili použiť LiAlH₄ ako redukčné činidlo, bohužiaľ ani táto reakcia nebola úspešná. Látku 5 sme sa snažili pripraviť ešte iným spôsobom z 1-aminoadamantánu reakciou s dibrometánom. Táto reakcia tiež nebola úspešná a na TLC bola viditeľná opäť len nezreagovaná východisková látka. Keďže redukcia amidu nebola úspešná, pokúšali sme sa najprv substituovať bróm za tiol a redukcia by nasledovala až v ďalšom kroku. Táto reakcia s tiomočovinou (Schéma 15) taktiež nebola úspešná.

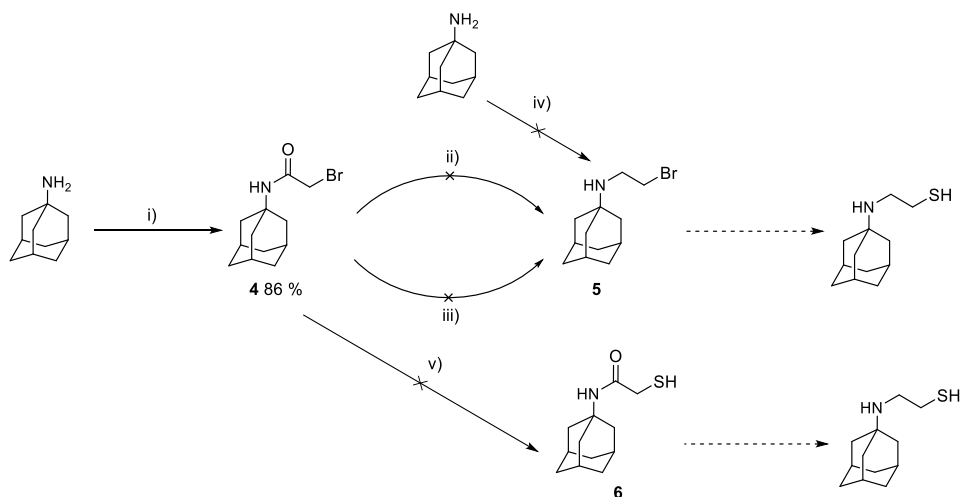


Schéma 15. Reakčné podmienky: i) brómocetyl bromid, bezvodý dichlórmetán, TEA, lab. teplota, 24 h, ii) borán-tetrahydrofuránový komplex, THF, 60 °C, 24 h, iii) LiAlH₄, bezvodý THF, lab. teplota, 24 h, iv) dibrómetán, K₂CO₃, DMF, lab. teplota, 24 h, v) tiomočovina, EtOH, 80 °C, 15 h.

Keďže predchádzajúce syntetické reakcie nevedli k žiadanému produktu, zvolili sme inú syntetickú cestu. Reakciu chlóracetaldehydu a sulfidu sodného sme pripravili látku **7** v dobrom výťažku (Schéma 16). Následnou reakciou s 1-aminoadamantánom sme pomocou redukčnej aminácie chceli pripraviť látku **8**. Ako redukčné činidlo bol použitý kyanobórohydrid sodný. Keďže samotný NaCNBH₃ nebol účinný, v ďalších pokusoch sme použili ZnCl₂, prípadne izopropoxid titaničitý ako Lewisovu kyselinu¹⁰⁶ na zvýšenie účinnosti reakcie. Ani jeden z použitých spôsobov redukčnej aminácie nefungoval, keďže podľa TLC nevznikla požadovaná látka **8**.

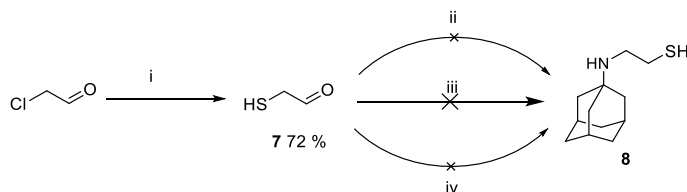


Schéma 16. Reakčné podmienky: i) NaSH, voda, 0 °C, 30 min, ii) 1-aminoadamantán, NaCNBH₃, MeOH, lab. teplota, 24 h, iii) 1-aminoadamantán, NaCNBH₃, ZnCl₂, MeOH, lab. teplota, 24 h, iv) 1-aminoadamantán, izopropoxid titaničitý, NaCNBH₃, MeOH, 100 °C 24 h, potom lab. teplota 24 h.

Ako ďalšiu syntetickú cestu sme si zvolili ochránenie tiolovej skupiny 2-merkptoetanolu pomocou dimetoxytřitylu (Schéma 17). Tento krok fungoval v dobrom výťažku okolo 75 %. Následne sme hydroxy skupinu chceli substituovať dobre odstupujúcou funkčnou skupinou. Keďže pri syntéze látky **3** sa nám osvedčil jód a tosylát ako dobre odstupujúce funkčné skupiny, použili sme ich aj v tomto prípade. Ani jedna reakcia nebola úspešná a látky **10** a **11** sa nepodarilo pripraviť. K ďalším krokom, ako je substitúcia 1-aminoadamantánu za jód/tosylát a následnému ochráneniu tiolovej funkčnej skupiny, už nedošlo (Schéma 17).

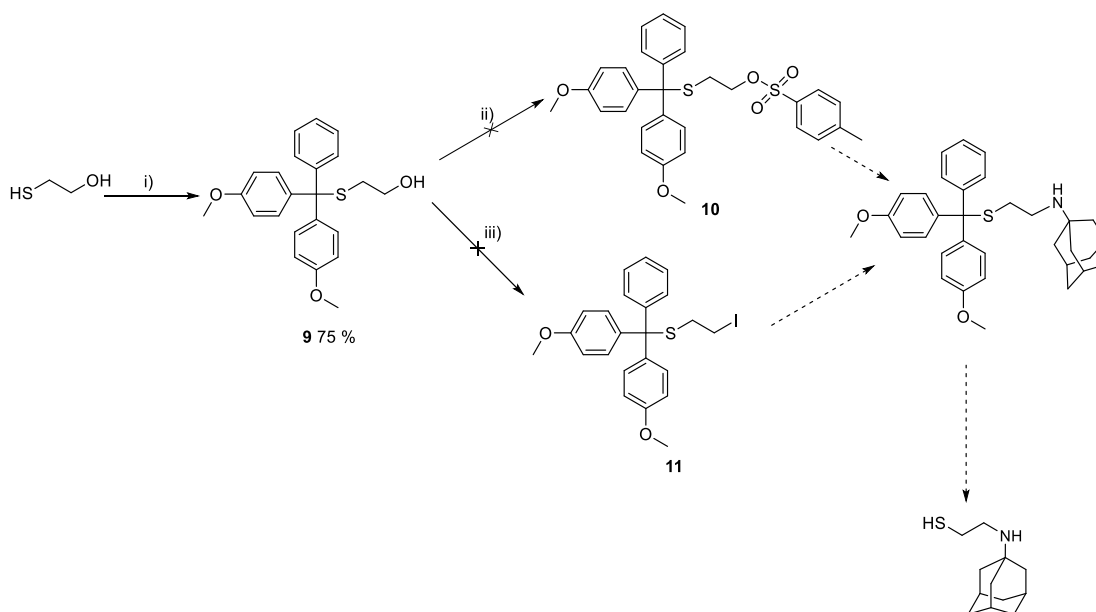


Schéma 17 Reakčné podmienky: i) 4,4'-dimetoxytrityl chlorid, TEA, THF, lab. teplota, 2 h, ii) p-toluénsulfonyl chlorid, K_2CO_3 , acetón, 60 °C, 24 h, iii) jód, trifenylofosfin, pyridín, THF, 75 °C 3 h, potom lab. teplota 20 h.

Ako ďalší spôsob prípravy 2-((adamantan-1-yl)amino)etán-1-tiolu sme zvolili ako prvú prípravu látky **12** a jej následnú substitúciu hydroxy skupiny za tiolovú funkčnú skupinu (Schéma 18). Príprava látky **12** prebiehala vo vysokých výťažkoch takmer 90 %. Následnou reakciou s tiooctovou kyselinou bola pripravená látka **13**. Jej redukcia na látku **15** už ale bola neúspešná, aj keď sme skúšali rôzne redukčné činidlá. Z látky **12** sme ešte pripravili látku **14**, pričom sme znova použili tosylát ako odstupujúcu funkčnú skupinu. Jej reakcia so sulfidom sodným už ale znova nebola úspešná. Látku **15** sme ďalej skúšali pripraviť úplne iným spôsobom, a to reakciou 1-aminoadamantánu s trojčlenným cyklom etylénsulfidu (thiiranu), kde malo dôjsť k otvoreniu jeho cyklu spolu so substitúciou amínu. Táto reakcia ale taktiež nevyšla, na TLC bola len východisková látka 1-aminoadamantán.

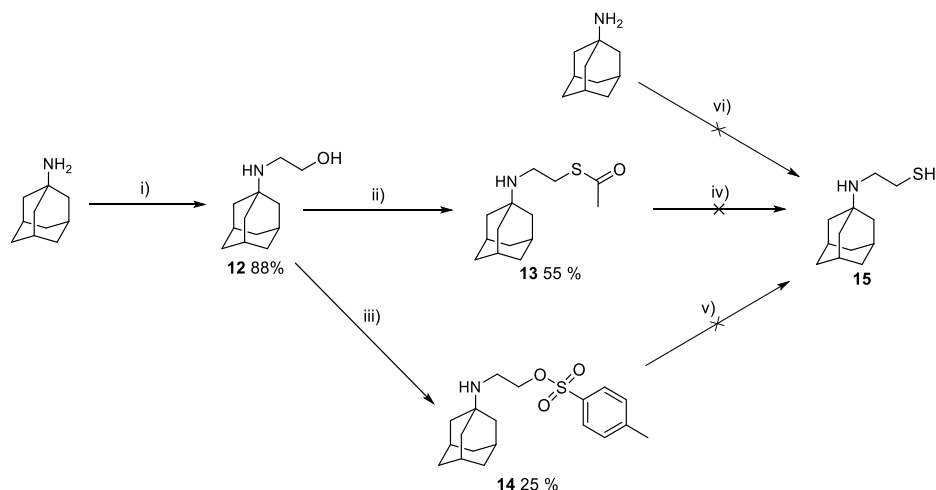


Schéma 18. Reakčné podmienky: i) 2-brómetanol, benzonitril, 120 °C, 2 h, ii) trifenylofosfin, diizopropylazodicarboxylát, kyselina tiooctová, DMF, 0 °C 1 h, potom lab. teplota 3 h, iii) p-toluénsulfonyl chlorid, pyridín, lab. teplota, 15 h, iv) NaOH/ K_2CO_3 , MeOH, lab. teplota, 20 h, v) NaSH, DTT, DMF, 80 °C 2 h, potom lab. teplota 24 h, vi) etylénsulfid, benzén, 80 °C, 5 h.

4.1.2.2 Syntéza prekursorov s kyslíkom ako spojovacím heteroatómom

Keďže optimalizácia syntézy prekursorov so sírou ako spojovacím heteroatómom nebola úspešná a mali sme zatiaľ len jeden precursor, rozhodli sme sa pripraviť ftalonitrilové precursory s kyslíkom ako spojovacím heteroatómom.

Syntéza týchto prekursorov vychádzala z látky **12**, ktorá bola metylovaná na terciárny amín pomocou Eschweiler-Clarkeovej metylácie s kyselinou mravčou a formaldehydom (Schéma 19) za tvorby látky **16**. Tento typ metylácie má výhodu v tom, že prebieha maximálne do tvorby terciárneho amínu a tvorba kvartérnej amóniovej soli už nie je možná. Nasledovali nukleofilné substitučné reakcie so substituovaným ftalonitrilom a uhličitanom draselným v DMF. Reakciou látok **12** a **16** so 4-nitroftalonitrilom vznikli precursory **17** a **18**, ktoré boli substituované v polohe 4. Vyšší výtazok 55 % nukleofilnej substitúcie sme pozorovali pri reakcii látky **12**, teda sekundárneho amínu, na rozdiel od terciárneho amínu, kde bol výtazok len 31 %. Reakciou látok **12** a **16** s 3-nitroftalonitrilom vznikali precursory **19** a **20**, ktoré boli substituované v polohe 3. Vyšší výtazok reakcie sme mohli opäť pozorovať u sekundárneho amínu (Schéma 19). Všetky tieto reakcie prebiehali v bežnej kyslíkovej atmosfére a bez striktné bezvodých podmienok, pričom keď sme skúšali použiť bezvodé podmienky (bezvodý DMF a argónovú atmosféru), výtazok reakcií bol približne rovnaký a nezvýšil sa.

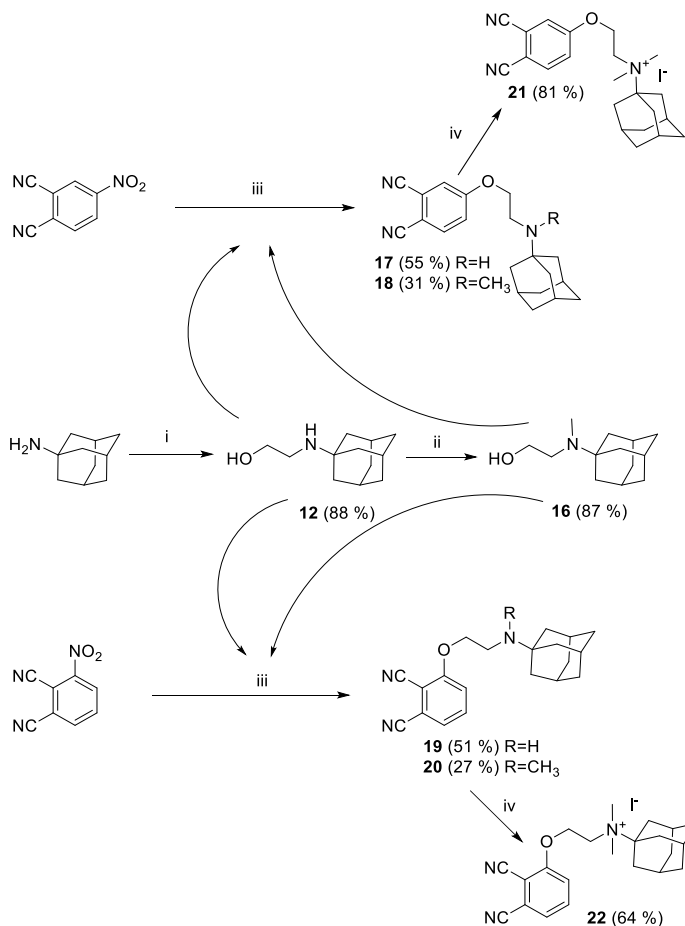


Schéma 19. Reakčné podmienky: i) 2-brómetanol, benzonitril, 120 °C, 2 h, ii) 84% kyselina mravčia, 37% formaldehyd, MeOH, 70 °C, 24 h, iii) K₂CO₃, DMF, lab. teplota, 24 h, iv) metyljodid, lab. teplota, 24 h.

Reakciou látok **18** a **20** s metyljodidom sme získali kvarternizované látky **21**, respektíve **22** (Schéma 19). Táto reakcia prebiehala za laboratórnej teploty bez ďalšieho rozpúšťadla, pričom výtazok reakcií bol uspokojivý, približne 60 – 80 %.

4.1.2.3 Syntéza ftalocyanínov

Cyklotetramerizácia Pc prebiehala templátovou alebo Linsteadovou metódou (Schéma 20).

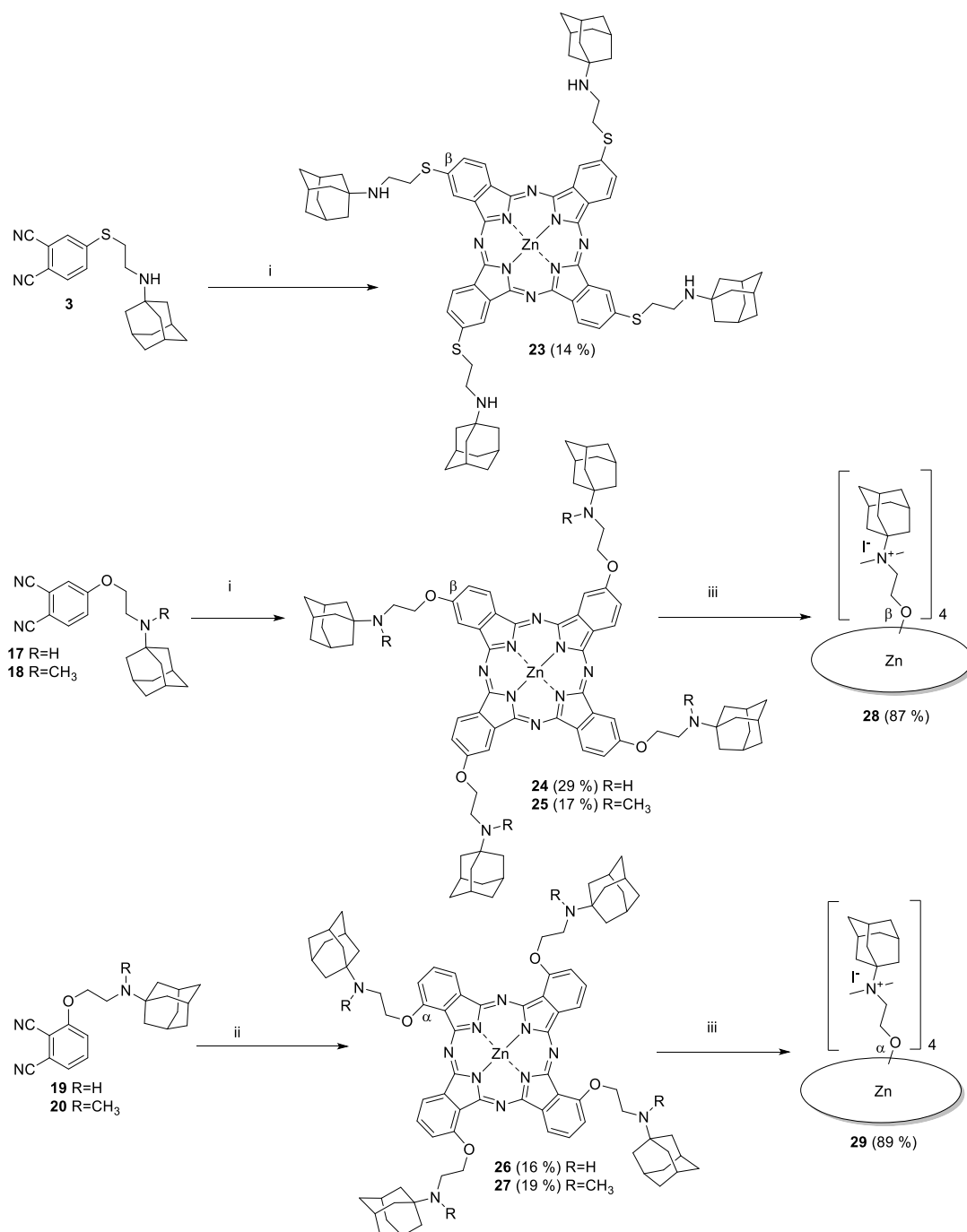
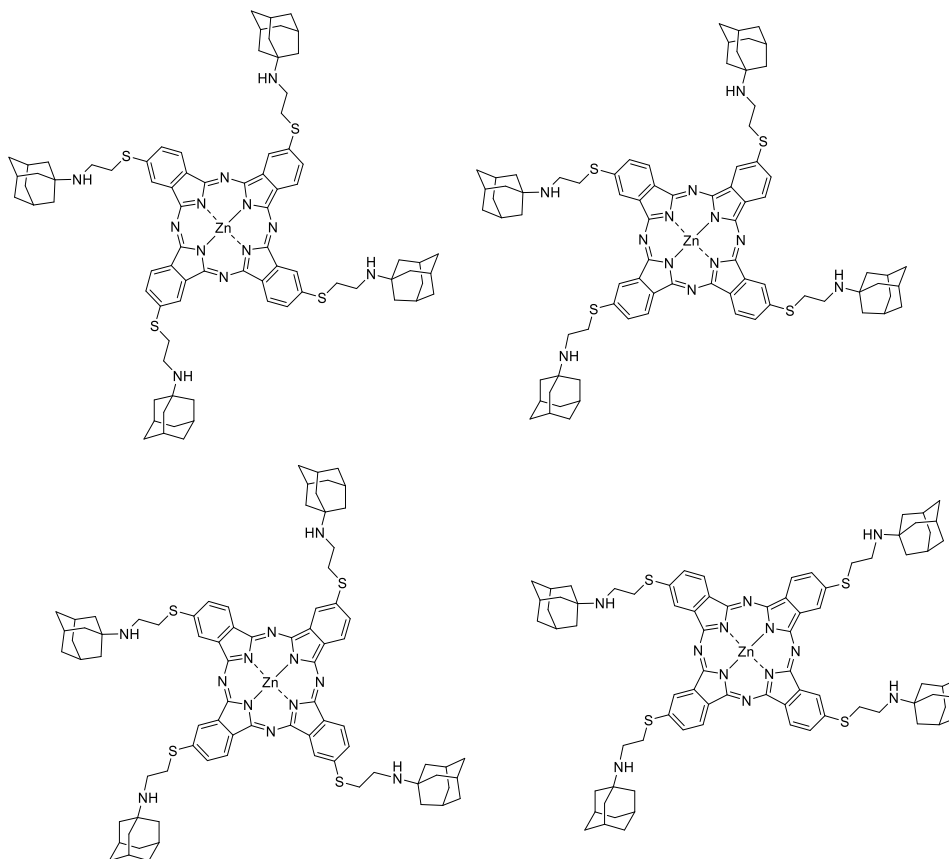


Schéma 20. Reakčné podmienky: i) $Zn(CH_3COO)_2$, pyridín, $120\text{ }^\circ\text{C}$, 24 h, ii) Li, butanol $120\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h, $Zn(CH_3COO)_2$, $120\text{ }^\circ\text{C}$, 24 h, iii) metyljodid, N-metylpyrolidón, lab. teplota, 7 dní.

Pri syntéze látok **23**, **24** a **25** (všetko to boli ftalonitrily substituované v polohe 4) bola využitá templátová metóda pomocou bezvodého octanu zinočnatého v prostredí pyridínu. Výťažok reakcií nebol veľmi vysoký, ale pri týchto cyklotetramerizačných reakciách je to typické. Pri príprave Pc substituovaných v α polohe, teda látok **26** a **27**, bolo nutné použiť Lindsteadovu metódu, ktorá je založená na použití butanolátu lítneho ako iniciátora reakcie. Lítne ióny sú

následne chelátované centrálne, ale nie sú pevne viazané v cykle a takmer okamžite sú z makrocyklu odstránené aj veľmi mierne kyslými rozpúšťadlami, ako napríklad voda. Tento bezkovový Pc nebol izolovaný a hneď bol do reakčnej zmesi vložený octan zinočnatý, vďaka ktorému sme získali finálne zinočnaté Pc. U týchto látok **26** a **27** bola vyskúšaná najprv templátova metóda, ktorá nám ale neposkytla požadovaný cyklotetramerizačný produkt.

Všetky výsledné Pc mali 4 substituenty, preto vznikali počas cyklotetramerizácie polohové izoméry (Obrázok 35), ktoré aj napriek tomu, že separácia polohových izomérov je v niektorých prípadoch publikovaná,^{56, 107} v našom prípade ich nebolo možné ani detekovať, nie to ešte aj od seba oddeliť, a preto boli ďalej používané ako zmes týchto izomérov.



Obrázok. 35 Polohové izoméry Pc.

Látky **23**, **24**, **25**, **26** a **27** boli kvôli lepšej rozpustnosti v polárnych rozpúšťadlách prevedené do formy hydrochloridu pomocou koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej.

Posledným krokom syntézy bola tvorba kvartérnych amóniových solí ftalocyanínov. Za použitia metyljodidu boli za 7 dní získané látky **28** a **29**. Reakcia trvala preto tak dlho, aby sme mali istotu, že došlo ku kvantitatívnej alkylácii látok obsahujúcich štyri aminoskupiny, keďže následné čistenie kvartérnych produktov pomocou stĺpcovej chromatografie už nebolo možné. Východiskovými látkami pre kvarternizáciu boli Pc s terciárnymi amínmi, teda látky **25** a **27**.

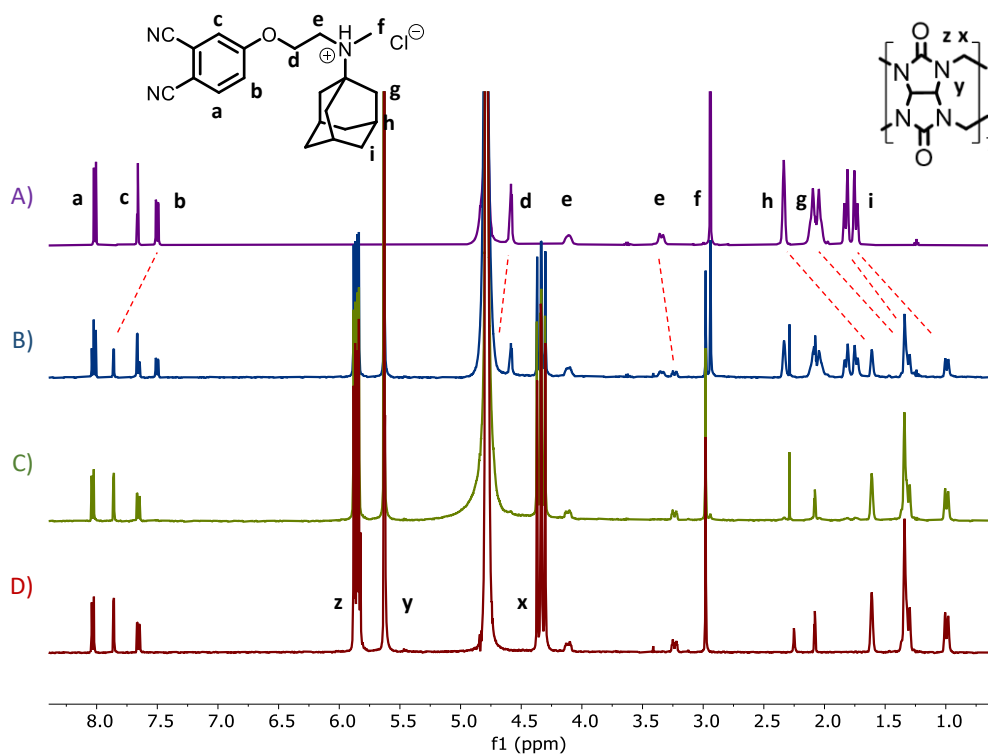
4.1.3 Štúdium interakcie s CB[7]

Interakciu s CB[7] sme študovali nielen na finálnych ftalocyanínoch, ale aj na ich ftalonitrilových prekurzoroch. Vďaka spolupráci s výskumnou skupinou prof. Šindelára z Masarykovej univerzity v Brne sme interakciu sledovali pomocou NMR titrácií a následne už v našej výskumnej skupine pomocou UV-vis a fluorescenčnej spektroskopie.

4.1.3.1 Štúdium interakcie ftalonitrilov s CB[7]

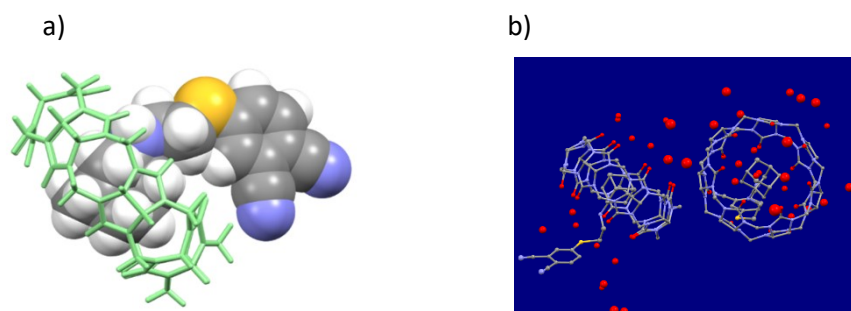
Vďaka svojej hydrofóbnej dutine a hydrofilným karbonylovým portálom dokážu CB[7] ochotne viazať malé organické kationné molekuly. V našom prípade ide o 1-aminoadamantán ako substituent na ftalonitrilovom jadre. Keďže pre interakciu je dôležitá kladne nabitá molekula hostá, interakcia bola sledovaná na látkach **3**, **17**, **18**, **19** a **20** vo forme hydrochloridu. Kvartérne amóniové soli **21** a **22** boli taktiež testované na túto interakciu. Všetky látky v tejto forme boli dobre rozpustné vo vode. Štúdium interakcie prebiehalo pomocou ^1H NMR (Obrázok 36) a postupným pridávaním CB[7] boli sledované zmeny na NMR spektre. Ako rozpúšťadlo bola použitá D_2O spolu s pufrom deuterovaného octanu sodného.

Všetky ftalonitrilové prekurzory vykazovali rovnaké zmeny po pridaní CB[7]. Pre ilustráciu je na Obrázku 36A uvedený NMR zápis látky **18·HCl**. Po pridaní 0,5 ekvivalentu CB[7] (Obrázok 36B) sme na spektre videli dva sety signálov, pričom jeden set patril voľnému hostovi a druhý set signálov patril komplexovanému hostovi v CB[7]. Signály vodíkov (a, b, c) aromatického cyklu sa po pridaní CB[7] posunú do oblasti slabého poľa (downfield shift). Naopak signály vodíkov (g, h, i) adamantánu sa posunú po pridaní CB[7] do oblasti silného poľa (upfield shift). Po pridaní jedného ekvivalentu CB[7] (Obrázok 36C) signály voľného hostá zmizli a po pridaní nadbytku CB[7] (Obrázok 36D) sa spektrum už nijako nemenilo a signály sa už neposúvali. To znamená, že látka **18·HCl** (a rovnako aj všetky ostatné ftalonitrilové prekurzory) tvoria komplex s CB[7] v stechiometrii 1 : 1.



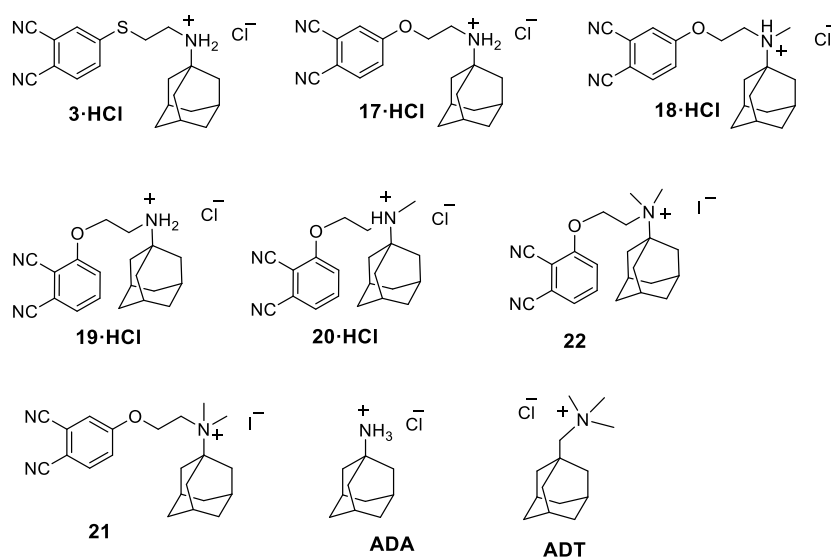
Obrázok 36. ^1H NMR spektrum (500 MHz, 50 mM CD_3COONa v D_2O , $\text{pD} = 4,74$, $30\text{ }^\circ\text{C}$) A) látka **18·HCl**, B) prídavok 0,5 ekvivalentu CB[7], C) 1 ekvivalent CB[7], D) 1,5 ekvivalentu CB[7].

Tieto zmeny na NMR spektrách sú v súlade s počítačovým modelom látky **3** a CB[7] (Obrázok 37a), kde adamantylová časť je umiestnená v hydrofóbnej dutine CB[7] a zvyšok molekuly je orientovaný mimo CB[7]. V jednom prípade sa nám podarilo vypestovať aj kryštál komplexu látky **3** a CB[7], pričom jeho kryštalografická štruktúra potvrdila orientáciu molekuly tak ako ju navrhol počítačový model (Obrázok 37b).



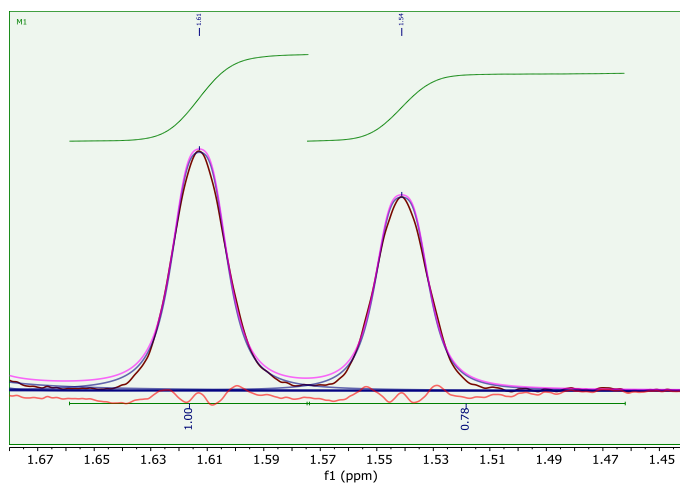
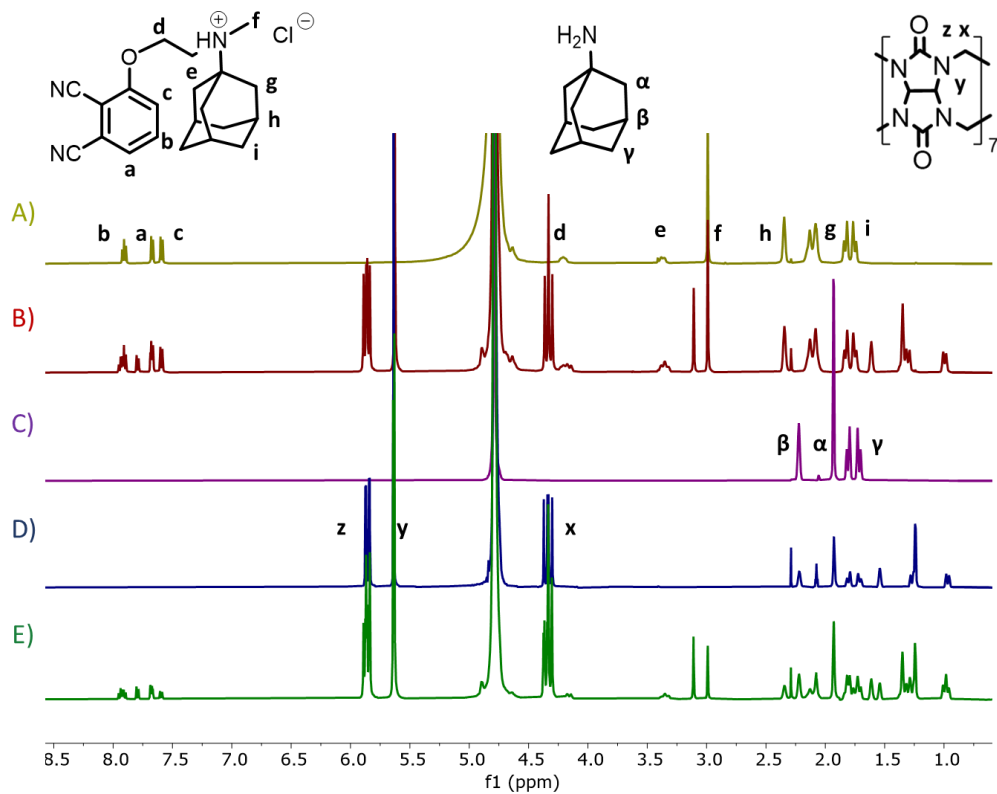
Obrázok 37 a) počítačový model komplexu látky **3** a CB[7], b) kryštalografická štruktúra komplexu látky **3** a CB[7]

Pre všetky látky **3·HCl**, **17·HCl**, **18·HCl**, **19·HCl**, **20·HCl**, **21** a **22** (Obrázok 38) bola stanovená aj asociačná konštanta (K_a) komplexu s CB[7].



Obrázok 38. Štruktúry študovaných ftalonitrilov a konkurenčných látok (ADA, ADT).

Asociačnú konštantu nebolo možné určiť priamo z ^1H NMR ako ekvimolárny pomer hostiteľa a hosťa, keďže v spektre neboli viditeľné signály voľného ftalonitrilu. Preto sme použili kompetitívne ^1H NMR experimenty (Obrázok 39) pridaním konkurenčnej látky a daného ftalonitrilového hosťa k roztoku CB[7]. Konkurenčné látky boli vybrané podľa toho, aby mali podobnú afinitu k CB[7] ako naše študované látky. Pre látky **3·HCl**, **17·HCl** a **18·HCl** bol ako konkurenčná látka použitý 1-adamantyl(trimetyl)amónium (ADT), a pre látky **19·HCl**, **20·HCl**, **21** a **22** bol použitý 1-adamantylamín (ADA). ADT bolo použité preto, lebo signály komplexu CB[7]·ADA sa u niektorých látok prelínali so signálmi komplexu CB[7]·ftalonitril. Asociačná konštanta K_a ($4,23 \pm 1$) $\times 10^{12}$ M^{-1} komplexu CB[7]·ADA už bola publikovaná.¹⁰⁴ Pre komplex CB[7]·ADT bola asociačná konštanta určená pomocou kompetitívneho experimentu s CB[7]·ADA a bola stanovená na hodnotu ($8,5 \pm 2$) $\times 10^{12}$ M^{-1} . Všetky látky tvoria s CB[7] vysoko stabilné komplexy (Tabuľka 8) s asociačnou konštantou v rozmedzí $1,0 \times 10^{12}$ až $3,7 \times 10^{13}$ M^{-1} . Najstabilnejšie komplexy s CB[7] tvorili látky **19·HCl** a **17·HCl**. Keďže ide o sekundárne amíny, adamantylová časť je prístupnejšia dutine CB[7]. Pri porovnávaní kyslíkového a sírového spojovacieho atómu sme zistili, že látka **3·HCl**, ktorá má ako spojovací atóm síru, má rádovo nižšiu asociačnú konštantu ako látka **17·HCl**, ktorá má ako spojovací atóm kyslík.



Obrázok 39. Horná časť: ^1H NMR spektrá (500 MHz, 50 mM NaO_2CCD_3 pufrovaná D_2O (pD 4,74) 30 °C) A) látky **20·HCl** (0,6 mM), B) látky **20·HCl** (0,6 mM) s 0,5 ekvivalentom CB[7] C) ADA, D) ADA s 0,5 ekvivalentom CB[7], E) zmes 1 ekvivalentu CB[7] a 1,2 ekvivalentu látky **20·HCl** a ADA. Spodná časť: priblíženie časti spektra E, ktorá zobrazuje signály h komplexu CB[7]·látky **20·HCl** (1,61 ppm) a signálu β komplexu CB[7]·ADA (1,54 ppm).

Tabuľka 8. Asociačné konštanty K_a (M^{-1}) interakcie ftalonitrilov a CB[7].^a

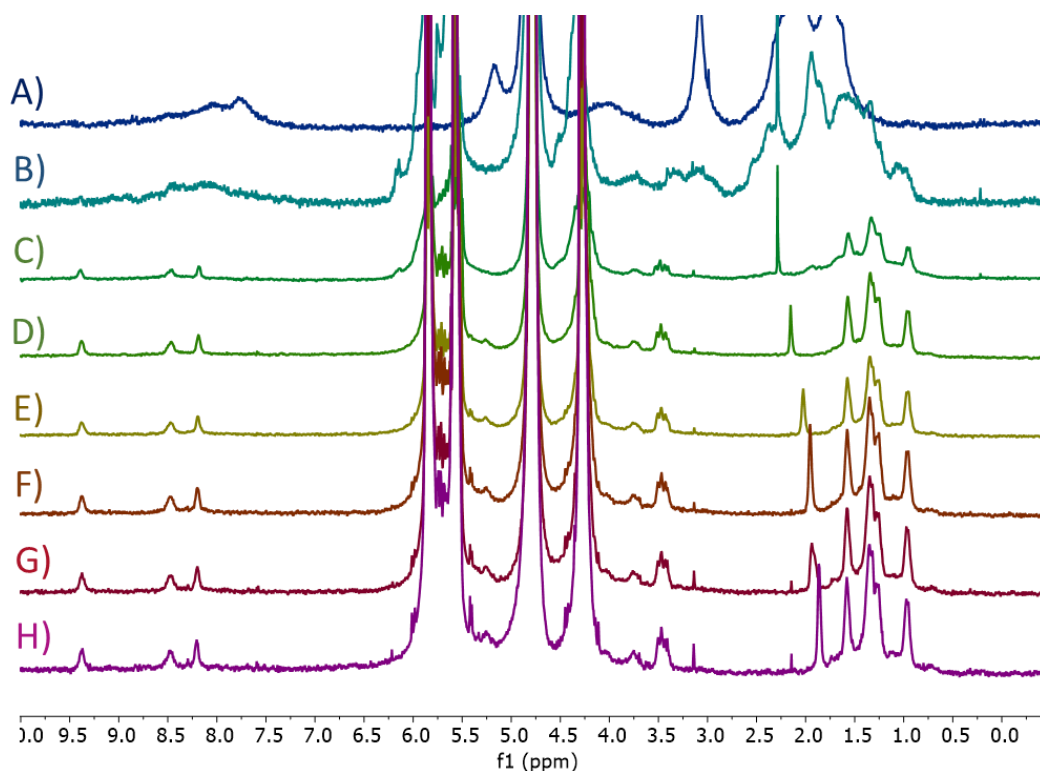
spojovací atóm	alkylačný stupeň	3-substitúcia	4-substitúcia
S	-N ⁺ (H) ₂ -		$(3,4 \pm 0,8) \times 10^{12}$ (3·HCl) ^c
O	-N ⁺ (H) ₂ -	$(2,1 \pm 0,5) \times 10^{13}$ (19·HCl) ^c	$(3,7 \pm 0,9) \times 10^{13}$ (17·HCl) ^c
O	-N ⁺ (H)CH ₃ -	$(7,0 \pm 1,8) \times 10^{12}$ (20·HCl) ^b	$(1,0 \pm 0,2) \times 10^{12}$ (18·HCl) ^b
O	-N ⁺ (CH ₃) ₂ -	$(4,7 \pm 1,1) \times 10^{12}$ (22) ^b	$(2,0 \pm 0,5) \times 10^{13}$ (21) ^b

^a Experimenty robené pomocou kompetitívneho ¹H NMR v 50 mM CD₃COONa v D₂O, pD = 4,74. ^b ADA ako konkurenčná látka [$K_a = (4,23 \pm) \times 10^{12} M^{-1}$]. ^c ADT ako konkurenčná látka [$K_a = (8,5 \pm 2) \times 10^{12} M^{-1}$]. Hodnoty reprezentujú priemer minimálne dvoch nezávislých meraní.

4.1.3.2 Štúdium interakcie ftalocyanínov s CB[7]

4.1.3.2.1 NMR metóda

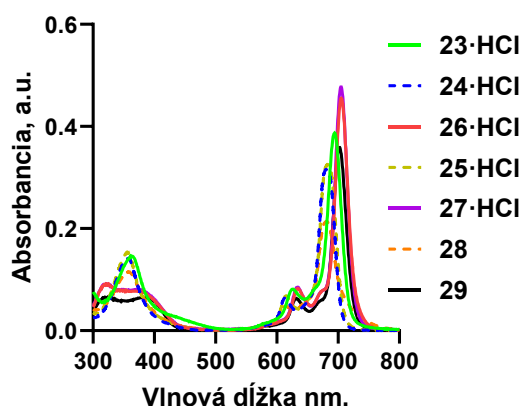
Podobne ako u ftalonitrilových prekursorov boli sledované interakcie s CB[7] aj u Pc vo forme hydrochloridov pomocou ¹H NMR. Ako príklad sú na Obrázku 40 uvedené NMR spektrá látky **26·HCl**, kde vidíme, že látka je v D₂O agregovaná, pretože na spektre vidíme široké signály, ktoré naznačujú agregáciu Pc. Po pridaní CB[7] vidíme, že signály sú ostrejšie už dokonca len pri jednom ekvivalente CB[7]. Okrem zostrenia signálov po pridaní CB[7] sme ešte pozorovali aj posun signálov vodíkov metylových skupín smerom do oblasti silného poľa (upfield shift). Preto môžeme skonštatovať, že rovnako ako u ftalonitrilových prekursorov aj u Pc je aminoadamantylová časť vo vnútri CB[7] a zvyšok molekuly je mimo CB[7]. Keďže bola látka **26·HCl** vo vode agregovaná, nebolo možné kvantitatívne určiť interakciu hostiteľ-hosť.



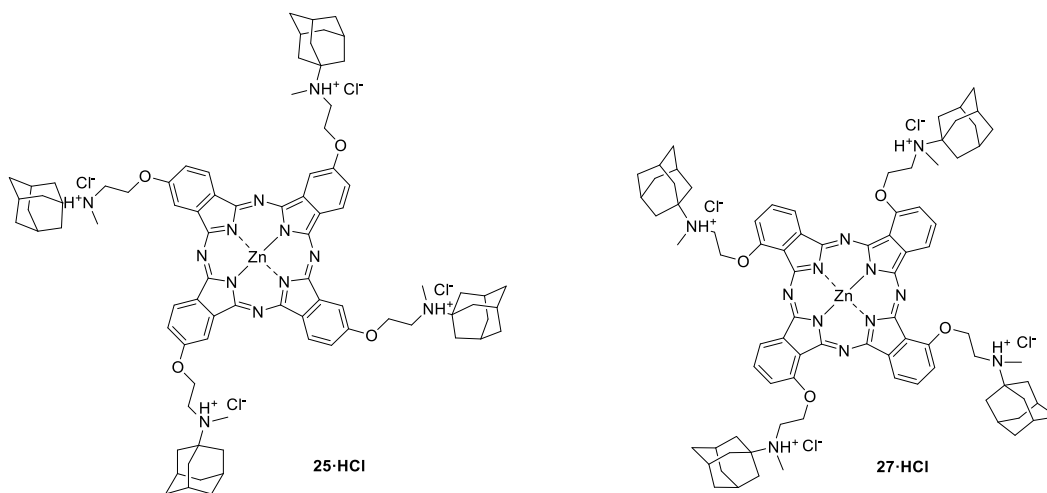
Obrázok 40. ¹H NMR spektrá (500 MHz, D₂O, 30 °C) A) látky **26·HCl** v prítomnosti B) 0,5 ekvivalentu CB[7], C) 1 ekvivalentu, D) 2 ekvivalentov, E) 3 ekvivalentov, F) 4 ekvivalentov, G) ekvivalentov, H) 6 ekvivalentov CB[7].

4.1.3.2.2 UV-vis a fluorescenčná spektroskopia

Absorpčné spektrá v DMSO sú u všetkých Pc monomérene, čo sa vyznačuje výrazným ostrým Q-pásom v oblasti 680 – 710 nm (Obrázok 41). Na druhej strane vo vode je Q-pás absorpčného spektra široký, čo znamená, že látky sú agregované. Ide o H-typ agregácie, ktorá je spôsobená π - π interakciou makrocyclických jadier. Pri postupnom pridávaní CB[7] dochádzalo k čiastočnej monomerizácii látok. Najviac viditeľné zmeny boli pri látkach **25·HCl** a **27·HCl** (substituované v β respektíve α polohe), preto budú podrobnejšie opísané zmeny na spektrách týchto 2 látok (Obrázok 42).



Obrázok 41. Absorpčné spektrá skúmaných Pc v DMSO.



Obrázok 42. Štruktúry vybraných Pc.

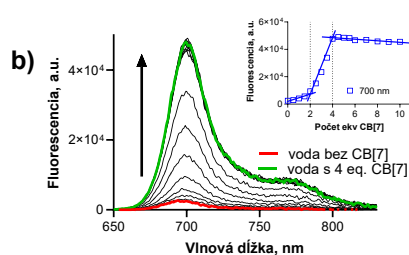
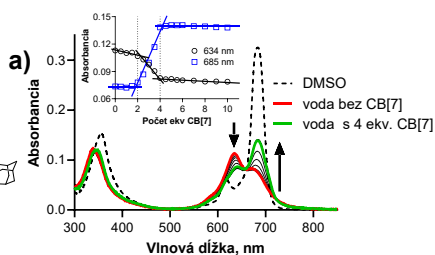
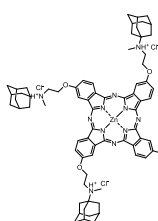
Vo vode sú naše látky agregované a okrem širokého Q-pásu je možné pozorovať aj posun absorpčného maxima (Obrázok 43a, c) do nižších vlnových dĺžok (634 a 655 nm pre látky **25·HCl**, resp. **27·HCl**) a nízku hodnotu emisie fluorescencie (Obrázok 43b, d). Po pridaní CB[7] dochádza k interakcii medzi aminoadamantylovými substituentmi Pc a CB[7] a celý komplex je oveľa objemnejší, pričom obidve tieto vlastnosti vyvolávajú monomerizáciu Pc vo vode. Pozorujeme to zvýšenou fluorescenciou a taktiež zvýšením absorpcie Q-pásu a posun jeho maxima k vyšším vlnovým dĺžkam (685 a 706 nm pre látku **25·HCl**, resp. **27·HCl**).

Proces monomerizácie má 2 fázy ako môžeme vidieť na inzerte obrázka 43a, b, keďže tieto zmeny sú lepšie ilustrované na látke **25·HCl**. Do pridaní 2 ekvivalentov CB[7] vidíme len minimálne zmeny absorpcie a fluorescencie. Následne po pridaní 2 až 4 ekvivalentov CB[7] už

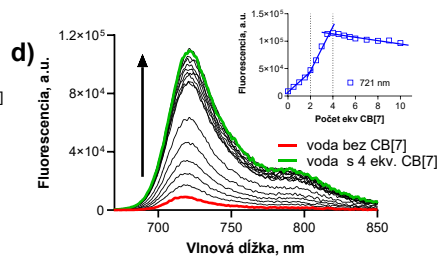
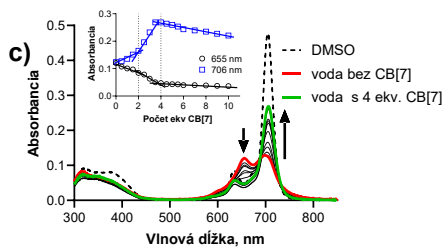
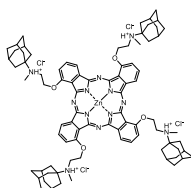
vidíme výrazné zmeny a vysoký nárast absorpcie a fluorescence. Po pridaní 4 ekvivalentov mali absorpčné spektrá (predovšetkým u látky **27·HCl**) porovnateľný tvar ako mali monomérne spektrá v DMSO. Po pridaní ďalšieho množstva CB[7] už neboli pozorované žiadne ďalšie zmeny.

Z výsledkov je zrejmé, že predovšetkým u β substituovaných Pc, 2 molekuly CB[7] nie sú dostatočné, aby došlo k monomerizácii. Je to preto, že substituenty v β polohe sú flexibilnejšie, a preto sú potrebné 4 molekuly CB[7], aby došlo k výraznejšej monomerizácii. V prípade α substituovaných Pc sú substituenty orientované bližšie k makrocyklu a musia byť orientované smerom hore a dole od makrocyklu. Tým je obmedzená ich flexibilita, a preto je monomerizácia α substituovaných Pc vyššia aj pri nižšom pomere Pc : CB[7].

25·HCl

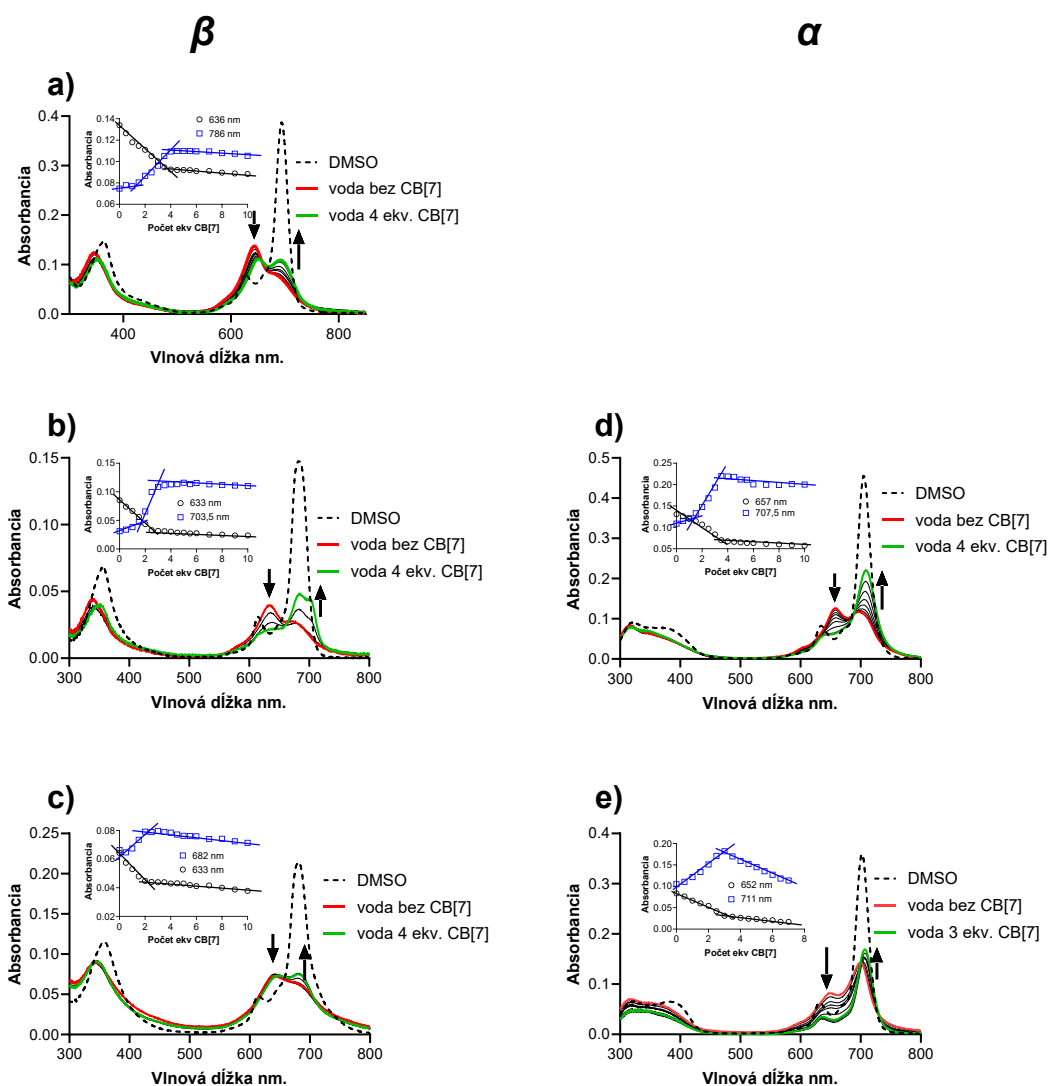


27·HCl



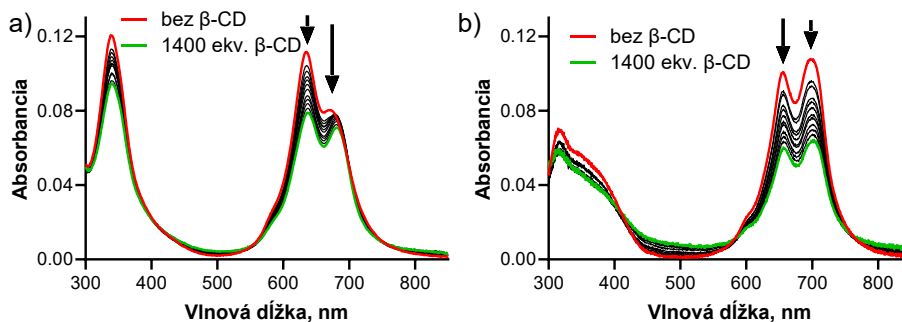
Obrázok 43. Zmeny absorpčných (a, c) a emisných (b, d) spektier ($\lambda_{exc} = 640 \text{ nm}$) látok **25·HCl** a **27·HCl**.

Ostatné Pc sa chovali podobne ako vyššie spomínané látky, a to tak, že β substituované Pc **23·HCl**, **24·HCl** a **28** boli vo vode viac agregované ako α substituované látky **26·HCl** a **29**. U α substituovaných Pc malo absorpčné spektrum po pridaní CB[7] podobný tvar ako spektrum v DMSO, v ktorom sú Pc monomérne (Obrázok 44). U β substituovaných Pc nebol až tak výrazný rozdiel v monomerizácii v porovnaní s α substituovanými Pc a taktiež sa u nich absorpčné spektrum väčšinou nemenilo už po 2 – 3 ekvivalentoch CB[7] (predovšetkým pri látkach **24·HCl** a **28**).



Obrázok 44. Absorpčné spektrá Pc vo vode a po pridání CB[7] pre látky a) 23-HCl, b) 24-HCl, c) 28, d) 26-HCl, e) 29.

Medzi ďalšie hostiteľské molekuly, ktoré tvoria komplex s 1-aminoadamantánom patria aj cyklodextríny (CD), pričom ako najsilnejšia interakcia je uvedená interakcia s β -CD (K_a je $5\ 150\ \text{M}^{-1}$).¹⁰⁸ CD sú taktiež vysoko polárne molekuly, ktoré sa takisto používajú na zvýšenie rozpustnosti hostčovských molekúl. Chceli sme porovnať, či aj CD spôsobujú monomerizáciu Pc tak ako CB. Na štúdium boli použité len látky 25-HCl a 27-HCl. V tomto prípade sme ale nevideli žiadne zmeny v monomerizácii Pc ani po prídavku 1400 ekvivalentov β -CD (Obrázok 45). Tvar spektier sa nemenil a k znižovaniu absorpcie dochádzalo len kvôli zriedeniu vzorky. Ak dochádza ku komplexácii Pc s CD, tak to nemá vplyv na monomerizáciu Pc v nami študovaných a použitých koncentráciách.



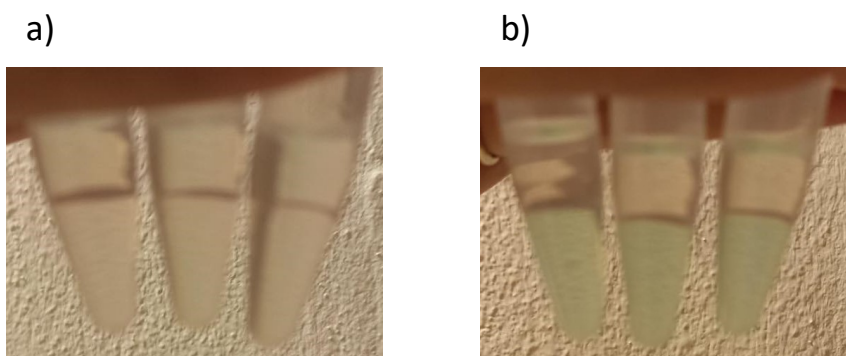
Obrázok 45. Zmeny absorpčných spektier a) β substituovanej látky **25·HCl** a b) α substituovanej látky **27·HCl** vo vode po postupnom pridávaní β -CD.

4.1.3.2.3 Určenie $\log P$

Okrem monomerizácie Pc pomocou CB[7] vo vode vytvorením komplexu by malo dochádzať aj k zvýšeniu hydrofility molekuly. To sme chceli dokázať zmeraním a porovnaním $\log P$ samotného Pc a následne Pc-CB komplexu. Experimentálnym určením rozdeľovacieho koeficientu v oktanolovej a vodnej vrstve sme vyjadrili ako $\log P$ (Tabuľka 9), sme dokázali, že po vytvorení komplexu Pc-CB sa rozpustnosť vo vode jednoznačne zvýšila. Pc bez CB[7] sa nachádzali predovšetkým v oktanolovej vrstve, prípadne bolo ich rozloženie približne rovnaké v oktanolovej aj vodnej vrstve. Po interakcii s CB[7] boli všetky Pc vo vodnej fáze, čo sa prejavilo zápornými hodnotami $\log P$, pričom to bolo viditeľné aj voľným okom (Obrázok 46).

Tabuľka 9. Namerané hodnoty $\log P$.

Látka	substitúcia	$\log P$	
		Pc	Pc+CB[7]
23·HCl	βS , -NH-	0,08	-0,35
24·HCl	βO , -NH-	0,00	-0,37
25·HCl	βO , -NCH ₃ -	0,10	-0,63
26·HCl	αO , -NH-	0,17	-0,54
27·HCl	αO , -NCH ₃ -	-0,01	-0,62
28	βO , -N ⁺ (CH ₃) ₂ -	0,58	-0,01
29	αO , -N ⁺ (CH ₃) ₂ -	0,31	-0,69



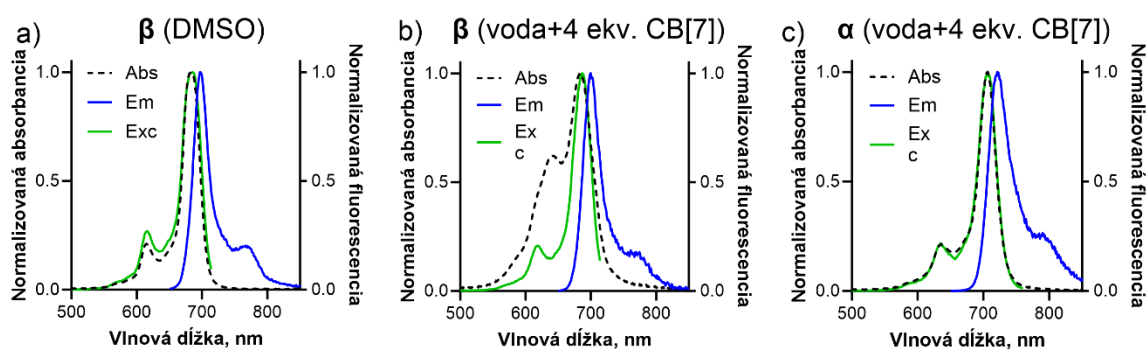
Obrázok 46. Rozloženie v oktanole a vode a) samotný Pc, b) Pc-CB[7] komplex.

4.1.3.2.4 Fotofyzikálne parametre Pc

Fotofyzikálne parametre, ako vlnová dĺžka absorpcie, fluorescencia a kvantové výťažky singletového kyslíka fluorescencie, sú užitočnými parametrami charakterizácie úrovne agregácie aj ako základná charakteristika každého PS.

Absorpčné spektrá všetkých študovaných Pc (vo forme hydrochloridov) boli v DMSO monomérmé (Obrázok 41), keďže sa vyznačovali ostrým Q-pásom, ktorý je charakteristický pre monomérmé Pc. Pozícia maxima Q-pásmu odrážala štruktúrne znaky Pc, ako je poloha substituentu a spojovací heteroatóm. Pc substituované v polohe β a s kyslíkom ako spojovacím heteroatómom (**24·HCl**, **25·HCl** a **28**) mali maximum absorpcie okolo 682 nm. Na druhej strane Pc substituované v α polohe a rovnako s kyslíkom ako spojovacím heteroatómom (**26·HCl**, **27·HCl** a **29**) mali posunuté absorpčné maximum do červenej oblasti okolo 704 nm (Tabuľka 10). V prítomnosti síry ako spojovacieho heteroatómu (β substitúcia, látka **23·HCl**) dochádzalo k miernemu posunu maxima absorpcie do oblasti 695 nm.

Fluorescenčné emisné spektrá v DMSO boli zrkadlovým obrazom absorpčných spektrier s malým Stokesovým posunom (okolo 14 nm), ktorý je typický pre Pc (Obrázok 47a). Fluorescenčné excitačné spektrá v DMSO kopírovali absorpčné spektrá, čo taktiež potvrdzuje úplnú monomerizáciu Pc v DMSO.



Obrázok 47. Normalizované absorpčné (čierna čiarkovaná), emisné (modré) a excitačné (zelené) spektrá β substituovaného Pc **25·HCl** a) v DMSO alebo b) vo vode so 4 ekvivalentami CB[7], c) α substituovaný Pc **27·HCl** vo vode so 4 ekvivalentami CB[7].

Kvantové výťažky fluorescencie Φ_F v DMSO dosahovali u všetkých Pc hodnoty viac ako 0,20, pričom u β substituovaných Pc boli kvantové výťažky fluorescencie vyššie (okolo 0,30) v porovnaní s α substituovanými Pc (Tabuľka 10). Všetky Pc vykazovali vysoké kvantové výťažky singletového kyslíka $\Phi_\Delta > 0,50$, čo znamená, že naše látky majú dobré predpoklady stať sa vhodnými kandidátmi na PS v PDT. V praxi sú ale podstatnejšie ich vlastnosti vo vode, aby mohli účinkovať na bunkách.

Tabuľka 10. Fotofyzikálne parametre študovaných Pc.

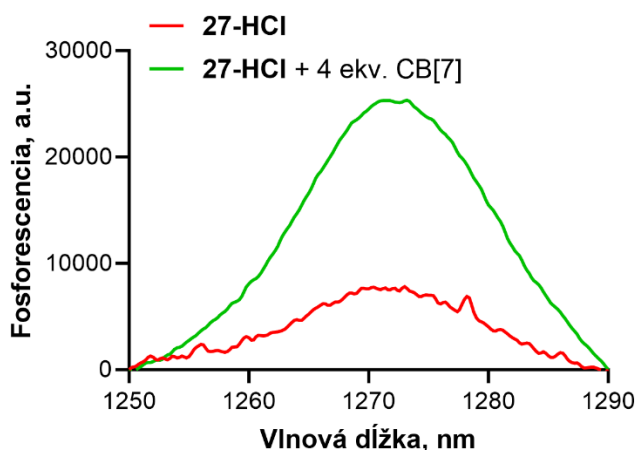
Látka	substitúcia	λ_A (nm)	λ_F (nm)	Φ_F DMSO	Φ_{Δ} DMSO	Φ_F voda	nárast Φ_F vo vode ^a
23·HCl	$\beta S, -NH-$	695	708	0,17	0,60	0,0003	7,5
24·HCl	$\beta O, -NH-$	681	696	0,31	0,63	0,0022	13
25·HCl	$\beta O, -NCH_3-$	683	697	0,30	0,51	0,0017	27
26·HCl	$\alpha O, -NH-$	705	718	0,19	0,58	0,0031	28
27·HCl	$\alpha O, -NCH_3-$	705	718	0,20	0,51	0,0144	10
28	$\beta O, -N^+(CH_3)_2-$	682	693	0,23	0,51	0,0012	14
29	$\alpha O, -N^+(CH_3)_2-$	702	717	0,22	0,65	0,0222	3

^aNárast Φ_F vo vode znamená nárast fluorescence po pridaní CB[7]

Ako bolo spomínané vyššie v kapitole 4.1.3.2.2, absorpčné spektrá všetkých Pc vo vode sa vyznačujú širokým Q-pásom a jeho posunom k nižším vlnovým dĺžkam, čo znamená prítomnosť H-agregátov (Obrázok 43 a 44 červené spektrá). Nízka emisia fluorescence sa prejavuje nízkymi kvantovými výťažkami fluorescence Φ_F vo vode (Tabuľka 10). Intenzita fluorescence sa po pridaní 4 ekvivalentov CB[7] niekoľkonásobne zvýšila, vo väčšine prípadov viac ako o jeden rád (Tabuľka 10 – nárast Φ_F vo vode), pretože dochádzalo k čiastočnej monomerizácii Pc (Obrázok 43 zelené spektrá).

Excitačné spektrá látok **25·HCl** a **27·HCl** vo vode odhalili rozdiel v agregácii β a α substituovaných Pc. V prípade β substituovanej látky **25·HCl** sa absorpčné spektrum vo vode po pridaní 4 ekvivalentov CB[7] neprekrýva s excitačným spektrom látky (Obrázok 47b) a pri 634 nm dochádza k vyššej absorpcii. Aj keď je táto absorpcia oveľa nižšia ako u samotného Pc bez CB[7], tvar spektra znamená, že ani 4 molekuly CB[7] nestačia na monomerizáciu Pc, ktorý stále ostáva čiastočne agregovaný. Na druhej strane u α substituovanej látky **27·HCl** dochádza k úplnému prekrytiu excitačného a absorpčného spektra vo vode (Obrázok 47c) po pridaní CB[7]. To potvrdzuje, že substituenty v tejto polohe sú nútene orientované smerom hore a dole od makrocyklu, čím sa po pridaní CB[7] úplne minimalizuje agregácia Pc.

Aby sme ešte viac potvrdili zlepšenie fotofyzikálnych vlastností Pc po pridaní CB[7], skúmali sme produkciu singletového kyslíka v D₂O okyslenej pomocou DCI. Singletový kyslík je najdôležitejšou molekulou vo fotodynamicknej terapii, ktorá spôsobuje smrť buniek. Preto je jeho produkcia veľmi dôležitá. Produkcia singletového kyslíka v D₂O bola sledovaná monitorovaním jeho fosforescencie pri 1270 nm, ktorá je pre molekulu singletového kyslíka typická. Po pridaní 4 ekvivalentov CB[7] sme pozorovali približne trojnásobný nárast fosforescencie u látky **27·HCl** (Obrázok 48), čo znamená, že aj tvorba singletového kyslíka je po interakcii Pc-CB[7] zvýšená.



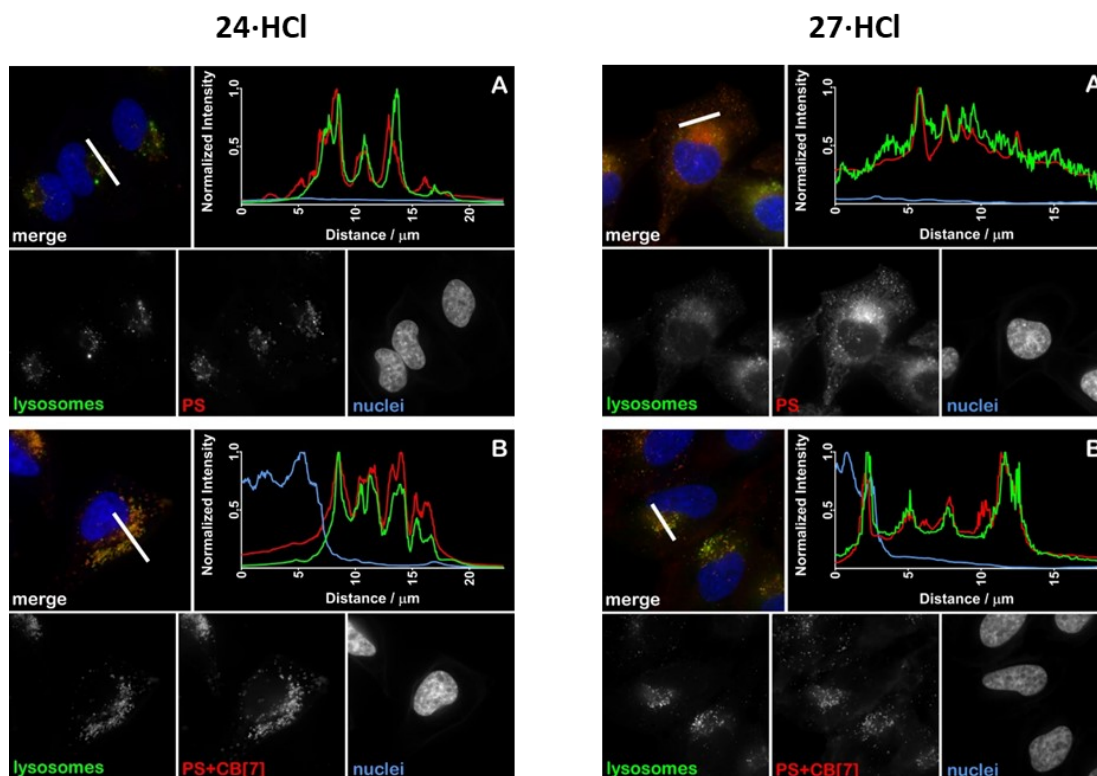
Obrázok 48. Fosforescencia singletového kyslíka v D_2O produkovaného po excitácii látky **27-HCl** samostatne (červená) alebo po pridaní 4 ekvivalentov CB[7] (zelená).

4.1.4 *In vitro* biologické hodnotenie

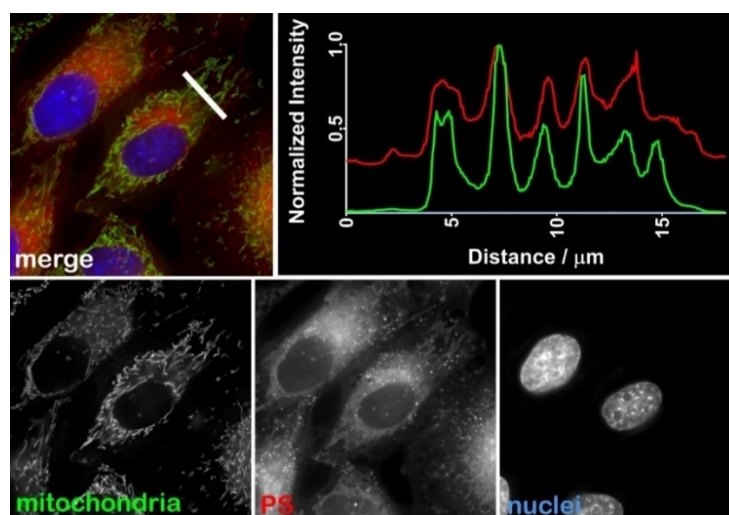
Keďže predchádzajúce experimenty nám ukázali výrazne zlepšenie fotofyzikálnych vlastností, ďalším krokom štúdia našich látok bolo ich *in vitro* testovanie na fotodynamickú aktivitu.

4.1.4.1 Subcelulárna lokalizácia

V prvom rade sme pozorovali subcelulárnu lokalizáciu našich Pc (vo forme hydrochloridov) na rakovinových bunkách krčka maternice (HeLa). Pomocou špecifického značenia organel sme určili, že všetky Pc sa lokalizujú predovšetkým v lyzozómoch. To znamená, že pri fotodynamickej aktivácii sú primárnym cieľom práve lyzozómy. Takisto aj Pc-CB[7] komplex bol u všetkých študovaných látok lokalizovaný predovšetkým v lyzozómoch. Nepozorovali sme teda rozdiel lokalizácie samotného Pc a Pc-CB[7] komplexu. Pre ilustráciu je na Obrázku 49 zobrazená lokalizácia látok **24-HCl** a **27-HCl**. V časti A sú HeLa bunky inkubované len so samotným Pc a v časti B sú s Pc a 4 ekvivalentmi CB[7]. Jediným rozdielom bola lokalizácia látok **26-HCl** a **27-HCl** (ide o α substituované Pc). Obe tieto látky boli lokalizované v lyzozómoch, ale čiastočne boli viditeľné signály vychádzajúce z perinukleárneho priestoru (Obrázok 49 vpravo) ďalej od jadra, ktoré boli následným pokusom potvrdené ako mitochondrie (Obrázok 50). Tieto 2 látky sú lokalizované teda okrem lyzozómov aj v mitochondriách.



Obrázok 49. Subcelulárna lokalizácia vľavo pre látku **24-HCl** a vpravo pre látku **27-HCl** (červená) v HeLa bunkách pomocou fluorescenčného zobrazovania. HeLa bunky boli inkubované s Pc (A) alebo s Pc a 4 ekvivalentmi CB[7] (B) so značením pre lyzozómy (zelené) a jadro (modré). Biela čiara znázorňuje časť, ktorá bola použitá na určenie intenzity lokalizácie a predstavuje 24 μm alebo 18 μm (pre látku **24-HCl**, resp. **27-HCl**).



Obrázok 50. Subcelulárna lokalizácia látky **27-HCl** (červená) v HeLa bunkách pomocou fluorescenčného zobrazovania. HeLa bunky boli inkubované s Pc a značenie pre mitochondrie (zelené) a jadro (modré). Biela čiara znázorňuje časť, ktorá bola použitá na určenie intenzity lokalizácie a predstavuje 18 μm .

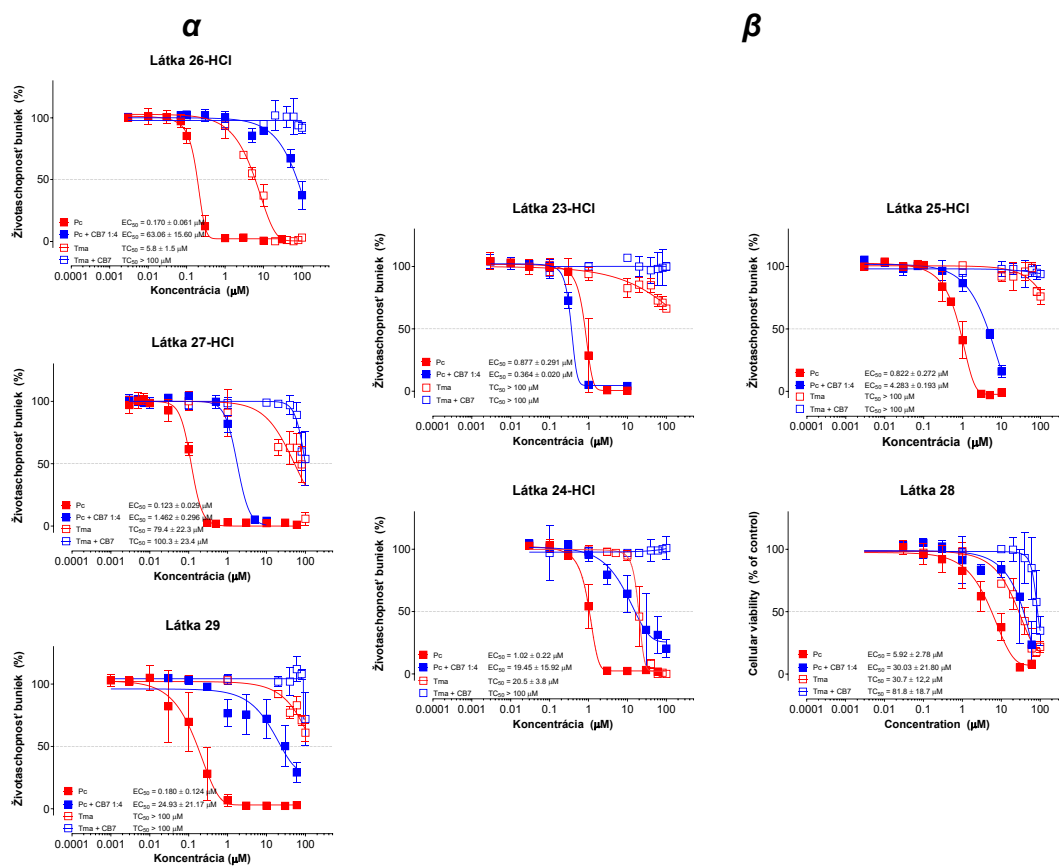
4.1.4.2 Fotodynamická aktivita

Následne boli všetky Pc testované aj na fotodynamickú aktivitu, ktorá bola vyjadrená ako koncentrácia vyvolávajúca 50% efekt (EC_{50}) a taktiež boli testované na toxicitu bez ožiarenia, ktorá bola vyjadrená ako koncentrácia spôsobujúca 50% toxicitu („dark toxicita“, TC_{50}) na dvoch bunkových líniiach, a to bunkových líniiach rakovinových buniek krčka maternice (HeLa)

a bunkových líníách ľudského melanómu (SK-MEL-28). Všetky látky vykazovali po ožiarovaní veľmi dobré hodnoty fotodynamickej aktivity EC_{50} v mikromolárnych koncentráciách (okolo 1 – 5 μM). U najúčinnnejšej látky **27·HCl** boli tieto hodnoty EC_{50} dokonca v nanomolárnej koncentrácii (Tabuľka 11), 46 nM pre HeLa bunky a 123 nM pre SK-MEL-28. Aktivita medzi rôznymi bunkovými líniami sa príliš nelíšila, len u látok **25·HCl**, **27·HCl**, **28** a **29** bola trochu lepšia aktivita voči SK-MEL-28 bunkám. Čo sa týka štruktúry Pc, pozorovali sme niekoľkonásobne vyššiu aktivitu α substituovaných látok **26·HCl**, **27·HCl** a **29** v porovnaní s ich korešpondujúcimi β derivátmi (Obrázok 51). Naše namerané hodnoty sú porovnateľné s podobnými Pc substituovanými alkylsulfanylovými substituentmi s kvartérnymi amóniovými skupinami a dokonca lepšie ako sulfonovaný hydroxyhlinitý Pc [$S_3\text{AlOHPC}$; $EC_{50}(\text{HeLa}) = 2,07 \pm 0,29 \mu\text{M}$],¹⁰⁹ ktorý je schválený k klinickému použitiu v Rusku.

Tabuľka 11. Hodnoty EC_{50} so štandardnou odchýlkou. Podmienky ožiarovania: $\lambda > 570 \text{ nm}$, $12,4 \text{ mW cm}^{-2}$, 15 min , $11,2 \text{ J cm}^{-2}$. Každý experiment bol robený 4 krát.

Látka	substitúcia	EC_{50} HeLa (μM)		EC_{50} SK-MEL-28 (μM)	
		Pc	Pc+CB[7]	Pc	Pc+CB[7]
23·HCl	βS , -NH-	$0,89 \pm 0,29$	$0,36 \pm 0,02$	$0,87 \pm 0,57$	$0,39 \pm 0,01$
24·HCl	βO , -NH-	$1,02 \pm 0,22$	$19,5 \pm 15,9$	$1,08 \pm 0,16$	$24,7 \pm 19,2$
25·HCl	βO , -NCH ₃ -	$0,82 \pm 0,27$	$4,28 \pm 0,19$	$0,18 \pm 0,06$	$22,1 \pm 9,4$
26·HCl	αO , -NH-	$0,17 \pm 0,06$	$63,1 \pm 15,6$	$0,12 \pm 0,02$	$14,2 \pm 4,65$
27·HCl	αO , -NCH ₃ -	$0,12 \pm 0,03$	$1,46 \pm 0,30$	$0,046 \pm 0,02$	$1,58 \pm 0,33$
28	βO , -N ⁺ (CH ₃) ₂ -	$5,92 \pm 2,78$	$30,0 \pm 21,8$	$1,04 \pm 0,43$	$22,6 \pm 25,6$
29	αO , -N ⁺ (CH ₃) ₂ -	$0,18 \pm 0,12$	$24,9 \pm 21,2$	$0,072 \pm 0,038$	$8,02 \pm 1,74$



Obrázok 51. Fototoxicita (plné symboly) a toxicita v tme (prázne symboly) voči HeLa bunkám, ktoré boli inkubované len s Pc (červené) alebo s Pc + 4 ekv. CB[7] (modré).

Všetky látky vykazovali bez ožiarenia nízku toxicitu TC₅₀ na HeLa bunkách v rozsahu okolo 20 – 80 µM (Tabuľka 12). V prípade látok **23-HCl**, **25-HCl** a **29** boli dokonca hodnoty TC₅₀ ešte vyššie ako 100 µM (Obrázok 51). Vyššie koncentrácie sme už nemohli testovať, keďže v experimentoch bolo ako pomocné rozpúšťadlo aj DMSO, ktoré má vo vyšších koncentráciách už aj vlastnú toxicitu na bunky. Po pridaní CB[7] už pri takmer všetkých látkach nebolo možné určiť hodnoty TC₅₀, keďže boli vyššie ako 100 µM. Výnimkou bola látka **28**, ktorej TC₅₀ bola 81,1 ± 18,7 µM.

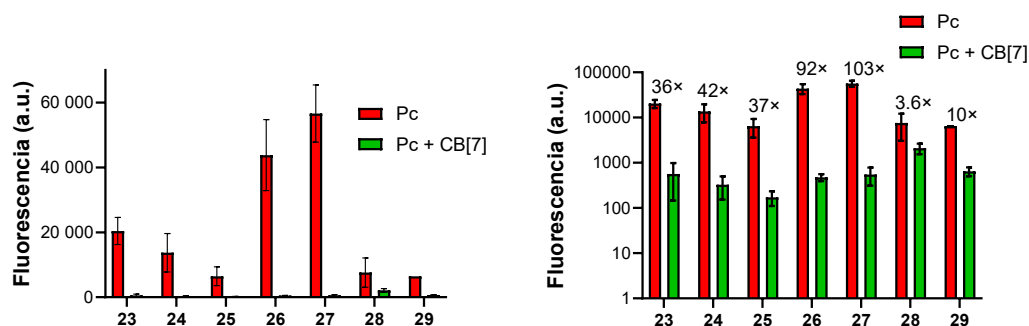
Tabuľka 12. Hodnoty TC₅₀ toxicity bez ožiarenia pre študované Pc na HeLa buňkách. Podmienky ožiarovania: λ > 570 nm, 12,4 mW cm⁻², 15 min, 11,2 J cm⁻².

Látka	substitúcia	TC ₅₀ HeLa (µM)	
		Pc	Pc+CB[7]
23-HCl	βS, -NH-	>100	>100
24-HCl	βO, -NH-	20,5 ± 3,8	>100
25-HCl	βO, -NCH ₃ -	>100	>100
26-HCl	αO, -NH-	5,8 ± 1,5	>100
27-HCl	αO, -NCH ₃ -	79,4 ± 22,3	100,3 ± 23,4
28	βO, -N ⁺ (CH ₃) ₂ -	30,7 ± 12,2	81,8 ± 18,7
29	αO, -N ⁺ (CH ₃) ₂ -	>100	>100

Toxicita samotného CB[7] už bola v minulosti stanovená, jej hodnota IC_{50} bola $0,53 \pm 0,02$ mM na CHO-K1 bunkách (bunky vaječníkov samičky čínskeho škrečka).¹¹⁰ Z toho vyplýva, že CB[7] má veľmi nízku toxicitu a v používaných koncentráciách na fotodynamickú aktivitu je prakticky netoxický. V našom prípade ani nebolo možné určiť toxicitu CB[7] na HeLa bunkách, pretože ani pri použití 1mM koncentrácie nebolo zaznamenané žiadne zníženie životaschopnosti buniek.

Po pridaní 4 ekvivalentov CB[7] k našim Pc došlo nečakane k výrazne zníženej fotodynamickej aktivite na oboch bunkových líniiach (Tabuľka 11). K zníženiu aktivity došlo takmer u všetkých látok 10-násobne (v prípade látky **26·HCl** bolo zníženie aktivity až 100-násobné). Jedinou výnimkou vo fotodynamickej aktivite bola látka **23·HCl** (látka so sírou ako spojovacím heteroatómom). V tomto prípade dochádzalo po pridaní CB[7] k mierne zvýšenej fotodynamickej aktivite na oboch bunkových líniiach.

Zníženie fotodynamickej aktivity bolo nečakané, pretože predchádzajúce výsledky naznačovali zvýšenú monomerizáciu Pc vo vode po komplexácii s CB[7]. Spolu s tým sme očakávali aj zvýšenú fotodynamickú aktivitu, ku ktorej ale nedošlo, práve naopak, došlo k zníženiu aktivity. Preto sme ďalej viac skúmali ako veľmi Pc vstupujú do buniek pomocou intenzity fluorescence v lýzovaných HeLa bunkách. Tieto bunky boli 12 h inkubované s Pc o koncentrácii 1 μ M a následným odstránením a premytím nenaviazaného Pc. Z výsledných hodnôt je zrejmé, že bunky inkubované s Pc a 4 ekvivalentmi CB[7] vykazovali niekoľkonásobne nižšiu hodnotu fluorescence voči samotným Pc (Obrázok 52). Je to pravdepodobne preto, že komplex Pc-CB[7] je už veľmi veľký a hydrofilný, a preto je jeho prestup do buniek veľmi obmedzený. Preto napriek zlepšeným fotofyzikálnym vlastnostiam a zvýšeniu monomerizácie Pc vo vode, dochádza k výrazne zníženej fotodynamickej aktivite.



Obrázok 52. Intenzita fluorescence HeLa buniek inkubovaných Pc. Na grafe vpravo je osa y v logaritmickom formáte a čísla nad stĺpcami znamenajú koľkokrát je prechod do buniek nižší u Pc-CB[7] komplexu voči Pc, vypočítané podľa vzorca $F_{(Pc)}/F_{(Pc+4 eq. CB[7])}$.

4.1.5 Záver

Tvorba supramolekulárneho komplexu Pc-CB[7] síce výrazne zlepšilo fotofyzikálne vlastnosti Pc vo vode, ale tento komplex je už príliš veľký a hydrofilný na vstup do buniek. Preto táto cesta monomerizácie Pc nie je vhodná, ak výsledné Pc majú byť použité v PDT. Tento postup by ale mohol byť vhodný, ak by boli použité len 1 alebo 2 molekuly CB[7], ako napríklad u amfifilného Pc typu A₃B, kde by boli 3 nesubstituované časti Pc zanorené do membrány buniek a komplex by tým pádom nemusel prejsť až do vnútra buniek. CB[7] by tvoril komplex len s časťou Pc, ktorá nie je v membráne a tvorbou komplexu by sa zvýšila hydrofilita Pc.

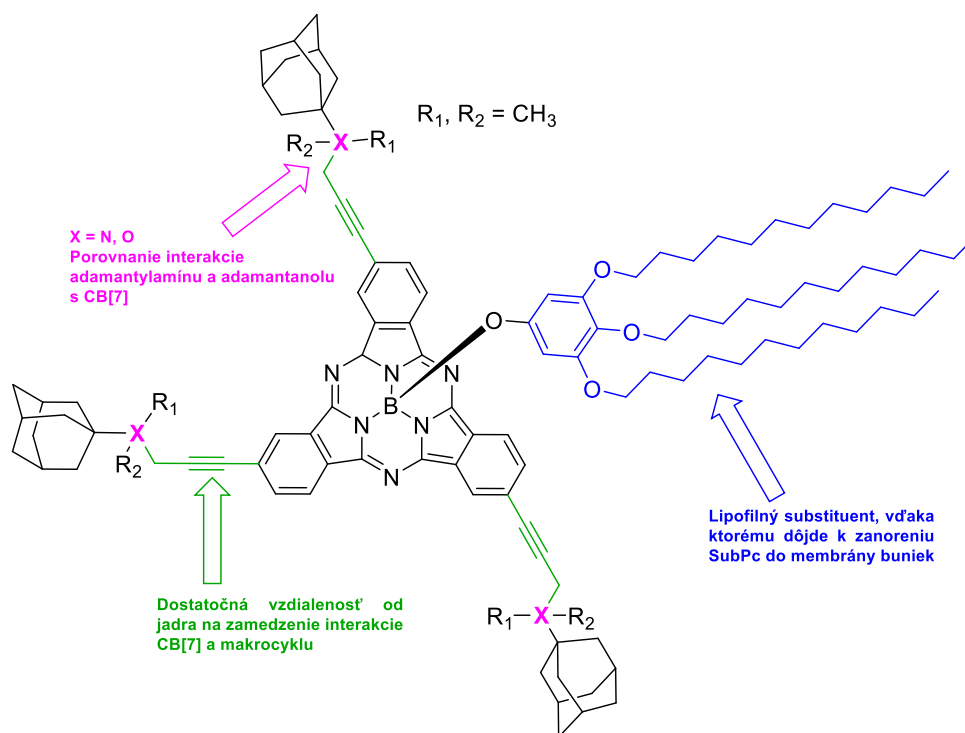
4.2 Štúdium supramolekulárnych interakcií subftalocyanínov

Podiel autorov

Lucia Rychvalská nasynthetizovala, vyčistila a charakterizovala všetky látky pod vedením Marie Victorie Martínez-Díaz v Madride. Študovala interakcie SubPc s CB[7] pomocou absorpčných a fluorescenčných spektier, zmerala ich fotofyzikálne parametre a podieľala sa na vyhodnocovaní dát. Magdaléna Kozlíková robila *in vitro* biologické testovanie. Petr Zimčík koncipoval a navrhol projekt a podieľal sa na vyhodnocovaní dát.

4.2.1 Návrh štruktúry

Návrh štruktúry SubPc prebiehal na podobných predpokladoch a základoch ako u Pc. Adamantylový substituent bol na periférii makrocyklu kvôli jednoduchšej syntéze naviazaný v β polohe. Boli pripravené SubPc a adamantylamínom a adamantanolom pre porovnanie ich interakcie s CB[7]. Tieto substituenty boli od makrocyclického jadra vzdialené 4 atómy na zamedzenie interakcie CB[7] a makrocyklu. Objemný lipofilný substituent v axiálnej polohe zabezpečuje zanorenie SubPc do membrány buniek (Obrázok 53).



Obrázok 53. Návrh štruktúry SubPc.

4.2.2 Syntéza

4.2.2.1 Syntéza substituentov

V prvom rade sme začali syntézou axiálneho substituentu (Schéma 21). Prvým krokom syntézy bola reakcia metylesteru kyseliny gallovej a 1-brómdodekanu za vzniku látky **30** v relatívne dobrom výťažku. Ďalším krokom bola redukcia esteru na alkohol za vzniku látky **31** vo vysokom výťažku vyše 90 % a bez nutnosti ďalšieho čistenia, keďže pri reakcii vznikal len jeden produkt. Nasledujúcim krokom bola oxidácia alkoholu na aldehyd pomocou 2,3-dichlór-5,6-dikyano-1,4-benzochinónu (DDQ). Aj táto reakcia vznikla látka **32** prebiehala bez problémov s výťažkom takmer 80 %. Posledným krokom prípravy finálneho axiálneho substituentu látky **33** bola kyslo katalyzovaná Dakinova oxidácia aldehydu na fenol pomocou peroxidu vodíka. Celkový výťažok prípravy látky **33** bol takmer 40 %, čo je na štvorkrokovú syntézu dobré.

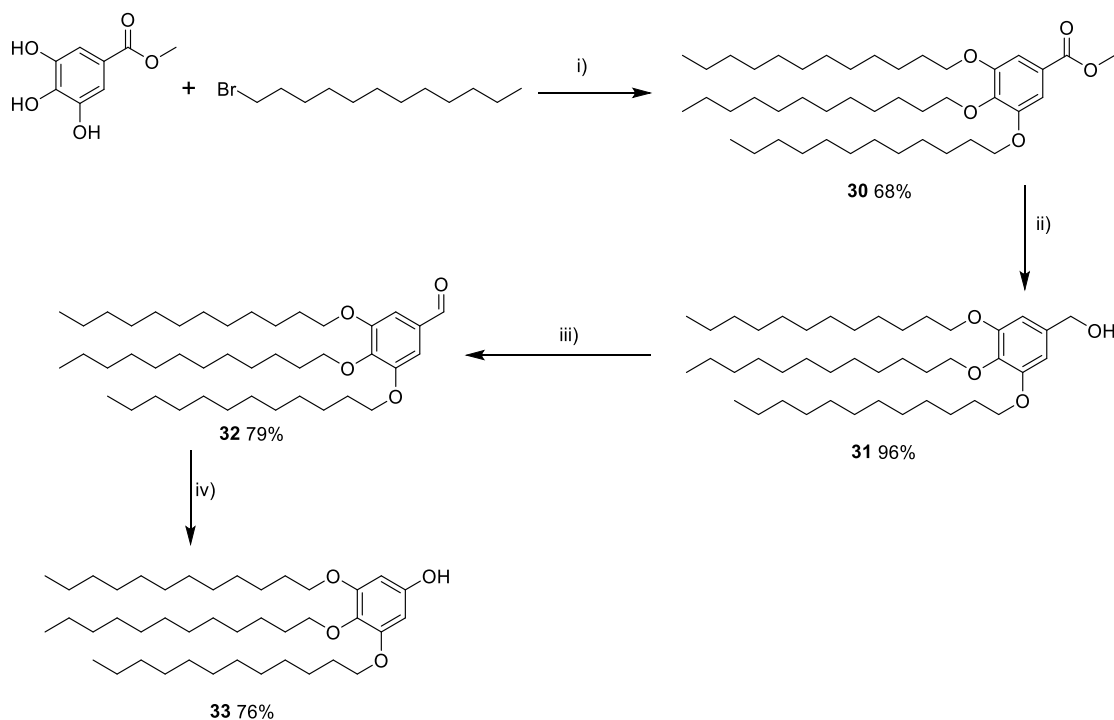


Schéma 21. Reakčné podmienky: i) K_2CO_3 , NaI, acetonitril, 90 °C, 2 dni, ii) $LiAlH_4$, THF, lab. teplota, 1 h, následne voda, H_2SO_4 , 0 °C, iii) DDQ, dioxan, iv) H_2O_2 , H_2SO_4 , chloroform, metanol, lab. teplota, 4 dni.

Následne sme sa pustili do prípravy periférnych substituentov (Schéma 22). Príprava látky **34** bola len jedнокroková syntéza reakciou 1-hydroxyadamantánu a propargyl bromidu. Výťažok tejto reakcie bol len 30 %, a to bolo maximum čo sme získali, keďže pri opakovaných pokusoch boli výťažky tejto reakcie nižšie.

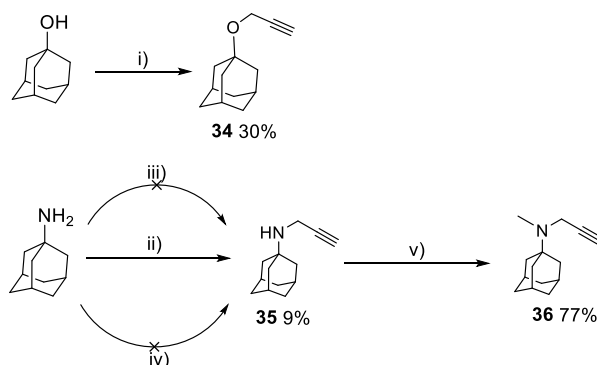
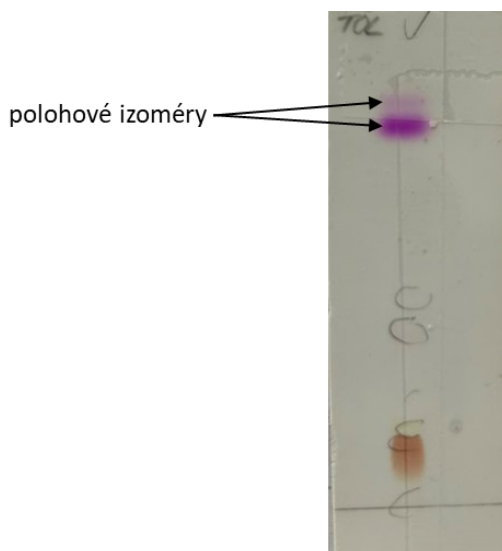


Schéma 22. Reakčné podmienky: i) NaH, THF, 0 °C, 1 h, potom propargyl bromid, 30 °C, 3 dni, ii) propargyl bromid, K_2CO_3 , DMF, 60 °C, 4 dni, iii) propargyl bromid, K_2CO_3 , izopropanol, 70 °C, 16 h, iv) propargyl bromid, benzonitril, 120 °C, 2 h, v) formaldehyd, kyselina mravčia, 100 °C, 16 h.

Príprava druhého periférneho substituentu látky **36** bola dvojkroková syntéza. V prvom kroku to bola reakcia 1-aminoadamantánu a propargyl bromidu. Výťažok tejto reakcie bol veľmi nízky (len okolo 10 %), preto sme sa snažili aj o optimalizáciu tejto syntézy. Najprv sme skúsili použiť namiesto DMF izopropanol, táto reakcia ale vôbec neprebehla. Následne sme skúsili použiť rovnaké podmienky ako pri syntéze látky **12** (Schéma 18), keďže sa jedná o podobný typ reakcie, len teraz sme namiesto 2-brómetanolu mali propargyl bromid. Použili sme teda len benzonitril bez ďalšej bázy, ale ani táto reakcia nebola úspešná. Posledným krokom bola metylácia sekundárnej aminoskupiny pomocou Eschweiler-Clarkeovej metylácie s kyselinou mravčou a formaldehydom (Schéma 19) za vzniku finálneho periférneho substituentu látky **36**.

4.2.2.2 Syntéza subftalocyanínov

Prvým krokom syntézy bola cyklotrimerizačná reakcia 4-jódftalonitrilu v BCl_3 v *p*-xyléne pri teplote $140\text{ }^\circ\text{C}$ za vzniku tmavofialového SubPc **37** (Schéma 23). Pri tejto látke sme na TLC pozorovali polohové izoméry, ktoré boli ale veľmi tesne vedľa seba a nebolo možné ich rozdeliť (Obrázok 54). Nasledovala substitučná reakcia v axiálnej polohe látky **33** za vzniku SubPc **38** v bezvodom *o*-dichlórbenzéne. Substitučné reakcie fenolov za axiálny chlór sú známe a prebiehajú s relatívne vysokým výťažkom, v našom prípade to bolo 67 %. Ďalším krokom bola reakcia periférneho jódu pomocou Sonogashirovej reakcie s látkami **34** alebo **36** za vzniku SubPc **39**, respektíve **40** (Schéma 23). V oboch prípadoch sme použili rovnaké rozpúšťadlá ako katalyzátor použili bis(trifenyfosfín)paládium dichlorid a CuI. Rozdiel bol len v rýchlosti reakcie, pretože príprava látky **39** trvala 16 h a látka **40** bola hotová už po 6 h a dokonca s vyšším výťažkom. Posledným krokom bola príprava látky **41**, teda kvarternizácia terciárneho amínu látky **40** pomocou metyljodidu. Reakcia prebiehala 3 dni, aby sme mali istotu, že došlo ku kvarternizácii všetkých troch amino skupín, keďže čistenie látky **41** už neprebiehalo stĺpcovou chromatografiou.



Obrázok 54. Polohové izoméry látky **37**.

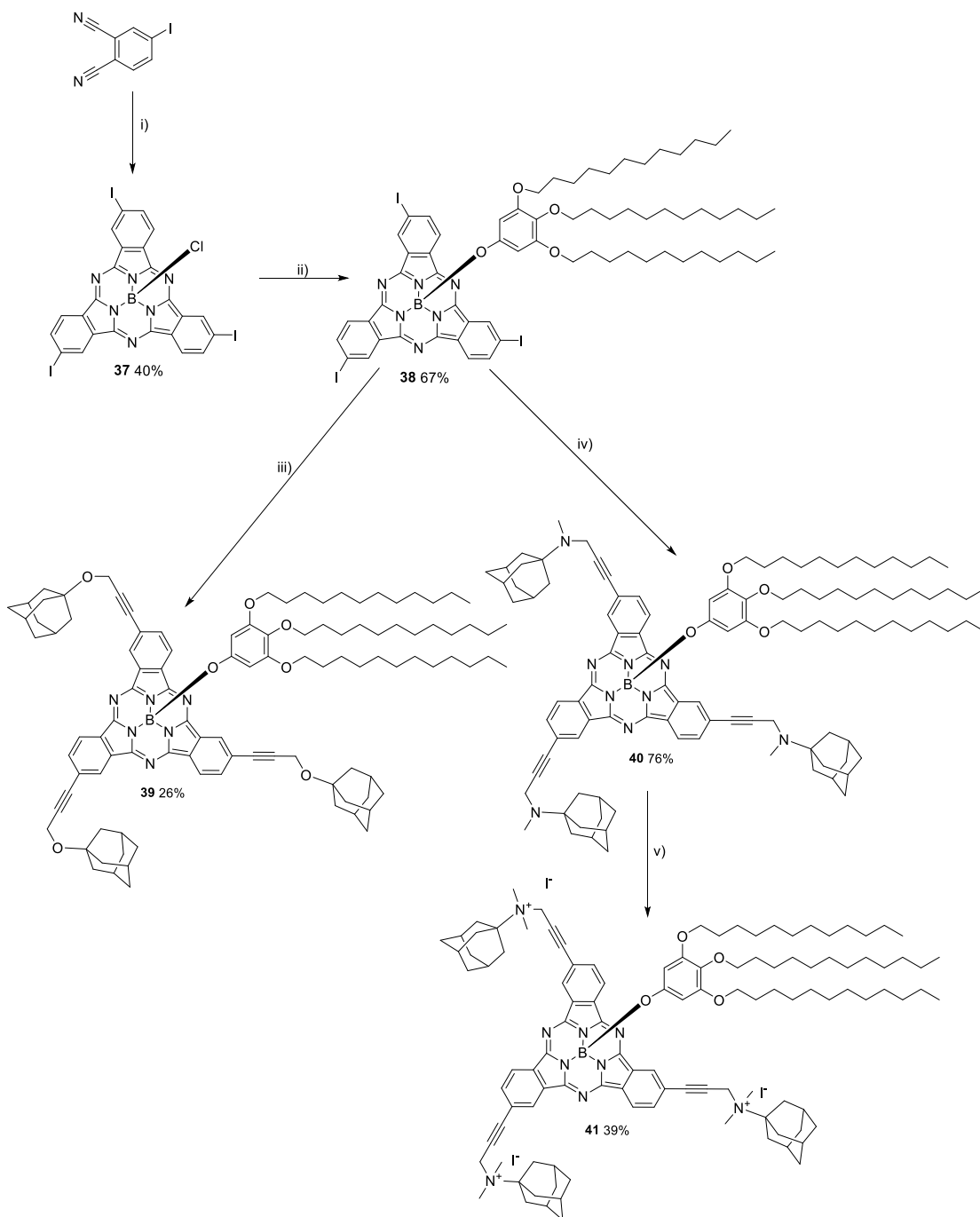


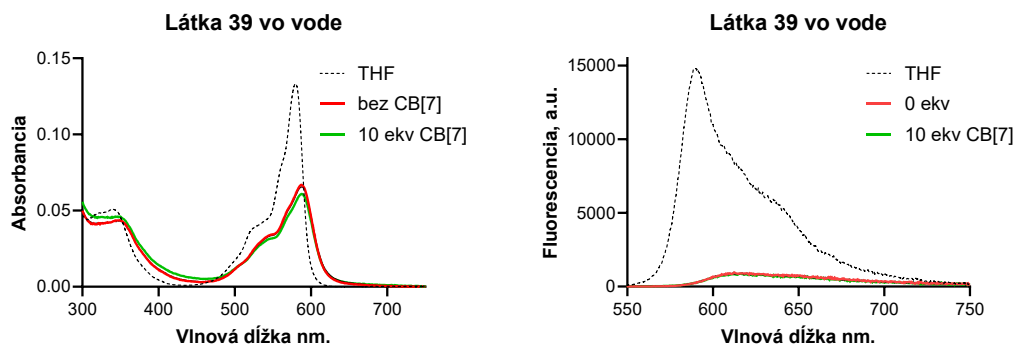
Schéma 23. Reakčné podmienky: i) BCl_3 /*p*-xylén, 140 °C, 20 min, ii) *o*-dichlórbenzén, 120 °C, 4 h, iii) látka **34**, $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, CuI , THF, TEA, lab. teplota, 16 h, iv) látka **36**, $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, CuI , THF, TEA, lab. teplota, 6 h, v) metyljodid, lab. teplota, 3 dni.

4.2.3 Štúdium interakcie SubPc a CB[7]

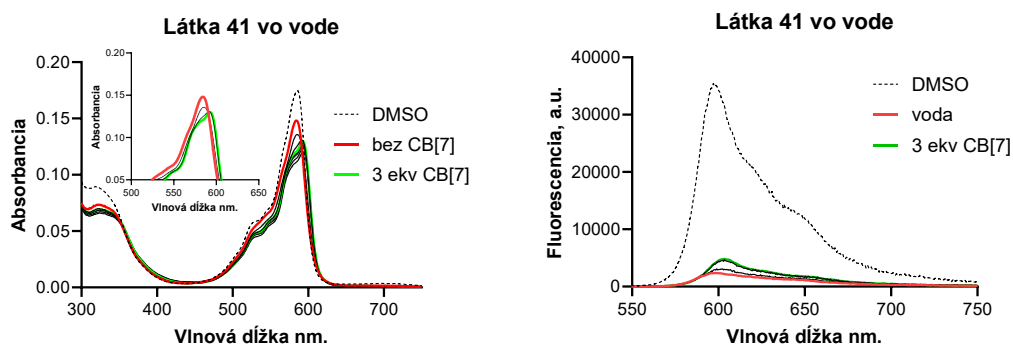
4.2.3.1 Fluorescenčná spektroskopia

Pripravené SubPc mali vo vode nižšie a širšie absorpčné spektrum než v THF a mali veľmi nízku fluorescenciu, čo môže naznačovať tvorbu agregátov. V prvom rade sme skúsili naše SubPc titrovať vo vode postupným pridávaním CB[7] a rozvoľniť tak agregáty. Pri látke **39** sme ani po pridaní desiatich ekvivalentov CB[7] nepozorovali žiadnu zmenu na absorpčnom ani na emisnom fluorescenčnom spektre (Obrázok 55). Pokles hodnoty absorpcie po pridaní desiatich ekvivalentov CB[7] je spôsobený len zriedovaním vzorky. Na druhej strane u látky **41** (kvartérny amín) sme pozorovali zmenu tvaru a mierny posun absorpčného spektra a taktiež

mierny nárast hodnoty fluorescence (Obrázok 56), teda dochádza aspoň k nejakej interakcii medzi látkou **41** a CB[7].

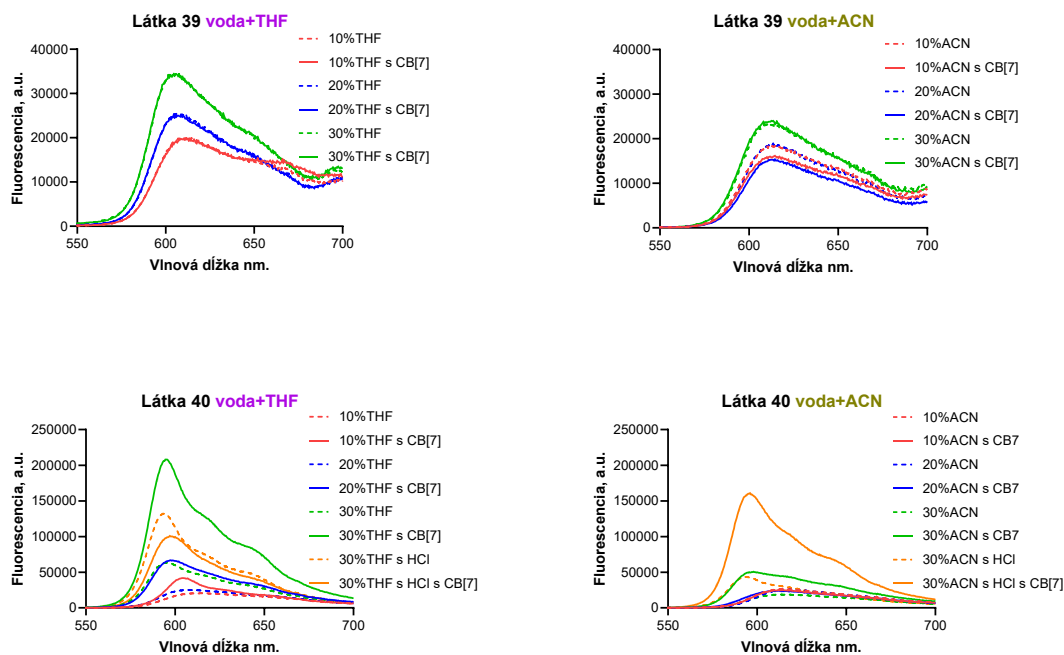


Obrázok 55. Absorpčné (vľavo) a fluorescenčné (vpravo) spektrá látky **39** vo vode.



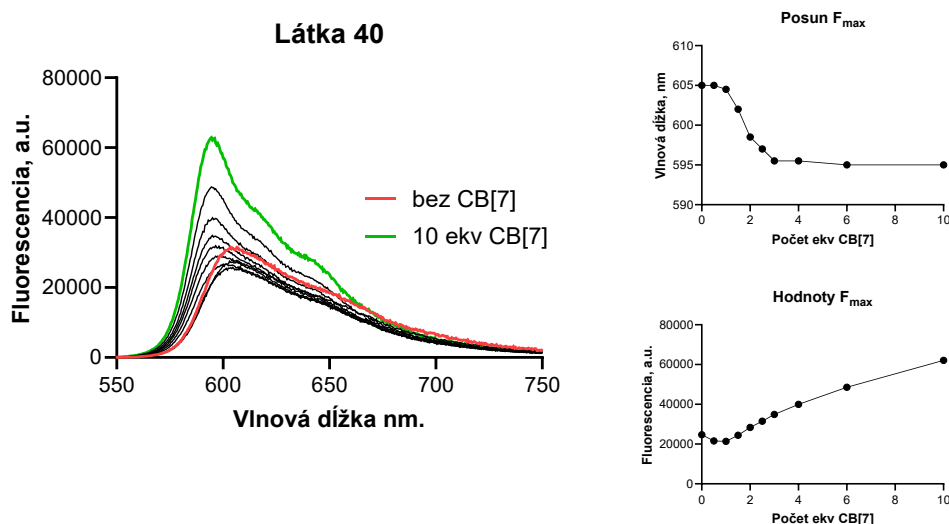
Obrázok 56. Absorpčné (vľavo) a fluorescenčné (vpravo) spektrá látky **41** vo vode.

Keďže sme nepozorovali významnú zmenu u SubPc po pridaní CB[7] v čistej vode, skúsili sme sledovať ich interakciu v kombinácii rozpúšťadiel, a to voda + THF alebo voda + acetonitril (ACN). V prítomnosti organického rozpúšťadla by nemali byť vytvorené agregáty tak silné. V tomto prípade sme sledovali predovšetkým fluorescenčné spektrá, keďže u nich je lepšie viditeľná aj malá zmena prítomnosti agregátov. Pri látke **39** sme opäť nepozorovali žiadnu zmenu ani pri 30% THF alebo ACN. Dochádzalo síce k nárastu fluorescence s vyšším prídavkom organického rozpúšťadla, ale v porovnaní spektra bez a s CB[7] nedochádzalo k žiadnej zmene. Pri látke **40** sme už pozorovali viditeľné zmeny (Obrázok 57). V kombinácii rozpúšťadiel voda + THF sme už pri 10% THF videli zmenu a zvýšenie hodnoty fluorescence. Pri použití 20% THF sa po pridaní CB[7] zvýšila fluorescence a taktiež došlo k posunu absorpčného maxima. Pri použití 30% THF bol nárast fluorescence najvyšší, ale k posunu maxima už nedošlo. Keďže látka **40** vo svojej štruktúre obsahuje terciárny amín, chceli sme skúsiť, či po okyslení vody pomocou HCl dôjde k nejakému zlepšeniu, ale k zvýšeniu fluorescence po pridaní CB[7] nedošlo. Čo sa týka kombinácie rozpúšťadiel voda + ACN, tak opäť vysoký nárast fluorescence bol u 30% ACN. V tomto prípade použitím HCl došlo k najvýraznejšiemu zvýšeniu fluorescence, ale stále nie menej ako pri použití 30% THF. Preto všetky nasledujúce experimenty prebiehali už vo vode s prídavkom 30% THF.



Obrázok 57. Fluorescenčné spektrá látok **39** a **40** v kombinácii vody a organického rozpúšťadla s (plná čiara) a bez (prerušovaná čiara) CB[7].

Ako ďalší experiment sme spravili titráciu postupným pridávaním CB[7] vo vode s 30% THF (Obrázok 58). Maximum fluorescence sa síce najprv mierne znížilo, a potom znova narástalo aj pri 10 ekvivalentoch CB[7]. To naznačuje, že dochádza k interakcii s cieľovou štruktúrou a táto interakcia zvyšuje podiel monomérskej formy vo vode, ale nie je možné jednoznačne určiť asociačné konštanty interakcie. Počas interakcie dochádzalo nielen k zvyšovaniu intenzity fluorescence, ale aj k miernemu hypsochromnému posunu maxima. Analýza polohy fluorescenčného maxima (Obrázok 58 vpravo) ukázala, že až do 1 ekvivalentu nedochádza k žiadnej zmene a potom až následne pri pridaní ďalších dvoch ekvivalentov CB[7] dôjde k výraznému hypsochromnému posunu až o 10 nm. Poloha maxima sa ďalej už nemení. Z týchto údajov je možné vydedukovať, že dochádza k očakávanej stechiometrii interakcie 1 SubPc ku 3 CB[7] odpovedajúcim trom aminoadamantylovým substituentom na periférii.



Obrázok 58. Fluorescenčné spektrá látky **40**.

4.2.3.2 Určenie log P

Rovnako ako v kapitole 4.1.3.2.3 u vyššie popísaných Pc, aj u SubPc sme experimentálne určili hodnotu log P (Tabuľka 13). Po vytvorení komplexu SubPc-CB[7] by malo dôjsť k zvýšeniu hydrofility molekuly, a tým k zníženiu hodnoty log P . V našom prípade došlo k zníženiu log P len u látok **40** a **41**, kde ide o terciárny, resp. kvartérny amín. Pri týchto dvoch látkach došlo k 10 až 100-násobnému zvýšeniu hydrofility. Na druhej strane pri látkach **38** a **39** dochádzalo k neočakávanému zvýšeniu hodnoty log P , a tým teda aj k zvýšeniu lipofility molekuly. V súčasnej dobe nemáme pre toto chovanie bližšie vysvetlenie.

Tabuľka 13. Hodnoty log P SubPc bez a po pridaní CB[7].

	38	39	40	41
Bez CB[7]	0,5079	0,4516	1,5630	-0,7073
S CB[7]	0,9572	1,4157	-0,5177	-1,5305

4.2.4 Fotofyzikálne parametre SubPc

V rámci fotofyzikálnych parametrov sme skúmali a určovali hodnoty kvantových výťažkov singletového kyslíka a fluorescence samotných SubPc. Konkrétne hodnoty sú uvedené v Tabuľke 14. Ako rozpúšťadlo bol použitý THF, keďže v DMSO (častejšie využívané na určenie fotofyzikálnych parametrov, je to biokompatibilnejšie rozpúšťadlo) bola väčšina látok nerozpustná. V tomto rozpúšťadle podľa absorpčných spektier sú SubPc v monomérskej forme. Celkovo boli všetky nami namerané hodnoty veľmi nízke, u väčšiny prípadov minimálne 10 až 100-krát nižšie ako by sme očakávali pri podobných látkach. Kvantový výťažok singletového kyslíka bol najvyšší pri látke **38**, ktorá má na periférii jódo substituenty, ktoré zvyšujú produkciu singletového kyslíka na základe efektu ťažkého atómu. Rozdiel v kvantovom výťažku singletového kyslíka medzi látkami **39** a **40** bol minimálny. Čo sa týka kvantového výťažku fluorescence (stanovený v integračnej sfére), jeho hodnoty boli pri všetkých látkach minimálne. Pri látkach **39** a **40** bol mierne vyšší v porovnaní s látkou **38**, keďže pri týchto látkach nie je prítomný efekt ťažkého atómu.

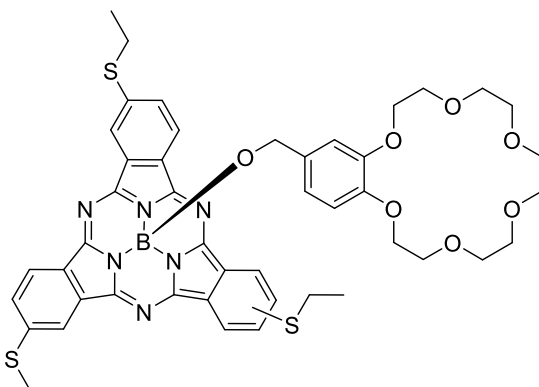
Vzhľadom k tomu, že všetky parametre boli neobvykle nízke, skúsili sme pri látke **39** určiť kvantový výťažok fluorescence ešte porovnávacou metódou s využitím rhodaminu ako

referenčnej látky pre potvrdenie, že chyba nie je v metóde stanovení. Ďalej sme vyskúšali aj iné rozpúšťadlo (etanol), ktoré by prípadne mohlo taktiež ovplyvňovať fotofyzikálne parametre. Hodnoty kvantových výťažkov fluorescence porovnávacou metódou v oboch rozpúšťadlách boli rádovo porovnateľné ako s využitím integračnej sféry. Nízke kvantové výťažky singletového kyslíka aj fluorescence preto neboli ovplyvnené použitou metódou, ale jedná sa o vnútornú charakteristiku (aj keď veľmi neobvyklú) pripravených látok.

Tabuľka 14. Fotofyzikálne parametre SubPc.

	38	39	40	41
Φ_{Δ} v THF	0,096	0,046	0,046	
Φ_F – sféra v THF	0,0014	0,0055	0,006	0,0015
Φ_F – porovnávací metóda v THF		0,008		
Φ_F – porovnávací metóda v EtOH		0,015		

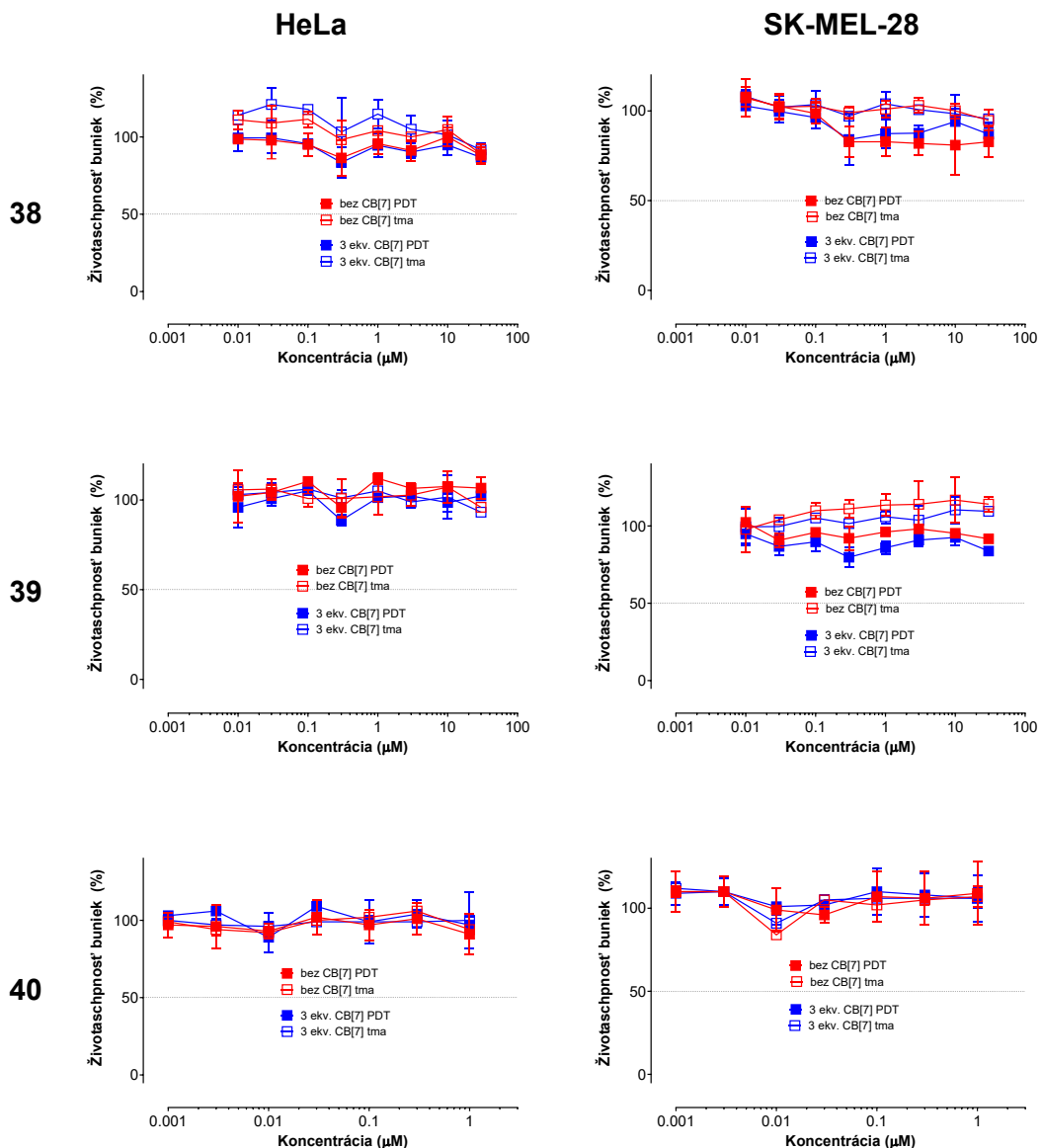
Pre porovnanie SubPc (Obrázok 59) v minulosti pripravené v našej skupine mali kvantový výťažok singletového kyslíka okolo 0,6 a kvantový výťažok fluorescence okolo 0,2,⁹⁰ čo je niekoľko-násobne vyššie ako kvantové výťažky látok syntetizovaných v tomto projekte.



Obrázok 59. Príklad SubPc s vysokými kvantovými výťažkami singletového kyslíka a fluorescence.

4.2.5 In vitro biologické hodnotenie

SubPc boli testované na fotodynamickú aktivitu na HeLa a SK-MEL-28 bunkách (Obrázok 60). V tomto prípade sme ani u jednej z látok nepozorovali žiadne zmeny v aktivite po pridaní CB[7] a taktiež neboli aktívne v prítomnosti svetla, takže nemali žiadnu vlastnú fotodynamickú aktivitu. Bude to spôsobené pravdepodobne nezvyčajne nízkymi kvantovými výťažkami singletového kyslíka všetkých SubPc.



Obrázok 60. Fototoxicita (plné symboly) a toxicita v tme (prázdne symboly) na HeLa a SK-MEL-28 bunkách, ktoré boli inkubované so samotným SubPc (červené) alebo so SubPc + 3 ekvivalety CB[7] (modré).

4.2.6 Záver

Pripravili sme 3 deriváty SubPc, ktoré mali periférne substituovaný aminoadamantyl alebo adamantán viazaný éterovou väzbou na makrocyklus. Interakcia s CB[7] bola pozorovaná pomocou fluorescencie veľmi ťažko a len pri jednej látke **40** sme pozorovali na fluorescenčných spektrách nejakú zmenu. Podľa posunu fluorescenčného maxima sme vedeli určiť stechiometriu SubPc-CB[7] komplexu, ktorá bola 1 : 3, keďže naše látky obsahovali 3 aminoadamantylové substituenty. Fotofyzikálne vlastnosti SubPc (kvantové výťažky singletového kyslíka a fluorescencie) boli nezvyčajne nízke, čo sa prejavilo aj na *in vitro* testovaní, keďže žiadna látka nebola na skúšaných bunkových líniách účinná.

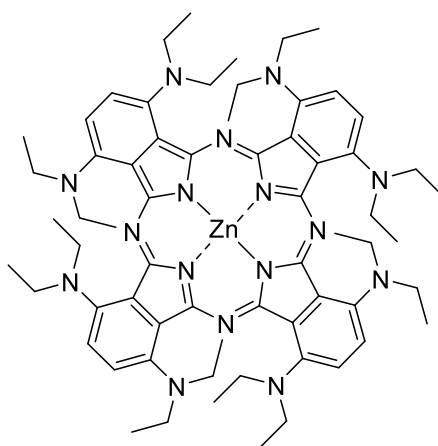
4.3 Príprava α -substituovaných aminofthalocyanínov

Výsledky tohto projektu boli publikované v recenzovanom časopise s impakt faktorom: Kociscakova L, Senipek MI, Zimcik P, Novakova V, Non-peripherally alkylamino-substituted phthalocyanines: Synthesis, spectral, photophysical and acid-base properties, Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 2019, 23, 427–436. <https://doi.org/10.1142/S108842461950024X>. IF₂₀₁₈ = 1,292 (Q3_{AIS2018})

Podiel autorov

Lucia Rychvalská sa venovala syntetickým reakciám prekursorov a niektorým Pc, dohliadala na fotofyzikálne merania a podieľala sa na príprave článku. Merve Ipek Senipek merala fotofyzikálne a spektrálne vlastnosti Pc. Veronika Nováková sa podieľala na vyhodnocovaní dát a písaní článku. Petr Zimčík sa podieľal na vyhodnocovaní dát a korekcii článku.

Pc s α substituentmi majú posunuté maximum absorpcie do červenej oblasti, čo je výhodou ich použitia ako PS pri PDT. Ak sú tieto substituenty naviazané cez dusík, tak posun je ešte výraznejší. Preto sme sa snažili pripraviť Pc, ktoré majú v α polohe dietylaminu substituenty (Obrázok 61).



Obrázok 61. Štruktúra zamýšľaného Pc.

4.3.1 Syntéza ftalonitrilových prekursorov

Prvým krokom syntézy prekursorov bola príprava ftalonitrilu s dobre odstupujúcou funkčnou skupinou: triflát, tosylát alebo bróm (Schéma 24). Látky **42** a **43** boli už v minulosti pripravené v našej výskumnej skupine podľa publikovaného postupu.^{111, 112}

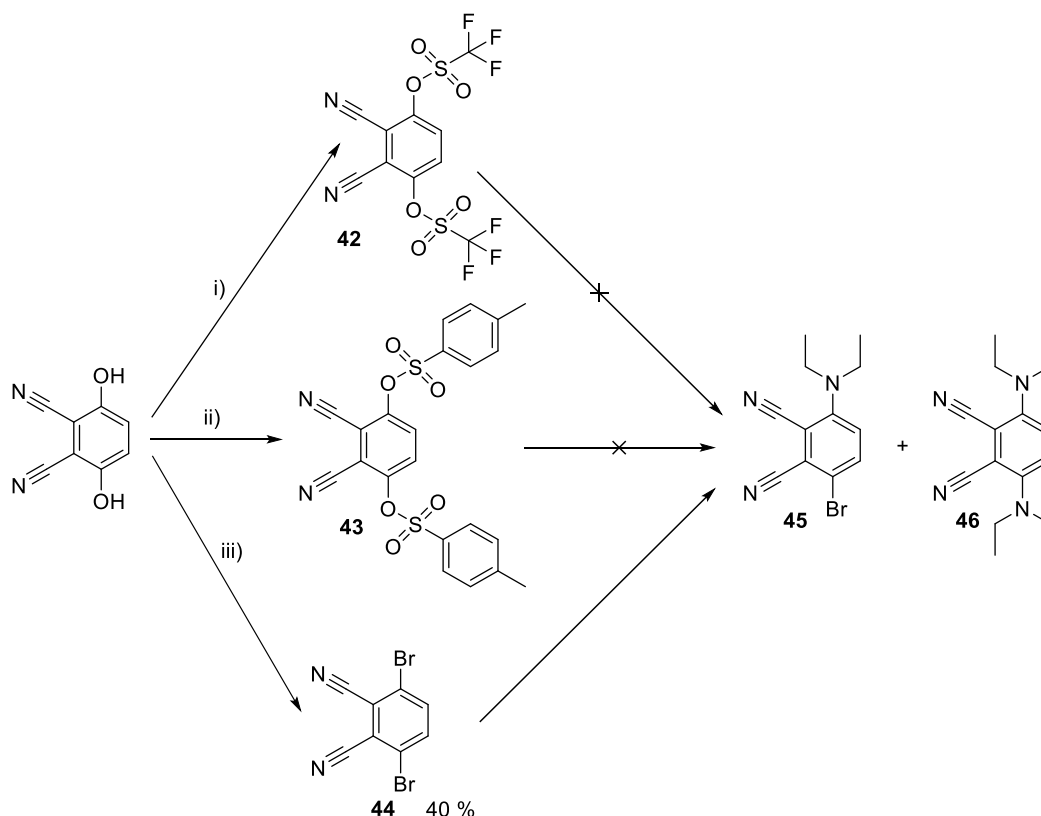


Schéma 24. Reakčné podmienky: i) trifluórmetánsulfonát anhydrid, DCM, TEA, lab. teplota, 14 h; ii) *p*-toluénsulfonyl chlorid, K_2CO_3 , acetón, 60 °C, 12 h, iii) bróm, trifenyfosfín, acetonitril, 0 °C pár minút, 70 °C 30 min, 230 °C 1 h

Izolovanie látky **44** bolo komplikované, pretože keď sme postupovali podľa publikovaného postupu¹¹³ získali sme len vedľajší produkt reakcie trifenyfosfín oxid. Museli sme preto použiť iné zloženie mobilných fáz počas opakovanej stĺpcovej chromatografie.

Ďalším krokom bola príprava látky **46** pomocou nukleofilnej substitúcie alebo Buchwald-Hartwig couplingovej reakcie.

4.3.1.1 Nukleofilná substitúcia

Pri použití východiskových látok **42** a **43** sme nepozorovali ani stopové množstvo látky **45** alebo **46** a hlavným produktom reakcie bol vždy 3,6-dihydroxyftalonitril pravdepodobne kvôli amidolýze esterovej väzby. Nukleofilná substitúcia s látkou **44** už bola čiastočne úspešná, pretože sa nám podarilo pripraviť monosubstituovanú látku **45**. Malé množstvo látky **46** sa nám podarilo pripraviť až pri striktné bezvodých podmienkach, aj keď len vo výťažku okolo 1 %. Mierne vyšší výťažok v porovnaní s Cs_2CO_3 sme získali použitím K_2CO_3 ako zásady. Dlhší reakčný čas (7 dní) mierne zvýšil výťažok oboch látok **45** aj **46**. Vo všetkých prípadoch sme ako rozpúšťadlo použili DMSO. Konkrétne výťažky sú uvedené v Tabuľke 15.

Tabuľka 15. Reakčné podmienky syntézy látok **45** a **46** pomocou nukleofilnej substitúcie z látky **44** s dietylamiénom

Zásada	Rozpúšťadlo	Reakčný čas	Teplota	Výťažok látky 45	Výťažok látky 46
K_2CO_3	DMSO	24 h	80 °C	64 %	0,95 %
K_2CO_3	DMSO	7 dní	80 °C	73 %	1,3 %
Cs_2CO_3	DMSO	7 dní	80 °C	71 %	0,86 %

4.3.1.2 Buchwald-Hartwig couplingová reakcia

Ide o tzv. „cross coupling“ reakciu, ktorá je katalyzovaná pomocou paládia. Produktom tejto reakcie sú aryl amíny, ktoré vznikajú reakciou primárnych alebo sekundárnych amínov s arylmi s dobre odstupujúcimi funkčnými skupinami (látky **42** a **43**) alebo s arylhalidmi (látky **44**). Počas optimalizácie syntézy sme menili rôzne podmienky reakcií, a to hlavne katalyzátory, zásady, rozpúšťadlá a teplotu reakcií. V Tabuľke 16 sú uvedené všetky reakčné podmienky, ktoré sme skúšali.

Prvé 3 reakcie sme skúsili so všetkými tromi východiskovými látkami **42** – **44**. Pri použití látok **42** a **43** sme ale nepozorovali žiadnu tvorbu požadovaných produktov a dochádzalo len k ich rozloženiu. Pri látke **44** sme až pri tretej reakcii pozorovali aspoň malé množstvo produktov **45** a **46**, preto sme pri všetkých nasledujúcich reakciách použili len východiskovú látku **44**. Keďže použitie rôznych zásad môže meniť pomer výsledných produktov, v reakciách číslo 3 – 5 sme porovnávali rôzne zásady. Použitie K_2CO_3 mierne zvýšilo výťažok látky **45**, ale získali sme menšie množstvo látky **46**. Na druhej strane použitie zásad Cs_2CO_3 a K_3PO_4 poskytovalo vyššie výťažky látky **46**. Keďže požadovaným produktom bola predovšetkým látka **46**, ďalej sme pokračovali už len s Cs_2CO_3 a K_3PO_4 . Zníženie reakčnej teploty zo $110\text{ }^\circ\text{C}$ na $80\text{ }^\circ\text{C}$ (reakcie 3 vs. 6, a 5 vs. 7) viedlo k zníženiu výťažku látky **46**, pričom výraznejšie zníženie bolo pri použití Cs_2CO_3 . Kľúčovým parametrom nakoniec bolo použité rozpúšťadlo, pretože akonáhle sme použili DMSO, množstvo látky **45** sa takmer desaťnásobne zvýšilo a taktiež došlo aj k miernemu nárastu množstva látky **46**. V tomto prípade ale nemôžeme vylúčiť, že reakcie v DMSO neprebíhali mechanizmom nukleofilnej substitúcie (viď vyššie), pretože výťažky látok **45** a **46** sú podobné (Tabuľka 15). Keďže podmienky nukleofilnej substitúcie sú jednoduchšie, látky **45** a **46** boli pripravené vo väčšom množstve už len práve pomocou nukleofilnej substitúcie.

Tabuľka 16. Reakčné podmienky syntézy látok **45** a **46** pomocou Buchwald-Hartwig couplingovej reakcie.^a

Číslo reakcie	Látka	Amín	Katalyzátor	Pomocný katalyzátor	Zásada	Rozpúšťadlo	Teplota	45 %	46 %
1	42/43/44	DEA	Pd(OAc)	X-Phos	Cs_2CO_3	Toluén, <i>t</i> BuOH	$110\text{ }^\circ\text{C}$	^b	^b
2	42/43/44	DBuA	RuPhos-PdG3	Ru-Phos	KOtB	THF	$70\text{ }^\circ\text{C}$	^b	^b
3	42/43/44	DEA	RuPhos-PdG3	Ru-Phos	Cs_2CO_3	Toluén, <i>t</i> BuOH	$110\text{ }^\circ\text{C}$	1,6 ^c	1 ^c
4	44	DEA	RuPhos-PdG3	Ru-Phos	K_2CO_3	Toluén, <i>t</i> BuOH	$110\text{ }^\circ\text{C}$	8,2	0,5
5	44	DEA	RuPhos-PdG3	Ru-Phos	K_3PO_4	Toluén, <i>t</i> BuOH	$110\text{ }^\circ\text{C}$	5,4	1
6	44	DEA	RuPhos-PdG3	Ru-Phos	Cs_2CO_3	Toluén, <i>t</i> BuOH	$80\text{ }^\circ\text{C}$	1,9	0,6
7	44	DEA	RuPhos-PdG3	Ru-Phos	K_3PO_4	Toluén, <i>t</i> BuOH	$80\text{ }^\circ\text{C}$	4,9	0,9
8	44	DEA	RuPhos-PdG3	Ru-Phos	Cs_2CO_3	DMSO	$80\text{ }^\circ\text{C}$	58	0,7
9	44	DEA	RuPhos-PdG3	Ru-Phos	K_3PO_4	DMSO	$80\text{ }^\circ\text{C}$	79	1,4

^aDEA – dietylamin, DBuA – dibutylamín, *t*BuOH – *tert*-butanol, KOtB – *tert*-butoxid draselný, ^bstopové množstvo, ^cvýťažok len s použitím východiskovej látky **44**.

4.3.2 Syntéza ftalocyanínov

Hlavný Pc pre tento projekt bola látka **47**. Bohužiaľ ani opakované pokusy o cyklotetramerizáciu tejto látky pomocou Linsteadovej metódy s butoxidom horečnatým alebo lítym v butanole neboli úspešné (Schéma 25). Ani zámena rozpúšťadla za oktanol a zvýšenie reakčnej teploty nepriniesli požadovaný Pc. Podobne negatívne výsledky cyklotetramerizácie 3,6-bis(diarylamino)ftalonitrilov už boli publikovné.¹¹⁴ Dôvodom môže byť kladný mezomérny efekt amino skupiny, ktorý zvyšuje elektrónovú hustotu ftalonitrilového jadra a znižuje jeho reaktivitu.

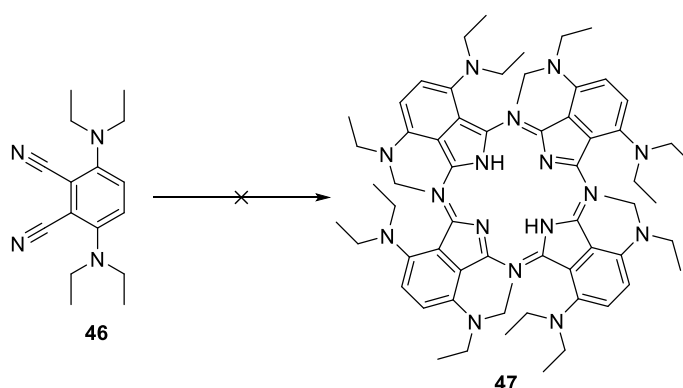


Schéma 25. Príprava látky **47**.

Pokus o cyklotetramerizáciu látky **45** a tvorbu látky **48** pomocou templátovej metódy síce nebol úspešný, ale pomocou Linsteadovej metódy sme získali požadovaný bezkovový Pc **48H** (Schéma 26). Pri použití butoxidu lítneho dochádzalo k tvorbe veľkého množstva vedľajších produktov, preto sme namiesto neho radšej zvolili butoxid horečnatý, kde bolo menej vedľajších produktov cyklotetramerizácie a získali sme požadovaný horečnatý Pc. Odstránenie nadbytočného butoxidu horečnatého pomocou vody/metanolu/kyseliny octovej viedlo k čiastočnej demetyláci, čo sa prejavilo na TLC. Preto bola zmes horečnatého a bezkovového Pc ponechaná reagovať s *p*-toluénsulfónovou kyselinou, aby sme dosiahli kompletnú demetyláciu za vzniku látky **48H**. Pokusy o opätovnú koordináciu Mg(II) do makrocyklu boli neúspešné. Na druhej strane koordináciou Zn(II) pomocou octanu zinočnatého v malom množstve pyridínu sme dostali látku **48Zn** v takmer kvantitatívnom výťažku (Schéma 26). Pc **48H** a **48Zn** sme získali ako zmesi polohových izomérov, keďže sme použili asymetrický prekursor **45**.

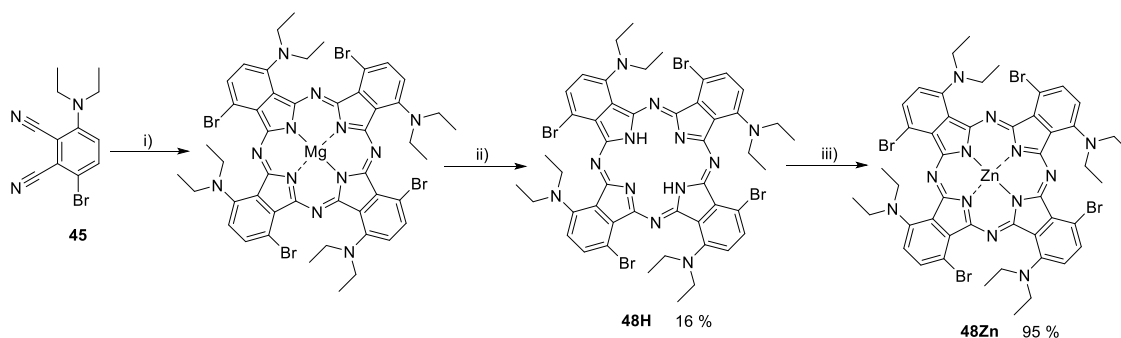
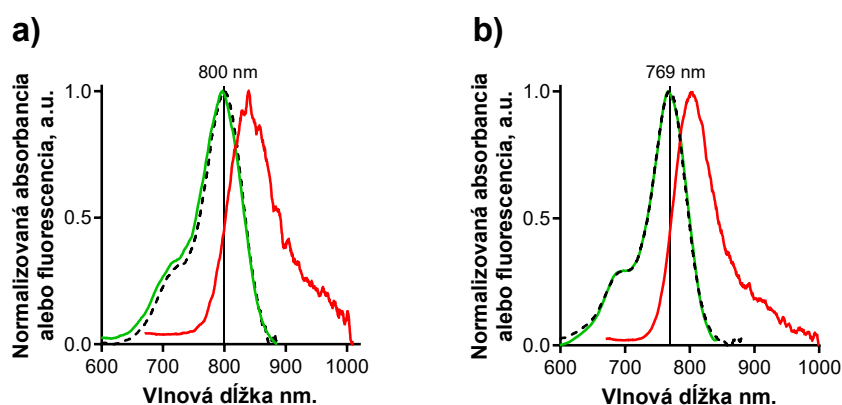


Schéma 26. Reakčné podmienky: i) aktivovaný horčík, jód, butanol, 120 °C, 20 h, ii) *p*-toluénsulfónová kyselina, lab. teplota, 1 h, iii) Zn(COO)₂, pyridín, 120 °C, 1 h.

4.3.3 Štúdium spektrálnych a fotofyzikálnych vlastností aminorftalocyanínov

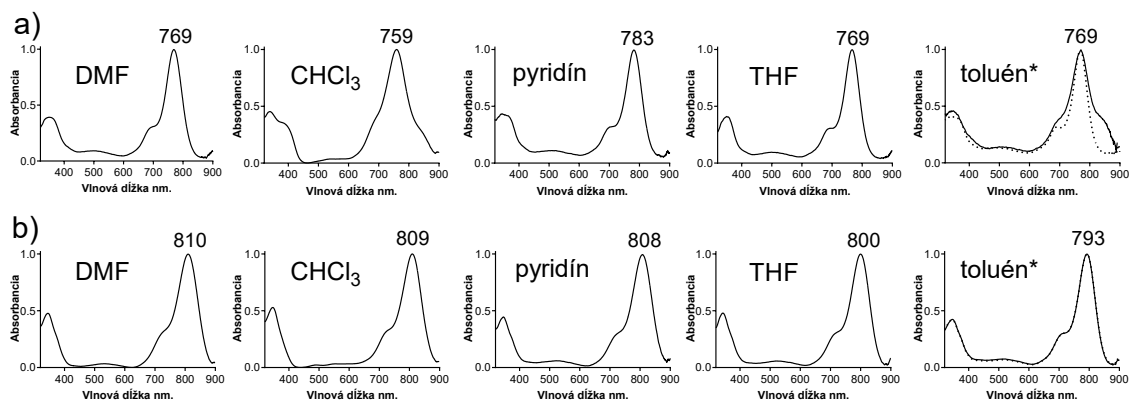
V prvom kroku sme študovali absorpčné spektrá Pc **48H** a **48Zn**. Ich absorpčné spektrá vykazovali charakteristický Q-pás s maximom absorpcie pri 800, resp. 769 nm (Obrázok 62). Pre porovnanie v minulosti pripravené 1,8,15,22-tetrakis(dibutylamino) ftalocyaníny¹¹⁵ majú absorpčné maximá pri 770 a 746 nm pre bezkovový, resp. zinočnatý Pc. Bróm v neperiférnej polohe nami pripravených Pc teda výrazne prispieva do systému π -elektrónov a posúva absorpčné maximum do infračervenej oblasti, ktorá je žiaduca pre PDT.

Napriek tomu, že látka **48H** má asymetrický charakter, nedochádzalo k typickému rozdeleniu Q-pásu bezkovových Pc.¹¹⁶ Je to preto, že so zvyšujúcou sa vlnovou dĺžkou maximálnej absorpcie dochádza k znižovaniu energetických rozdielov medzi dvoma excitovanými stavmi nesymetrickej molekuly a u bezkovových Pc absorbujúcich pri 800 nm už obecnne nedochádza k žiadnemu štiepeniu.⁵⁷



Obrázok 62. Normalizované absorpčné (čierna čiarkovaná), emisné (červené) a excitačné (zelené) spektrá látok a) **48H**, b) **48Zn**.

Okrem absorpcie v infračervenej oblasti je pre PDT dôležitá aj úroveň monomerizácie PS. Absorpčné spektrá látok **48H** a **48Zn** v bežných organických rozpúšťadlách (DMF, pyridín a THF) majú vysoký a ostrý Q-pás, ktorý znamená monomérený charakter Pc v týchto rozpúšťadlách (Obrázok 63). Rozšírenie Q-pásu, a teda miernu agregáciu, sme pozorovali len pri látke **48Zn** v chloroforme a ešte výraznejšie v toluéne (Obrázok 63a). Prídavok pyridínu k látke **48Zn** v toluéne viedlo k jej kompletnej monomerizácii. Mierna agregácia látky **48Zn** v chloroforme a toluéne môže byť spôsobená tvorbou *J*-dimérov. Ide o supramolekulárne usporiadanie založené na prepojení neperiférneho amínu a centrálného Zn(II), podobne ako sa to deje u analógov Pc tetrapyrazinoporfyrazínov.¹¹⁷



Obrázok 63. Normalizované absorpčné spektrá látok a) **48Zn**, b) **48H** v rôznych rozpúšťadlách (* plná čiara vyjadruje spektrá v toluéne, bodkovaná čiara v toluéne s 1% pyridínom).

Monoméry charakter Pc potvrdzuje aj prekrývajúce sa fluorescenčné excitačné spektrá s absorpčnými spektrami (Obrázok 62). Fluorescenčné emisné spektrá vykazovali pomerne veľký Stokesov posun o 36 a 33 nm pre látky **48H**, resp. **48Zn** (typický Stokesov posun pre Pc je okolo 10 nm).

Tretím faktorom dôležitým pre PDT sú dobré fotofyzikálne vlastnosti PS, predovšetkým dostatočná produkcia singletového kyslíka (Φ_{Δ}). Ako rozpúšťadlo bolo zvolené THF, aby bola zaistená monomerizácia Pc. Obidve látky (**48H** aj **48Zn**) mali nízke kvantové výťažky fluorescencie, ale látka **48Zn** mala dostatočne vysoký Φ_{Δ} okolo 0,7 na základe efektu ťažkého atómu (Tabuľka 17). Φ_{Δ} sme určovali aj v DMF, keďže ide o biokompatibilnejšie rozpúšťadlo. Jeho hodnota bola 0,60, čo je neočakávané menej ako bolo publikované u 1,8,15,22-tetrakis(dibutylamino) Pc, ktorého hodnota bola 0,67.¹¹⁵ Naša látka **48Zn** obsahuje vo svojej štruktúre navyše atómy brómu, ktoré by mali práve naopak zvyšovať množstvo Φ_{Δ} na základe efektu ťažkého atómu. Rozdiel bol pravdepodobne spôsobený rozdielnymi experimentálnymi podmienkami.

Tabuľka 17. Fotofyzikálne parametre študovaných Pc.

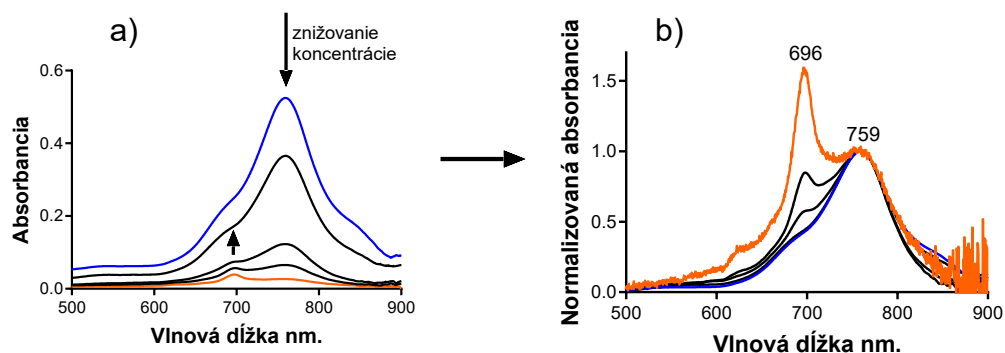
Pc	Φ_F THF	Φ_{Δ} THF	Φ_{Δ} DMF
48H	0,014	0,017	
48Zn	0,027	0,77	0,60

Nižšia hodnota Φ_{Δ} v DMF môže taktiež naznačovať, že vo vysoko polárnych rozpúšťadlách môže dochádzať k intramolekulárnemu prenosu náboja (ICT) z voľného elektrónového páru periférnych amínov na makrocyclické jadro. Účinnosť ICT, ktorá výrazne závisí na polarite rozpúšťadla bola popísaná pre iné aminoftalocyaníny, predovšetkým pre ich aza-analógy tetrapyrazinoporfyrazíny.¹¹⁸ Preto sme sa rozhodli ďalej študovať vlastnosti pripravených Pc v kyslom prostredí, kde môže dochádzať k protonizácii aminosubstituentov a tak k inhibícii ICT.

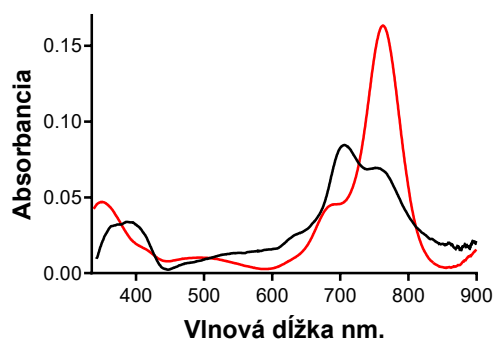
4.3.4 Protonizácia aminoftalocyanínov

Pri zriedení látky **48Zn** sme na jej absorpčnom spektre v chloroforme pozorovali nový absorpčný pás pri 696 nm (Obrázok 64). To nás priviedlo k myšlienke, že neperiférne amíny môžu byť jednoducho protonizované už aj pri stopovom množstve reziduálnej kyseliny v chloroforme, čo sa samozrejme prejaví viac v zriedenom roztoku, kde je vyššie množstvo molekúl kyseliny

na molekuly Pc. Takto protonizovaný dusík neprispieva do konjugovaného systému makrocyklu, a preto je Q pás posunutý smerom do modrej oblasti svetla. Túto teóriu sme potvrdili pridaním tetrabutylamónium hydroxidu do zriedeného roztoku látky **48Zn**, čo spôsobilo zmiznutie absorpčného pásu pri 696 nm a obnovenie pásu pri 759 nm, ktorý predstavuje monomérnu formu Pc (Obrázok 65).

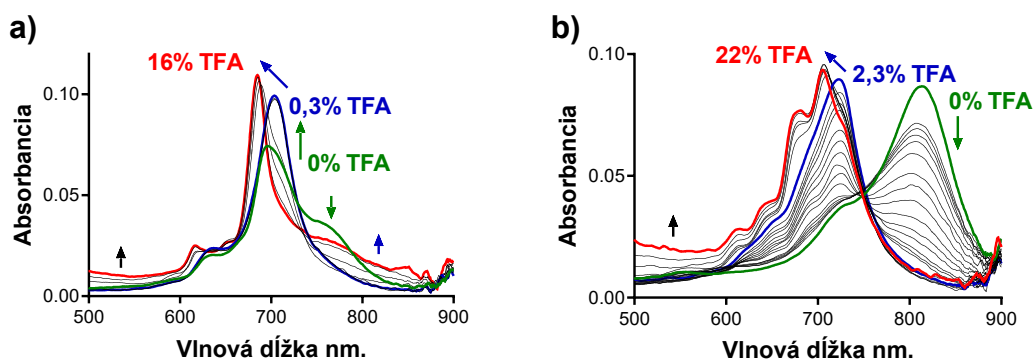


Obrázok 64. a) Absorpčné spektra, b) normalizované absorpčné spektrá látky **48Zn** v rôznych koncentráciách v chloroforme.



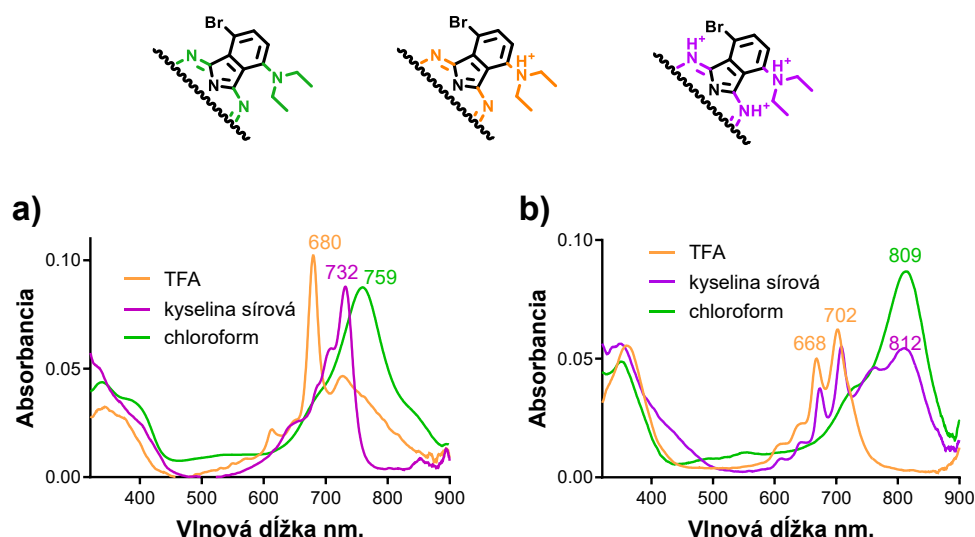
Obrázok 65. Absorpčné spektrá látky **48Zn** v chloroforme (čierna) a v chloroforme s 1% tetrabutylamónium hydroxidom (červená).

Nasledujúce podrobnejšie experimenty protonizácie kyselinou trifluóroctovou (TFA) prebiehali na oboch látkach **48H** aj **48Zn**. Pridaním TFA do roztoku **48Zn** v chloroforme dochádzalo k výraznému hypsochromnému posunu Q pásu (Obrázok 66a). Do 0,3% TFA sme pozorovali zvyšovanie absorpčného pásu pri 700 nm a znižovanie pásu pri 759 nm. Vyššia koncentrácia TFA spôsobila ďalší posun Q pásu až na vlnovú dĺžku 684 nm pri použití 16% TFA. Podobné trendy sme pozorovali aj pri látke **48H**, ale bazicita dusíkov bola výrazne nižšia. Na rozdiel od látky **48Zn**, bolo absorpčné spektrum látky **48H** v chloroforme takmer úplne v neprotonizovanej forme (Obrázok 66b). Prvý posun Q pásu sme pozorovali až pri 2,3% TFA. Vyššia koncentrácia TFA spôsobovala rozdelenie Q pásu s maximami absorpcie pri 670 a 707 nm.



Obrázok 66. Absorpčné spektrá látky a) **48Zn**, b) **48H** v chloroforme počas postupného pridávania TFA.

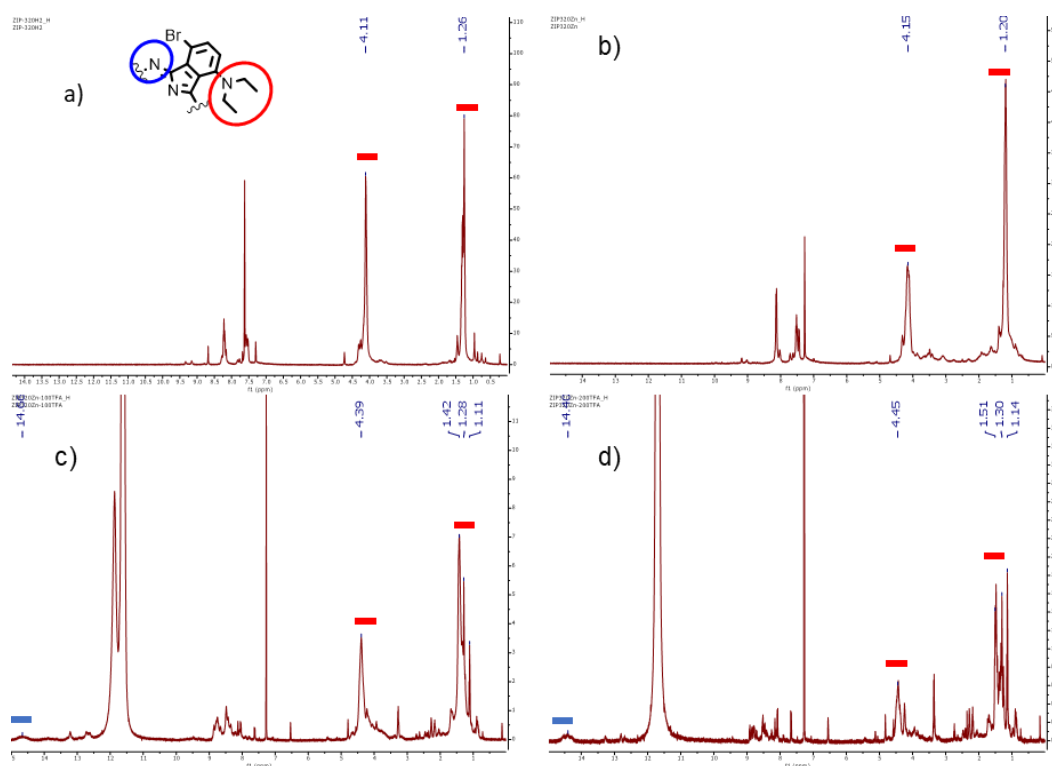
V ďalšom experimente sme použili čistú TFA ako rozpúšťadlo. Pri látke **48Zn** sme pozorovali Q pás pri 680 nm a taktiež tvorbu nového absorpčného pásu pri 732 nm (Obrázok 67a). Tento nový absorpčný pás môže predstavovať protonizáciu azometínových dusíkov makrocyku, ktorá sa prejavuje typickým posunom Q pásu do červenej oblasti spektra.⁶⁴ Následne sme látku **48Zn** rozpustili v silnejšej kyseline sírovej, čo spôsobilo kompletnú protonizáciu azometínových dusíkov s absorpčným maximom pri 632 nm (Obrázok 67a). Pri látke **48H** v TFA pravdepodobne nedochádza ani k čiastočnej protonizácii azometínových dusíkov, pretože na jej spektre sme pozorovali len rozdelenie Q pásu s maximami absorpcie pri 668 a 702 nm (Obrázok 67b). K protonizácii azometínových dusíkov došlo až v SA, pretože na absorpčnom spektre sme pozorovali znova typický posun do červenej oblasti spektra s maximom absorpcie pri 812 nm (Obrázok 67b). Nedochádzalo ale k úplne protonizácii azometínových dusíkov, pretože aj v koncentrovanej SA boli stále prítomné absorpčné pásy pri 668 a 702 nm.



Obrázok 67. Absorpčné spektrá látky a) **48Zn**, b) **48H** v chloroforme, kyseline trifluóroctovej (TFA) a kyseline sírovej.

Protonizáciu spôsobenú pridaním TFA do roztoku látky **48Zn** v chloroforme sme sledovali aj pomocou ^1H NMR spektroskopie a jej spektrá sme porovnávali so spektrom neprotonizovanej látky **48Zn** v chloroforme s pyridínom (Obrázok 68). So zvyšujúcim sa stupňom protonizácie sme pozorovali výrazný posun a rozštiepenie signálov N-CH₂. So zvyšujúcim sa

množstvom TFA dochádzalo k tvorbe nového širokého signálu pri 14,5 ppm, ktorý pravdepodobne patrí protonizovaným azometínovým dusíkom.



Obrázok 68. ^1H NMR (500 MHz) spektrá látky **48Zn** (7 mM) v a) $\text{CDCl}_3/\text{pyridín-}d_5$, b) CDCl_3 , c) 16% TFA v CDCl_3 , d) 29% TFA v CDCl_3 .

Vplyv protonizácie na fotofyzikálne vlastnosti látky **48Zn** sme sledovali pomocou fluorescenčnej spektroskopie a hodnôt kvantových výťažkov fluorescencie (Φ_F). Výsledné dáta sú uvedené v Tabuľke 18. Mierna protonizácia spôsobila výrazné zníženie Φ_F , keďže sme namerali hodnoty 0,0026 v chloroforme (ktorý je aj samostatne mierne kyslý, ako bolo diskutované vyššie), 0,0035 v chloroforme s 0,3% TFA a 0,0078 v DMF s 1,6% TFA. Neprorotonizovaná látka **48Zn** vykazovala takmer 10-násobne vyššie hodnoty Φ_F v THF, DMF a chloroforme neutralizovanom tetrabutylamónium hydroxidom (TBAH).

Tabuľka 18. Fluorescenčné vlastnosti látky **48Zn** v rôznych rozpúšťadlách s prídavkom TFA.

Rozpúšťadlo	Φ_F	λ_F/nm
THF	0,027	802
CHCl_3	0,0026	
CHCl_3 + TBAH	0,031	787
CHCl_3 + 0,3% TFA	0,0035	
CHCl_3 + 8% TFA	0,033	690
CHCl_3 + 16% TFA	0,040	690
DMF	0,020	806
DMF + 1,6% TFA	0,0078	
DMF + 8% TFA	0,021	698
DMF + 25% TFA	0,026	698
kyselina trifluóroctová	0,057	684
kyselina sírová	0,041	734

Vyššie množstvo TFA v roztoku viedlo k miernemu zvýšeniu Φ_F , čo môže byť spôsobené blokovaním ICT pri kompletnej protonizácii periférnych dietylamínov. Posun fluorescenčného maxima na hodnotu 690 nm znamená, že kompletne protonizovaná látka **48Zn** spôsobuje fluorescenčnú emisiu. Najvyššie hodnoty Φ_F sme namerali v čistej TFA (0,057), zatiaľ čo v silnejšej kyseline sírovej sme pozorovali mierne zníženie Φ_F na hodnotu 0,041. Je to pravdepodobne dôsledok protonizácie azometínových dusíkov.

4.3.5 Záver

Aj keď sa nám nepodarilo pripraviť pôvodne zamýšľaný Pc s ôsmimi dietylamino substituentmi v α polohe, pripravili sme 2 deriváty so štyrmi substituentmi. Tieto deriváty vykazovali zaujímavé vlastnosti v kyslom prostredí, kde dochádzalo najprv k protonizácii periférnych amínov a v prítomnosti silnejších kyselín aj k protonizácii azometínových dusíkov, čo sa prejavovalo posunmi Q pásu a taktiež zmenami v kvantových výťažkoch fluorescencie.

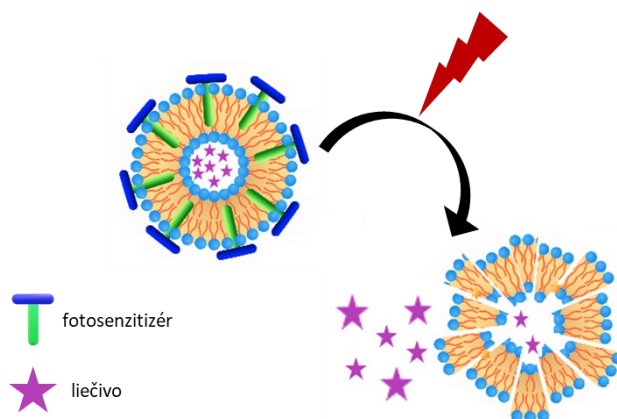
4.4 Svetlom aktivované uvoľňovanie liečiv

Z výsledkov tohto projektu je pripravený manuskript, ktorý aktuálne podlieha revíznemu konaniu.

Podiel autorov

Lucia Rychvalská mala na starosti charakterizáciu lipozómov, fotodegradáciu PS pôsobením svetla a peroxidáciu lipidov, meranie log P , spolupodieľala sa na experimentoch uvoľňovania inkorporovaných látok z lipozómov a na formálnej úprave dát. Michaela Beranová plánovala všetky fotofyzikálne experimenty, analyzovala výsledky experimentov a podieľala sa na texte originálneho draftu článku, vrátane všetkých grafov. Ján Kollár charakterizoval všetky látky, vrátane ich inkorporácie do lipozómov, spravil pilotné experimenty svetlom aktivovaného uvoľnenia látok inkorporovaných v lipozómoch. Filip Kostelanský syntetizovali niektoré Pc. Magdaléna Kozlíková a Marie Halášková sa venovali príprave prázdnych lipozómov aj lipozómom s inkorporovanou látkou. Miloslav Macháček vytvoril koncept projektu a vybral metódy, ktoré boli použité, podieľal sa na vyhodnocovaní dát a písaní článku. Miroslav Miletín a Veronika Nováková sa podieľali na písaní článku. Petr Zimčík sa podieľal na tvorbe konceptu projektu, vyhodnocovaní dát a písaní článku.

Svetlom aktivované uvoľňovanie liečiv z lipozómov využíva prítomnosť amfifilného PS, ktorý je inkorporovaný v membráne lipozómu a po ožiarení svetlom špecifickej vlnovej dĺžky (680 nm) dochádza k peroxidácii membrán lipozómov a k uvoľneniu látok z lipozómov (Obrázok 69).

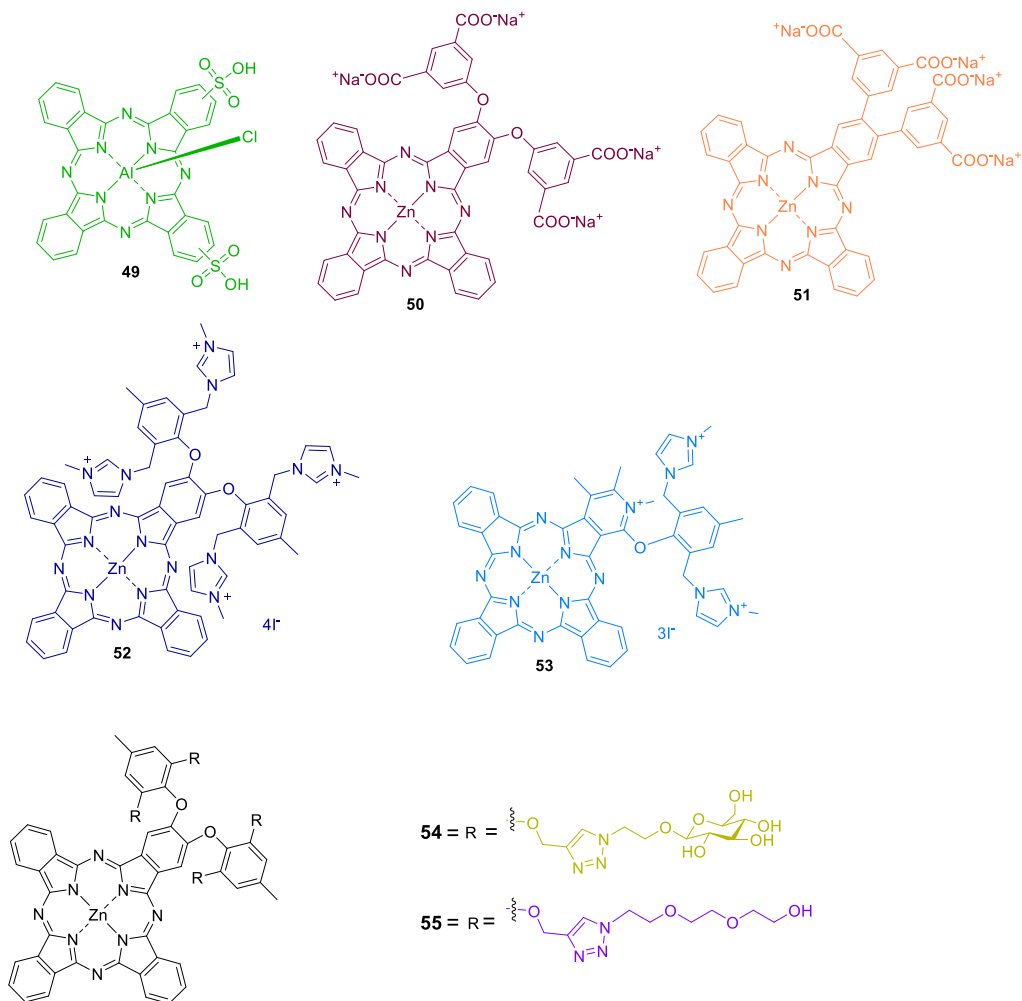


Obrázok 69. Princíp svetlom aktivovaného uvoľňovania liečiv.

V rámci tohto projektu boli ako PS použité 3 skupiny Pc, v minulosti pripravené našou výskumnou skupinou¹², skupinou prof. Makhseeda z Kuwaitu¹¹⁹ a jeden komerčne dostupný hlinitý Pc (Obrázok 70). Všetky látky sú asymetrické amfifilné Pc, ktoré ako hydrofilnú zložku obsahujú:

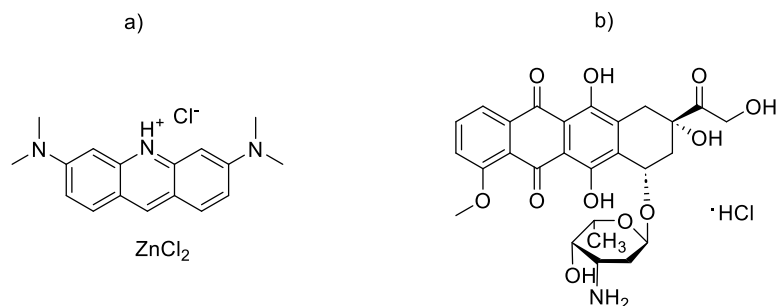
- anionické sulfónové funkčné skupiny – látka **49**,
- anionické karboxylové kyseliny (vo forme sodnej soli) – látky **50** a **51**,
- kationické kvartérne amóniové soli – látky **52** a **53**, pričom jeden kladný náboj u látky **53** je lokalizovaný aj na pyridínovom jadre, čím sa táto látka odlišuje od ostatných Pc,
- neionogénne funkčné skupiny: glukóza – látka **54** alebo pegylové reťazce – látka **55**.

Všetky látky obsahujú ako lipofilnú zložku 3 nesubstituované izoindolinové jednotky (respektíve 2 v prípade látky **49**), vďaka ktorým sú PS schopné zanoriť sa do membrány lipozómov.



Obrázok 70. Štruktúry použitých Pc.

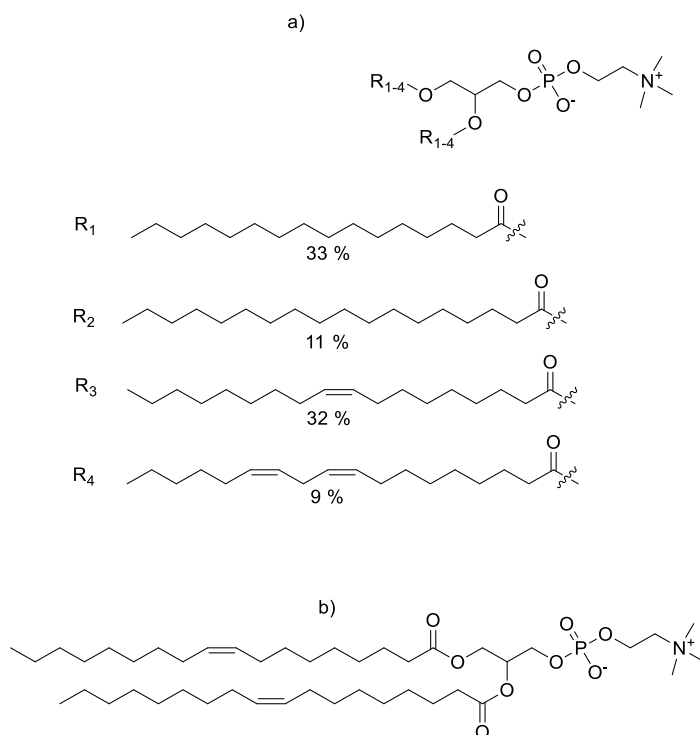
V rámci tohto projektu sme skúmali dve látky, ktoré sa nachádzajú vo vnútri lipozómov a po aktivácii svetlom sú uvoľnené do prostredia. Išlo o akridínovú oranž zásaditú (AO, Basic Orange 14) alebo doxorubicín (DOX). Ich štruktúry sú zobrazené na Obrázku 71. Ide o hydrofilné látky, ktoré sú už v rámci prípravy lipozómov inkorporované do ich dutiny. AO bola pôvodne použitá ako modelová látka, DOX mal byť už konkrétnym liečivom uvoľňovaným z lipozómov.



Obrázok 71. a) štruktúra AO, b) štruktúra DOX.

Pre porovnanie sme taktiež použili 2 druhy lipozómov:

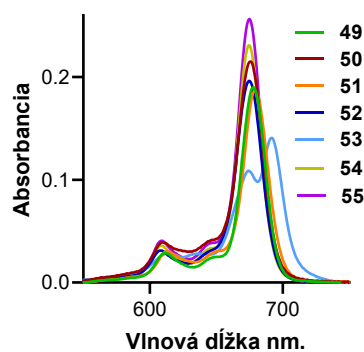
- EYPC lipozómy (egg yolk phosphatidylcholine) fosfatidylcholín (Obrázok 72a) v kombinácii s cholesterolom v pomere 55 : 45. Fosfatidylcholín vaječného žĺtka obsahuje nasýtené mastné kyseliny, a to predovšetkým kyselinu palmitovú (16 : 0, 33 %), steárovú (18 : 0, 11 %) a taktiež nenasýtené mastné kyseliny, ako kyselinu olejovú (18 : 1, 32 %) a linolovú (18 : 2, 9 %).¹²⁰ V kombinácii s DOX je schváleným liečivým prípravkom na jeho doručenie na miesto účinku v terapii rakoviny.
- DOPC lipozómy (1,2-dioleoyl-*sn*-glycerol-3-fosfatidylcholine), ktoré sa skladajú z dioleoylfosfatidylcholínu (DOPC) a cholesterolu v pomere 60 : 40. Vo svojej štruktúre obsahujú dve kyseliny olejové, preto obsahuje 2 nenasýtené dvojité väzby, a vďaka ktorým by malo byť uvoľnenie liečiv z lipozómov rýchlejšie (Obrázok 72b).



Obrázok 72 a) štruktúra EYPC, b) štruktúra DOPC

4.4.1 Fotofyzikálne vlastnosti PS

Všetky PS absorbujú v DMSO v červenej oblasti viditeľného spektra s maximom Q-pásu okolo 680 nm (Obrázok 73). Rozdelenie Q-pásu pri látke **53** je spôsobené nesymetrickým jadrom, ktorý obsahuje jeden kvartérny náboj na pyridínovom jadre.



Obrázok 73. Absorpčné spektrá Pc v DMSO.

Všetky látky majú relatívne vysoký kvantový výťažok fluorescence Φ_F . Najvyšší bol pri látke **49** (0,62), pri ostatných látkach sa pohyboval v rozmedzí 0,2 – 0,3 (Tabuľka 14). Čo sa týka kvantového výťažku singletového kyslíka Φ_Δ , tak všetky zinočnaté Pc ho mali vysoký 0,4 – 0,5. Na druhej strane hlinitý Pc **49** mal Φ_Δ len okolo 0,2. Vyšší Φ_F a súčasne nižší Φ_Δ a naopak, sú v súlade s efektom ťažkého atómu, na základe ktorého dochádza viac k medzi systémovému prechodu a tvorbe singletového kyslíka u ťažších centrálnych iónov (zinočnatých) na úkor fluorescence.¹²¹ Úroveň lipofility sme odhadli určením rozdeľovacieho koeficientu vyjadreného ako $\log P$ (Tabuľka 19). Pri porovnaní kationných a aniónnych Pc sme zistili, že negatívne nabité karboxylové skupiny látok **50** a **51** zvyšujú hydrofilitu Pc viac ako kladné náboje na Pc **52** a **53**. Najlipofilnejšou je látka **55**, ktorá obsahuje 4 pegylové reťazce.

Tabuľka 19. Fotofyzikálne parametre Pc v DMSO.

Látka	Φ_F	Φ_Δ	$\log P$
49	0,62	0,20	-0,49
50	0,35 ^a	0,42 ^a	-2,33
51	0,31 ^a	0,41 ^a	-2,27
52	0,26	0,38	-0,90
53	0,23	0,44	1,45
54	0,20	0,51	-1,21
55	0,24	0,54	1,62

^akvôli problém s rozpustnosťou, boli tieto látky v tomto experimente vo forme voľnej kyseliny

4.4.2 Charakterizácia lipozómov

Lipozómy boli pripravené hydratáciou filmu lipidov a následnou opakovanou extrúziou cez dva 100 nm polykarbonátové filtre. Po sformulovaní lipozómov boli do nich následne vložené skúmané látky (AO a DOX) pomocou difúzie a s využitím rozdielneho pH vnútri a mimo lipozómov. Tým že sa vytvorilo zásaditejšie vonkajšie prostredie lipozómov, došlo k vytvoreniu ionizačného spádu a skúmané látky sú aktívne „nasávané“ do vnútra lipozómov.

Obidva typy lipozómov boli charakterizované veľkosťou a zeta potenciálom pred a po ožiarení 10 min pomocou laserovej diódy (685 nm, 400 mW/cm²) pomocou DLS (dynamic light scattering). Konkrétne hodnoty sú uvedené v Tabuľke 20. Veľkosť lipozómov bez AO/DOX bola približne rovnaká okolo 95 nm. Po pridaní AO/DOX do lipozómov sa ich veľkosť mierne zvýšila (u AO) alebo znížila (u DOX). Po pridaní PS sa veľkosť lipozómov veľmi nezmenila, stále boli lipozómy obsahujúce AO trochu väčšie ako tie, ktoré obsahovali DOX. Po ožiarení a uvoľnení

liečiva sa veľkosť lipozómov taktiež nezmenila, čo znamená, že po peroxidácii lipidov dochádza znova k reformulovaniu lipozómov do rovnako veľkých častíc ako pred ožiarení. U zeta potenciálu sme nepozorovali viditeľné rozdiely medzi rôznymi druhmi lipozómov ani medzi rôznymi liečivami či Pc. Stále sa pohybovali v záporných hodnotách okolo -10 až -20 mV.

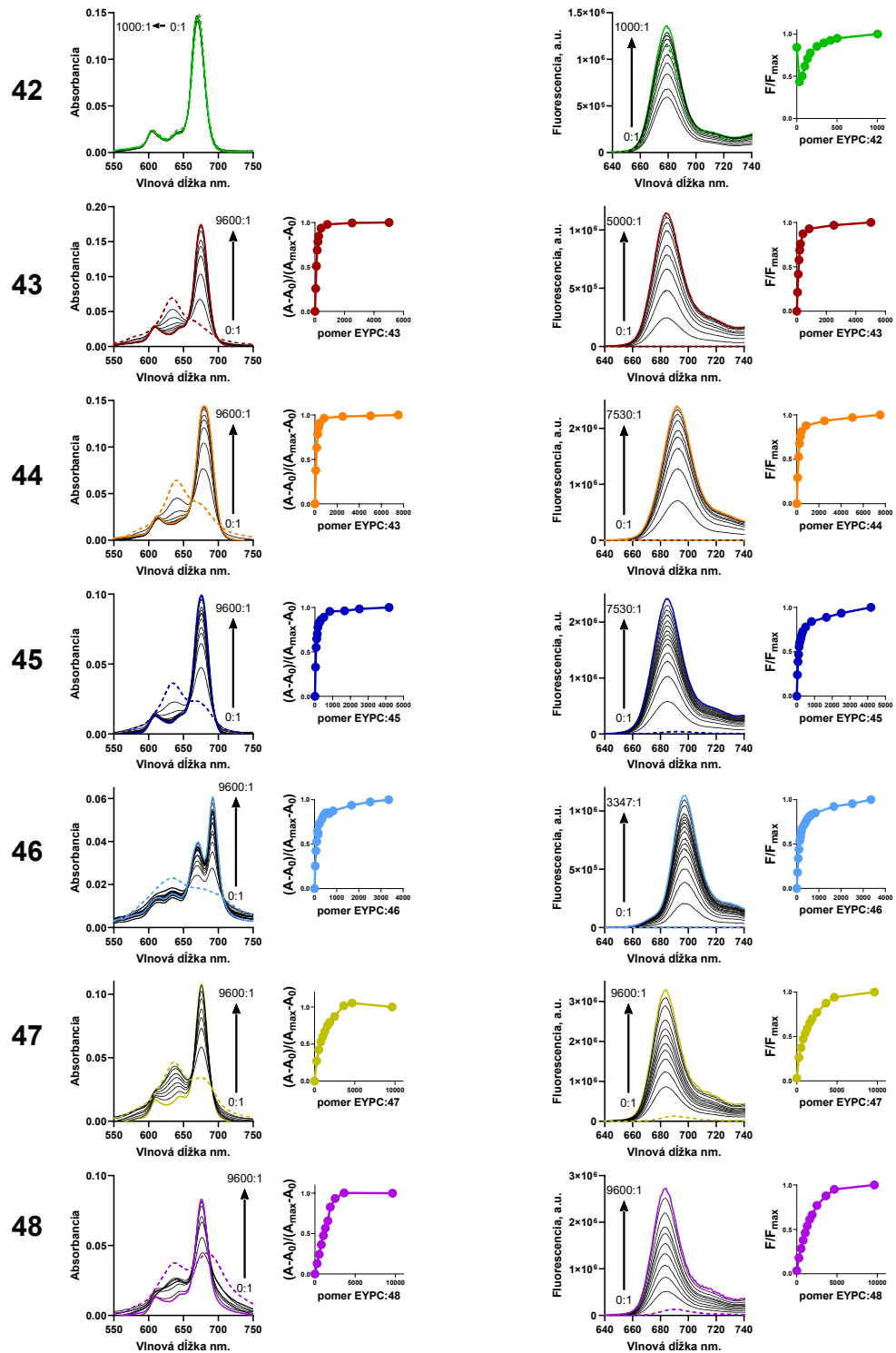
Tabuľka 20 Veľkosť, polydisperzný index (Pdl) a zeta potenciál všetkých kombinácií lipozómov, liečiv a PS

PS	Liečivo	Lipozómy	Veľkosť / nm, (Pdl)		Zeta potenciál (mV)	
			Tma	Po ožiarení	Tma	Po ožiarení
		EYPC	98,82 (0,071)		-16,07	
		DOPC	94,22 (0,065)		-11,50	
	AO	EYPC	100,73 (0,059)	102,33 (0,082)	-10,97	-11,00
		DOPC	110,16 (0,101)	106,93 (0,089)	-10,25	-8,89
	DOX	EYPC	85,43 (0,055)	85,58 (0,049)	-19,17	-19,70
		DOPC	93,29 (0,045)	92,82 (0,071)	-14,37	-15,40
49	AO	EYPC	87,31 (0,063)	88,73 (0,051)	-14,37	-14,57
		DOPC	84,53 (0,073)	84,71 (0,092)	-8,02	-8,48
	DOX	EYPC	86,93 (0,057)	85,78 (0,072)	-18,57	-16,77
		DOPC	82,24 (0,073)	82,49 (0,077)	-9,72	-9,22
50	AO	EYPC	102,76 (0,067)	101,56 (0,080)	-14,37	-11,63
		DOPC	113,16 (0,107)	111,9 (0,113)	-14,63	-14,87
	DOX	EYPC	86,73 (0,060)	87,11 (0,046)	-20,60	-23,17
		DOPC	81,35 (0,073)	82,30 (0,061)	-9,84	-9,99
51	AO	EYPC	103,4 (0,065)	102,43 (0,081)	-13,03	-12,57
		DOPC	112,83 (0,117)	110,7 (0,111)	-16,07	-16,00
	DOX	EYPC	86,39 (0,047)	86,63 (0,059)	-21,40	-21,43
		DOPC	80,91 (0,080)	82,69 (0,053)	-8,04	-8,06
52	AO	EYPC	102,16 (0,074)	105,20 (0,094)	-5,86	-6,95
		DOPC	110,56 (0,071)	108,13 (0,105)	-6,10	-7,81
	DOX	EYPC	86,95 (0,075)	87,78 (0,065)	-15,77	-15,07
		DOPC	93,34 (0,056)	94,61 (0,061)	-10,34	-12,90
53	AO	EYPC	102,73 (0,067)	101,70 (0,076)	-8,77	-8,89
		DOPC	115,53 (0,070)	109,63 (0,041)	-10,12	-11,53
	DOX	EYPC	86,96 (0,112)	87,51 (0,113)	-21,13	-20,70
		DOPC	94,81 (0,056)	94,33 (0,040)	-14,13	-13,47
54	AO	EYPC	122,73 (0,1413)	120,23 (0,1093)	-3,62	-3,69
		DOPC	119,07 (0,1903)	122,97 (0,1467)	-13,70	-7,33
	DOX	EYPC	87,98 (0,0873)	87,16 (0,058)	-18,83	-18,67
		DOPC	99,71 (0,0513)	100,66 (0,075)	-5,28	-5,35
55	AO	EYPC	124,13 (0,1637)	119,90 (0,1293)	-3,53	-4,76
		DOPC	119,57 (0,124)	121,67 (0,163)	-14,83	-17,50
	DOX	EYPC	100,15 (0,1043)	100,38 (0,112)	-7,08	-6,63
		DOPC	94,83 (0,0863)	96,9 (0,0713)	-23,27	19,30

4.4.3 Interakcia PS s lipozómami

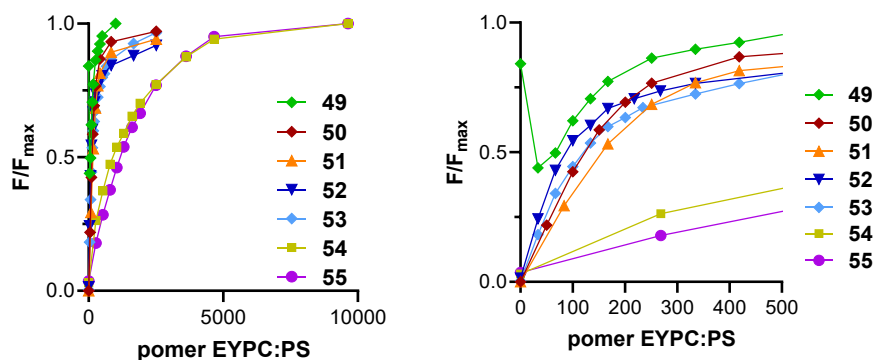
Aj keď všetky PS obsahujú vo svojej štruktúre hydrofilné funkčné skupiny, po ich rozpustení v PBS (phosphate buffered saline, pufovaný fyziologický roztok) dochádza k ich silnej agregácii, čo sa prejavuje zmenou tvaru absorpčného spektra a minimálnou fluorescenciou. Postupným pridávaním prázdnych EYPC lipozómov dochádzalo k monomerizácii PS, keďže tvar spektra sa podobal na spektrum v DMSO (Obrázok 73) a taktiež narastala intenzita fluorescencie. Rozdiel bol len pri látke **49**, pri ktorej sme pozorovali monoméne absorpčné spektrum aj bez pridania EYPC lipozómov (Obrázok 74). Na spektre bol viditeľný len

zanedbateľný hypsochromný posun o 2 nm. Taktiež už počiatková intenzita fluorescence bola pri látke **49** relatívne vysoká. Po prvom prídavku EYPC intenzita fluorescence spadla približne na polovicu, ale postupným pridávaním EYPC sme pozorovali nárast fluorescence, pričom konečná hodnota bola vyššia ako počiatková hodnota fluorescence. Tým sme potvrdili, že aj pri látke **49** dochádza k interakcii s EYPC lipozómami.



Obrázok 74. Zmeny v absorpčnom a fluorescenčnom spektre Pc postupným pridávaním EYPC lipozómov. Závislosť absorpčného maxima Q-pásu alebo fluorescenčného maxima na pomere EYPC : Pc.

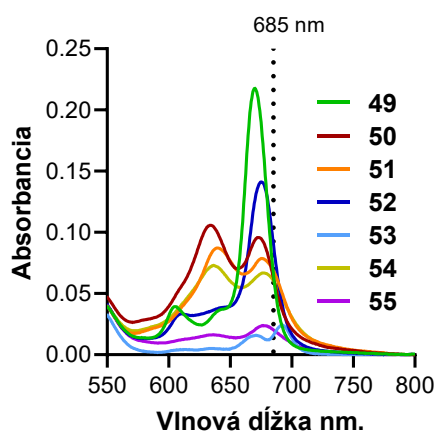
Väzbové izotermy (Obrázok 75) boli pri látkach **49** – **53** približne rovnaké, pričom mierne sa líšili v tom, kedy bolo dosiahnuté plató, približne to bolo v pomere 500 : 1. Výrazný rozdiel v interakcii s lipozómami sme pozorovali ale pri látkach **54** a **55**, pri ktorých dochádzalo k fáze plató až pri pomere približne 8000 : 1, a teda bolo potrebné väčšie množstvo lipozómov na dosiahnutie monomerizácie týchto látok.



Obrázok 75. Závislosť fluorescenčného maxima na pomere EYPC : PS v PBS, vpravo zväčšená časť grafu vľavo.

V rámci porovnania katiónnych a aniónnych PS môžeme povedať, že kladne nabité látky **52** a **53** dosahovali monomerizáciu pri nižšej koncentrácii EYPC v porovnaní so záporne nabitými látkami **50** a **51**. Interakcia prebiehala nezávisle na lipofilite látok, keďže aj najhydrofilnejšie látky **50** a **51** sa interkalovali dobre do lipidovej membrány lipozómov. Na druhej strane, aj keď majú látky **54** a **55** veľký rozdiel v hodnote log P, obidve sa interkalovali do lipozómov výrazne horšie ako ostatné PS a až pri vyšších koncentráciách EYPC. To môže byť spôsobené výrazne väčšou veľkosťou hydrofilnej časti, ktorá zostáva mimo lipidovú dvojvrstvu a zrejme neumožňuje interkaláciu viacerých molekúl na povrch.

Pre ďalšie experimenty bol zvolený pomer 50 : 1 pre lipozómy : Pc, keďže tento pomer v minulosti viedol k najkratšiemu polčasu uvoľnenia liečiva z lipozómov u látky **52**.⁷⁴ Absorpčné spektrá všetkých látok pri tomto pomere s EYPC sú na Obrázku 76. Látky **49** a **52** sú pri tomto množstve lipozómov monomérené, látka **53** je čiastočne agregovaná, ale ostatné látky **50**, **51**, **54** a **55** sú agregované.



Obrázok 76. Absorpčné spektrá látok pri pomere 50 : 1 pre EYPC : Pc, zvislá čiara reprezentuje vlnovú dĺžku použitého laseru.

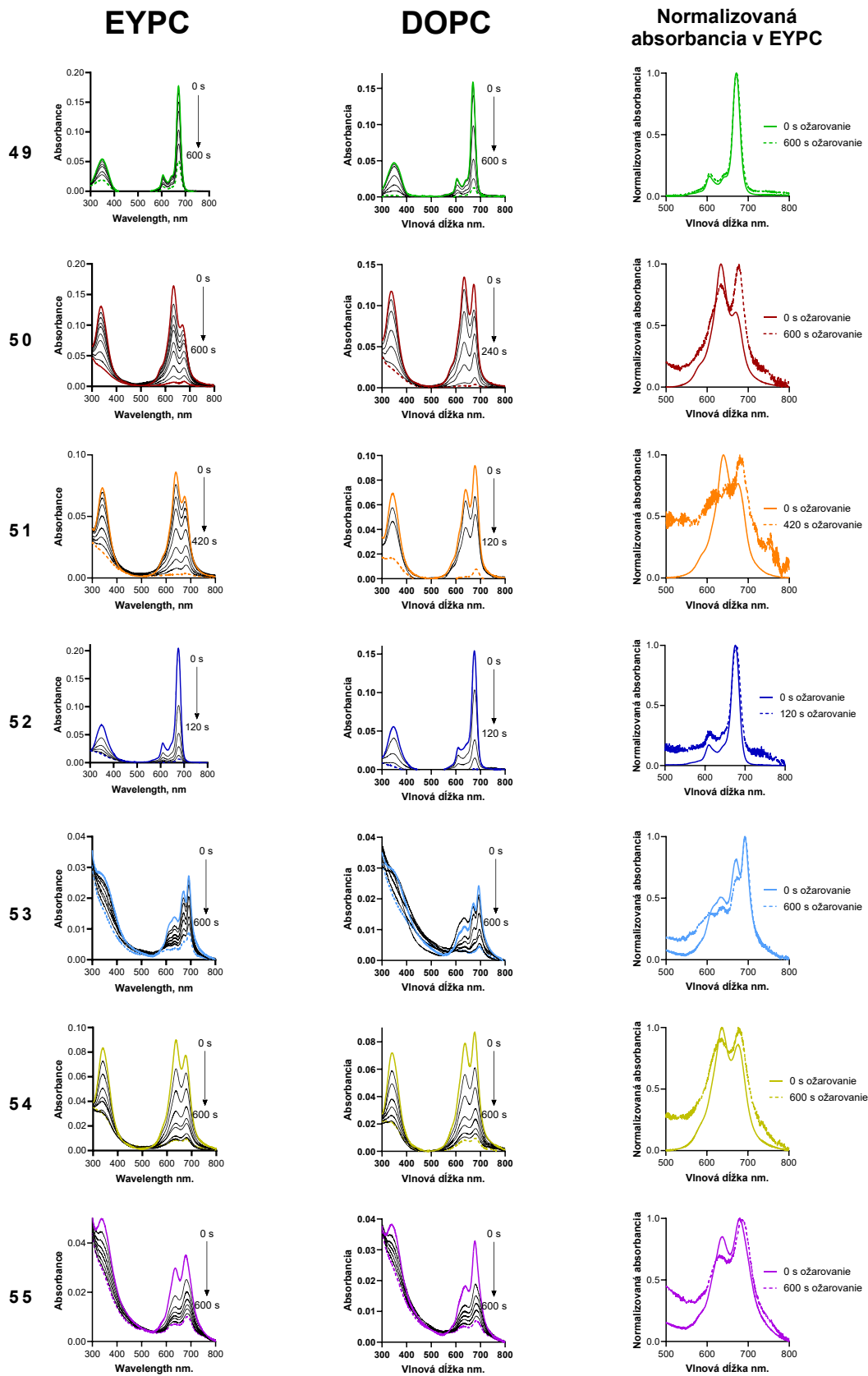
4.4.4 Fotostabilita PS v lipozómoch

4.4.4.1 Rozklad PS pôsobením svetla v lipozómoch

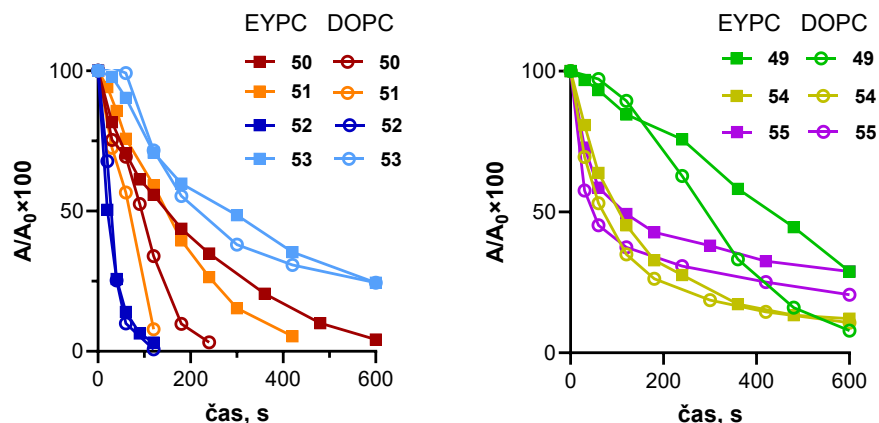
Aj keď sú Ps považované za stabilné látky, pôsobením svetla dochádza k ich nežiaducemu rozkladu (tzv. photobleaching). Dôvodom rozkladu Pc sa obecné udáva produkovaný singletový kyslík. Rozložený Pc už ďalej nemôže produkovať singletový kyslík, a preto sa potom stáva neúčinným (pri PDT aj pri peroxidácii lipidov lipozómov). Miera rozkladu Pc závisí aj na prostredí, v ktorom sa Pc nachádza, preto sme v našom prípade sledovali ich rozklad v lipozómoch.

Rozklad PS v oboch typoch prázdnych lipozómov (bez AO/DOX) sme sledovali ako zmenu absorpčného spektra po ožiarení laserom (685 nm, 400 mW/cm²). Po ožiarení dochádzalo k zníženiu absorbancie v celej oblasti spektra (Obrázok 77) a nedochádzalo k tvorbe nových absorpčných pásov, čo znamená, že dochádza k úplnému rozkladu Pc, nie len k jeho modifikácii štruktúry. V priebehu ožiarovania dochádzalo taktiež ku kvalitatívnym zmenám v absorpčnom spektre Pc v oblasti Q-pásu. Po čiastočnom rozklade PS sa zvýšil pomer lipozómy : Pc, a preto na konci ožiarovania majú PS síce nižšiu absorbanciu, ale zato monoménernejšie spektrum ako na začiatku pred ožiarovaním (príklad pre EYPC lipozómy je na Obrázku 77 vpravo).

Najrýchlejšie prebiehal rozklad látky **52**, kde už za 2 minúty bola látka takmer úplne rozložená (Obrázok 78). Najpomalšie dochádzalo k rozkladu látky **49**, pričom rýchlejšie to bolo v DOPC lipozómoch v porovnaní s EYPC. Takisto pri všetkých ostatných látkach prebiehal rozklad rýchlejšie v DOPC lipozómoch okrem látky **52**, u ktorej sme žiaden rozdiel nepozorovali a látka sa rozkladala rýchlo v oboch typoch lipozómov.



Obrázok 77. Absorpčné spektrá Pc v prítomnosti prázdnych EYPC alebo DOPC lipozómov po postupnom ožiarovaní, vpravo normalizované absorpčné spektrá pred a po ožiarení v EYPC lipozómoch.



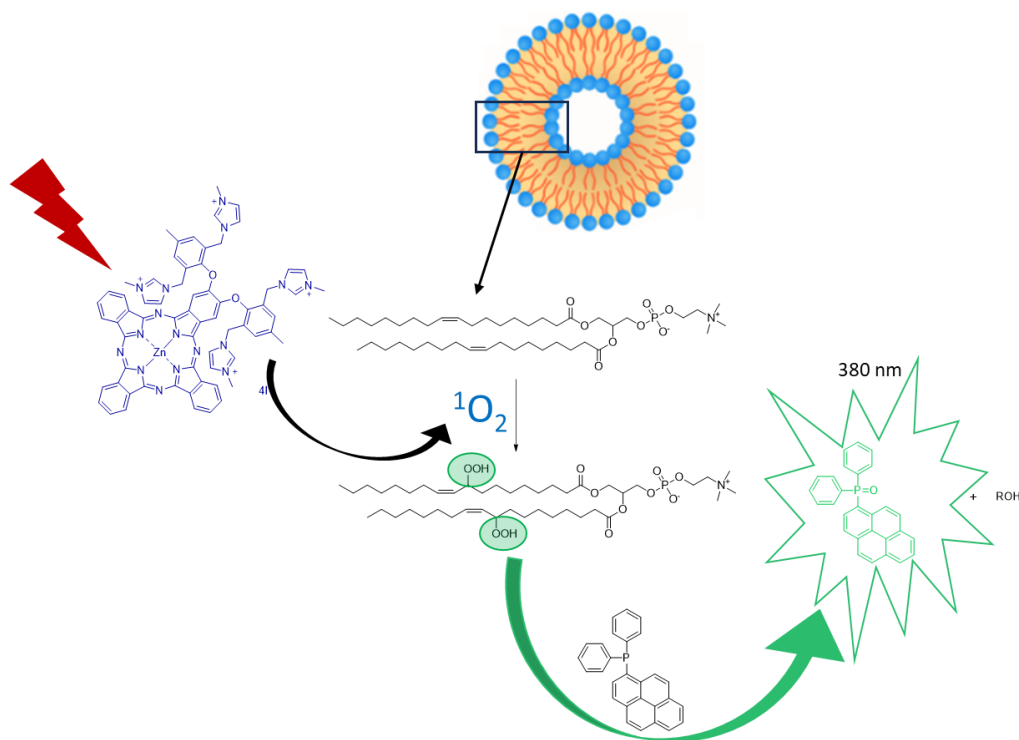
Obrázok 78. Rýchlosť rozkladu Pc v PBS v lipozómoch.

Rýchlosť rozkladu látok svetlom závisí okrem stability Pc jadra hlavne na množstve produkovaného singletového kyslíka ako sebadeštruktívneho agens. To závisí na viacerých faktoroch, ako napríklad na kvantovom výťažku singletového kyslíka (Φ_{Δ}), jeho dobe života, agregácii Pc a hodnote absorpcie pri excitačnej vlnovej dĺžke (to súvisí s množstvom absorbovaných fotónov). V PBS je väčšina látok agregovaná a aj v prítomnosti lipozómov v pomere 50 : 1 sú látky stále zväčša agregované. Neplatí to pre látku **52**, ktorá je monomérna, teda produkuje najviac singletového kyslíka, a preto sa rozkladá najrýchlejšie. Látka **49** je taktiež monomérna v prítomnosti lipozómov, ale na základe efektu ťažkého atómu majú hlinité Pc nižší Φ_{Δ} ako zinočnaté Pc, preto ani takmer úplná monomerizácia látky **49** nestačí na vysokú produkciu singletového kyslíka a látka sa rozkladá pomaly. Látky **50** a **51** sú v PBS viac agregované ako látky **49**, preto produkujú menej singletového kyslíka a rozkladajú sa pomalšie. Látka **53** je síce čiastočne monomérna pri prítomnosti lipozómov, ale jej absorpcia je oveľa nižšia ako u ostatných Pc, preto produkuje menej singletového kyslíka a rozkladá sa pomalšie. Látky **54** a **55** sa v prvých sekundách rozkladali rýchlo, ale od 200 – 300 sek. dochádzalo už k fáze plató a ďalej sa tieto látky nerozkladali. Aj po 10 min neboli tieto látky úplne rozložené, na rozdiel od látok **50** – **52**.

4.4.4.2 Fotoperoxidácia lipidov

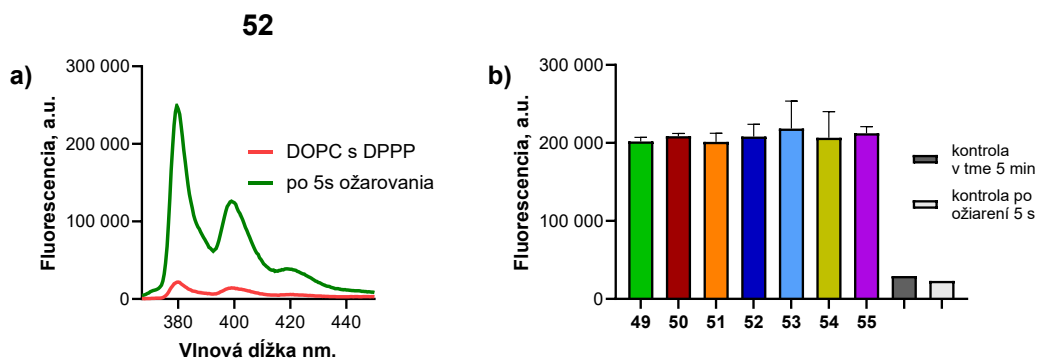
Hlavným mechanizmom uvoľnenia obsahu lipozómov je fotoperoxidácia lipidov, čo spôsobuje narušenie ich membrány a následné uvoľnenie látok z vnútorného prostredia lipozómov. Fotoperoxidáciu sme sledovali len v DOPC lipozómoch, pretože majú viac dvojitých väzieb, ktoré je možné oxidovať.

Fotoperoxidáciu lipidov DOPC lipozómov sme sledovali pomocou difenyl(pyren-1-yl)fosfínu (DPPP). Táto molekula sama o sebe nemá žiadnu fluorescenciu, ale po reakcii s hydroperoxidmi, ktoré vznikajú po ožiarení lipozómov s inkorporovaným PS a po tvorbe singletového kyslíka, vzniká DPPP-oxid, ktorý sa prejavuje výraznou fluorescenciou pri 380 nm (Obrázok 79).¹²²



Obrázok 79. Ožiarenie PS spôsobuje tvorbu singletového kyslíka, ktorý spôsobuje peroxidáciu lipidov lipozómu a následne tieto peroxidy reagujú s DPPP za tvorby DPPP-oxidu s výraznou fluorescenciou.

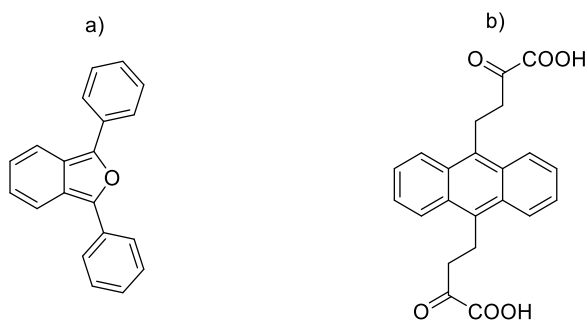
Už po 5 sekundách ožiarovania DOPC lipozómov s inkorporovaným DPPP sme pozorovali prudký nárast fluorescencie pri 380 nm, ktorá ale po ďalšom ožiarovaní už len klesala (zrejme dochádzalo k rozkladu DPPP-oxidu produkovaným singletovým kyslíkom). Preto sme každý PS v DOPC ožiarovali len 5 sekúnd v troch opakovaní. Hodnoty fluorescencie dosahovali približne rovnaké hodnoty u všetkých PS (Obrázok 80b), teda tvorba hydroperoxidov prebieha nezávisle na použítom Pc, teda zrejme došlo už k reakcii všetkých dostupných molekúl DPPP aj po takto krátkej dobe ožiarovania. Ako kontroly sme spravili ožiarovanie samotných DOPC lipozómov bez PS a kontrolu v tme. Po 5 s ožiarovania prázdnych lipozómov sme tiež pozorovali malý nárast fluorescencie, ktorý bol ale výrazne nižší ako po 5 s ožiarovania lipozómov s PS. V prípade kontroly v tme (5 min miesto 5 s) fluorescencia síce mierne narástla ale len minimálne v porovnaní s ostatnými vzorkami.



Obrázok 80. a) fluorescenčné emisné spektrum DOPC lipozómov s DPPP a PS 52, b) hodnoty fluorescencie DOPC lipozómov s DPPP s rôznymi PS po ožiarení laserom 5 sekúnd a kontroly bez PS.

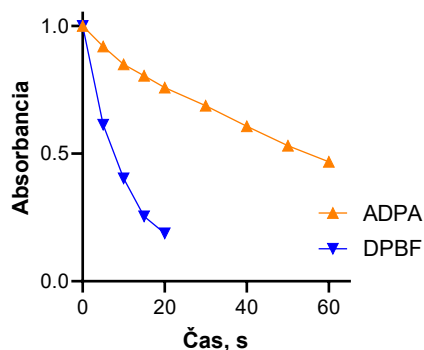
4.4.5 Tvorba singletového kyslíka v lipozómoch

Najčastejšie sa meria množstvo singletového kyslíka nepriamo pomocou chemickej pasce (scavengeru) 1,3-difenylobenzofuránu (DPBF, Obrázok 81a), ktorý reaguje cykloadičnou reakciou so vznikajúcim singletovým kyslíkom, a tým dochádza k otvoreniu furánového jadra a k zmene jeho absorpčného spektra. Tento postup je v našej skupine bežný a využívame ho na určenie kvantových výťažkov singletového kyslíka u väčšiny látok.^{12, 56, 69, 123}



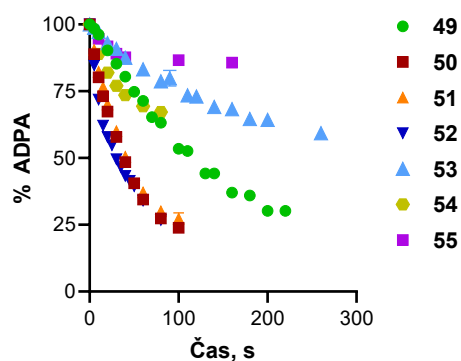
Obrázok 81. a) štruktúra DPBF, b) štruktúra ADPA

V našom prípade ale po ožiarení lipozómov s inkorporovaným PS dochádzalo k veľmi rýchlemu rozkladu DPBF (Obrázok 82), ktorý by bol veľmi nepraktický z experimentálneho hľadiska pre priame porovnanie medzi jednotlivými látkami, preto sme v tomto prípade zvolili namiesto neho stabilnejšiu antracén-9,10-dipropiónovú kyselinu (ADPA, Obrázok 81b). U ADPA dochádza k cykloadičnej reakcii na centrálnom kruhu, a tým k porušeniu konjugovaného systému antracénu.



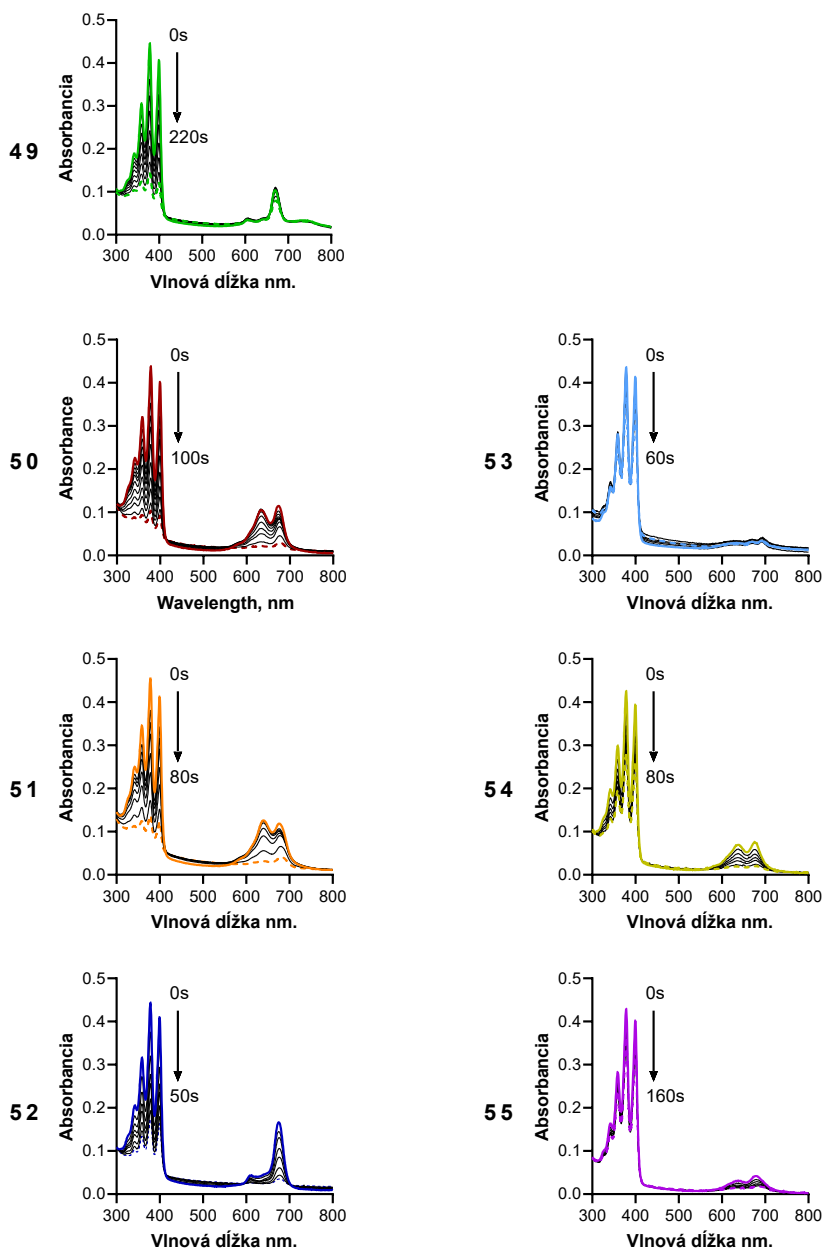
Obrázok 82. Rozklad DPBF a ADPA pôsobením singletového kyslíka.

Následne sme sledovali rozklad ADPA po ožiarení laserom (685 nm) v prítomnosti DOPC lipozómov s inkorporovanými PS.



Obrázok 83. Rozklad ADPA po ožiarení PS v DOPC lipozómoch.

ADPA sa rozkladala najrýchlejšie pri látkach **50 – 52**, keďže už po niečo vyše minúty kleslo množstvo ADPA na 25 % (Obrázok 83). Keďže dochádzalo aj k rýchlemu rozkladu daných PS (Obrázok 84), s ďalším ožiarovaním už nedochádzalo k ďalšiemu rozkladu ADPA, pretože už v lipozómoch bolo malé množstvo PS a nedochádzalo k ďalšej tvorbe singletového kyslíka. Látka **53** sa síce rozkladala pomalšie, ale keďže má nízku absorpciu v maxime Q-pásu a je viac agregovaná, tak nedochádza k vysokej tvorbe singletového kyslíka a aj po 4 minútach bola ADPA rozložená len na 60 %. Látka **49** je monoméerna a rozkladá sa pomaly, čo by naznačovalo vysokú produkciu singletového kyslíka a rýchly rozklad ADPA, ale keďže ide o hlinitý Pc, na základe efektu ťažkého atómu neprodukuje vysoké množstvo singletového kyslíka, preto dochádza k pomalšiemu rozkladu ADPA. Pri látkach **54** a **55** dochádzalo k výrazne pomalšiemu rozkladu ADPA v porovnaní s ostatnými PS, ktoré sa rozložili len na 70 %, respektíve 85 %. Je to preto, lebo PS sú viac agregované a taktiež majú nízku absorpciou pri vlnovej dĺžke použitého lasera (685 nm), a preto nedochádzalo k tvorbe vysokého množstva singletového kyslíka. K ďalšiemu ožiarovaniu už nedošlo, pretože látky boli už takmer úplne rozložené.



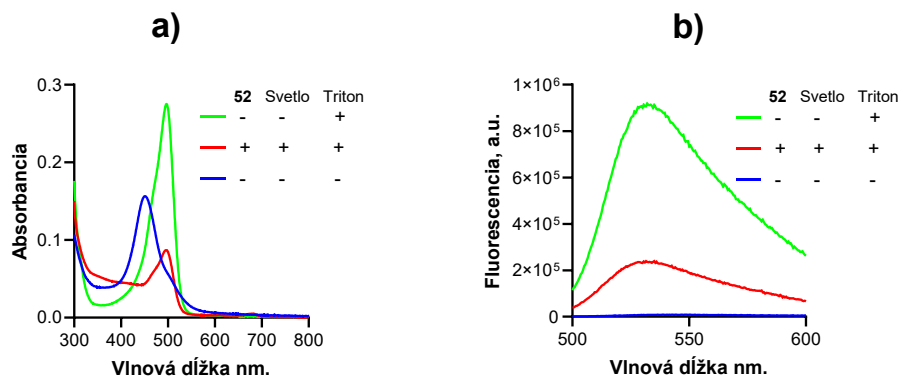
Obrázok 84. Absorpčné spektrá PS v DOPC lipozómoch a rozklad ADPA po ožiarení v závislosti na čase.

4.4.6 Svetlom aktivované uvoľnenie liečiv z lipozómov

V prvom rade sme ako modelovú látku zvolili AO a následne sme experimenty zopakovali s DOX pre potvrdenie dosiahnutých výsledkov.

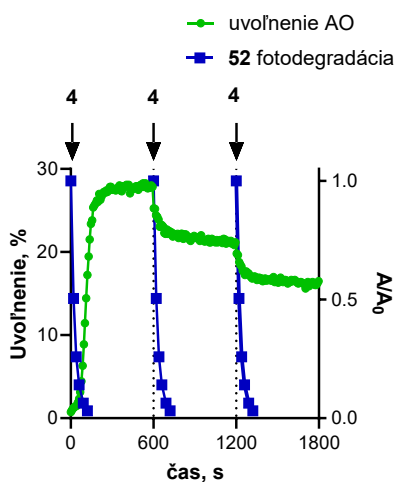
4.4.6.1 Vlastnosti AO v EYPC lipozómoch

AO je vo vyšších koncentráciách agregovaná, čo sa prejavuje zmenami absorpčného spektra a výrazným znížením fluorescencie. V nasledujúcich experimentoch uvoľňovania liečiva svetlom bola AO v lipozómoch vo vysokej koncentrácii a bola teda agregovaná (Obrázok 85). Po uvoľnení z lipozómov dochádza k jej monomerizácii, čo sa prejavuje zvýšením fluorescenčnej intenzity, ktorá bola použitá na monitorovanie množstva uvoľneného liečiva.



Obrázok 85. a) absorpčné a b) fluorescenčné spektrá AO v EYPC lipozómoch.

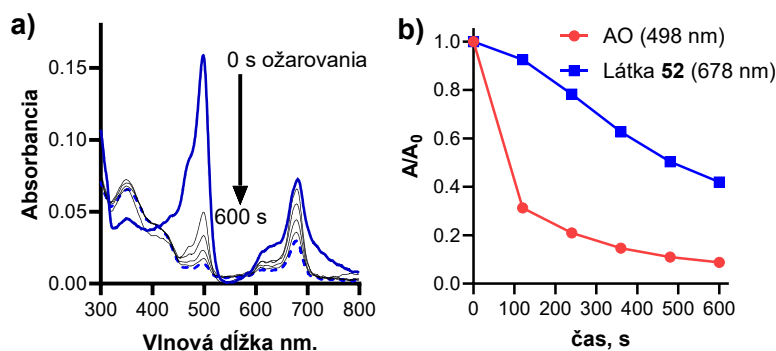
Na vyhodnotenie množstva uvoľneného liečiva sme k vzorke po 10 minútach ožiarovania pridali ešte Triton X-100, ktorý spôsobil narušenie lipozómov a celý zvyšok obsahu bol uvoľnený do prostredia a súčasne dochádzalo k monomerizácii AO. Pri prvotnom experimente uvoľňovania AO z lipozómov s látkou **52** sme nedosiahli kompletne uvoľnenie AO, pretože po pridaní Tritonu dosiahla intenzita fluorescencie menej ako 30 % očakávanej intenzity (Obrázok 85b). Za 100% uvoľnenie bola považovaná hodnota intenzity fluorescencie lipozómov s AO a prídavkom Tritonu (bez PS a bez ožiarovania). Keďže ožiarovaním dochádzalo k fotodegradácii PS (Obrázok 77), nízka hodnota uvoľnenia AO mohla byť spôsobená tým, že PS sa rozložil ešte skôr ako došlo ku kompletnému uvoľneniu AO. Keď sme ale po 10 minútach ožiarovania pridali znovu ďalšie množstvo PS, množstvo uvoľneného AO sa nezvýšilo, ale naopak znížilo (Obrázok 86). To naznačuje, že AO sa ožiarovaním rozkladá pôsobením singletového kyslíka a nedochádza teda k jej nekompletnému uvoľneniu z lipozómov.



Obrázok 86. Uvoľnenie AO z EYPC lipozómov (zelený graf, ľavá os) s látkou **52**. Šípky označujú ďalšie prídavky rovnakého množstva látky **52** ako na začiatku. Pre porovnanie modrý graf zobrazuje fotodegradáciu látky **52** (pravá os).

Podľa literatúry sa AO rozkladá reaktívnymi formami kyslíka a dochádza buď k dealkylácii, čo vedie k malému posunu absorpčného spektra, alebo k rozkladu na menšie molekuly, ktoré nemajú žiadnu absorpciu v pôvodnej vlnovej dĺžke.^{124, 125} Aby sme potvrdili tento rozklad AO, skúsili sme ožiarovať AO s látkou **52** v chloroforme, pretože látka **52** je v chloroforme monomérna a doba života singletového kyslíka v chloroforme je výrazne dlhšia

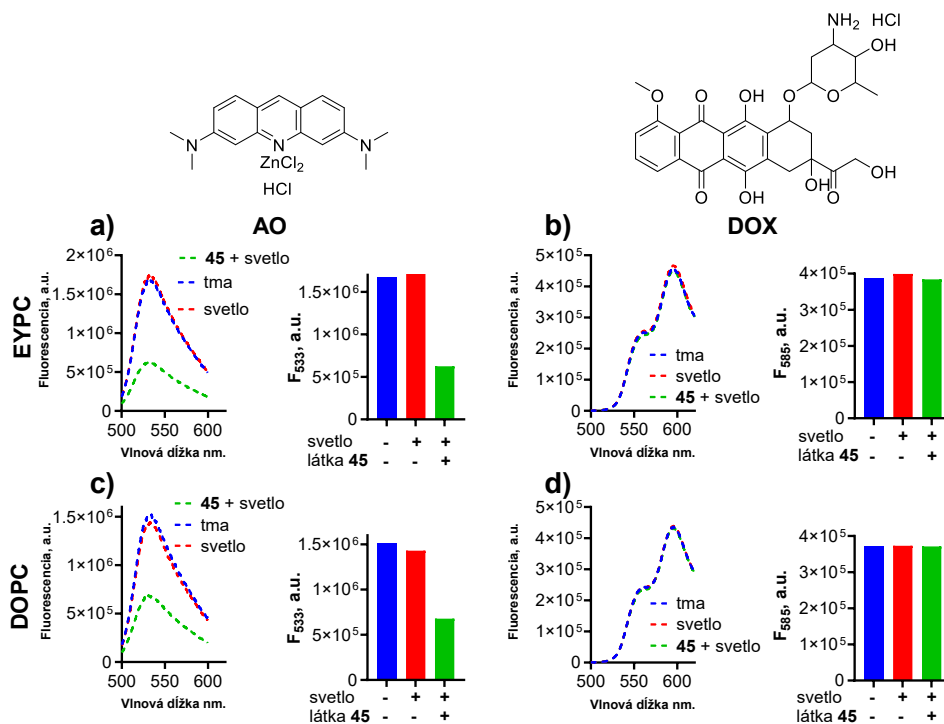
($\tau = 2 - 5 \times 10^{-4}$ s).¹²⁶ V priebehu pár minút sme pozorovali veľmi rýchly rozklad AO, dokonca ešte rýchlejší ako rozklad látky **52** (Obrázok 87b), čo znamená, že AO je veľmi náchylná voči singletovému kyslíku a jej následkom dochádza k rozkladu akridínového jadra.



Obrázok 87. a) Zmeny absorpčného spektra počas rozkladu látky **52** a AO v chloroforme po postupnom ožiarovaní. b) Závislosť fotodegradácie AO (červená) a látky **52** (modrá) na čase ožiarovania

Pre potvrdenie rozkladu AO sme spravili ďalšie experimenty v oboch typoch lipozómov a rovnaké experimenty sme vyskúšali aj pre DOX, aby sme zistili, či nie je taktiež náchylný na singletový kyslík. V tomto experimente sme zaznamenávali emisné spektrá EYPC alebo DOPC lipozómov s AO alebo DOX (Obrázok 88) a po pridaní Tritonu v 3 rôznych podmienkach:

1. ožiarenie a v prítomnosti látky **52** - - - -
2. ožiarenie (bez PS) - - - -
3. bez ožiarenia, len v tme - - - -



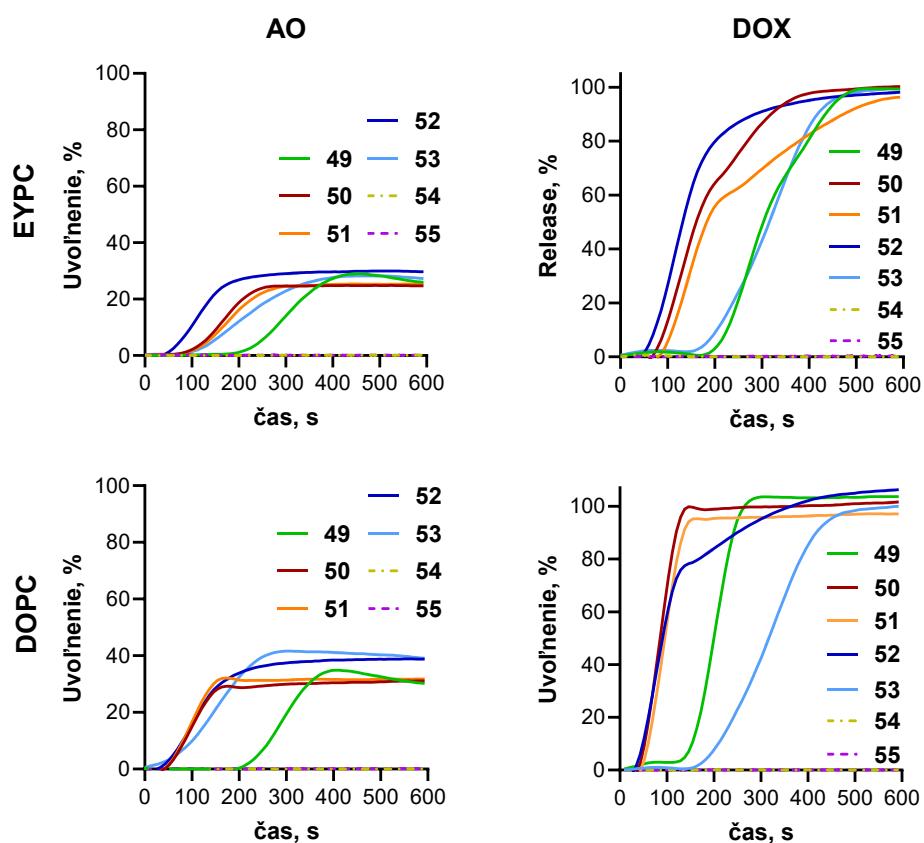
Obrázok 88. Fluorescencia AO (a,c) alebo DOX (b, d) v EYPC (a, b) alebo DOPC (c, d) lipozómoch v tme bez PS (modrá), bez PS po ožiarení (červená) alebo po ožiarení s prítomnou látkou **52**. Ku všetkým vzorkám bol nakoniec pridaný Triton X-100 (1%).

Zistili sme, že množstvo AO je znížené singletovým kyslíkom produkovaným látkou **52** približne na tretinu. Pre porovnanie, keď sme použili DOX namiesto AO, žiadne zníženie množstva DOX sme nepozorovali (Obrázok 88b, d) a po ožiarení svetlom dochádzalo ku kompletnému uvoľneniu DOX z lipozómov.

AO teda nie je vhodnou modelovou látkou na monitorovanie uvoľnenia liečiv z lipozómov, kvôli svojej citlivosti na singletový kyslík a ďalšie reaktívne formy kyslíka. DOX sa preto javí ako vhodnejší na monitorovanie uvoľnenia obsahu lipozómov. Napriek tomu bola AO použitá aj v nasledujúcich experimentoch s ďalšími PS na potvrdenie trendov v uvoľňovaní obsahu lipozómov.

4.4.6.2 Porovnanie vplyvu rôznych Ps na uvoľnenie liečiv z lipozómov

Uvoľnenie AO/DOX z oboch typov lipozómov (EYPC alebo DOPC) sme sledovali ako zmeny fluorescenčného maxima (533 nm pre AO, 585 nm pre DOX) v reálnom čase počas kontinuálneho ožiarovania (Obrázok 89). Pomer lipozómy : PS bol 50 : 1 a polčas uvoľnenia (Tabuľka 21) bol vypočítaný z kriviek na Obrázku 89.



Obrázok 89. Svetlom aktivované uvoľnenie AO (a, c) a DOX (b, d) z EYPC (a, b) alebo DOPC (c, d) lipozómov s rôznym PS.

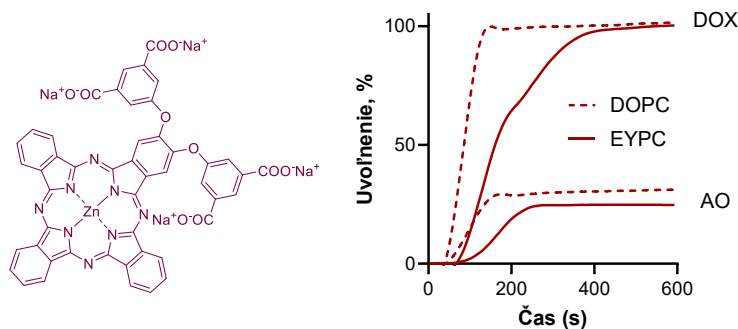
U DOX sme dosiahli u látok **49-53** kompletné uvoľnenie z oboch typov lipozómov, ale u AO sme dosiahli len približne 30% uvoľnenie AO, kvôli dôvodom uvedených v kapitole 4.3.5.1. U látok **54** a **55** bolo uvoľnenie z lipozómov takmer nulové, nezávisle na type lipozómov a liečive a nie sú preto ďalej diskutované. Je to pravdepodobne preto, lebo pri pomere lipozómy : PS 50 : 1 sú tieto látky stále výrazne agregované a produkujú málo singletového kyslíka.

Tabuľka 21. Polčasy (v sekundách) uvoľnenej AO/DOX z lipozómov a rôzneho PS.

PS	AO		DOX	
	EYPC	DOPC	EYPC	DOPC
49	300.6	292.0	299.1	199.9
50	168.9	100.9	150.2	83.8
51	180.0	97.4	172.8	92.7
52	112.8	108.3	127.4	84.0
53	209.1	147.0	301.2	230.8
54	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a
55	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a

^auvoľnenie liečiva bolo zanedbateľné, preto nebolo možné určiť ich polčasy

Polčasy uvoľneného DOX boli pre danú látku v tomto poradí **52** > **50** ~ **51** > **53** ~ **49** v EYPC, čo zodpovedá aj poradiu rýchlosti degradácie ADPA a teda aj s množstvom produkovaného singletového kyslíka. V DOPC lipozómoch už bol len nepatrný rozdiel v rýchlosti uvoľnenia DOX pri látkach **50** – **52** a najpomalšie sa DOX uvoľňoval pri látke **53**. Súvisí to s malou produkciou singletového kyslíka a najpomalšieho rozkladu ADPA (z látok **49** – **53**). Celkovo sa DOX v DOPC lipozómoch uvoľňoval jednoznačne rýchlejšie u všetkých PS ako v EYPC (Obrázok 89). Je to preto, lebo DOPC lipozómy majú viac dvojité väzby v alkylových reťazcoch, ktoré môžu byť oxidované, a tým dochádza k rýchlejšiemu uvoľneniu DOX. Čo sa týka uvoľňovania AO, videli sme podobné trendy v uvoľňovaní ako v DOX, ale vzhľadom k rozkladu AO singletovým kyslíkom, nie je možné výsledky považovať za úplne presné. Napríklad pri látke **52** sa AO uvoľňovala najrýchlejšie z EYPC lipozómov a najpomalšie pri látke **49**. AO sa z DOPC lipozómov opäť uvoľňovala rýchlejšie (takisto ako DOX) a rozdiely v uvoľňovaní AO boli u PS **50** – **53** už takmer zanedbateľné. Na Obrázku 90 je pre porovnanie znázornené uvoľnenie AO/DOX z EYPC/DOPC lipozómov v prítomnosti látky **50**.



Obrázok 90. Uvoľnenie AO/DOX v EYPC/DOPC lipozómoch v prítomnosti látky **50**.

4.4.7 Záver

Fotooxidácia a uvoľnenie látok z lipozómov závisí hlavne na produkcii singletového kyslíka. Množstvo produkovaného singletového kyslíka závisí na type PS a jeho schopnosti produkovať singletoý kyslík, keďže Zn(II) Pc ho produkujú viac ako Al(III) Pc na základe efektu ťažkého atómu. Okrem typu PS závisí množstvo produkovaného singletového kyslíka aj na úrovni agregácii PS a jeho intenzite absorpcie v excitačnej vlnovej dĺžke. Preto najrýchlejšie uvoľnenie AO/DOX bolo pri použití PS **52**, ktorý má vysoký kvantový výťažok singletového kyslíka, v prítomnosti lipozómov je takmer monomérny a jeho intenzita absorpcie je relatívne vysoká. Na druhej strane pri látkach **54** a **55** nedochádzalo takmer k žiadnemu uvoľneniu AO/DOX, keďže

tieto látky boli výrazne agregované a boli s nízkou absorpciou v excitačnej vlnovej dĺžke, a tým pádom produkovali malé množstvo singletového kyslíka.

Uvoľnenie látok závisí aj na type použitých lipozómov, pretože lipozómy, ktoré obsahujú mastné kyseliny s viacerými nenasýtenými dvojitými väzbami majú viac cieľov, kde môže nastať peroxidácia lipidov, a tým sa uvoľňujú látky rýchlejšie.

Aj keď je AO modelovou látkou využívanou vo viacerých experimentoch, v prítomnosti singletového kyslíka sa významne rozkladá, a preto sme nedosiahli jej kompletne uvoľnenie z lipozómov. Nie je teda vhodným modelom na ďalšie experimenty uvoľňovania liečiv. Na druhej strane DOX bol po celý čas experimentov stabilný.

5 Záver

Táto dizertačná práca sa zaoberala syntézou derivátov Pc a následne štúdiom ich vlastností po interakcii s CB[7] alebo po ich aktivácii svetlom v lipozómoch. Práca bola rozdelená do štyroch samostatných projektov.

V prvom projekte sme sa zamerali na možnosti supramolekulárnych interakcií zvyšovať monomérený charakter lipofilných PS. Bolo pripravených 7 derivátov Pc so štyrmi adamantylaminovými substituentmi na periférii, 1 so sírou ako spojovacím heteroatómom a 6 Pc s kyslíkom ako spojovacím heteroatómom. V projekte bol porovnávaný alkylačný stupeň aminoadamantánu (sekundárny/terciárny amín a kvartérna amóniová soľ) a poloha substituentu v α alebo β polohe makrocyclického jadra Pc a ich interakcia s CB[7] vo vode. Interakcia bola sledovaná pomocou ^1H NMR, absorpčných a fluorescenčných spektier. Bolo zistené, že α substituované Pc sú po interakcii s CB[7] monomérejšie ako β deriváty, pretože α substituenty sú orientované hore a dole voči makrocyclickému jadrú a nie je tam až taká voľná rotácia substituentov ako u β derivátov. *In vitro* testovanie Pc na dvoch bunkových líniách ukázalo ich vysokú fotodynamickú aktivitu, ale po pridaní CB[7] sa aktivita neočakávane niekoľkonásobne znížila. Bolo to kvôli nízkemu vstupu látok do buniek, keďže komplex Pc-CB[7] je už veľmi veľký a hydrofilný. Použitie vyššieho počtu CB teda nie je vhodné na zlepšenie monomerizácie Pc, ak má byť následne použitý v PDT. V budúcnosti by bolo možné pripraviť asymetrické deriváty Pc, ktoré by mali len jeden alebo dva adamantylaminové substituenty, a tým pádom by komplex Pc-CB[7] nebol tak hydrofilný na vstup do buniek.

V nasledujúcej časti boli pripravené 4 SubPc substituované aminoadamantánom na periférii s lipofilným axiálnym substituentom, vďaka ktorému by mohlo dôjsť k zanoreniu SubPc-CB[7] komplexu do membrány buniek. Zmeny na fluorescenčných spektrách ukázali, že len jeden SubPc tvorí komplex s CB[7], ale interakcia bola viditeľná až po prídavku THF do vody, nie v čistej vode. Tvorba komplexu SubPc s CB[7] bola nekonzistentná a nebolo možné určiť pri akom množstve CB[7] dochádza k úplnej monomerizácii SubPc. *In vitro* biologické testovanie bolo neúspešné, pretože ani jeden SubPc nevykazoval žiadnu aktivitu, či už samostatne, alebo po pridaní CB[7], čo bolo pravdepodobne spôsobené nízkym kvantovým výťažkom singletového kyslíka.

V treťom projekte sme pripravili 2 deriváty Pc so štyrmi dietylaminovými substituentmi. Syntéza pôvodne zamýšľaného derivátu s ôsmimi substituentmi nebola úspešná. Syntézu prekursorov sme skúšali rôznymi postupmi (nukleofilná substitúcia a Buchwald-Hartwig coupling) a s rôznymi podmienkami. Bezkovový a Zn(II) Pc vykazovali zaujímavé vlastnosti v kyslých podmienkach. Keďže látka **48Zn** je viac bázičná ako látka **48H**, známky protonizácie sme mohli sledovať už aj v čistom chloroforme. Protonizované amino skupiny nemôžu prispievať do konjugovaného systému, preto dochádza k posunu absorpčného maxima Q pásu do modrej oblasti spektra. Mierne okyslenie roztoku viedlo k výraznému zníženiu Φ_F , no na druhej strane použitie väčšieho množstva kyseliny zvýšilo Φ_F pravdepodobne kvôli blokovaniu ICT periférnych amínov.

V poslednej časti bolo skúmaných 7 amfifilných Pc na uvoľnenie AO/DOX z lipozómov po aktivácii svetlom. Uvoľnenie AO bolo len okolo 30 %, keďže sa AO pôsobením singletového kyslíka, ktorý je produkovaný po ožiarení Pc, rýchlo rozkladá. Uvoľnenie DOX už prebiehalo na 100 % a uvoľnenie oboch látok prebiehalo rýchlejšie z DOPC lipozómov, ktoré majú viac dvojité väzby, ktoré sú náchylné na singletový kyslík. Z hľadiska použitého PS, dochádzalo k najrýchlejšiemu uvoľneniu AO/DOX pri látke **52**, ktorá má vysoký kvantový výťažok

singletového kyslíka a v prítomnosti lipozómov sa vyskytuje hlavne v monomérskej forme. Pri látke **49** bolo uvoľnenie AO/DOX pomalšie, keďže AL(II) Pc majú nízky Φ_{Δ} . Pri látkach **54** a **55** nedochádzalo takmer k žiadnemu uvoľneniu AO/DOX, keďže tieto látky boli výrazne agregované a mali nízku absorpciu v excitačnej vlnovej dĺžke, a tým pádom produkovali malé množstvo singletového kyslíka. Svetlom aktivované uvoľnenie liečiv je komplexný proces, ktorý závisí na mnohých faktoroch, ktoré je potrebné brať do úvahy pri navrhovaní vhodných PS a lipozómov.

6 Experimentálna časť

Chemikálie a rozpúšťadlá použité pri syntéze zlúčením boli zakúpené u nasledujúcich dodávateľov: Sigma-Aldrich, Lach-Nech, Acros, Fluorochem, Penta Chemicals, Merck, VWR a TCI Europe. Tieto komerčne dostupné látky boli použité v takom stave v akom boli dodané. Na tenkovrstvovú chromatografiu boli použité hliníkové dosky pokryté silikagélom 60 F254 (Merck). Na preparatívne TLC boli použité sklenené dosky SIL G-200 20x20 cm (Macherey-Nagel, Nemecko). Detekcia látok prebiehala pod UV lampou UV240 (KRÜSS Optronic GmbH) pri vlnových dĺžkach 254 a 366 nm, alebo aj pomocou Dragendorffovho činidla. Čistenie produktov prebiehalo pomocou stĺpcovej chromatografie, kde ako stacionárna fáza bola použitá Merck Kiesegel 60 (0,040 – 0,063 mm). ^1H NMR a ^{13}C NMR spektra boli zmerané na prístrojoch Jeol JNM-ECZ600R (Jeol, Akišima, Japonsko) alebo Varian VNMR S500 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Teploty topenia (t.t.) boli stanovené na prístroji Electrothermal IA9200 Series Digital Melting Point apparatus (Electrothermal Engineering Ltd, Southend-on-Sea, Essex, UK). IČ spektrá boli zmerané v peletách KBr na spektrofotometri Nicolet 6700 v ATR móde. UV/vis spektrá boli zmerané pomocou spektrofotometra Shimadzu UV-2600 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Fluorescenčné spektrá boli zmerané na spektrofluorometri FLS1000 (Edinburgh Instruments Ltd, Edinburgh, UK) alebo na fluorescenčnom spektrofluorometri FS5 (Edinburgh Instruments Ltd, UK). HRMS spektrá boli zmerané na prístroji UHPLC system Acquity UPLC I-class (Waters, Millford, USA) spojeným s hmotnostným spektrometrom s vysokým rozlíšením (high-resolution mass spectrometer, HRMS) Synapt G2Si (Waters, Manchester, UK) založenom na Q-TOF. Hmotnostné spektrá kvartérnych zlúčenín boli zmerané na UHPLC system Acquity UPLC instrument (Waters, Milford, MA) spojeným s trojito kvadrupólovým hmotnostným spektrometrom Quattro Micro (Waters, Manchester, UK). Veľkosť, plysperzný index a zeta potenciál boli zmerané pomocou Zetasizeru Nano-ZS (Malvern, UK).

6.1. Syntéza prekursorov a medziproduktov ftalocyanínov

6.1.1 4-(2hydroxyetylsulfanyl)ftalonitril (1)

K_2CO_3 (5,1 g, 37,1 mmol) v DMSO (15 ml) bol ponechaný v ultrazvukovom kúpeli 15 min a následne bol pridaný 2-sulfanyletan-1ol (3,2 g, 2,9 ml, 40,7 mmol). 4-nitroftalonitril (5,0 g, 28,9 mmol) bol pridaný v desiatich častiach počas 2 h. Reakčná zmes bola miešaná pri laboratórnej teplote 24 h a potom bola naliata do vody (80 ml). Produkt bol vytrepaný s chloroformom (3x100 ml), následne bola organická fáza vysušená bezvodým síranom sodným, prefiltrovaná cez filtračný papier a odparená do sucha. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s toluénom/acetónom 2 : 1 ako mobilnou fázou ($R_f(\mathbf{1}) = 0,49$). Bolo získaných 3,7 g bielej práškovej látky. Výťažok reakcie bol 63 %.

T.t. 87,5 – 89,6 °C. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ 7,67 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 7,65 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,59 (dd, $J = 8,3, 1,9$ Hz, 1H), 3,91 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H), 3,25 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H), 2,06 (s, 1H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CDCl_3): δ 146,5, 133,4, 130,7, 130,5, 116,4, 115,6, 115,2, 111,4, 60,7, 34,9. IČ (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 3330, 2932, 2226, 1582, 1068. HRMS (m/z) vypočítané pre $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{OS} \cdot \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$: 187,0324, namerané: 187,0336 [$\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$] $^+$.

6.1.2 4-(2-tosyloxyetylsulfanyl)ftalonitril (2a)

K_2CO_3 (2,5 g, 18,0 mmol) a *p*-toluénsulfonyl chlorid (1,9 g, 10,0 mmol) boli pridané k látke **1** (1,7 g, 8,3 mmol) rozpustenej v acetóne (20 ml) a reakčná zmes bola miešaná pri teplote varu rozpúšťadla 2 h. Reakčná zmes bola naliata do vody (100 ml) a miešaná pri laboratórnej teplote 2 h. Vytvorená zrazenina bola odfiltrovaná, premytá vodou a prečistená stĺpcovou

chromatografiou na silikageli s toluénom/acetónom 15 : 1 ako mobilnou fázou ($R_f(\mathbf{2b}) = 0,35$). Bolo získaných 0,8 g svetložltej olejovitej látky, ktorá cez noc stuhla. Výťažok reakcie bol 27 %.

T.t. 118,5 – 121,4 °C. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ 7,73 (m, 1H), 7,72 (m, 1H), 7,63 (dd, $J = 8,4, 0,5$ Hz, 1H), 7,54 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,52 (dd, $J = 8,3, 2,0$ Hz, 1H), 7,34 (m, 1H), 7,33 (m, 1H), 4,22 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 3,31 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 2,45 (s, 3H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CDCl_3): δ 145,6, 144,6, 133,5, 132,6, 131,1, 130,9, 130,1, 128,0, 116,6, 115,3, 114,9, 112,1, 67,0, 30,9, 21,8. IČ (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 2233, 1589, 1348, 1172. HRMS (m/z) vypočítané pre $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2 + \text{Na}^+$: 381,0338, namerané 381,0342 [M + Na] $^+$.

6.1.3 4-(2-mesyloxysulfanyl)ftalonitril (2b)

TEA (0,2 g, 0,3 ml, 2,0 mmol) a metánsulfonyl chlorid (1,8 g, 1,2 ml, 15,6 mmol) boli pridané k látke **1** (0,2 g, 0,98 mmol) rozpustenej v bezvodom DCM (15 ml) v argónovej atmosfére. Reakčná zmes bola miešaná 1 h pri laboratórnej teplote. Následne bola zriedená pomocou DCM (50 ml), premytá nasýteným roztokom chloridu sodného (2 \times 50 ml). Organická fáza bola vysušená bezvodým síranom sodným, prefiltrovaná cez filtračný papier a odparená do sucha. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s toluénom/acetónom 5 : 1 ako mobilnou fázou ($R_f(\mathbf{2c}) = 0,44$). Bolo získaných 0,23 g svetložltej olejovitej látky, ktorá cez noc stuhla. Výťažok reakcie bol 83 %.

T.t. 87,8 – 88,9 °C. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ 7,71 (dd, $J = 8,4, 0,5$ Hz, 1H), 7,68 (dd, $J = 2,1, 0,5$ Hz, 1H), 7,61 (dd, $J = 8,3, 2,0$ Hz, 1H), 4,40 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 3,41 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 3,05 (s, 3H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CDCl_3): δ 144,5, 133,7, 131,1, 130,8, 116,7, 115,3, 115,0, 112,3, 66,4, 38,0, 31,2. IČ (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 2231, 1581, 1341, 1167. HRMS (m/z) vypočítané pre $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2 + \text{Na}^+$: 305,0025, namerané 305,0033 [M + Na] $^+$.

6.1.4 4-(2-jodoethylsulfanyl)ftalonitril (2c)

Jód (1,73 g, 6,8 mmol) a trifenyfosfín (1,79 g, 6,8 mmol) boli v THF (70 ml) miešané pri teplote varu rozpúšťadla 5 min. Následne bol pridaný pyridín (0,72 g, 0,73 ml, 9,1 mmol) a reakčná zmes bola miešaná pri teplote varu rozpúšťadla ďalších 5 min. Látka **1** (0,76 g, 3,72 mmol) bola rozpustená v THF (10 ml) a pridaná do reakčnej zmesi, ktorá bola následne miešaná pri teplote varu rozpúšťadla 3 h a potom cez noc pri laboratórnej teplote. Reakčná zmes bola prefiltrovaná cez Celite a materský lúh bol odparený do sucha. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s toluénom/acetónom 60 : 1 ako mobilnou fázou ($R_f(\mathbf{2a}) = 0,49$). Bolo získaných 1,1 g žltej olejovitej látky, ktorá cez noc stuhla. Výťažok reakcie bol 94 %.

T.t. 88,9 – 90,7 °C. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7,72 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 7,63 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 7,56 (dd, $J = 8,4, 2,0$ Hz, 1H), 3,54–3,47 (m, 2H), 3,37–3,30 (m, 2H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 144,5, 133,7, 131,0, 130,6, 116,7, 115,3, 114,9, 112,1, 34,7, –0,7. IČ (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 2236, 1581, 1163, 836. HRMS (m/z) vypočítané pre $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{IN}_2 - \text{HI} + \text{H}^+$: 187,0324, namerané 187,0338 [M – HI + H] $^+$.

6.1.5 2-[(3,4-dikyanofenyl)sulfanyl]etyl trifluorometán sulfonát (2x)

Látka **1** (0,2 g, 1,0 mmol) bola rozpustená v bezvodom DCM (15 ml) a TEA (0,2 g, 0,3 ml, 2,0 mmol) v argónovej atmosfére a schladená na –20 °C. K reakčnej zmesi bol po kvapkách pridaný anhydrid trifluórmetánsulfónovej kyseliny (0,28 g, 0,17 ml, 1,0 mmol) a zmes bola miešaná pri –20 °C 1 h a následne cez noc pri laboratórnej teplote. Reakčná zmes bola zriedená pomocou DCM (50 ml), premytá vodou, vysušená bezvodým síranom sodným, prefiltrovaná cez filtračný papier a odparená do sucha. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou

na silikageli s toluénom/acetónom 5 : 1 ako mobilnou fázou ($R_f(\mathbf{2x}) = 0,38$). Bolo získaných 57 mg svetlohnedej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 30 %.

T.t. 156,2 – 158,9 °C. ^1H NMR (600 MHz, CD_3SOCD_3): δ 8,00 (d, $J = 1,8$ Hz, 2H), 7,91 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,72 (dd, $J = 8,3, 1,8$ Hz, 2H), 3,66 (t, $J = 5,9$ Hz, 4H), 3,32–3,27 (m, prekrýva sa so signálom vody). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CD_3SOCD_3): δ 147,1, 134,1, 131,2, 131,0, 116,6, 116,2, 115,6, 110,2, 68,9, 31,4. IČ (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 2926, 2863, 2229, 1581, 1121, 1070. HRMS (m/z) vypočítané pre $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{OS}_2 + \text{H}^+$: 391,0682, namerané 391,0679 [M + H] $^+$.

6.1.6 4-[2-(aminoadamantan-1-yl)etylsulfanyl]ftalonitril (3)

Látka **2a** (0,312 g, 1 mmol), **2b** (0,357 g, 1 mmol) alebo **2c** (0,282 g, 1 mmol) bola rozpustená v DMF (3 ml) a k zmesi bol pridaný K_2CO_3 (0,253 g, 1,8 mmol) a 1-aminoadamantán (0,303 g, 2 mmol). Reakčná zmes bola miešaná pri laboratórnej teplote 24 h, potom bola naliata do vody (40 ml) a produkt bol extrahovaný chloroformom (2 × 50 ml) a etylacetátom (2 × 50 ml). Organické vrstvy boli spojené, vysušené bezvodým síranom sodným, prefiltrované cez filtračný papier a odparené do sucha. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s toluénom/acetónom 60 : 1 ako mobilnou fázou, aby bol eliminovaný produkt **3x** a následne acetónom ako mobilnou fázou ($R_f(\mathbf{3}) = 0,43$), aby bol získaný produkt **3**, svetložltá pevná látka. Výťažky látky **3** boli 0,054 g (16 %), 0,095 g (29 %) a 0,016 g (5 %) z východiskových látok **2a – 2c**. Látka **3** (t.t. rozklad od 205 °C) bola kvôli lepšej stabilite prevedená na hydrochlorid (**3·HCl**). Výťažky látky **3x** boli 0,13 g (70 %), 0,095 g (51 %) a 0,128 g (69 %) z východiskových látok **2a – 2c**.

3·HCl: T.t. 250 °C rozklad. ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 7,95 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 7,89 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,81 (dd, $J = 8,4, 2,0$ Hz, 1H), 3,44 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 3,27 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,21 (s, 3H), 1,934 (s, 3H), 1,930 (s, 3H), 1,75 (q, $J = 14,0$ Hz, 6H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CD_3OD): δ 144,2, 133,8, 131,3, 131,2, 116,3, 115,2, 114,9, 111,9, 58,0, 38,4, 38,2, 35,2, 29,3, 28,0. IČ (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 2906, 2754, 2232, 1584, 1080, 838. HRMS (m/z) vypočítané pre $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{S} + \text{H}^+$: 338,1685, namerané 338,1696 [M + H] $^+$.

3x: T.t. 77,9 – 80,6 °C. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7,71 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 7,64 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H), 7,58 (dd, $J = 8,3, 1,9$ Hz, 1H), 6,53 (dd, $J = 16,6, 9,2$ Hz, 1H), 5,85–5,78 (m, 2H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 145,3, 133,4, 130,9, 130,8, 125,8, 125,0, 116,4, 115,3, 114,9, 112,0. HRMS (m/z) vypočítané pre $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{N}_2\text{S} + \text{H}^+$: 187,0324, namerané 187,0332 [M + H] $^+$.

6.1.7 N-(adamantan-1-yl)-2-bromoacetamid (4)

Adamantan-1-amín (1 g, 6,5 mmol) bol rozpustený v bezvodom DCM (10 ml) v argónovej atmosfére a následne bol pridaný TEA (1,8 ml). Brómacetyl bromid (1,7 ml, 19,5 mmol) bol rozpustený v bezvodom DCM (5 ml) a tento roztok bol postupne pridávaný k roztoku adamantan-1-amínu za chladenia na 0 °C. Následne bola reakčná zmes miešaná pri laboratórnej teplote 24 h. Zmes bola naliata do vody (30 ml) a produkt bol extrahovaný do DCM (3 × 30 ml). Organické vrstvy boli spojené, vysušené bezvodým síranom sodným, prefiltrované cez filtračný papier a odparené do sucha. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s acetónom ako mobilnou fázou ($R_f(\mathbf{4}) = 0,47$). Bolo získaných 1,52 g svetložltej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 86 %.

^1H NMR (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$): δ 6,94 (s, 1H), 3,77 (d, $J = 0,6$ Hz, 2H), 2,07 – 2,01 (m, 9H), 1,70 (t, $J = 3,0$ Hz, 6H), $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (126 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$): δ 165,63, 52,43, 41,77, 37,02, 30,84, 29,80.

6.1.8 *N*-(2-bromoetyl)adamantan-1-amín (5)

Postup A: látka **4** (0,3 g, 1,1 mmol) bola rozpustená v THF (10 ml) a borán-tetrahydrofuránový komplex (4 ml, 4 mmol) bol postupne pridaný do reakčnej zmesi. Reakčná zmes bola zahrievaná 24 h pri 60 °C. Následne bola zmes naliata do vody (30 ml) a produkt bol extrahovaný do etylacetátu (3 × 30 ml). Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na oxide hlinitom s chloroformom/metanolom 30 : 1 ako mobilnou fázou. Požadovaný produkt nebol potvrdený.

Postup B: látka **4** (0,3 g, 1,1 mmol) bola rozpustená v bezvodom THF (5 ml) v argónovej atmosfére. Následne bol pridaný LiAlH₄ (0,095 g, 2,5 mmol) a reakčná zmes bola miešaná pri laboratórnej teplote 24 h. Za chladenia na 0 °C bola pridaná voda (20 ml) a produkt bol extrahovaný do etylacetátu (3 × 30 ml). Podľa TLC ale požadovaný produkt nevznikol.

Postup C: K₂CO₃ (0,138 g, 1 mmol) v DMF (1,5 ml) bol vystavený ultrazvuku na 15 min. Následne bol pridaný dibrómetán (57 µL, 6,6 mmol) a postupne po častiach počas 1 h bol pridaný 1-aminoadamantán. Reakčná zmes bola miešaná pri laboratórnej teplote 24 h. Zmes bola naliata do vody (20 ml) a produkt bol extrahovaný do etylacetátu (3 × 30 ml). Podľa TLC reakcia neprebehla.

6.1.9 *N*-(adamantan-1-yl)-2-merkptoacetamid (6)

Látka **4** (0,3 g, 1,1 mmol) bola rozpustená v etanole (20 ml). Následne bola pridaná tiomočovina (0,084 g, 1,1 mmol) a reakčná zmes bola miešaná pri teplote varu rozpúšťadla cez noc. Na druhý deň bol pridaný NaOH vo vode (55 mg) a reakčná zmes bola miešaná ďalej pri teplote varu rozpúšťadla 2 h. Etanol bol odparený za zníženého tlaku. Zvyšok bol naliaty do vody (20 ml) a produkt bol extrahovaný do DCM (3 × 30 ml). Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s chloroformom/metanolom 5 : 1 ako mobilnou fázou ($R_f(\mathbf{6}) = 0,48$). Bolo získaných 12 mg svetlohnedej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 5 %.

6.1.10 2-merkptoacetaldehyd (7)

Chlóracetaldehyd (8 ml, 63 mmol) bol rozpustený vo vode (10 ml). NaSH (2,2 g, 30 mmol) bol rozpustený vo vode (10 ml), schladený na 0 °C a tento roztok bol postupne pridaný k roztoku chlóracetaldehydu. Vytvorená zrazenina bola odsatá, premytá vodou a vysušená. Bolo získaných 4,3 g bielej olejovitej látky. Výťažok reakcie bol 72 %.

6.1.11 2-((adamantan-1-yl)amino)etáne-1-tiol (8)

Postup A: látka **7** (0,12 g, 1,28 mmol) bola rozpustená v metanole (8 ml). Následne bol pridaný 1-aminoadamantán (0,166 g, 1,07 mmol) a NaCNBH₃ (0,241 g, 3,84 mmol) a reakčná zmes bola miešaná pri laboratórnej teplote 24 h. Zmes bola naliata do vody (40 ml) a produkt bol extrahovaný do etylacetátu (3 × 50 ml). Podľa TLC ale požadovaný produkt nevznikol.

Postup B: látka **7** (0,3 g, 3,2 mmol) bola rozpustená v metanole (20 ml). Následne bol pridaný 1-aminoadamantán (0,48 g, 3,2 mmol), NaCNBH₃ (0,201 g, 3,2 mmol) a ZnCl₂ (0,4 g, 1,6 mmol) a reakčná zmes bola miešaná pri laboratórnej teplote 3 h. Potom bol pridaný nadbytok NaCNBH₃ (0,4 g, 6,4 mmol) a miešanie pokračovalo pri laboratórnej teplote 24 h. Zmes bola naliata do vody (50 ml) a produkt bol extrahovaný do etylacetátu (3 × 60 ml). Podľa TLC ale požadovaný produkt nevznikol.

Postup C: 1-aminoadamantán (1,335 g, 8,83 mmol) a látka **7** (1 g, 10,6 mmol) boli rozpustené v MeOH (10 ml). K roztoku bol pridaný izopropoxid titaničitý (10 ml, 33,78 mmol) a reakčná zmes bola zahrievaná 24 h pri 100 °C. Zmes bola schladená na 0 °C, bol pridaný MeOH (15 ml) a postupne počas 10 min bol pridaný NaCNBH₃ (2,218 g, 35,32 mmol). Reakčná zmes

bola ďalej miešaná pri laboratórnej teplote 24 h. Rozpúšťadlo bolo odparené za zníženého tlaku. K zvyšku po odparení bola pridaná voda (40 ml) a produkt bol extrahovaný do etylacetátu (3 × 50 ml). Podľa TLC ale požadovaný produkt nevznikol.

6.1.12 2-((bis(4-metoxyfenyl)(fenyl)metyl)tio)etán-1-ol (9)

K 2-merkptoetanolu (0,18 ml, 2,56 mmol) a TEA (0,35 ml, 2,56 mmol) bol pridaný THF (3 ml). 4,4'-dimetoxytiryl chlorid (0,78 g, 2,3 mmol) bol rozpustený v THF (5 ml) a postupne bol pridávaný do reakcie. Miešanie reakčnej zmesi pokračovalo pri laboratórnej teplote 2 h. Reakčná zmes bola prefiltrovaná a filtrát bol odparený za zníženého tlaku. K zvyšku po odparení bola pridaná voda (30 ml) a zmes bola extrahovaná do etylacetátu (3 × 40 ml). Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s chloroformom/metanolom 10 : 1 ako mobilnou fázou ($R_f(9) = 0,56$). Bolo získaných 0,659 g jasnožltej olejovitej látky. Výťažok reakcie bol 75 %.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7,45 (d, 2H), 7,32 (m, 12H), 6,84 (d, 4H), 3,81 (s, 6H), 3,43 (d, 2H), 2,52 (t, 2H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CDCl_3): 158,1, 145,3, 137,1, 130,6, 129,3, 127,9, 126,6, 113,1, 65,7, 60,9, 55, 2, 35,3.

6.1.13 (bis(4-metoxyfenyl)(fenyl)metyl)(2-tosyletyl)sulfán (10)

Látka **9** (0,1 g, 0,26 mmol) bola rozpustená v acetóne (3 ml). Následne bol pridaný K_2CO_3 (96 mg, 0,7 mmol), *p*-toluénsulfonyl chlorid (76 mg, 0,4 mmol) a reakčná zmes bola miešaná pri teplote varu rozpúšťadla 24 h. Podľa TLC reakcia neprebehla, keďže v zmesi bola len nezreagovaná látka **9**.

6.1.14 (bis(4-metoxyfenyl)(fenyl)metyl)(2-jodoetyl)sulfán (11)

Trifenylfosín (0,123 g, 0,47 mmol) a jód (0,119 g, 0,47 mmol) boli rozpustené v THF (2 ml) a reakčná zmes bola zahrievaná 5 min pri 75 °C. Potom bol pridaný pyridín (50 μl , 0,624 mmol) a zmes bola znova zahrievaná 5 min pri 75 °C. Látka **9** (0,1 g, 0,26 mmol) bola rozpustená v THF (1 ml) a pridaná do reakčnej zmesi. Zahrievanie pokračovalo ďalšie 3 h pri 75 °C a následne 20 h pri laboratórnej teplote. Podľa TLC reakcia neprebehla.

6.1.15 2(adamantan-1-yl)etán-1-ol (12)

Adamantan-1-amín (10,3 g, 68,1 mmol) a 2-bromoetanol (9,3 g, 5,2 ml, 74,16 mmol) boli rozpustené v benzonitrile (40 ml) a reakčná zmes bola miešaná 2 h pri 120 °C. Vytvorená zrazenina bola odfiltrovaná, premytá dietyl éterom a následne rozpustená vo vode. Pridaním vodného roztoku hydroxidu sodného (10%, 20 ml) sa vytvorila zrazenina, ktorá bola extrahovaná do chloroformu. Organická fáza bola vysušená bezodým síranom sodným, prefiltrovaná cez filtračný papier a odparená do sucha. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s metanolom ako mobilnou fázou ($R_f(12) = 0,24$). Bolo získaných 11,76 g bielej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 88 %.

T.t. 93,3 – 96,4 °C. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ 3,58 (t, $J = 5,1$ Hz, 2H), 2,73 (t, $J = 5,1$ Hz, 2H), 2,06 (br s, 3H), 1,67–1,54 (m, 12H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CDCl_3): δ 61,9, 50,3, 43,1, 43,0, 43,0, 41,9, 36,8, 36,8, 29,7. IČ (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 3323, 3231, 2907, 1064. HRMS (m/z) vypočítané pre $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO} + \text{H}^+$: 196,1695, namerané 196,1704 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

6.1.16 S-(2-((adamantan-1-yl)amino)etyl)ester tiooctovej kyseliny (13)

Trifenylfosín (0,3 g, 1,14 mmol) bol rozpustený v DMF (2 ml) a roztok bol schladený na 0 °C. Po kvapkách bol pridaný diizopropylazodikarboxylát (0,22 ml, 1,14 mmol, DIAD) a reakčná zmes bola miešaná 1 h pri 0 °C. Látka **12** (0,15 g, 0,76 mmol) a kyselina tiooctová (0,08 ml, 1,14 mmol) boli rozpustené v DMF (1,5 ml) a postupne bol tento roztok po kvapkách pridaný do reakcie za stáleho chladenia na 0 °C. Reakčná zmes bola miešaná 3 h pri laboratórnej

teplote. Rozpúšťadlo bolo odparené a produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s chloroformom/MeOH 30 : 1 ako mobilnou fázou ($R_f(\mathbf{13}) = 0,32$). Bolo získaných 100 mg bielej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 55 %.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 3,38 (t, 2H), 3,09 (t, 2H), 2,38 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 1,96 (s, 6H), 1,68 (s, 6H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CDCl_3): δ 195,3, 39,7 35,6, 30,5, 29,1, 29,0, 27,1.

6.1.17 (3s,5s,7s)-N-(2-tosylethyl)adamantan-1-amine (14)

Látka **12** (0,35 g, 1,77 mmol) bola rozpustená v pyridíne (5 ml) a zmes bola schladená na 0 °C. Postupne bol pridaný *p*-toluénsulfonyl chlorid (0,404 g, 2,12 mmol). Reakčná zmes bola miešaná pri laboratórnej teplote cez noc. Potom bola zmes naliata do vody (20 ml) a produkt bol extrahovaný do etylacetátu (3 × 30 ml). Organická fáza bola vysušená bezvodým síranom sodným, prefiltrovaná cez filtračný papier a odparená do sucha. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na oxide hlinitom s chloroformom ako mobilnou fázou na odstránenie nečistôt a následne bola použitá mobilná fáza chloroform/MeOH 1 : 1 na získanie produktu ($R_f(\mathbf{14}) = 0,82$). Bolo získaných 150 mg žltej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 25 %.

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 9,02 – 8,98 (m, 2H), 8,60 (tt, $J = 7,8, 1,4$ Hz, 1H), 8,15 – 8,07 (m, 2H), 4,67 – 4,57 (m, 2H), 3,36 (s, 3H), 3,15 (dd, $J = 6,5, 5,0$ Hz, 2H), 2,06 – 1,95 (m, 3H), 1,75 – 1,54 (m, 6H), 1,50 (d, $J = 2,9$ Hz, 6H).

6.1.18 2-(((3s,5s,7s)-adamantan-1-yl)amino)ethane-1-thiol (15)

Postup A: 1-adamantánamín (0,5 g, 3 mmol) bol rozpustený v benzéne (5 ml) a roztok bol zahriaty na 80 °C. Postupne bol do reakčnej zmesi prikvapávaný etylénsulfid (7,5 μL , 0,5 mmol, thiiran) v benzéne (1 ml) počas 1 h. Reakčná zmes bola ďalej miešaná 5 h pri 80 °C. Rozpúšťadlo bolo odparené a produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s acetómom ako mobilnou fázou. Požadovaný produkt nebol potvrdený.

Postup B: látka **13** (85 mg, 0,35 mmol) bola rozpustená v MeOH (5 ml). Následne bol pridaný NaOH (130 μL , 3,5 mmol, 10%). Reakčná zmes bola miešaná 20 h pri laboratórnej teplote. Zmes bola okyslená 1% HCl na pH 7 a potom bola extrahovaná do etylacetátu (3 × 20 ml). Reakcia neprebehla. Na TLC bola len východisková látka **13**.

Postup C: látka **13** (50 mg, 0,21 mmol) bola rozpustená v MePH (5 ml). Následne bol pridaný K_2CO_3 (58 mg, 0,42 mmol). Reakčná zmes bola miešaná 3 h pri laboratórnej teplote. Rozpúšťadlo bolo odparené za zníženého tlaku. Potom bola pridaná voda (10 ml) a zmes bola okyslená na pH 5. Produkt bol následne extrahovaný do dichlómetánu (3 × 20 ml). Reakcia neprebehla, na TLC bola len východisková látka **13**.

Postup D: látka **14** (0,12 g, 0,34 mmol) bola rozpustená v DMF (2 ml). Následne bol pridaný sulfid sodný (64 mg, 0,86 mmol) a reakčná zmes bola miešaná 2 h pri 80 °C. Zmes bola schladená na laboratórnu teplotu a do reakcie bol pridaný ditiotritol (0,157 g, 1,02 mmol). Miešanie pokračovalo 24 h pri laboratórnej teplote. Reakcia neprebehla, na TLC bola len východisková látka **14**.

6.1.19 2(adamantan-1-yl-metylamino)etan-1-ol (16)

Kyselina mravčia (84%, 3,45 ml, 46,5 mmol) a formaldehyd (37%, 1,1 ml, 38 mmol) boli pridané k látke **12** (1,5 g, 7,68 mmol) rozpustenej v MeOH (7 ml) a reakčná zmes bola miešaná pri teplote varu rozpúšťadla 24 h. Potom bolo rozpúšťadlo odparené a bola pridaná voda (50 ml). Roztok bol zalkalizovaný roztokom NaOH (10%, ~20 ml). Vytvorená zrazenina bola extrahovaná chloroformom (3 × 70 ml). Organická fáza bola vysušená bezvodým síranom sodným,

prefiltrovaná cez filtračný papier a odparená do sucha. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s MeOH ako mobilnou fázou ($R_f(\mathbf{16}) = 0,35$). Bolo získaných 1,4 g bielej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 87 %.

T.t. 51,9 – 54,7 °C. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 4,05 (bs, 1H), 3,53 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H), 2,61 (t, $J = 5,4$ Hz, 2H), 2,24 (s, 3H), 2,07 (s, 3H), 1,70–1,53 (m, 12H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 58,2, 50,1, 8,8, 36,7, 33,0, 29,7. IČ (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 3149, 2903, 1075. HRMS (m/z) vypočítané pre $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NO} + \text{H}^+$: 210,1852, namerané 210,1859.

6.1.20 4-{2-[(adamantan-1-yl)amino]etoxy}ftalonitril (17)

K_2CO_3 (0,272 g, 2,0 mmol) v DMF (5 ml) bol ponechaný v ultrazvukovom kúpeli 15 min. K tejto suspenzii bola pridaná látka **12** (0,6 g, 3,07 mmol) rozpustená v DMF (2 ml). Následne bol pridaný 4-nitroftalonitril (0,262 g, 1,51 mmol) počas 2 h v desiatich častiach. Potom bola reakčná zmes miešaná pri laboratórnej teplote 24 h a následne bola naliata do vody (40 ml). Produkt bol extrahovaný do chloroformu (3 × 50 ml), organická fáza bola vysušená bezvodým síranom sodným, prefiltrovaná cez filtračný papier a odparená do sucha. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s acetónom ako mobilnou fázou ($R_f(\mathbf{17}) = 0,41$). Bolo získaných 0,268 g žltej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 55 %. Látka **17** bola kvôli stabilite prevedená na hydrochlorid (**17·HCl**).

17·HCl: T.t. rozklad od 258 °C. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 7,93 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,64 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 7,49 (dd, $J = 8,8, 2,6$ Hz, 1H), 4,45 (t, $J = 5,0$ Hz, 2H), 3,52 (t, $J = 5,0$ Hz, 2H), 2,25 (br s, 3H), 2,02 (s, 3H), 2,01 (s, 3H), 1,78 (q, $J = 11$ Hz, 6H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 162,6, 136,9, 121,2, 121,2, 118,5, 116,7, 116,4, 109,1, 66,2, 59,1, 40,1, 39,2, 36,5, 30,6. IČ (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 2932, 2224, 1598, 1306, 834. HRMS (m/z) vypočítané pre $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O} + \text{H}^+$: 322,1913, namerané 322,1924 [M + H] $^+$.

6.1.21 4-{2-[(adamantan-1-yl)*N*-metylamino]etoxy}ftalonitril (18)

K_2CO_3 (0,46 g, 3,38 mmol) v DMF (8 ml) bol ponechaný v ultrazvukovom kúpeli 15 min. K tejto suspenzii bola pridaná látka **16** (1,1 g, 5,26 mmol) rozpustená v DMF (2 ml). Následne bol pridaný 4-nitroftalonitril (0,445 g, 2,57 mmol) počas 2 h v desiatich častiach. Potom bola reakčná zmes miešaná pri laboratórnej teplote 48 h a následne bola naliata do vody (30 ml). Produkt bol extrahovaný do chloroformu (3 × 50 ml), organická fáza bola vysušená bezvodým síranom sodným, prefiltrovaná cez filtračný papier a odparená do sucha. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s acetónom ako mobilnou fázou ($R_f(\mathbf{18}) = 0,46$). Bolo získaných 0,27 g žltej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 31 %. Látka **18** (t.t. 114,5 – 117,1 °C) bola kvôli stabilite prevedená na hydrochlorid (**18·HCl**).

18·HCl: T.t. rozklad od 215 °C. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): δ 7,94 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,65 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 7,48 (dd, $J = 8,8, 2,6$ Hz, 1H), 4,57–4,47 (m, 2H), 4,08–4,03 (m, 1H), 3,29–3,27 (m, 1H), 2,92 (s, 3H), 2,30 (s, 3H), 2,1–1,99 (m, 6H), 1,79 (q, $J = 11,0$ Hz, 6H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CD_3OD): δ 161,1, 135,5, 120,0, 119,9, 117,1, 115,5, 115,1, 107,8, 65,3, 64,1, 49,2, 35,9, 35,1, 33,8, 29,7. IČ (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 2913, 2450, 2230, 1595, 1289. HRMS (m/z) vypočítané pre $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O} + \text{H}^+$: 336,2070, namerané 336,2076 [M + H] $^+$.

6.1.22 3-{2-[(adamantan-1-yl)amino]etoxy}-ftalonitril (19)

K_2CO_3 (0,34 g, 2,5 mmol) v DMF (5 ml) bol ultrazvukovaný 15 min. K tejto suspenzii bola pridaná látka **12** (0,75 g, 3,82 mmol) rozpustená v DMF (2 ml). Následne bol pridaný 3-nitroftalonitril (0,327 g, 1,89 mmol) počas 2 h v desiatich častiach. Potom bola reakčná zmes miešaná pri laboratórnej teplote 24 h a následne bola naliata do vody (40 ml). Produkt bol

extrahovaný do chloroformu (3 × 30 ml), organická fáza bola vysušená bezvodým síranom sodným, prefiltrovaná cez filtračný papier a odparená do sucha. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s acetónom ako mobilnou fázou ($R_f(\mathbf{19}) = 0,27$). Bolo získaných 0,31 g žltej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 51 %. Látka **19** (t.t. 141,7 – 144,2 °C) bola kvôli stabilite prevedená na hydrochlorid (**19·HCl**).

19·HCl: T.t. rozklad od 220 °C. ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 7,82 (dd, $J = 8,9, 7,7$ Hz, 1H), 7,58 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 7,56 (dd, $J = 7,6, 0,9$ Hz, 1H), 4,47 (t, $J = 4,8$ Hz, 2H), 3,53 (t, $J = 4,8$ Hz, 2H), 2,23 (br s, 3H), 1,991 (s, 3H), 1,987 (s, 3H), 1,77 (q, $J = 13,0$ Hz, 6H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CD_3OD): δ 160,3, 135,4, 126,2, 117,8, 116,5, 115,1, 113,1, 104,4, 65,6, 57,9, 39,0, 38,0, 35,2, 29,2. IČ (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 2916, 2709, 2659, 2233, 1578, 1293, 1066, 796. HRMS (m/z) vypočítané pre $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O} + \text{H}^+$: 322,1913, namerané 322,1922 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

6.1.23 3-{2-[(adamantan-1-yl)-*N*-metylamino]etoxy}ftalonitril (20)

K_2CO_3 (0,42 g, 3,12 mmol) v DMF (6 ml) bol ultrazvukovaný 15 min. K tejto suspenzii bola pridaná látka **16** (1,0 g, 4,78 mmol) rozpustená v DMF (2 ml). Následne bol pridaný 3-nitroftalonitril (0,4 g, 2,31 mmol) počas 2 h v desiatich častiach. Potom bola reakčná zmes miešaná pri laboratórnej teplote 48 h a následne bola naliata do vody (50 ml). Produkt bol extrahovaný do chloroformu (3 × 30 ml), organická fáza bola vysušená bezvodým síranom sodným, prefiltrovaná cez filtračný papier a odparená do sucha. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s acetónom ako mobilnou fázou ($R_f(\mathbf{20}) = 0,37$). Bolo získaných 0,21 g žltej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 27 %. Látka **20** (t.t. 144,2 – 146,3 °C) bola kvôli stabilite prevedená na hydrochlorid (**20·HCl**).

20·HCl: T.t. rozklad od 223 °C. ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 7,82 (dd, $J = 8,9, 7,7$ Hz, 1H), 7,57 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H), 7,56 (s, 1H), 4,64–4,59 (m, 1H), 4,52–4,48 (m, 1H), 4,17–4,11 (m, 1H), 3,32–3,30 (m, 1H), 2,96 (s, 3H), 2,28 (s, 3H), 2,07 (q, $J = 13,0$ Hz, 6H), 1,77 (q, $J = 11,0$ Hz, 6H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CD_3OD): δ 160,4, 135,4, 126,2, 117,6, 116,4, 115,1, 113,1, 104,3, 65,5, 65,1, 49,8, 36,1, 35,1, 34,7, 29,7. IČ (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 2913, 2451, 2234, 1579, 1290, 808. HRMS (m/z) vypočítané pre $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O} + \text{H}^+$: 336,2070, namerané 336,2080 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

6.1.24 4-{2-[(adamantan-1-yl)-*N,N*-dimetylamónium]etoxy}ftalonitril jodid (21)

Látka **18** (120 mg, 0,36 mmol) a metyl jodid (1,02 g, 0,42 ml, 7,2 mmol) boli spolu miešané pri laboratórnej teplote cez noc. Potom bol pridaný dietyléter (5 ml) a vytvorená zrazenina bola pozbieraná filtráciou, premytá éterom a používaná bez ďalšieho čistenia. Bolo získaných 138 mg žltej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 81 %.

T.t. rozklad od 204 °C. ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 7,94 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 7,67 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 7,50 (dd, $J = 8,7, 2,3$ Hz, 1H), 4,69 (t, $J = 4,5$ Hz, 2H), 3,84 (t, $J = 4,5$ Hz, 2H), 3,09 (s, 6H), 2,37 (br s, 3H), 2,203 (s, 3H), 2,198 (s, 3H), 1,81–1,75 (m, 6H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CD_3OD): δ 160,9, 135,5, 120,1, 120,096, 117,1, 115,4, 115,1, 107,9, 76,6, 63,3, 56,6, 44,0, 34,8, 34,3, 30,7. IČ (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 2917, 2222, 1591, 1348, 1261, 857. LRMS (ESI) vypočítané pre $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}^+$: 350,2, namerané 349,9 [M] $^+$.

6.1.25 3-{2-[(adamantan-1-yl)-*N,N*-dimetylamónium]etoxy}ftalonitril jodid (22)

Látka **20** (78 mg, 0,232 mmol) a metyl jodid (0,61 g, 0,25 ml, 4,28 mmol) boli spolu miešané pri laboratórnej teplote cez noc. Potom bol pridaný dietyléter (5 ml) a vytvorená zrazenina bola pozbieraná filtráciou, premytá éterom a používaná bez ďalšieho čistenie. Bolo získaných 71 mg žltej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 64 %.

T.t. rozklad od 212 °C. ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 7,86 (dd, J = 8,7, 7,7 Hz, 1H), 7,64 (dd, J = 8,8, 0,8 Hz, 1H), 7,59 (dd, J = 7,7, 0,8 Hz, 1H), 4,77 (t, J = 4,6 Hz, 2H), 3,90 (t, J = 4,6 Hz, 2H), 3,15 (s, 6H), 2,38 (br s, 3H), 2,22 (s, 3H), 2,21 (s, 3H), 1,80–1,73 (m, 6H). ¹³C{¹H} NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 160,2, 135,5, 126,3, 117,7, 116,3, 115,0, 113,2, 104,3, 76,7, 63,9, 56,7, 44,0, 34,8, 34,3, 30,7, 29,7. IČ (ATR): ν_{max} (cm⁻¹) 2913, 2234, 1476, 1291. LRMS (ESI) vypočítané pre C₂₂H₂₈N₃O⁺: 350,2, namerané 350,0 [M]⁺.

6.2 Syntéza ftalocyanínov

6.2.1 Obecný postup A

Látka **3**, **17** alebo **18** vo forme voľnej bázy (1 ekvivalent) a bezvodý octan zinočnatý (1 ekvivalent) v bezvodom pyridíne (1 ml) boli miešané pri teplote varu rozpúšťadla v argónovej atmosfére 24 h. Rozpúšťadlo bolo odparené za zníženého tlaku a zvyšok po odparení bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli. Množstvá reaktantov a príslušné zloženie mobilnej fázy sú uvedené pre každú látku nasledujúcich kapitolách.

Produkt bol prevedený na hydrochlorid pomocou nasledujúceho postupu. Voľná báza zinočnatého ftalocyanínu bola rozpustená v THF (1 – 2 ml) kde bolo pridaných pár kvapiek koncentrovanej HCl. Zmes bola pomaly nakvapkaná do dietyléteru (20 ml), čo viedlo k vytvoreniu zrazeniny vytvoreného hydrochloridu. Rozpúšťadlá boli dekantované a zvyšná zrazenina bola premytá dietyléterom (20 ml) a acetónom (2 × 20 ml), pričom po každom premytí bolo rozpúšťadlo dekantované. Zrazenina bola rozpustená v malom množstve MeOH (0,5 – 1 ml) a nakvapkaná do dietyléteru, pričom sa vytvorila jemná zrazenina produktu, ktorý bol pozbieraný filtráciou.

6.2.2 Obecný postup B

Látka **19** alebo **20** vo forme voľnej bázy (1 ekvivalent) bola rozpustená v čerstvo nadestilovanom butanole (2 – 3 ml) a zahriata na teplotu varu rozpúšťadla. Potom bolo pridané lítium (7 ekvivalentov) a zmes bola miešaná pri teplote varu rozpúšťadla 2 h, čím sa vytvoril bezkovový ftalocyanín, čo sa prejavilo intenzívnym sfarbením roztoku do tmavozelena. Následne bol do reakčnej zmesi pridaný bezvodý octan zinočnatý (2,5 ekvivalentov) a zmes bola miešaná pri teplote varu rozpúšťadla 24 h. Rozpúšťadlo bolo odparené za zníženého tlaku. Zvyšok po odparení bol rozpustený v THF (1 ml) a nakvapkaný do zmesi voda/metanol 1 : 1 (20 ml). Vytvorená zrazenina bola pozbieraná filtráciou, vysušená a prečistená stĺpcovou chromatografiou na silikageli. Množstvá reaktantov a príslušné zloženie mobilnej fázy sú uvedené pre každú látku v nasledujúcich kapitolách.

Produkt bol prevedený na hydrochlorid pomocou nasledujúceho postupu. Voľná báza zinočnatého ftalocyanínu bola rozpustená v THF (1 – 2 ml) kde bolo pridaných pár kvapiek koncentrovanej HCl. Zmes bola pomaly nakvapkaná do dietyléteru (20 ml), čo viedlo k vytvoreniu zrazeniny vytvoreného hydrochloridu. Rozpúšťadlá boli dekantované a zvyšná zrazenina bola premytá dietyléterom (20 ml) a acetónom (2 × 20 ml), pričom po každom premytí, bolo rozpúšťadlo dekantované. Zrazenina bola rozpustená v malom množstve MeOH (0,5 – 1 ml) a nakvapkaná do dietyléteru, pričom sa vytvorila jemná zrazenina produktu, ktorý bol pozbieraný filtráciou.

6.2.3 2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis{[2-(adamant-1-yl)amino]etylsulfanyl}ftalocyanináto zinočnatého komplexu (23)

Bol použitý obecný postup A, látka **3** (100 mg, 0,297 mmol), bezvodý octan zinočnatý (53 mg, 0,296 mmol) a bezvodý pyridín (1 ml). Produkt bol prečistený stĺpcovou

chromatografiou na silikageli s mobilnou fázou chloroform/MeOH/TEA 100 : 20 : 1. Bolo získaných 15 mg tmavozelenej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 14 %.

23·HCl: T.t. rozklad od 310 °C. ^1H NMR [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 9,54–9,37 (m, 6H), 9,35–9,15 (m, 10H), 8,27–8,14 (m, 4H), 4,00–3,92 (m, 4H), 3,85–3,76 (m, 4H), 3,48–3,37 (m, 8H), 2,10 (br s, 12H), 2,04 (br s, 12H), 1,99 (br s, 12H), 1,61 (br s, 24H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR [125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 57,37, 57,36, 57,29, 57,27, 38,9, 38,17, 38,12, 35,6, 31,2, 29,0. IČ (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 2913, 2853, 1339, 1075, 744. UV-vis (DMSO): λ_{max} (nm) (ϵ) 364 (78 700), 625 (42 200), 693 (214 800). HRMS (m/z) vypočítané pre $\text{C}_{80}\text{H}_{92}\text{N}_{12}\text{S}_4\text{Zn} + \text{H}^+$: 1413,5814, namerané 1413,5781 [M + H] $^+$.

6.2.4 2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis[[2-(adamant-1-yl)amino]etoxy]ftalocyanináto zinočnatého komplexu (24)

Bol použitý obecný postup A, látka **17** (50 mg, 0,156 mmol), bezvodý octan zinočnatý (28 mg, 0,156 mmol) a bezvodý pyridín (700 μl). Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli najprv s mobilnou fázou metanol/chloroform 10 : 1 a následne s mobilnou fázou chloroform/MeOH/TEA 100 : 20 : 1. Bolo získaných 15 mg tmavozelenej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 29 %.

24·HCl: T.t. rozklad od 310 °C. ^1H NMR [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 9,37–9,28 (m, 4H), 9,25–9,06 (m, 8H), 9,01–8,88 (m, 4H), 7,90–7,82 (m, 4H), 4,90–4,78 (m, 8H), 3,67–3,56 (m, 8H), 2,26–2,17 (m, 12H), 2,12–1,99 (m, 24H), 1,78–1,64 (m, 24H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR [125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 65,2, 57,3, 38,0, 35,7, 29,0 (signály aromatických vodíkov neboli detekované kvôli agregácii látky v rozpúšťadle). IČ (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 2916, 1609, 1456, 1239, 1061. UV-vis (DMSO): λ_{max} (nm) (ϵ) 357 (95 700), 615 (44 000), 684 (203 400). HRMS (m/z) vypočítané pre $\text{C}_{80}\text{H}_{92}\text{N}_{12}\text{O}_4\text{Zn} + \text{H}^+$: 1349,6728, namerané 1349,6688 [M + H] $^+$.

6.2.5 2,9(10),16(17),23(24)-Tetrakis{2-[(adamantan-1-yl)-N-metylamino]etoxy}ftalocyanináto zinočnatého komplexu (25)

Bol použitý obecný postup A, látka **18** (270 mg, 0,8 mmol), bezvodý octan zinočnatý (143 mg, 0,8 mmol) a bezvodý pyridín (2,5 ml). Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli najprv s mobilnou fázou metanol/chloroform 5 : 1 a následne s mobilnou fázou chloroform/MeOH/TEA 100 : 20 : 1. Bolo získaných 48 mg tmavozelenej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 17 %.

25·HCl: T.t. rozklad od 310 °C. ^1H NMR [600 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 10,09–9,62 (br s, 4 H), 9,37–9,30 (m, 4H), 9,08–8,90 (m, 4H), 7,87–7,80 (m, 4H), 4,98 (br s, 8H), 4,14 (br s, 4H), 3,46 (br s, 4H), 3,00 (s, 6H), 2,996 (s, 6H), 2,28 (br s, 12H), 2,19–2,13 (m, 12H), 2,10–2,05 (m, 12H), 1,77–1,67 (m, 24H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR [150 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 64,3, 57,3, 35,9, 29,5 (signály aromatických vodíkov neboli detekované kvôli agregácii látky v rozpúšťadle). IR (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 2913, 2858, 2640, 1610, 1482, 1225, 1046, 765. λ_{max} (nm) (ϵ) 357 (86 100), 615 (37 900), 683 (184 800). HRMS (m/z) vypočítané pre $\text{C}_{84}\text{H}_{100}\text{N}_{12}\text{O}_4\text{Zn} + \text{H}^+$: 1405,7354, namerané 1405,7323 [M + H] $^+$.

6.2.6 1,8(11),15(18),22(25)-tetrakis{2-[(adamantan-1-yl)amino]etoxy}ftalocyanináto zinočnatého komplexu (26)

Bol použitý obecný postup B, látka **19** (120 mg, 0,372 mmol), lítium (21 mg, 2,6 mmol) a bezvodý octan zinočnatý (172 mg, 0,93 mmol). Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli najprv s mobilnou fázou MeOH/chloroform 3 : 1 a následne

s mobilnou fázou chloroform/MeOH/TEA 100 : 20 : 1. Bolo získaných 20 mg tmavozelenomodrej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 16 %.

26·HCl: T.t. rozklad od 290 °C. ^1H NMR [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 9,50 (br s, 8H), 8,94 (br s, 4H), 8,02 (br s, 4H), 7,80 (br s, 4H), 5,15 (s, 8H), 3,86 (s, 8H), 2,15 (s, 12H), 2,09 (s, 24H), 1,66 (q, $J = 8$ Hz, 6H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR [125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 155,0, 142,9, 130,9, 124,8, 117,0, 66,4, 57,3, 38,2, 35,7, 29,0. IČ (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 2912, 2854, 1593, 1488, 1335, 1267, 1237, 1067, 761. λ_{max} (nm) (ϵ) 320 (48 800), 634 (43 400), 704 (237 800). HRMS (m/z) vypočítané pre $\text{C}_{80}\text{H}_{92}\text{N}_{12}\text{O}_4\text{Zn} + \text{H}^+$: 1349,6728, namerané 1349,6707 [M + H] $^+$.

6.2.7 1,8(11),15(18),22(25)-tetrakis{2-[(adamantan-1-yl)-*N*-metylamino]etoxy}ftalocyanináto zinočnatý komplex (27)

Bol použitý obecný postup B, látka **20** (100 mg, 0,3 mmol), lítium (17 mg, 2,1 mmol) a bezvodý octan zinočnatý (139 mg, 0,75 mmol). Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli najprv s mobilnou fázou MeOH/chloroform 5 : 1 a následne s mobilnou fázou chloroform/MeOH/TEA 100 : 20 : 1. Bolo získaných 20 mg tmavozelenomodrej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 19 %.

27·HCl: T.t. rozklad od 310 °C. ^1H NMR [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 10,60–10,30 (m, 4H), 9,08 (br s, 4H), 8,17–8,11 (m, 4H), 7,83–7,78 (m, 4H), 5,17 (s, 8H), 4,49–3,88 (m, 20H), 2,27–2,15 (m, 36H), 1,71 (m, 24H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR [125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 154,9, 153,2, 153,0, 141,2, 130,9, 125,2, 116,1, 113,5, 65,5, 64,2, 49,2, 48,8, 35,7, 35,2, 29,2. IČ (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 2913, 2855, 1589, 1235, 1045, 761. λ_{max} (nm) (ϵ) 323 (51 000), 376 (45 000), 634 (46 500), 705 (263 000). HRMS (m/z) vypočítané pre $\text{C}_{84}\text{H}_{100}\text{N}_{12}\text{O}_4\text{Zn} + \text{H}^+$: 1405,7354, namerané 1405,7335 [M + H] $^+$.

6.2.8 Obecný postup kvarternizácie ftalocyanínov

Zinočnatý ftalocyanín 14 alebo 16 (1 ekvivalent) a metyljodid (1000 ekvivalentov) boli miešané pri laboratótnej teplote 24 h, chránené pred svetlom pomocou alobalu. Následne bol pridaný *N*-metylpyrolidón (1 ml) a miešanie pri laboratórnej teplote pokračovalo 7 dní. Potom bol pridaný dietyléter (5 ml) a vytvorená zrazenina bola pozbieraná filtráciou. Zrazenina bola rozpustená v MeOH (5 ml) s pár kvapkami DMSO a tento roztok bol filtrovaný cez ručný PTFE membránový filter. Filtrát bol nakvapkaný do dietyléteru (20 ml) a vytvorená zrazenina bola pozbieraná filtráciou. Množstvá reaktantov sú uvedené pre každú látku v nasledujúcej kapitole.

6.2.9 2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis{2-[(adamantan-1-yl)-*N,N*-dimethylammónium]etoxy}ftalocyanináto zinočnatý komplex tetrajodidu (28)

Látka **25** (35 mg, 0,025 mmol) a metyljodid (2,84 mg, 1,25 ml, 20 mmol). Bolo získaných 43 mg tmavozelenej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 87 %.

T.t. rozklad od 300 °C. ^1H NMR [600 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 9,41–9,33 (m, 4H), 9,07–8,99 (m, 4H), 7,97–7,91 (m, 4H), 5,14 (s, 8H), 4,01 (s, 8H), 3,26–3,21 (m, 24H), 2,36 (br s, 12H), 2,24 (s, 24H), 1,75 (q, $J = 10,0$ Hz, 24H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR [150 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 160,2, 132,5, 75,7, 57,4, 45,1, 40,6, 35,2, 34,4, 30,5. IČ (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 2917, 2855, 1607, 1483, 1226, 1049. λ_{max} (nm) (ϵ) 358 (79 100), 614 (33 600), 682 (163 700).

6.2.10 1,8(11),15(18),22(25)-tetrakis{2-[(adamantan-1-yl)-*N,N*-dimethylammónium]etoxy} ftalocyanináto zinočnatý komplex tetrajodidu (29)

Látka **27** (23 mg, 0,016 mmol) a metyljodid (2,37 mg, 1,04 ml, 16,67 mmol). Bolo získaných 28 mg tmavozelenej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 89 %.

T.t. rozklad od 290 °C. ^1H NMR [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 9,14 (d, $J = 7,4$ Hz, 4H), 8,19 (t, $J = 7,6$ Hz, 4H), 7,96 (d, $J = 8,0$ Hz, 4H), 5,31 (s, 8H), 4,40 (s, 8H), 3,32 (br s, 24H, prekrýva sa so signálom vodíkov vody), 2,40 (s, 12H), 2,37 (s, 24H), 1,78 (q, $J = 14,0$ Hz, 24H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR [125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 154,9, 153,1, 140,8, 131,2, 124,8, 116,3, 114,3, 75,5, 63,5, 57,2, 44,7, 34,8, 34,2, 30,3. IČ (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 2925, 2855, 1488, 1235, 1091, 742. λ_{max} (nm) (ϵ) 323 (55 600), 377 (51 800), 634 (50 800), 704 (290 500).

6.3 Syntéza subftalocyanínov

6.3.1 Metyl-3,4,5-tris(dodecyloxy)benzoát (30)

Metyl ester kyseliny gallovej (1,86 g, 10,1 mmol), 1-bromododekan (15,1 g, 14,55 ml, 60,6 mmol), K_2CO_3 (9,76 g, 70,7 mmol) a NaI (0,151 g, 1,1 mmol) boli rozpustené v acetonitrile (100 ml). Reakčná zmes bola miešaná pri teplote varu rozpúšťadla 2 dni, následne bola schladená na laboratórnu teplotu a rozpúšťadlo bolo odparené. Zvyšok bol zriedený dichlórmetánom a prefiltrovaný cez Celite. Rozpúšťadlo bolo odparené a zvyšok po odparení bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s hexánom/etylacetátom 10 : 1 ako mobilnou fázou ($R_f(\mathbf{30}) = 0,66$). Bolo získaných 4,7 g bielej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 68 %.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ 4,00 (td, $J = 6,5, 4,7$ Hz, 2H), 3,87 (s, 1H), 1,87 – 1,78 (m, 1H), 1,80 – 1,69 (m, 1H), 1,50 – 1,41 (m, 2H), 1,34 (dd, $J = 10,2, 5,0$ Hz, 1H), 1,26 (d, $J = 10,2$ Hz, 15H), 0,87 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (151 MHz, CDCl_3): δ 167,04, 152,92, 142,49, 124,75, 108,10, 77,31, 77,10, 76,89, 73,58, 69,27, 52,17, 34,10, 32,94, 32,02, 30,42, 29,83, 29,79, 29,72, 29,66, 29,48, 29,40, 28,86, 28,28, 26,17, 22,78, 14,19.

6.3.2 (3,4,5-tris(dodecyloxy)fenyl)metanol (31)

Látka **30** (8,05 g, 11,68 mmol) bola rozpustená v bezvodom THF (40 ml) pod argónovou atmosférou. Tento roztok bol po kvapkách pridaný do suspenzie LiAlH_4 (1,08 g, 22,86 mmol) v bezvodom THF (22 ml) pri laboratórnej teplote. Po 1 h bola reakčná zmes schladená na 0 °C. Pomaly po kvapkách bola pridaná voda (100 ml). Bola to búrlivá reakcia, pričom sa vytvorila zrazenina. Reakčná zmes bola zneutralizovaná 2M H_2SO_4 (5 – 10 ml). THF bolo odparené za zníženého tlaku a zvyšok po odparení bol extrahovaný chloroformom (3 × 70 ml). Organické vrstvy boli spojené, vysušené bezvodým síranom sodným, prefiltrované cez filtračný papier a odparené do sucha. Látka **31** bola používaná bez ďalšieho čistenia. Bolo získaných 7,46 g svetložltej olejovitej látky, ktorá cez noc stuhla. Výťažok reakcie bol 96 %.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ 6,54 (s, 2H), 4,58 (s, 2H), 3,96 (t, $J = 6,5$ Hz, 4H), 1,49 – 1,42 (m, 6H), 1,37 – 1,22 (m, 53H), 0,87 (t, $J = 7,0$ Hz, 10H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (151 MHz, CDCl_3): δ 153,37, 137,72, 136,10, 105,46, 77,31, 77,10, 76,88, 73,52, 69,21, 65,77, 32,02, 30,42, 29,84, 29,80, 29,74, 29,51, 29,46, 26,23, 26,20, 22,78, 14,20.

6.3.3 3,4,5-tris(dodecyloxy)benzaldehyde (32)

Látka **31** (4 g, 6,04 mmol) bola rozpustená v dioxane (100 ml) a postupne bolo pridané DDQ (1,368 mmol). Reakčná zmes bola miešaná pri laboratórnej teplote 1 h. Rozpúšťadlo bolo odparené za zníženého tlaku a zvyšok po odparení bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s hexánom/etylacetátom 10 : 1 ako mobilnou fázou ($R_f(\mathbf{32}) = 0,64$). Bolo získaných 3,26 g žltej olejovitej látky, ktorá po pár hodinách stuhla. Výťažok reakcie bol 79 %.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ 9,81 (s, 1H), 7,07 (s, 2H), 4,09 – 3,96 (m, 6H), 1,81 (dt, $J = 14,3, 6,7$ Hz, 4H), 1,76 – 1,72 (m, 2H), 1,50 – 1,43 (m, 6H), 1,36 – 1,21 (m, 54H), 0,87 (t, $J = 7,0$ Hz, 9H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (151 MHz, CDCl_3): δ 191,38, 153,63, 143,98, 131,55, 107,97,

77,31, 77,10, 76,89, 73,73, 69,34, 32,02, 30,43, 29,81, 29,78, 29,74, 29,71, 29,64, 29,46, 29,35, 26,16, 26,12, 22,78, 14,19.

6.3.4 3,4,5-tris(dodecyloxy)phenol (33)

Látka **32** (2 g, 2,92 mmol) bola rozpustená v zmesi chloroformu (40 ml) a MeOH (15 ml). Následne bol pridaný peroxid vodíka (0,68 ml, 7,3 mmol, 33%) a koncentrovaná H₂SO₄ (0,065 ml, 1,17 mmol, 95 – 98%) a reakčná zmes bola miešaná pri laboratórnej teplote 4 dni. Potom bolo pridané také množstvo vody, aby sa vytvorili 2 oddelené fázy (cca 60 ml). Organická fáza bola oddelená a vodná fáza bola extrahovaná chloroformom (3 × 50 ml). Všetky organické vrstvy boli spojené, vysušené bezvodým síranom sodným, prefiltrované cez filtračný papier a odparené do sucha. Produkt bol následne prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s hexánom/etylacetátom 10 : 1 ako mobilnou fázou (R_f(**33**) = 0,41). Bolo získaných 1,44 g svetložltej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 76 %.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 6,01 (s, 2H), 3,86 (dt, J = 9,3, 6,6 Hz, 6H), 1,81 – 1,63 (m, 6H), 1,48 – 1,40 (m, 6H), 1,34 – 1,21 (m, 49H), 0,87 (t, J = 7,0 Hz, 9H). ¹³C{¹H} NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 153,63, 151,87, 132,07, 94,35, 77,30, 77,09, 76,88, 73,74, 69,07, 32,03, 30,34, 29,85, 29,80, 29,75, 29,52, 29,49, 29,46, 29,42, 26,24, 26,18, 22,79, 14,19.

6.3.5 1-(prop-2-yn-1-yloxy)adamantán (34)

1-adamantanol (1,67 g, 11 mmol) bol rozpustený v bezvodom THF (30 ml). NaH (1,8 g, 45 mmol, 60% disperzia v minerálnom oleji) bol premytý hexánom, aby bol zbavený minerálneho oleja a následne bol pridaný do reakčnej zmesi pri 0 °C a reakčná zmes bola miešaná 1 h pri 0 °C. Propargyl bromid (2 ml, 19 mmol, 80% v toluéne) bol po kvapkách pridaný do reakčnej zmesi, ktorá bola následne zahrievaná 3 dni pri 30 °C. Pomaly bola pridaná voda (okolo 50 ml), THF bolo odparené za zníženeho tlaku a zvyšok po odparení bol extrahovaný etylacetátom (3 × 50 ml). Organické vrstvy boli spojené, vysušené bezvodým síranom sodným, prefiltrované cez filtračný papier a odparené do sucha. Produkt bol následne prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s hexánom/etylacetátom 5 : 1 ako mobilnou fázou (R_f(**34**) = 0,52). Bolo získaných 0,62 g žltej olejovitej látky. Výťažok reakcie bol 30 %.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 4,13 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 2,36 (t, J = 2,4 Hz, 1H), 2,16 (d, J = 4,4 Hz, 3H), 1,79 (d, J = 3,0 Hz, 6H), 1,72 – 1,55 (m, 6H). ¹³C{¹H} NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 151,35, 84,45, 77,30, 77,09, 76,88, 76,16, 72,10, 41,25, 36,29, 36,08, 31,67, 31,02, 22,74, 14,20.

6.3.6 N-(prop-2-yn-1-yl)adamantán-1-amín (35)

Adamantan-1-amín (2,5 g, 16,5 mmol) bol rozpustený v DMF (7 ml). K roztoku bol pridaný K₂CO₃ (3 g, 24,7 mmol) a propargyl bromid (1,5 ml, 7 mmol) a reakčná zmes bola zahrievaná 4 dni pri 60 °C. Potom bola zmes naliata do vody (20 ml) a produkt bol extrahovaný do chloroformu (3 × 30 ml). Organické vrstvy boli spojené, vysušené bezvodým síranom sodným, prefiltrované cez filtračný papier a odparené do sucha. Produkt bol následne prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s chloroformom/MeOH 10 : 1 ako mobilnou fázou (R_f(**35**) = 0,49). Bolo získaných 0,56 g bielej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 18 %.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 3,39 (d, J = 2,5 Hz, 2H), 2,15 (t, J = 2,6 Hz, 1H), 2,07 – 2,03 (m, 3H), 1,68 – 1,55 (m, 12H). ¹³C{¹H} NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 84,01, 77,33, 77,12, 76,91, 70,65, 51,04, 42,67, 36,69, 30,19, 29,70, 29,61, 29,49.

6.3.7 *N*-metyl-*N*-(prop-2-yn-1-yl)adamantán-1-amín (36)

Látka **35** (85 mg, 0,45 mmol) bola rozpustená v MeOH (2 ml). Následne bola pridaná kyselina mravčia (0,018 ml, 0,45 mmol, 96%) a formaldehyd (0,017 ml, 0,225 mmol, 37%) a reakčná zmes bola miešaná pri teplote varu rozpúšťadla cez noc. Potom bola reakčná zmes naliata do vody (20 ml) a bol pridaný roztok 10 % NaOH v takom množstve, aby pH vody bolo zásadité, čím sa vytvorila zrazenina. Zmes bola extrahovaná do chloroformu (3 × 30 ml). Organické vrstvy boli spojené, vysušené bezvodým síranom sodným, prefiltrované cez filtračný papier a odparené do sucha. Produkt bol následne prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s chloroformom/MeOH 20 : 1 ako mobilnou fázou ($R_f(\mathbf{36}) = 0,67$). Bolo získaných 70 mg bielej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 77 %.

^1H NMR (600 MHz, CHCl_3): δ 3,39 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H), 2,39 (s, 3H), 2,16 (t, $J = 2,3$ Hz, 1H), 2,09 – 2,04 (m, 3H), 1,73 (d, $J = 3,0$ Hz, 6H), 1,66 – 1,55 (m, 6H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (151 MHz, CHCl_3): δ 82,82, 77,33, 77,12, 76,90, 71,88, 54,56, 39,08, 38,90, 36,80, 33,73, 29,71, 29,60.

6.3.8 Chlorid 2,9,16(17) trijódosubftalocyanín bóru (37)

4-jódftalonitril (0,762 g, 3mmol) bol rozpustený v BCl_3 (3 ml, 3 mmol, 1M v *p*-xyléne) v argónovej atmosfére. Banka s reakčnou zmesou bola vložená do predhriateho hniezda na 150 °C a reakčná zmes bola miešaná 20 min. Rozpúšťadlo bolo odparené za zníženého tlaku a zvyšok po odparení bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s toluénom ako mobilnou fázou ($R_f(\mathbf{36}) = 0,76$). Bolo získaných 330 mg tmavofialovej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 40 %.

6.3.9 B-[tris(3,4,5-dodecyloxy)fenoxi]-2,9,16(17) trijódosubftalocyanín bóru (38)

Látka **37** (100 mg, 0,124 mmol) a látka **33** (400 mg, 0,618 mmol) boli rozpustené v bezvodom *o*-dichlórbenzéne (1 ml). Reakčná zmes bola miešaná 4 h pri 120 °C v olejovom kúpeli. Rozpúšťadlo bolo odparené za zníženého tlaku a zvyšok po odparení bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s hexánom/etylacetátom 10 : 1 ako mobilnou fázou ($R_f(\mathbf{38}) = 0,52$). Bolo získaných 117 mg tmavofialovej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 67 %.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 9,20 (s, 3H), 8,54 (dt, $J = 8,3, 2,6$ Hz, 3H), 8,22 (dd, $J = 8,3, 1,5$ Hz, 3H), 4,54 (s, 2H), 3,65 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 3,53 (t, $J = 6,6$ Hz, 4H), 1,59 (q, $J = 8,9$ Hz, 12H), 1,27 (d, $J = 26,2$ Hz, 66H), 0,89 (dt, $J = 8,7, 6,9$ Hz, 9H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 152,60, 151,39, 151,20, 151,00, 150,25, 150,08, 150,04, 149,87, 147,87, 138,80, 138,77, 132,95, 132,34, 132,27, 132,21, 131,41, 131,38, 129,86, 129,82, 123,52, 123,47, 123,45, 97,49, 96,20, 96,18, 77,25, 77,20, 77,00, 76,74, 73,16, 68,71, 31,95, 31,93, 30,15, 29,76, 29,73, 29,70, 29,69, 29,67, 29,55, 29,40, 29,38, 29,12, 26,03, 25,99, 22,71, 22,69, 14,14, 14,11.

6.3.10 B-[tris(3,4,5-dodecyloxy)fenoxi]-2,9,16(17)-tris[3-(adamantan-1-yl)oxy]prop-1-yn-1-yl] subftalocyanín bóru (39)

Látka **38** (65 mg, 0,046 mmol), bis(trifenylfosfín) paládium chlorid (6,4 mg, 0,008 mmol) a CuI (1,55 mg, 0,008 mmol) boli rozpustené v bezvodom THF (5 ml) a bezvodom TEA (1 ml) v argónovej atmosfére. Následne bola pridaná látka **34** (39 mg, 0,205 mmol) a reakčná zmes bola miešaná pri laboratórnej teplote cez noc. Reakčná zmes bola zriedená pomocou THF (15 ml) a prefiltrovaná cez Celite. Rozpúšťadlo bolo odparené za zníženého tlaku a zvyšok po odparení bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s hexánom/etylacetátom 10 : 1 ako mobilnou fázou ($R_f(\mathbf{39}) = 0,41$) a následne gélovou chromatografiou pomocou gélovej chromatografie na BioBeads v chloroforme. Bolo získaných 19 mg tmavofialovej olejovitej látky. Výťažok reakcie bol 26 %.

^1H NMR (600 MHz, CHCl_3): δ 8,87 (d, $J = 3,3$ Hz, 3H), 8,74 – 8,67 (m, 3H), 7,92 (ddt, $J = 8,2, 2,9, 1,5$ Hz, 3H), 4,53 (s, 2H), 4,48 – 4,45 (m, 6H), 3,62 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 3,55 – 3,49 (m, 4H), 2,21 (d, $J = 3,5$ Hz, 9H), 1,89 (t, $J = 4,0$ Hz, 21H), 1,71 – 1,62 (m, 22H), 1,60 – 1,54 (m, 18H), 1,33 – 1,21 (m, 72H), 0,87 (dt, $J = 9,7, 6,9$ Hz, 9H).

6.3.11 B-[tris(3,4,5-dodecyloxy)fenoxý]-2,9,16(17)-tris[3-(adamantan-1-yl)(*N*-metyl)amino]prop-1-yn-1-yl] subftalocyanín bóru (40)

Látka **38** (29 mg, 0,02 mmol), bis(trifenylfosfín) paládium chlorid (2,7 mg, 0,004 mmol) a CuI (0,65 mg, 0,004 mmol) boli rozpustené v bezvodom THF (3 ml) a bezvodom TEA (1 ml) v argónovej atmosfére. Následne bola pridaná látka **36** (18,3 mg, 0,09 mmol) a reakčná zmes bola miešaná pri laboratórnej teplote 6 h. Reakčná zmes bola zriedená pomocou THF (10 ml) a prefiltrovaná cez Celite. Rozpúšťadlo bolo odparené za zníženého tlaku a zvyšok po odparení bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s hexánom/etylacetátom/TEA 20 : 10 : 1 ako mobilnou fázou ($R_f(\mathbf{40}) = 0,42$) a následne gélovou chromatografiou pomocou gélovej chromatografie na BioBeads v THF. Bolo získaných 25 mg tmavofialovej olejovitej látky, Výťažok reakcie bol 76 %.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ 8,84 (s, 3H), 8,70 (d, $J = 8,2$ Hz, 3H), 7,89 (d, $J = 8,1$ Hz, 3H), 4,54 (s, 2H), 3,78 (s, 6H), 3,62 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 3,52 (t, $J = 6,7$ Hz, 4H), 2,57 (d, $J = 3,2$ Hz, 9H), 2,15 (s, 12H), 1,87 (s, 20H), 1,74 – 1,64 (m, 36H), 1,33 – 1,21 (m, 96H), 0,87 (qd, $J = 6,9, 4,4$ Hz, 9H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (151 MHz, CDCl_3): δ 152,68, 133,05, 125,50, 122,13, 97,59, 77,31, 77,10, 76,89, 73,26, 68,78, 39,95, 39,18, 36,82, 34,07, 32,05, 32,02, 30,27, 29,87, 29,79, 29,66, 29,51, 29,48, 29,24, 26,13, 26,09, 22,80, 14,22.

6.3.12 B-[tris(3,4,5-dodecyloxy)fenoxý]-2,9,16(17)-tris[3-(adamantan-1-yl)(*N,N*-dimetyl)amino]prop-1-yn-1-yl] subftalocyanín bóru trijodid (41)

Látka **40** (8 mg, 0,005 mmol) a metyljodid (0,5 ml, 8 mmol), ktorý bol použitý aj ako rozpúšťadlo, boli miešané pri laboratórnej teplote 3 dni. Potom bol pridaný dietyléter (5 ml) a vytvorená zrazenina bola odsatá a použitá bez ďalšieho čistenia. Boli získané 4 mg čiernej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 39 %.

6.4 Syntéza α -aminoftalocyanínov

6.4.1 2,3-dikýano-1,4-fenylén bis(trifluorometánsulfonát) (42)

Látka bola pripravená podľa publikovaného postupu.¹¹¹

6.4.2 2,3-dikýano-1,4-fenylén bis(4-metylbenzénsulfonát) (43)

Látka bola pripravená podľa publikovaného postupu.¹¹²

6.4.3 3,6-dibrómftalonitril (44)

Trifenylfosfín (22,5 g, 0,858 mol) bol rozsuspendovaný v acetonitrile (100 ml) pomocou ultrazvuku na 10 min pri laboratórnej teplote a následne bola suspenzia schladená na 0 °C. Potom bol pridaný bróm (14 g, 4,49 ml, 0,0876 mol) a reakčná zmes bola zahriata na laboratórnu teplotu. Ďalej bol pridaný 3,6-dihydroxyftalonitril (5,0 g, 0,0313 mmol) a reakčná zmes bola zahriata na 70 °C na 30 min. Acetonitril bol odparený za zníženého tlaku a zvyšok po odparení bol miešaný ešte 1 h pri 230 °C a potom pri 330 °C s otvorenou reakčnou bankou, až kým sa neprestal vytvárať plynný HBr. Produkt bol rozpustený v DCM, premytý 5% NaHCO_3 a vysušený bezvodým síranom sodným. Produkt bol prečistený dvakrát stĺpcovou chromatografiou na silikageli s toluénom/hexánom 3 : 1 ako mobilnou fázou. Bolo získaných 3,53 g bielej kryštalickej látky. Výťažok reakcie bol 40 %.

T.t. 245,9 – 247,1 °C; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 8,1 (s, 2H, ArH); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 138,7, 125,3, 120,0, 114,7; IČ (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 3105, 3063, 2234 (CN), 1959, 1556, 1445, 1394, 1204.

6.4.4 Metóda nukleofilnej substitúcie

Látka **42**, **43** alebo **44** (1 ekvivalent) a zásada (3 ekvivalenty) boli rozpustené pod argónovou atmosférou v DMSO. Do reakčnej zmesi bol pridaný dietylamin (10 ekvivalentov) a zmes bola zahrievaná na 80 °C 24 h alebo 7 dní. Množstvo vzniknutých produktov bolo kvantifikované metódou popísanou nižšie v kapitole 6.4.6. Izolácia produktov prebiehala nasledujúcim spôsobom: bola pridaná voda a produkt bol extrahovaný do etylacetátu a do chloroformu (2 \times). Organické vrstvy boli spojené a vysušené bezvodým síranom sodným. Produkty 3-bromo-6-(dietylamino)ftalonitril (**45**) a 3,6-bis(dietylamino)ftalonitril (**46**) boli izolované pomocou stĺpcovej chromatografie na silikageli s mobilnou fázou chloroform/toluén 1 : 1 (R_f (**45**) = 0,42) alebo hexán/etylacetát 3 : 1 (R_f (**46**) = 0,29). Výťažky jednotlivých reakcií sú uvedené v Tabuľke 15.

45: žltá pevná látka, T.t. 114,0 – 115,5 °C (MeOH); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7,56 (d, J = 9,4 Hz, 1H, ArH), 6,97 (d, J = 9,4 Hz, 1H, ArH), 3,51 (q, J = 7,1 Hz, 4H, NCH_2), 1,24 (t, J = 7,1 Hz, 6H, CH_3); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 151,9, 136,7, 122,4, 120,3, 116,0, 115,1, 113,0, 102,0, 46,1, 12,8; IČ (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 3101, 2980, 2934, 2231 (CN), 2211 (CN), 1585, 1534, 1467, 1414, 1383, 1357, 1317, 1289, 1210; HRMS (ESI) vypočítané pre $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{BrN}_3 + \text{H}^+$ 278,0287, namerané 278,0294 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

46: žltá olejovitá látka, ktorá postupne zatuhla, T.t. 94,6 – 95,7 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7,12 (s, 2H, ArH), 3,30 (q, 8H, J = 7,2 Hz, NCH_2), 1,14 (t, 12H, J = 7,0 Hz, CH_3); IČ (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 2975, 2933, 2870, 2212 (CN), 1604, 1504, 1468, 1446, 1417, 1383, 1358, 1333, 1319, 1272, 1245, 1215, 1187, 1170, 1148, 1098, 1082, 1027, 986; HRMS (ESI) vypočítané pre $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_4 + \text{H}^+$ 271,1917, namerané 271,1920 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

6.4.5 Buchwald-Hartwig coupling

Látka **42**, **43** alebo **44** (1 ekvivalent), zásada (5 ekvivalentov), Pd katalyzátor (0,02 ekvivalentu) a pomocný Pd katalyzátor (0,05 ekvivalentu) boli navážené do vopred vysušenej banky, ktorá bola následne naplnená argónovou atmosférou. Striekačkou bolo pridané rozpúšťadlo (toluén/ $t\text{BuOH}$ 5 : 1 alebo DMSO) a dietylamin (6 ekvivalentov). Reakčná zmes bola zahrievaná (konkrétne teploty sú uvedené v Tabuľke 16) po dobu 24 h. Množstvo získaných produktov **45** a **46** bolo kvantifikovaných pomocou metódy opísanej nižšie v kapitole 6.4.6.

6.4.6 Kvantifikácia látok 45 a 46

Reakčná zmes bola kvantitatívne prenesená do destilačnej banky a všetky rozpúšťadlá boli odparené do sucha. Zvyšok po odparení bol rozpustený v THF (2 ml) a 5 μl tohto roztoku bolo nanosených na TLC dosku (5 \times 5 cm). Produkty **45** a **46** boli izolované z dvojdimenzionálneho TLC s mobilnými fázami hexán/etylacetát 3 : 1 a chloroform/toluén 1 : 1. Príslušné škvrny produktov boli kvantitatívne vyškrapané z TLC dosky, extrahované do THF (2 ml) a prefiltrované priamo do fluorescenčnej kyvety. Množstvo produktu bolo vypočítané pomocou kalibračnej krivky na základe intenzity fluorescencie pri 472 a 505 nm pre látku **45**, resp. látku **46** (λ_{exc} = 400 nm). Merania boli robené v duplikáte a dáta prezentované v Tabuľkách 15 a 16 predstavujú priemer týchto dvoch meraní.

6.4.7 1,4,8,11,15,18,22,25-oktakis(dietylamino)ftalocyanináto horečnatý komplex (47)

Postup A: látka **46** (10 mg, 0,037 mmol) bola rozpustená v bezvodom čerstvo nadestilovanom butanole a zmes bola zahrievaná na 130 °C 10 min. Do reakčnej zmesi bolo pridané lítium (1 mg, 0,148 mmol) a zahrievanie pokračovalo 1 h. Na TLC sme ale nepozorovali požadovanú zelenú škvrnu produktu.

Postup B: k aktivovanému horčíku (6 mg, 0,247 mmol) bol pridaný bezvodý čerstvo nadestilovaný butanol a reakčná zmes bola zahrievaná pri 130 °C počas 2,5 h. Látka **46** bola rozpustená v malom množstve butanolu a tento roztok bol pridaný do reakčnej zmesi, ktorá bola následne ďalej zahrievaná pri 130 °C 24 h. Na TLC sme ale nepozorovali požadovanú zelenú škvrnu produktu.

6.4.8 1,8(11),15(18),22(25)-tetrabromo-4,11(8),18(15),25(22)-tetrakis(dietylamino)ftalocyanín (48H)

Aktivovaný horčík (0,478 g, 19,6 mmol) a kryštálik jódu boli v bezvodom butanole (4 ml) zahrievané pri teplote 130 °C 3 h, kým sa nevytvoril butoxid horečnatý. Následne bola pridaná látka **45** (0,793 g, 2,85 mmol) a reakčná zmes bola ďalej zahrievaná pri 130 °C cez noc. Potom bola do reakčnej zmesi pridaná zmes vody/MeOH/kyseliny octovej 10 : 10 : 1,5 (20 ml) na odstránenie nadbytočného butoxidu horečnatého. Produkt bol z tejto zmesi extrahovaný do chloroformu a prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s chloroformom/THF 5 : 1 ako mobilnou fázou. Stĺpcová chromatografia bola zopakovaná, tentoraz s chloroformom/THF 8 : 1 ako mobilnou fázou. Nakoniec bol produkt premytý metanolom a pevná látka bola pozbieraná filtráciou. Bolo získaných 126 mg tmavej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 16 % (ako zmes izomérov).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 /pyridín-*d*5 3 : 1): δ (ppm) 8,13 – 8,32 (m, 4H, ArH), 7,49 – 7,61 (m, 4H, ArH), 3,98 – 4,40 (m, 16H, NCH_2), 0,63 – 1,53 (m, 24H, CH_3); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3 /pyridín-*d*5 3 : 1): δ (ppm) 148,3, 148,0, 147,5, 130,9, 129,8, 122,7, 122,6, 122,3, 122,2, 108,6, 108,4, 48,4, 48,2, 12,4; IČ (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 2968, 2930, 2867, 1574, 1563, 1558, 1488, 1446, 1372, 1299, 1255, 1230, 1207, 1180, 1148, 1129, 1095, 1041, 1018, 953, 868; HRMS (ESI) vypočítané pre $\text{C}_{48}\text{H}_{50}\text{Br}_4\text{N}_{12} + \text{H}^+$ 1111,1086, namerané 1111,1082 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

6.4.9 1,8(11),15(18),22(25)-tetrabromo-4,11(8),18(15),25(22)-tetrakis(dietylamino)ftalocyanináto zinočnatý komplex (48Zn)

Látka **48H** (30 mg, 26,9 mmol) a octan zinočnatý (49,4 mg, 269 mmol) v pyridíne (5 ml) boli zahrievané na 120 °C 1 h. Následne bolo rozpúšťadlo odparené, zvyšok po odparení bol premytý vodou a produkt bol prečistený pomocou stĺpcovej chromatografie na silikageli s chloroformom/THF 1 : 1 ako mobilnou fázou. Nakoniec bol produkt premytý metanolom a hexánom a pevná látka bola pozbieraná filtráciou. Bolo získaných 30 mg tmavej pevnej látky. Výťažok reakcie bol 95 % (ako zmes izomérov).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 /pyridine-*d*5 3 : 1): δ (ppm) 8,18 – 8,27 (m, 4H, ArH), 7,49 – 7,62 (m, 4H, ArH), 4,12 – 4,44 (m, 16H, NCH_2), 0,89 – 1,48 (m, 24H, CH_3); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3 /pyridín-*d*5 3 : 1): δ (ppm) 152,41, 152,39, 152,14, 152,11, 151,9, 151,8, 151,7, 148,3, 148,1, 147,9, 147,81, 147,78, 147,02, 146,98, 146,8, 137,9, 137,80, 137,77, 137,62, 137,58, 135,1, 135,0, 134,9, 134,6, 130,1, 130,0, 129,9, 129,8, 129,6, 122,0, 121,8, 121,5, 108,6, 108,5, 108,4, 108,3, 108,2, 48,83, 48,76, 48,7, 48,42, 48,37, 48,2, 12,38, 12,36, 12,34, 12,29, 12,26; IČ (ATR): ν_{max} (cm^{-1}) 2968, 2929, 2869, 1569, 1482, 1446, 1373, 1299, 1254, 1217, 1180, 1148, 1117, 1092, 1063, 1021, 963; HRMS (ESI) vypočítané pre $\text{C}_{48}\text{H}_{48}\text{Br}_4\text{N}_{12}\text{Zn} + \text{H}^+$ 1179,0168 namerané 1179,0168 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

6.5 Fotofyzikálne štúdium vlastností Pcs

6.5.1 Skúmanie interakcie Pcs a CB[7] pomocou UV-vis a fluorescencie

Boli pripravené zásobné roztoky študovaných Pcs (200 μM) v ultračistej vode s 2% DMSO a CB[7] (200 μM) v ultračistej vode. Do fluorescenčnej kyvety s DMSO (2 ml) bolo pridaných 20 μl zásobného roztoku Pc a bolo zmerané absorpčné spektrum v rozsahu 300 – 850 nm, aby bolo získané úplne monoméne spektrum. Následne do druhej fluorescenčnej kyvety s ultračistou vodou (2 ml) bolo pridaných 20 μl zásobného roztoku Pc a bolo zmerané absorpčné spektrum v rozsahu 300 – 850 nm, a emisné spektrum po excitácii pri 640 nm. Ďalej bolo pridaných 10 μl zásobného roztoku CB[7] a bolo zmerané absorpčné a emisné spektrum. Nasledovali ďalšie prídavky CB[7] ($12 \times 10 \mu\text{l}$, potom $4 \times 20 \mu\text{l}$), pričom po každom prídavku bolo zmerané absorpčné a emisné spektrum až do celkového prídavku 10 ekvivalentov CB[7] k danému Pc. Dáta boli analyzované ako zmena absorpčného maxima Q-pásu alebo emisného maxima vzhľadom k počtu ekvivalentov CB[7].

6.5.2 UV-vis skúmanie interakcie Pcs a β -CD

Boli pripravené zásobné roztoky študovaných Pcs (200 μM) v ultračistej vode s 2% DMSO a β -CD (8 mM) v ultračistej vode. Do fluorescenčnej kyvety s DMSO (2 ml) bolo pridaných 20 μl zásobného roztoku Pc a bolo zmerané absorpčné spektrum v rozsahu 300 – 850 nm, aby bolo získané úplne monoméne spektrum. Následne do druhej fluorescenčnej kyvety s ultračistou vodou (2 ml) bolo pridaných 20 μl zásobného roztoku Pc a bolo zmerané absorpčné spektrum v rozsahu 300 – 850 nm. Následne bolo pridaných 20 μl zásobného roztoku β -CD a bolo zmerané absorpčné spektrum. Nasledovali ďalšie prídavky β -CD ($10 \times 20 \mu\text{l}$, potom $13 \times 40 \mu\text{l}$), pričom po každom prídavku bolo zmerané absorpčné spektrum až do celkového prídavku 1440 ekvivalentov β -CD k danému Pc.

6.5.3 Stanovenie $\log P$

Do plastovej vialky, v ktorej bola zmes oktanolu (400 μl) a ultračistej vody (400 μl) boli pridané 4 μl zásobného roztoku Pc v DMSO (500 μM). Táto zmes bola vortexovaná 5 min pri laboratórnej teplote a následne centrifugovaná (10 000 ot/min, 5 min, laboratórna teplota). Bolo odobratých 50 μl z každej vrstvy, ktoré boli zriedené s 2 ml DMSO a boli zmerané emisné spektrá ($\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$). Hodnota $\log P$ bola vypočítaná podľa vzorca $\log P = \log(F_{\text{oktanol}}/F_{\text{voda}})$, kde F_{oktanol} a F_{voda} sú hodnoty fluorescencie vo fluorescenčnom maxime v roztoku DMSO z oktanolovej, respektíve vodnej vrstvy. V prípade stanovenia $\log P$ pre komplex Pc-CB[7] bol použitý rovnaký postup, ale okrem 4 μl zásobného roztoku Pc v DMSO (500 μM) bolo pridaných ešte 8 μl zásobného roztoku CB[7] v ultračistej vode (1 mM).

6.5.4 Kvantové výťažky

Kvantový výťažok fluorescencie (Φ_F) v DMSO bol stanovený absolútnou metódou s použitím integračnej sféry v FLS 1000 spektrofluorimetri (Edinburgh Instruments) ($C_{\text{vzorku}} = 1 \mu\text{M}$).

Kvantový výťažok fluorescencie (Φ_F) vo vode bol stanovený porovnávacou metódou s použitím nesubstituovaného zinočnatého ftalocyanínu (ZnPc, Sigma-Aldrich) ako referenčnú látku ($\Phi_F = 0,32$ v THF⁶⁰). Do ultračistej vody (2,5 ml) bolo pridaných 25 μl zásobného roztoku Pc (100 μM) a bolo zmerané emisné spektrum ($\lambda_{\text{ex}} = 635 \text{ nm}$). Hodnota Φ_F bola zmeraná podľa nasledujúcej rovnice:

$$\Phi_F^S = \Phi_F^R \left(\frac{F^S}{F^R} \right) \left(\frac{1 - 10^{-A^R}}{1 - 10^{-A^S}} \right) \left(\frac{n^S}{n^R} \right)$$

pričom F je integrovaná plocha pod krivkou emisného spektra, A je absorbanca pri excitačnej vlnovej dĺžke a n je index lomu rozpúšťadla. Horné indexy R a S predstavujú referenčnú látku a vzorku (sample, S). Všetky experimenty boli robené v triplikáte a prezentované dáta predstavujú priemer týchto 3 meraní.

Kvantový výťažok produkcie singletového kyslíka (Φ_{Δ}) bol stanovený v DMSO podľa už publikovaného postupu¹²³ pomocou rozpadu chemickej pasce (1,3-difenyilizobenzofurán, DPBF) a ZnPc ako referenčnej látky ($\Phi_{\Delta}(\text{ZnPc}) = 0,67$ v DMSO¹²⁷). Zásobný roztok DPBF (2,5 ml) v DMSO (o takej koncentrácii, aby absorbanca pri 417 nm bola $\sim 1,0$) bol v kvete prebublávaný kyslíkom 1 min. Následne bol pridaný zásobný roztok Pc v DMSO tak, aby maximum absorbanca v Q-páse bolo približne 0,1. Roztok bol miešaný a ožiarovaný pomocou xenónovej lampy (100 W, Newport) po špecifický čas. Dopadajúce svetlo prešlo cez vodný filter (6 cm) a OG530 filter, aby bolo odstránené teplo, respektíve svetlo s vlnovou dĺžkou pod 523 nm. Následne bol použitý filter NBS-ND10 (Newport) na zvýšenie intenzity svetla. Pokles hladiny roztoku DPBF po daných ožiarovacích časoch bol sledovaný pri 417 nm. Všetky experimenty boli robené v triplikáte a dáta prezentované v tejto práci predstavujú priemer týchto troch meraní.

Signál singletového kyslíka v deuterovanej vode: v kvete bola deuterovaná voda (2,5 ml) okyslená deuterovanou kyselinou chlorovodíkovou (2 μl) a prebublávaná kyslíkom 1 min. Potom bol pridaný roztok **16•HCl** v D_2O tak, aby bola výsledná koncentrácia v kvete 8 μM . Roztok bol excitovaný VPL laserom pri 371,3 nm a následne bolo zmerané fosforescenčné spektrum v oblasti 1250 – 1290 nm pomocou NIR PMT detektora (FLS1000 spektrofluorometer, Edinburgh Instruments). Potom bol pridaný zásobný roztok CB[7] v D_2O tak, aby koncentrácia v kvete bola 32 μM , a pri rovnakých podmienkach bolo zmerané fosforescenčné spektrum.

6.6 Fotofyzikálne štúdium vlastností SubPc

6.6.1 Skúmanie interakcie vo vode

Boli pripravené zásobné roztoky študovaných SubPc (200 μM) v THF pre látku **39** a v DMSO pre látku **41**. Roztok CB[7] (200 μM) bol pripravený v ultračistej vode. Do fluorescenčnej kvety s 2 ml THF alebo DMSO (pre látku **39**, resp. **41**) bolo pridaných 20 μl zásobného roztoku SubPc a bolo zmerané absorpčné spektrum v rozsahu 300 – 750 nm, aby bolo získané úplne monoméne spektrum a emisné spektrum po excitácii pri 530 nm v rozsahu 540 – 750 nm. Následne do druhej fluorescenčnej kvety s ultračistou vodou (2 ml) bolo pridaných 20 μl zásobného roztoku SubPc a bolo zmerané absorpčné spektrum v rozsahu 300 – 750 nm, a emisné spektrum po excitácii pri 530 nm v rozsahu 540 – 750 nm. Pre látku **39** bolo následne pridaných 60 μl zásobného roztoku CB[7] a bolo zmerané absorpčné a emisné spektrum. Nakoniec bolo pridaných 200 μl zásobného roztoku CB[7] a bolo zmerané absorpčné a emisné spektrum. Pre látku **41** boli prídavky CB[7] 5 \times 20 μl , potom 1 \times 40 μl a nakoniec 1 \times 60 μl .

6.6.2 Skúmanie interakcie vo vode s prídavkom organického rozpúšťadla

Boli pripravené zmesi vody a organického rozpúšťadla 10 %, 20 % a 30 % THF alebo acetonitrilu. Do fluorescenčnej kvety s 2 ml zmesi vody a organického rozpúšťadla bolo pridaných 20 μl zásobného roztoku SubPc (200 μM v THF) a bolo zmerané emisné spektrum po excitácii pri 530 nm v rozsahu 540 – 750 nm. Následne bolo pridaných 80 μl zásobného roztoku CB[7] a znova bolo zmerané emisné spektrum.

6.6.3 Skúmanie interakcie vo vode s 30 % THF

Do fluorescenčnej kvety s 2,5 ml zmesi vody s 30 % THF bolo pridaných 25 μl zásobného roztoku SubPc (200 μM v THF) a bolo zmerané emisné spektrum po excitácii pri 530 nm

v rozsahu 540 – 750 nm. Postupne bol pridávaný zásobný roztok CB[7] (200 μM v ultračistej vode) v nasledujúcich prídavkoch: $6 \times 12,5 \mu\text{l}$, $1 \times 25 \mu\text{l}$, potom $1 \times 50 \mu\text{l}$ a nakoniec $1 \times 100 \mu\text{l}$. Po každom prídavku bolo po 10 min zmerané emisné spektrum po excitácii pri 530 nm v rozsahu 540 – 750 nm.

6.6.4 Určenie log P

Do plastovej vialky, v ktorej bola zmes oktanolu (400 μl) a ultračistej vody (400 μl) boli pridané 10 μl zásobného roztoku SubPc (200 μM v THF). Táto zmes bola vortexovaná 5 min pri laboratórnej teplote a následne centrifugovaná (10 000 ot/min, 5 min, laboratórna teplota). Bolo odobratých 50 μl z každej vrstvy, ktoré boli zriedené s THF (2 ml) a boli zmerané emisné spektrá ($\lambda_{\text{exc}} = 525 \text{ nm}$). Hodnota log P bola vypočítaná podľa vzorca $\log P = \log(F_{\text{oktanol}}/F_{\text{voda}})$, kde F_{oktanol} a F_{voda} sú hodnoty fluorescence vo fluorescenčnom maxime v roztoku THF z oktanolovej, respektíve vodnej vrstvy. V prípade stanovenia log P pre komplex Pc-CB[7] bol použitý rovnaký postup, ale okrem 10 μl zásobného roztoku SubPc (200 μM v THF) bolo pridaných ešte 6 μl zásobného roztoku CB[7] v ultračistej vode (1 mM).

6.6.5 Meranie fotofyzikálnych vlastností

Kvantový výťažok fluorescence (Φ_F) v DMSO bol stanovený absolútnou metódou s použitím integračnej sféry v FLS 1000 spektrofluorimetri (Edinburgh Instruments) ($C_{\text{vzorku}} = 1 \mu\text{M}$).

Kvantový výťažok fluorescence (Φ_F) vo vode bol stanovený porovnávacou metódou s použitím rodamínu 6G (Sigma-Aldrich) ako referenčnú látku ($\Phi_F = 0,94$ v etanole). Ďalej bol postup rovnaký ako v prípade určenia kvantového výťažku fluorescence v časti 6.5.4.

Kvantový výťažok produkcie singletového kyslíka (Φ_Δ) bol stanovený v THF rovnakou metódou ako bola popísaná v časti 6.5.4.

6.7 Fotofyzikálne štúdium aminorftalocyanínov

Kvantový výťažok fluorescence (Φ_F) v THF bol stanovený porovnávacou metódou s nesubstituovaným zinočnatým ftalocyanínom (ZnPc, Sigma-Aldrich). Podrobný postup je popísaný v časti 6.5.4.

Kvantový výťažok produkcie singletového kyslíka (Φ_Δ) bol stanovený v THF. Podrobný postup je popísaný v časti 6.5.4.

Protonizácia: 2,5 ml roztoku Pc v chloroforme (1 μM) bolo daných do absorpčnej kyvety a bolo zmerané absorpčné spektrum v rozsahu 500 – 900 nm. Následne bolo postupne pridávané definované množstvo TFA (5 – 50 μl) a po každom prídavku TFA bolo zmerané absorpčné spektrum.

6.8 Biologické experimenty

6.8.1 Bunkové kultúry a príprava vzoriek

Bunková línia ľudského karcinómu krčka maternice (HeLa) a bunková línia melanómu ľudskej kože (SK-MEL-28) boli zakúpené od American Type Cell Culture Collection. Zásobné roztoky študovaných Pcs (**4-HCl**, **13-HCl** – **16-HCl**, **17** a **18**) boli rozpustené v DMSO o koncentracii 10 mM a následne zriedené vodou alebo 1mM roztokom CB[7] vo vode tak, aby výsledný pomer PS : CB[7] bol 1 : 4. Nariedené zásobné roztoky boli sterilizované filtráciou cez 0,22 μm (pred a po filtrácii neboli pozorované žiadne zmeny v koncentracii). Tieto zásobné roztoky boli nariedené *ad hoc* bunkovým kultivačným médiom na požadovanú koncentráciu.

6.8.2 Cytotoxické experimenty

Experimenty na bunkovú toxicitu (fototoxicita a toxicita bez ožiarenia) boli robené v 96 jamkovej doštičke (ploché dno, TPP) s oboma bunkovými líniami. Na určenie fototoxicity boli bunky inkubované s Pc (bez alebo s CB[7]) 12 h v rôznych koncentráciách. Potom boli bunky opláchnuté, bolo pridané čerstvé médium a následne boli bunky ožiarené 15 min pomocou 450 W Xe-lampy (Newport) s vodným a cut-on filtrom ($\lambda > 570$ nm, 11,2 J/cm²). Po ďalších 24 h bola určená životaschopnosť buniek testom s neutrálnou červenou. Bunky s letálnou dávkou H₂O₂ boli použité ako pozitívna kontrola. Vlastná toxicita (bez ožiarenia) bola určená po inkubácii HeLa buniek s Pc (bez a s CB[7]) po 24 h a životaschopnosť buniek bola opäť určená testom s neutrálnou červenou. Koncentrácie študovaných látok, ktoré vyvolali 50 % pokles životaschopnosti buniek po ožiarení (EC₅₀, stredná efektívna koncentrácia) a bez ožiarenia (TC₅₀, stredná toxická koncentrácia) boli vypočítané pomocou softwaru GraphPad Prism (verzia 10.1.0; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) pre každý nezávislý experiment.

6.8.3 Časový profil vstupu látok do buniek

HeLa bunky boli nasadené do Petriho misiek, ktoré rástli 24 h. Potom bolo odstránené bunkové médium a k bunkám boli pridané Pc (1 μ M, bez alebo s CB[7]) a zmes bola inkubovaná 12 h. Potom boli bunky premyté, zoškrabnuté, centrifugované a zlyzované opakovaným zmrazením a rozmrazením (-80 °C/37 °C). Fluorescencia roztoku bola meraná na fluorimetri FLS100 po excitácii $\lambda_{exc} = 630$ nm. Emisné vlnové dĺžky sú uvedené v Tabuľke 22.

Tabuľka 22 Emisné vlnové dĺžky študovaných Pc

	λ_{em} (nm)	
	Pc	Pc + CB[7]
23-HCl	701	700
24-HCl	693	700
25-HCl	693	694
26-HCl	711	711
27-HCl	710	712
28	692	693
29	711	714

6.8.4 Subcelulárna lokalizácia

Boli použité HeLa bunky na Petriho miskách so skleneným dnom vhodnými na konfokálnu mikroskopiu (35 mm priemer, WilCo Wells, Holandsko). Bunky boli inkubované najprv 12 h a následne k nim boli pridané študované Pc (1 μ M, bez alebo s CB[7]). Bunky boli značené fluorescenčnými sondami MitoTracker Green FM (značenie mitochondrií), LysoTracker Blue DND-22 (značenie lyzozómov) alebo Hoechst 33342 (značenie jadier). Obrázky boli získané pomocou softwaru NIS Elements AR 4.20.01 (Laboratory Imaging) a epifluorescenčného mikroskopu Nikon Ti-E (Nikon).

6.9 Lipozómy

6.9.1 Príprava lipozómov

Lipozómy boli pripravené v celkovej konečnej koncentrácii 20 mg/ml podľa publikovaného postupu.¹²⁸ EYPC lipozómy boli pripravené z vaječného žltka L- α -fosfatidylcholínu (EYPC, Sigma-Aldrich) a cholesterolu (Chol, Sigma-Aldrich) v pomere 55 : 45 (EYPC : Chol). DOPC lipozómy boli pripravené z 1,2-dioleoyl-*sn*-glycerol-3-fosfatidylcholínu (DOPC, Lipoid) a Chol v pomere 60 : 40 (DOPC : Chol). Zmes lipidov (200 mg) bola rozpustená v absolútnom etanole

(2 ml) pri teplote 60 °C. Následne bol k tomuto roztoku lipidov pridaný tlmivý roztok sulfátu amónneho (dopredu nahriaty na 60 °C) za vzniku zakalenej lipidovej emulzie. Táto emulzia bola 10-krát extrudovaná cez 2 na seba naskladané polykarbonátové membrány (veľkosť pórov 100 nm a 80 nm, Genizer, Irvine, CA, USA) pomocou plášťového extrudéru poháňaného dusíkom (Genizer, Irvine, CA, USA) pri 60 °C. Zvyšný tlmivý roztok síranu amónneho bol odstránený dialýzou pomocou 800 ml dialyzačného roztoku (10 mM HEPES v 10 % sukroze) a dialyzačnej celulózovej membrány (Sigma-Aldrich). Dialyzačný roztok bol následne ešte 2-krát vymenený. Dialýza prebiehala pri 8 °C. Do oboch druhov lipozómov boli následne vložené AO (Carl Roth) alebo DOX (European Pharmacopoeia Reference Standard, Sigma-Aldrich) tak, aby bol výsledný pomer lipidov a látky 10 : 1. Vloženie do lipozómov prebiehalo zmiešaním lipozómov a zásobného roztoku látky (20 mg/ml AO, 10 mg/ml DOX) pri laboratórnej teplote a následným zahriatím na 60 °C na 30 min. Takto naložené lipozómy boli znova dialyzované rovnakým spôsobom, aký bol popísaný vyššie. Vloženie celého množstva AO/DOX bolo potvrdené tým, že v dialyzačnom tlmivom roztoku už nebolo žiadne množstvo AO/DOX po opakovanej výmene dialyzačného roztoku.

6.9.2 Charakterizácia lipozómov

Veľkosť, polydisperzný index (PDI) a zeta potenciál boli zmerané pre čisté lipozómy, lipozómy s AO/DOX, lipozómy s AO/DOX a súčasne interkalovaným PS **49** – **55** (50 : 1 lipozómy : PS). Všetky kombinácie boli zmerané pred a po ožiarení laserom (685 nm, 400 mW/cm², 600 s).

6.9.3 Interkalácia PS do lipozómov

Boli pripravené 1 μM roztoky PS v PBS. 2 ml tohto roztoku boli prevedené do fluorescenčnej kyvety a bolo zmerané absorpčné spektrum v rozsahu 550 – 750 nm a emisné spektrum v rozsahu 640 – 740 nm (λ_{ex} = 608 nm). Následne boli do roztoku postupne pridávané EYPC lipozómy (zásobný roztok 33,47 mM) a po každom prídavku boli zmerané absorpčné a emisné spektrá.

6.9.4 Fotostabilita PS v lipozómoch

6.9.4.1 Degradácia PS v lipozómoch pôsobením svetla

K PBS (2 ml) vo fluorescenčnej kyvete boli pridané EYPC alebo DOPC lipozómy s AO/DOX (tak aby $c_{(lipo)}$ = 62,5 μM) a 25 μl zásobného roztoku látky **49** – **52** a látky **54** (100 μM, pričom výsledná $c_{(PS)}$ = 1,25 μM, $c_{(lipo)}$ = 60 μM a pomer lipidy : PS bol 50 : 1). Pre látky **53** a **55** bol pripravený 1,25 μM zásobný roztok v PBS a k nemu boli pridané 4 μl lipozómov aby bol dosiahnutý pomer 50 : 1. Látky **49** – **53** boli po zmiešaní s lipozómami miešané v kyvete 2 min, látka **54** 5 min a látka **55** 30 min. Každá látka bola postupne ožiarovaná laserom (685 nm, 400 mW cm⁻²) po špecifickú dobu, maximálne ale 10 min a po každom ožiarení bolo zmerané absorpčné spektrum.

6.9.4.2 Fotoperoxidácia lipidov

DOPC lipozómy boli pripravené podľa postupu 6.7.1, ale okrem lipidov bol do zmesi navážený ešte 1 mg DPPP (difenyl-1-pyrenylfosfín). Výsledná koncentrácia bola 5mM DOPC a 0,25mM DPPP. K PBS (2,5 ml) vo fluorescenčnej kyvete bolo pridaných 10 μl DOPC lipozómov s DPPP a 10 μl zásobného roztoku látok **49** – **52** alebo látky **54** (pričom výsledná $c_{(PS)}$ = 0,4 μM, $c_{(lipo)}$ = 20 μM a pomer lipidy : PS bol 50 : 1). Pre látky **53** a **55** bol pripravený 1 μM roztok a ku 1000 μl tohto roztoku vo fluorescenčnej kyvete bolo pridaných 1500 μl PBS a 10 μl DOPC lipozómov s DPPP. Vzorka bola ožiarovaná laserom (685 nm, 400 mW cm⁻²) 5 s a následnej bolo

zmerané fluorescenčné emisné spektrum v rozsahu 367 – 450 nm ($\lambda_{em} = 380$ nm, $\lambda_{ex} = 357$ nm). Meranie každej vzorky bolo opakované 3-krát.

6.9.5 Rozklad ADPA

K PBS (2 ml) v kyvete bolo pridaných 5 μ l prázdnych DOPC lipozómov, 20 μ l roztoku ADPA (5 mM v DMSO) a 25 μ l látky **49** – **52** alebo látky **54** (100 μ M zásobný roztok v PBS, pričom výsledná $c_{(PS)} = 1,25$ μ M, $c_{(lipo)} = 60$ μ M a pomer lipidy : PS bol 50 : 1). Látky **53** a **55** boli pripravené ako 1 μ M zásobné roztoky v PBS a k 2 ml tohto roztoku boli pridané 4 μ l prázdnych DOPC lipozómov a 20 μ l roztoku ADPA (5 mM v DMSO). Každá látka bola postupne ožiarovaná laserom (685 nm, 400 mW cm^{-2}) po špecifickú dobu, kým nedošlo k rozloženiu PS, maximálne ale 5 minút, a po každom ožiarení bolo zmerané absorpčné spektrum, na ktorom sme pozorovali rozklad ADPA (znižovanie absorpcie pri 399,5 nm).

6.9.6 Svetlom aktivované uvoľnenie AO/DOX z lipozómov

K PBS (2 ml) vo fluorescenčnej kyvete boli pridané EYPC alebo DOPC lipozómy s AO/DOX (tak aby $c_{(lipo)} = 62,5$ μ M) a 25 μ l zásobného roztoku látky **49** – **52** alebo látky **54** (100 μ M, pričom výsledná $c_{(PS)} = 1,25$ μ M, $c_{(lipo)} = 60$ μ M a pomer lipidy : PS bol 50 : 1). Pre látky **43** a **55** bol pripravený 1,25 μ M zásobný roztok v PBS a k nemu boli pridané 4 μ l lipozómov aby bol dosiahnutý pomer 50 : 1. Látky **49** – **53** boli po zmiešaní s lipozómami miešané v kyvete 2 min, látka **54** 5 min a látka **55** 30 min. Takto pripravené vzorky boli kontinuálne ožiarované z vrchu kyvety laserom (685 nm, 400 mW cm^{-2}) 10 min. Počas ožiarovania sa obsah v kyvete miešal v teplotnom držiaku fluorimetra pri 23 °C. Fluorescenčné emisné spektrum bolo zmerané každých 8,6 s pre AO ($\lambda_{em} = 533$ nm, $\lambda_{ex} = 485$ nm) alebo DOX ($\lambda_{em} = 585$ nm, $\lambda_{ex} = 480$ nm) počas celého ožiarovania. Po 10 min ožiarovania bolo pridaných 210 μ l 10 % Tritonu X-100 vo vode na rozrušenie lipozómov a uvoľnenie zvyšného AO/DOX a znovu boli zmerané emisné spektrá za rovnakých podmienok. Lipozómy s AO/DOX, ale bez PS a s prídavkom Tritonu bez ožiarovania boli použité ako referenčná vzorka ktorá udáva 100 % uvoľnenie AO/DOX.

Uvoľnenie AO/DOX v % bolo vypočítané podľa nasledujúceho vzorca: % uvoľnenia = $100 \times (F/F_0)$, pričom F a F_0 sú intenzity fluorescencie vzorky s PS, po ožiarovaní a po pridaní Tritonu X-100 (F) a referenčnej vzorky lipozómov bez PS, bez ožiarovania a po pridaní Tritonu X-100 (F_0).

7 Zoznam vedeckých a publikovaných prác

Prehľad publikácií zahrnutých v dizertačnej práci:

Kociscakova L, Rando C, Kozlikova M, Machacek M, Novakova V, Sindelar V, Zimcik P, Monomerization of Phthalocyanines in Water via Their Supramolecular Interactions with Cucurbiturils, *J. Org. Chem.*, **2023**, 88, 2, 988–1002. IF₂₀₂₂ = 3,6 (Q1_{AIS2022})

Kociscakova L, Senipek MI, Zimcik P, Novakova V, Non-peripherally alkylamino-substituted phthalocyanines: Synthesis, spectral, photophysical and acid-base properties, *J. Porphyrins and Phthalocyanines*, **2019**, 23, 427–436. IF₂₀₁₈ = 1,292 (Q3_{AIS2018})

Ďalšie publikácie

Kolarova M, **Kociscakova L**, Kollar J, Kozlikova M, Halaskova M, Rohlickova M, Kostelansky F, Miletin M, Novakova V, Machacek M, Zimcik P, Amphiphilic phthalocyanines as a tool for a light-triggered drug release from liposomes, *podaný manuskript*

Prezentácia vedeckých výsledkov formou ústnych prezentácií a posterov:

Ústne prezentácie

Kočiščáková L., Zimčík P., Synthesis of phthalocyanine derivatives for supramolecular interaction with cucurbituril. 9. Postgraduální a 7. postdoktorandská konference, Hradec Králové, Česká republika, 23. – 24. 01. 2019.

Kočiščáková L., Zimčík P., Synthesis of 1-aminoadamantane substituted phthalocyanines and studying their supramolecular complexes with cucurbituril. 10. Postgraduální a postdoktorandská konference, Hradec Králové, Česká republika, 22. – 23. 01. 2020.

Kočiščáková L., Zimčík P., Synthesis of aminoadamantane phthalocyanines for supramolecular complexation with cucurbituril. 11th Postgraduate and Postdoc Conference, Hradec Králové, Česká republika, 27. – 28. 01. 2021.

Kočiščáková L., Kozlíková M., Zimčík P., Studying properties of supramolecular complexes of phthalocyanines with cucurbituril. 12th Postgraduate and Postdoc Conference, Hradec Králové, Česká republika, 01. – 02. 02. 2022.

Kočiščáková L., Diaz V. M., Torres T., Zimčík P., Synthesis of subphthalocyanines for formation of supramolecular complexes with cucurbituril. 13th Postgraduate and Postdoc Conference, Hradec Králové, Česká republika, 01. – 02. 02. 2023.

Postery

Kočiščáková L., Senipek M. I., Nováková V., Zimčík P., Novel Synthetic Approaches Toward Non-Peripherally Substituted Phthalocyanines. 53rd conference Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry. Lázně Bělohrad, Česká republika, 02. – 04. 11. 2018.

Kočiščáková L., Zimčík P., Synthesis of phthalocyanine derivatives for supramolecular interactions with cucurbituril. XIII International conference "Synthesis and application of porphyrins and their analogues". "Silver Plyos", Kostromská oblast, Rusko, 23. – 29. 06. 2019.

Kočiščáková L., Zimčák P., Synthesis of Phthalocyanine Derivatives and Studying Their Supramolecular Complexes with Cucurbituril. 54th conference Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry. Špindlerův Mlýn, Česká republika, 06. – 08. 11.2019.

Kočiščáková L., Zimčák P., Synthesis of phthalocyanine derivatives for supramolecular complexation with cucurbituril. International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP). Buffalo, USA (online), 28. 06. – 03. 07. 2021.

Kočiščáková L., Kozlíková M., Zimčák P., Synthesis of Phthalocyanine derivatives for Supramolecular Interaction with Cucurbituril and Studying Their Properties. 55th conference Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry. Špindlerův Mlýn, Česká republika, 03. – 06. 11.2021.

Kočiščáková L., Kozlíková M., Rando C., Šindelář V., Zimčák P., Synthesis of Phthalocyanines for Supramolecular Interaction with Cucurbituril and Studying Their Properties. 56th conference Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry. Špindlerův Mlýn, Česká republika, 10. – 12. 11.2022.

Kočiščáková L., Kozlíková M., Zimčák P., Improving Monomerization of Phthalocyanines via Their Supramolecular Interactions with Cucurbiturils. The International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry. Reykjavík, Island, 24. – 29. 06. 2023.

Rychvalská L., Díaz V. M., Torres T., Zimčák P., Studying Properties of Subphthalocyanines and Their Interaction with Cucurbituril. 57th conference Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry. Špindlerův Mlýn, Česká republika, 09. – 11. 11.2023.

8 Granty a výskumné stáže

Grantová agentura Univerzity Karlovy (2019)

Číslo projektu: **1606119**

Hlavný riešiteľ: Mgr. Lucia Kočiščáková

Názov projektu: „Štúdium supramolekulárnych interakcií ftalocyanínov s kukurbiturilom“

Grantová agentura České republiky (2020-2022)

Číslo projektu: **20-09212S**

Hlavný riešiteľ: prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.

Člen kolektívu: Mgr. Lucia Kočiščáková

Názov projektu: „Supramolecular approach for improvement of photodynamic activity of photosensitizers.“

Univerzita Karlova

Číslo projektu: **PRIMUS/20/SCI/013**

Hlavný riešiteľ: doc. PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D.

Člen kolektívu: Mgr. Lucia Rychvalská

Názov projektu: „Study of phthalocyanines for photodynamic therapy of cancer and bioimaging.“

Výskumná stáž

2022 Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Španielsko (Príprava subftalocyanínov vhodných na supramolekulárne interakcie s kukurbiturilom), 5 mesiacov

Vedúci práce: Tomas Torres, Prof. Dr. Dr. Hc mult

9 Zoznam použitej literatúry

- (1) Sharman, W. M.; Allen, C. M.; van Lier, J. E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today* **1999**, *4* (11), 507-517. DOI: 10.1016/s1359-6446(99)01412-9.
- (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.; et al. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *Cancer J. Clin.* **2011**, *61* (4), 250-281. DOI: 10.3322/caac.20114.
- (3) 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. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.07.049.
- (4) Li, X.; Lee, S.; Yoon, J. Supramolecular photosensitizers rejuvenate photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (4), 1174-1188. DOI: 10.1039/c7cs00594f.
- (5) Lan, M. H.; Zhao, S. J.; Liu, W. M.; Lee, C. S.; Zhang, W. J.; Wang, P. F. Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Adv. Healthcare Mater.* **2019**, *8* (13). DOI: 10.1002/adhm.201900132.
- (6) 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* (11), 2555-2563. DOI: 10.1039/b918546a.
- (7) Cidlina, A.; Novakova, V.; Miletin, M.; Zimcik, P. Peripheral substitution as a tool for tuning electron-accepting properties of phthalocyanine analogs in intramolecular charge transfer. *Dalton Trans.* **2015**, *44* (15), 6961-6971. DOI: 10.1039/c5dt00400d.
- (8) Jiang, X. J.; Lo, P. C.; Tsang, Y. M.; Yeung, S. L.; Fong, W. P.; Ng, D. K. P. Phthalocyanine-Polyamine Conjugates as pH-Controlled Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Chem. - Eur. J.* **2010**, *16* (16), 4777-4783. DOI: 10.1002/chem.200903580.
- (9) Dolmans, D.; Kadambi, A.; Hill, J. S.; Waters, C. A.; Robinson, B. C.; Walker, J. P.; Fukumura, D.; Jain, R. K. Vascular accumulation of a novel photosensitizer, MV6401, causes selective thrombosis in tumor vessels after photodynamic therapy. *Cancer Res.* **2002**, *62* (7), 2151-2156.
- (10) Dolmans, D.; Fukumura, D.; Jain, R. K. Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3* (5), 380-387. DOI: 10.1038/nrc1071.
- (11) Dolmans, D.; Kadambi, A.; Hill, J. S.; Flores, K. R.; Gerber, J. N.; Walker, J. P.; Rinkes, I.; Jain, R. K.; Fukumura, D. Targeting tumor vasculature and cancer cells in orthotopic breast tumor by fractionated photosensitizer dosing photodynamic therapy. *Cancer Res.* **2002**, *62* (15), 4289-4294.
- (12) Kollar, J.; Machacek, M.; Halaskova, M.; Lenco, J.; Kucera, R.; Demuth, J.; Rohlickova, 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**, *63* (14), 7616-7632. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c00481.
- (13) Wainwright, M.; Maisch, T.; Nonell, S.; Plaetzer, K.; Almeida, A.; Tegos, G. P.; Hamblin, M. R. Photoantimicrobials-are we afraid of the light? *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17* (2), E49-E55. DOI: 10.1016/s1473-3099(16)30268-7.
- (14) Lauro, F. M.; Pretto, P.; Covolo, L.; Jori, G.; Bertoloni, G. Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene-polylysine conjugates. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1* (7), 468-470. DOI: 10.1039/b200977c.
- (15) Carrera, E. T.; Dias, H. B.; Corbi, S. C. T.; Marcantonio, R. A. C.; Bernardi, A. C. A.; Bagnato, V. S.; Hamblin, M. R.; Rastelli, A. N. S. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a critical review. *Laser Phys.* **2016**, *26* (12). DOI: 10.1088/1054-660x/26/12/123001.
- (16) Wainwright, M.; Crossley, K. B. Photosensitising agents - circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2004**, *53* (2), 119-126. DOI: 10.1016/j.ibiod.2003.11.006.

- (17) Merchat, M.; Bertolini, G.; Giacomini, P.; Villanueva, A.; Jori, G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. *J. Photochem. Photobiol., B* **1996**, *32* (3), 153-157. DOI: 10.1016/1011-1344(95)07147-4.
- (18) Latham, K. *Gram-Positive vs. Gram-Negative* [online], [cit. 2023-11-15]. Dostupné z: <https://biologydictionary.net/gram-positive-vs-gram-negative/>.
- (19) Tegos, G. P.; Hamblin, M. R. Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50* (1), 196-203. DOI: 10.1128/aac.50.1.196-203.2006.
- (20) Prates, R. A.; Kato, I. T.; Ribeiro, M. S.; Tegos, G. P.; Hamblin, M. R. Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2011**, *66* (7), 1525-1532. DOI: 10.1093/jac/dkr160.
- (21) Wainwright, M. Local treatment of viral disease using photodynamic therapy. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2003**, *21* (6), 510-520. DOI: 10.1016/s0924-8579(03)00035-9.
- (22) Chung, H.; Dai, T. H.; Sharma, S. K.; Huang, Y. Y.; Carroll, J. D.; Hamblin, M. R. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. *Ann. Biomed. Eng.* **2012**, *40* (2), 516-533. DOI: 10.1007/s10439-011-0454-7.
- (23) Ormond, A. B.; Freeman, H. S. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials* **2013**, *6* (3), 817-840. DOI: 10.3390/ma6030817.
- (24) Aggelidou, C.; Theodossiou, T. A.; Gonçalves, A. R.; Lampropoulou, M.; Yannakopoulou, K. A versatile δ -aminolevulinic acid (ALA)-cyclodextrin bimodal conjugate-prodrug for PDT applications with the help of intracellular chemistry. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2414-2420. DOI: 10.3762/bjoc.10.251.
- (25) Liu, Q.; Pang, M. P.; Tan, S. H.; Wang, J.; Chen, Q. L.; Wang, K.; Wu, W. J.; Hong, Z. Y. Potent peptide-conjugated silicon phthalocyanines for tumor photodynamic therapy. *J. Cancer* **2018**, *9* (2), 310-320. DOI: 10.7150/jca.22362.
- (26) Li, H.; Marotta, D.; Kim, S. K.; Chance, B.; Glickson, J.; Busch, T. M.; Zheng, G. Phthalocyanine labeled LDL for tumor imaging and photodynamic therapy. In *Conference on Optics in Health Care and Biomedical Optics*, Beijing, PEOPLES R CHINA, Nov 08-12, 2004; 2005; Vol. 5630, pp 8-15. DOI: 10.1117/12.573912.
- (27) Zheng, G.; Li, H.; Zhang, M.; Lund-Katz, S.; Chance, B.; Glickson, J. D. Low-density lipoprotein reconstituted by pyropheophorbide cholesteryl oleate as target-specific photosensitizer. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13* (3), 392-396. DOI: 10.1021/bc025516h.
- (28) Vrouenraets, M. B.; Visser, G. W. M.; Loup, C.; Meunier, B.; Stigter, M.; Oppelaar, H.; Stewart, F. A.; Snow, G. B.; van Dongen, G. Targeting of a hydrophilic photosensitizer by use of internalizing monoclonal antibodies: A new possibility for use in photodynamic therapy. *Int. J. Cancer* **2000**, *88* (1), 108-114. DOI: 10.1002/1097-0215(20001001)88:1<108::Aid-ijc17>3.0.Co;2-h.
- (29) Chatterjee, D. K.; Fong, L. S.; Zhang, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60* (15), 1627-1637. DOI: 10.1016/j.addr.2008.08.003.
- (30) Lu, Y. R.; Wu, W. B. Conjugated-Polymer-Based Photodynamic Therapy. *Adv. Ther.* **2022**, *5* (12). DOI: 10.1002/adtp.202200165.
- (31) Massiot, J.; Rosilio, V.; Makky, A. 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* (11), 1805-1823. DOI: 10.1039/c9tb00015a.
- (32) Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A. Smart drug delivery systems: from fundamentals to the clinic. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (58), 7743-7765. DOI: 10.1039/c4cc01429d.
- (33) Gao, W. W.; Chan, J. M.; Farokhzad, O. C. pH-Responsive Nanoparticles for Drug Delivery. *Mol. Pharmaceutics* **2010**, *7* (6), 1913-1920. DOI: 10.1021/mp100253e.
- (34) Needham, D.; Dewhirst, M. W. The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *53* (3), 285-305. DOI: 10.1016/s0169-409x(01)00233-2.

- (35) Graf, N.; Lippard, S. J. Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64* (11), 993-1004. DOI: 10.1016/j.addr.2012.01.007.
- (36) Lin, W. Y.; Peng, D. W.; Wang, B.; Long, L.; Guo, C.; Yuan, J. A model for light-triggered porphyrin anticancer prodrugs based on an *o*-nitrobenzyl photolabile group. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008* (5), 793-796. DOI: 10.1002/ejoc.200700972.
- (37) Bozzuto, G.; Molinari, A. Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 975-999. DOI: 10.2147/ijn.S68861.
- (38) Rak, J.; Kabesova, M.; Benes, J.; Pouckova, P.; Vetvicka, D. Advances in Liposome-Encapsulated Phthalocyanines for Photodynamic Therapy. *Life-Basel* **2023**, *13* (2). DOI: 10.3390/life13020305.
- (39) Nsairat, H.; Khater, D.; Sayed, U.; Odeh, F.; Al Bawab, A.; Alshaer, W. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon* **2022**, *8* (5). DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e09394.
- (40) Mojzisova, H.; Bonneau, S.; Maillard, P.; Berg, K.; Brault, D. Photosensitizing properties of chlorins in solution and in membrane-mimicking systems. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8* (6), 778-787. DOI: 10.1039/b822269j.
- (41) Luo, D. D.; Li, N.; Carter, K. A.; Lin, C. Y.; Geng, J. M.; Shao, S.; Huang, W. C.; Qin, Y. L.; Atilla-Gokcumen, G. E.; Lovell, J. F. Rapid Light-Triggered Drug Release in Liposomes Containing Small Amounts of Unsaturated and Porphyrin-Phospholipids. *Small* **2016**, *12* (22), 3039-3047. DOI: 10.1002/smll.201503966.
- (42) Thompson, D. H.; Gerasimov, O. V.; Wheeler, J. J.; Rui, Y. J.; Anderson, V. C. Triggerable plasmalogen liposomes: Improvement of system efficiency. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1996**, *1279* (1), 25-34. DOI: 10.1016/0005-2736(95)00210-3.
- (43) Shin, J. H.; Shum, P.; Grey, J.; Fujiwara, S.; Malhotra, G. S.; González-Bonet, A.; Hyun, S. H.; Moase, E.; Allen, T. M.; Thompson, D. H. Acid-Labile mPEG-Vinyl Ether-1,2-Dioleoylglycerol Lipids with Tunable pH Sensitivity: Synthesis and Structural Effects on Hydrolysis Rates, DOPE Liposome Release Performance, and Pharmacokinetics. *Mol. Pharmaceutics* **2012**, *9* (11), 3266-3276. DOI: 10.1021/mp300326z.
- (44) Shum, P.; Kim, J. M.; Thompson, D. H. Phototriggering of liposomal drug delivery systems. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *53* (3), 273-284. DOI: 10.1016/s0169-409x(01)00232-0.
- (45) Chen, W. J.; Goldys, E. M.; Deng, W. Light-induced liposomes for cancer therapeutics. *Prog. Lipid Res.* **2020**, *79*. DOI: 10.1016/j.plipres.2020.101052.
- (46) Dendramis, K. A.; Chiu, D. T. Laser Photolysis of Dye-Sensitized Nanocapsules Occurs via a Photothermal Pathway. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (46), 16771-16778. DOI: 10.1021/ja904976r.
- (47) 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. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2007.00193.x.
- (48) Lao, J.; Madani, J.; Puertolas, T.; Alvarez, M.; Hernandez, A.; Pazo-Cid, R.; Artal, A.; Torres, A. A. Liposomal Doxorubicin in the Treatment of Breast Cancer Patients: A Review. *J. Drug Delivery* **2013**, *2013*. DOI: 10.1155/2013/456409.
- (49) Rafiyath, S. M.; Rasul, M.; Lee, B.; Wei, G. Q.; Lamba, G.; Liu, D. L. Comparison of safety and toxicity of liposomal doxorubicin vs. conventional anthracyclines: a meta-analysis. *Exp. Hematol. Oncol.* **2012**, *1*. DOI: 10.1186/2162-3619-1-10.
- (50) Silverman, J. A.; Reynolds, L.; Deitcher, S. R. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Vincristine Sulfate Liposome Injection (VSLI) in Adults With Acute Lymphoblastic Leukemia. *J. Clin. Pharmacol.* **2013**, *53* (11), 1139-1145. DOI: 10.1002/jcph.155.
- (51) Moen, M. D.; Lyseng-Williamson, K. A.; Scott, L. J. Liposomal Amphotericin B A Review of its Use as Empirical Therapy in Febrile Neutropenia and in the Treatment of Invasive Fungal Infections. *Drugs* **2009**, *69* (3), 361-392. DOI: 10.2165/00003495-200969030-00010.

- (52) Christie, R.; Abel, A. Phthalocyanine pigments: general principles. *Physical Sciences Reviews* **2021**, *6* (11), 671-677. DOI: 10.1515/psr-2020-0194.
- (53) Cogal, S.; Erten-Ela, S.; Ocakoglu, K.; Oksuz, A. U. Asymmetric phthalocyanine derivatives containing 4-carboxyphenyl substituents for dye-sensitized solar cells. *Dyes Pigm.* **2015**, *113*, 474-480. DOI: 10.1016/j.dyepig.2014.09.018.
- (54) Wong, R. C. H.; Lo, P. C.; Ng, D. K. P. Stimuli responsive phthalocyanine-based fluorescent probes and photosensitizers. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *379*, 30-46. DOI: 10.1016/j.ccr.2017.10.006.
- (55) Halaskova, M.; Kostelansky, F.; Demuth, J.; Hlbocanova, I.; Miletin, M.; Zimcik, P.; Machacek, M.; Novakova, V. Amphiphilic Cationic Phthalocyanines for Photodynamic Therapy of Cancer. *Chempluschem* **2022**, *87* (9). DOI: 10.1002/cplu.202200133.
- (56) Vachova, L.; Machacek, M.; Kucera, R.; Demuth, J.; Cermak, P.; Kopecky, K.; Miletin, M.; Jedlickova, A.; Simunek, T.; Novakova, V.; Zimcik, P. Heteroatom-substituted tetra(3,4-pyrido)porphyrazines: a stride toward near-infrared-absorbing macrocycles. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (20), 5608-5612. DOI: 10.1039/c5ob00651a.
- (57) Kobayashi, N.; Ogata, H.; Nonaka, N.; Luk'yanets, E. A. Effect of peripheral substitution on the electronic absorption and fluorescence spectra of metal-free and zinc phthalocyanines. *Chem. - Eur. J.* **2003**, *9* (20), 5123-5134. DOI: 10.1002/chem.200304834.
- (58) Furuyama, T.; Satoh, K.; Kushiya, T.; Kobayashi, N. Design, Synthesis, and Properties of Phthalocyanine Complexes with Main-Group Elements Showing Main Absorption and Fluorescence beyond 1000 nm. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (2), 765-776. DOI: 10.1021/ja411016f.
- (59) Fasiulla; Yashoda, M. P. Synthesis and Spectral Studies on Substituted Metal (II)-Tetra-1-(Thiophene-2-yl)methanimine Phthalocyanine Complexes. *Orient. J. Chem.* **2018**, *34* (3), 1526-1532. DOI: 10.13005/ojc/340344.
- (60) Zimcik, P.; Novakova, V.; Kopecky, K.; Miletin, M.; Kobak, R. Z. U.; Svandrlikova, E.; Vachova, L.; Lang, K. Magnesium Azaphthalocyanines: An Emerging Family of Excellent Red-Emitting Fluorophores. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (7), 4215-4223. DOI: 10.1021/ic2027016.
- (61) Koide, Y.; Urano, Y.; Hanaoka, K.; Terai, T.; Nagano, T. Development of an Si-Rhodamine-Based Far-Red to Near-Infrared Fluorescence Probe Selective for Hypochlorous Acid and Its Applications for Biological Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (15), 5680-5682. DOI: 10.1021/ja111470n.
- (62) Basel, B. S.; Young, R. M.; Krzyaniak, M. D.; Papadopoulos, I.; Hetzer, C.; Gao, Y. Z.; La Porte, N. T.; Phelan, B. T.; Clark, T.; Tykwinski, R. R.; et al. Influence of the heavy-atom effect on singlet fission: a study of platinum-bridged pentacene dimers. *Chem. Sci.* **2019**, *10* (48), 11130-11140. DOI: 10.1039/c9sc04410h.
- (63) Demuth, J.; Miletin, M.; Kucera, R.; Ruzicka, A.; Havlinova, Z.; Libra, A.; Novakova, V.; Zimcik, P. Self-assembly of azaphthalocyanine-oligodeoxynucleotide conjugates into J-dimers: towards biomolecular logic gates. *Org. Chem. Front.* **2020**, *7* (3), 445-456. DOI: 10.1039/c9qo01364d.
- (64) Cidlina, A.; Svec, J.; Ludvová, L.; Kunes, J.; Zimcik, P.; Novakova, V. Predominant effect of connecting atom and position of substituents on azomethine nitrogens' basicity in phthalocyanines. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2016**, *20* (8-11), 1122-1133. DOI: 10.1142/s1088424616500747.
- (65) Kobayashi, N.; Kondo, R.; Nakajima, S.; Osa, T. NEW ROUTE TO UNSYMMETRICAL PHTHALOCYANINE ANALOGS BY THE USE OF STRUCTURALLY DISTORTED SUBPHTHALOCYANINES. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (26), 9640-9641. DOI: 10.1021/ja00182a034.
- (66) de la Torre, G.; Claessens, C. G.; Torres, T. Phthalocyanines: The need for selective synthetic approaches. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *2000* (16), 2821-2830.
- (67) Mack, J.; Kobayashi, N. Low Symmetry Phthalocyanines and Their Analogues. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (2), 281-321. DOI: 10.1021/cr9003049.

- (68) Liu, S.; Hu, C.; Wei, Y.; Duan, M.; Chen, X.; Hu, Y. Transformation of H-Aggregates and J-Dimers of Water-Soluble Tetrakis (4-carboxyphenyl) Porphyrin in Polyion Complex Micelles. *Polymers* **2018**, *10* (5). DOI: 10.3390/polym10050494.
- (69) Zimcik, P.; Miletin, M.; Novakova, V.; Kopecky, K.; Nejedla, M.; Stara, V.; Sedlackova, K. Effective Monofunctional Azaphthalocyanine Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Aust. J. Chem.* **2009**, *62* (5), 425-433. DOI: 10.1071/ch08392.
- (70) Agirtas, M. S. Non-aggregating phthalocyanines with bulky 2,4-di-tert-butylphenoxy-substituents. *Dyes Pigm.* **2007**, *74* (2), 490-493. DOI: 10.1016/j.dyeing.2006.03.009.
- (71) Makhseed, S.; Tuhl, A.; Samuel, J.; Zimcik, P.; Al-Awadi, N.; Novakova, V. New highly soluble phenoxy-substituted phthalocyanine and azaphthalocyanine derivatives: Synthesis, photochemical and photophysical studies and atypical aggregation behavior. *Dyes Pigm.* **2012**, *95* (2), 351-357. DOI: 10.1016/j.dyepig.2012.03.023.
- (72) Zimcik, P.; Malkova, A.; Hrubá, L.; Miletin, M.; Novakova, V. Bulky 2,6-diphenylphenylsulfanyl substituents efficiently inhibit aggregation in phthalocyanines and tetrapyrrolineporphyrins and control their photophysical and electrochemical properties. *Dyes Pigm.* **2017**, *136*, 715-723. DOI: 10.1016/j.dyepig.2016.09.039.
- (73) Ghazal, B.; Machacek, M.; Shalaby, M. A.; Novakova, V.; Zimcik, P.; Makhseed, S. Phthalocyanines and Tetrapyrrolineporphyrins 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. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00272.
- (74) Machacek, M.; Carter, K. A.; Kostelansky, F.; Miranda, D.; Seffouh, A.; Ortega, J.; Simunek, T.; Zimcik, 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. DOI: 10.1039/c8tb01602j.
- (75) 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. DOI: 10.1039/c3cc44609c.
- (76) 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. DOI: 10.1039/b405868b.
- (77) 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. DOI: 10.1016/j.dyepig.2016.01.031.
- (78) Machacek, M.; Kollar, J.; Miletin, M.; Kucera, R.; Kubat, P.; Simunek, T.; Novakova, V.; Zimcik, P. Anionic hexadeca-carboxylate tetrapyrrolineporphyrin: synthesis and in vitro photodynamic studies of a water-soluble, non-aggregating photosensitizer. *Rsc Adv.* **2016**, *6* (12), 10064-10077. DOI: 10.1039/c5ra25881b.
- (79) 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. DOI: 10.1021/ma990367s.
- (80) Li, W. J.; Xu, W. W.; Zhang, S. Y.; Li, J.; Zhou, J.; Tian, D. M.; Cheng, J.; Li, H. B. Supramolecular Biopharmaceutical Carriers Based on Host-Guest Interactions. *J. Agric. Food Chem.* **2022**. DOI: 10.1021/acs.jafc.2c04822.
- (81) Vial, L.; Perret, F.; Leclaire, J. Dynamic arenes: Versatile Platforms To Study the Interplay between Covalent and Noncovalent Bonds. *Eur. J. Org. Chem.* **2022**, *2022* (2). DOI: 10.1002/ejoc.202101274.
- (82) Bolfarini, G. C.; Siqueira-Moura, M. P.; Demets, G. J. F.; Tedesco, A. C. Preparation, characterization, and in vitro phototoxic effect of zinc phthalocyanine cucurbit 7 uril complex encapsulated into liposomes. *Dyes Pigm.* **2014**, *100*, 162-167. DOI: 10.1016/j.dyepig.2013.08.018.

- (83) Ohno-Okumura, E.; Sakamoto, K.; Kato, T.; Hatano, T.; Fukui, K.; Karatsu, T.; Kitamura, A.; Urano, T. Synthesis of subphthalocyanine derivatives and their characterization. *Dyes Pigm.* **2002**, *53* (1), 57-65. DOI: 10.1016/s0143-7208(01)00102-4.
- (84) Morse, G. E.; Bender, T. P. Boron Subphthalocyanines as Organic Electronic Materials. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4* (10), 5055-5068. DOI: 10.1021/am3015197.
- (85) Claessens, C. G.; González-Rodríguez, D.; del Rey, B.; Torres, T.; Mark, G.; Schuchmann, H. P.; von Sonntag, C.; MacDonald, J. G.; Nohr, R. S. Highly efficient synthesis of chloro- and phenoxy-substituted subphthalocyanines. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003* (14), 2547-2551. DOI: 10.1002/ejoc.200300169.
- (86) Rauschnabel, J.; Hanack, M. NEW DERIVATIVES AND HOMOLOGS OF SUBPHTHALOCYANINE. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (10), 1629-1632. DOI: 10.1016/0040-4039(95)00124-u.
- (87) Claessens, C. G.; González-Rodríguez, D.; Torres, T. Subphthalocyanines:: Singular nonplanar aromatic compounds-synthesis, reactivity, and physical properties. *Chem. Rev.* **2002**, *102* (3), 835-853. DOI: 10.1021/cr0101454.
- (88) van de Winckel, E.; Mascaraque, M.; Zamarrón, A.; de la Fuente, A. J.; Torres, T.; de la Escosura, A. Dual Role of Subphthalocyanine Dyes for Optical Imaging and Therapy of Cancer. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28* (24). DOI: 10.1002/adfm.201705938.
- (89) Ogura, Y.; Nakano, M.; Maeda, H.; Segi, M.; Furuyama, T. Cationic Axial Ligand Effects on Sulfur-Substituted Subphthalocyanines. *Molecules* **2022**, *27* (9). DOI: 10.3390/molecules27092766.
- (90) Demuth, J.; Gallego, L.; Kozlikova, M.; Machacek, M.; Kucera, R.; Torres, T.; Martínez-Díaz, M. V.; Novakova, V. Subphthalocyanines as Efficient Photosensitizers with Nanomolar Photodynamic Activity against Cancer Cells. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (23), 17436-17447. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c01584.
- (91) El-Khouly, M. E.; El-Refaey, A.; Nam, W.; Fukuzumi, S.; Göktug, Ö.; Durmus, M. A subphthalocyanine-pyrene dyad: electron transfer and singlet oxygen generation. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2017**, *16* (10), 1512-1518. DOI: 10.1039/c7pp00166e.
- (92) Bukuroshi, E.; Petersen, A. U.; Brolos, L.; Bender, T. P.; Nielsen, M. B. Exploring the Synthesis and Electronic Properties of Axially Substituted Boron Subphthalocyanines with Carbon-Based Functional Groups. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2020**, *2020* (36), 3481-3495. DOI: 10.1002/ejic.202000525.
- (93) Claessens, C. G.; González-Rodríguez, D.; Rodríguez-Morgade, M. S.; Medina, A.; Torres, T. Subphthalocyanines, Subporphyrines, and Subporphyrins: Singular Nonplanar Aromatic Systems. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (4), 2192-2277. DOI: 10.1021/cr400088w.
- (94) Medina, A. S.; Claessens, C. G.; Rahman, G. M. A.; Lamsabhi, A. M.; Mó, O.; Yáñez, M.; Guldi, D. M.; Torres, T. Accelerating charge transfer in a triphenylamine-subphthalocyanine donor-acceptor system. *Chem. Commun.* **2008**, (15), 1759-1761. DOI: 10.1039/b719226f.
- (95) González-Rodríguez, D.; Carbonell, E.; Rojas, G. D.; Castellanos, C. A.; Guldi, D. M.; Torres, T. Activating Multistep Charge-Transfer Processes in Fullerene-Subphthalocyanine-Ferrocene Molecular Hybrids as a Function of π - π Orbital Overlap. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (46), 16488-16500. DOI: 10.1021/ja105864r.
- (96) Romero-Nieto, C.; Medina, A.; Molina-Ontoria, A.; Claessens, C. G.; Echegoyen, L.; Martín, N.; Torres, T.; Guldi, D. M. Towards enhancing light harvesting-subphthalocyanines as electron acceptors. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (41), 4953-4955. DOI: 10.1039/c2cc31167d.
- (97) Shibata, N.; Das, B.; Tokunaga, E.; Shiro, M.; Kobayashi, N. Trifluoroethoxy-Coating Improves the Axial Ligand Substitution of Subphthalocyanine. *Chem. - Eur. J.* **2010**, *16* (25), 7554-7562. DOI: 10.1002/chem.201000373.
- (98) Yamasaki, Y.; Mori, T. Subphthalocyanines Having Axial Substituent with Direct B-C Bond: General Preparation and Physical Properties. *Chem. Lett.* **2010**, *39* (10), 1108-1109. DOI: 10.1246/cl.2010.1108.

- (99) Chauhan, S. M. S.; Kumari, P. Synthesis of unsymmetrical benzoporphyrazines in functional ionic liquids and formation of self-aggregates of zinc(II) pyridino 3,4 tribenzoporphyrazines in solutions. *Tetrahedron* **2009**, *65* (12), 2518-2524. DOI: 10.1016/j.tet.2009.01.046.
- (100) Sharman, W. M.; van Lier, J. E. Synthesis and photodynamic activity of novel asymmetrically substituted fluorinated phthalocyanines. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16* (5), 1166-1175. DOI: 10.1021/bc0500241.
- (101) Robert Behrend, E. M., Franz Rusche. Ueber Condensationsproducte aus Glycoluril und Formaldehyd. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1905**, *339*, 1-37.
- (102) Freeman, W. A.; Mock, W. L.; Shih, N. Y. CUCURBITURIL. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103* (24), 7367-7368. DOI: 10.1021/ja00414a070.
- (103) Lee, J. W.; Samal, S.; Selvapalam, N.; Kim, H. J.; Kim, K. Cucurbituril homologues and derivatives: New opportunities in supramolecular chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36* (8), 621-630. DOI: 10.1021/ar020254k.
- (104) Kim, J.; Jung, I. S.; Kim, S. Y.; Lee, E.; Kang, J. K.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Kim, K. New cucurbituril homologues: Syntheses, isolation, characterization, and X-ray crystal structures of cucurbit n uril (n=5, 7, and 8). *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (3), 540-541. DOI: 10.1021/ja993376p.
- (105) Liu, S. M.; Ruspic, C.; Mukhopadhyay, P.; Chakrabarti, S.; Zavalij, P. Y.; Isaacs, L. The cucurbit n uril family: Prime components for self-sorting systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (45), 15959-15967. DOI: 10.1021/ja055013x.
- (106) *Reductive Amination* [online], [cit. 2023-12-3]. Dostupné z: https://commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Reductive_Amination/Reductive_Amination_Index.htm.
- (107) Novakova, V.; Roh, J.; Gela, P.; Kunes, J.; Zimcik, P. Azaphthalocyanines with fused triazolo rings: formation of sterically stressed constitutional isomers. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (36), 4326-4328. DOI: 10.1039/c2cc30942d.
- (108) Lis-Cieplak, A.; Sitkowski, J.; Kolodziejski, W. Comparative Proton Nuclear Magnetic Resonance Studies of Amantadine Complexes Formed in Aqueous Solutions with Three Major Cyclodextrins. *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103* (1), 274-282. DOI: 10.1002/jps.23802.
- (109) 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. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01140.
- (110) Uzunova, V. D.; Cullinane, C.; Brix, K.; Nau, W. M.; Day, A. I. Toxicity of cucurbit 7 uril and cucurbit 8 uril: an exploratory *in vitro* and *in vivo* study. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (9), 2037-2042. DOI: 10.1039/b925555a.
- (111) Al-Raqa, S. Y. Synthesis, photochemical and photophysical properties of novel unsymmetrically substituted zinc(II) phthalocyanines. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2006**, *10* (1), 55-62. DOI: 10.1142/s1088424606000077.
- (112) Mbambisa, G.; Tau, P.; Antunes, E.; Nyokong, T. Synthesis and electrochemical properties of purple manganese(III) and red titanium(IV) phthalocyanine complexes octa-substituted at non-peripheral positions with pentylthio groups. *Polyhedron* **2007**, *26* (18), 5355-5364. DOI: 10.1016/j.poly.2007.08.007.
- (113) Wang, R. R.; Zhao, Y.; Zhu, C. L.; Huang, X. B. New Synthesis of 3,6-Dibromophthalonitrile and Phthalocyanine Having Eight Thienyl Substituents at Peripheral α -Positions. *J. Heterocycl. Chem.* **2015**, *52* (4), 1230-1233. DOI: 10.1002/jhet.2130.
- (114) Yamamoto, S.; Kuribayashi, K.; Murakami, T. N.; Kwon, E.; Stillman, M. J.; Kobayashi, N.; Segawa, H.; Kimura, M. Regioregular Phthalocyanines Substituted with Bulky Donors at Non-Peripheral Positions. *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23* (61), 15446-15454. DOI: 10.1002/chem.201703105.
- (115) Chen, Y. X.; Fang, W. J.; Wang, K.; Liu, W.; Jiang, J. Z. Nonperipheral Tetrakis(dibutylamino)phthalocyanines. New Types of 1,8,15,22-Tetrakis(substituted)phthalocyanine Isomers. *Inorg. Chem.* **2016**, *55* (18), 9289-9296. DOI: 10.1021/acs.inorgchem.6b01371.

- (116) Kolarova, M.; Mulaku, A.; Miletin, M.; Novakova, V.; Zimcik, P. Magnesium Phthalocyanines and Tetrapyrizinoporphyrines: The Influence of a Solvent and a Delivery System on a Dissociation of Central Metal in Acidic Media. *Pharmaceuticals* **2022**, *15* (4). DOI: 10.3390/ph15040409.
- (117) Demuth, J.; Miletin, M.; Machan, M.; Kantor, M.; Zimcik, P.; Novakova, V. Synthesis and J-Dimer Formation of Tetrapyrizinoporphyrines with Different Functional Groups for Potential Biomolecular Probe Applications. *Chempluschem* **2020**, *85* (3), 527-537. DOI: 10.1002/cplu.202000026.
- (118) Vachova, L.; Novakova, V.; Kopecky, K.; Miletina, M.; Zimcik, P. Effect of intramolecular charge transfer on fluorescence and singlet oxygen production of phthalocyanine analogues. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (38), 11651-11656. DOI: 10.1039/c2dt31403g.
- (119) Al-Hamdan, N. S.; Hussain, A.; Kozlikova, M.; Alfred, M. A.; Machacek, M.; Ganesan, A.; Zimcik, P.; Makhseed, S. Enhanced photodynamic activity of asymmetric non-ionic Zn(II) phthalocyanine amphiphiles: Effect of molecular design on *in vitro* activity. *Dyes and Pigment.* **2024**, *221*. DOI: 10.1016/j.dyepig.2023.111809.
- (120) *Egg Phosphatidylcholine* [online], [cit. 2024-2-7]. Dostupné z: <https://www.creative-biolabs.com/lipid-based-delivery/egg-phosphatidylcholine.htm>.
- (121) 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. DOI: 10.1142/s1088424612500800.
- (122) Okimoto, Y.; Watanabe, A.; Niki, E.; Yamashita, T.; Noguchi, N. A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. *FEBS Lett.* **2000**, *474* (2-3), 137-140. DOI: 10.1016/s0014-5793(00)01587-8.
- (123) Novakova, V.; Miletin, M.; Filandrova, T.; Lenco, J.; Ruzicka, A.; Zimcik, P. Role of Steric Hindrance in the Newman-Kwart Rearrangement and in the Synthesis and Photophysical Properties of Arylsulfanyl Tetrapyrizinoporphyrines. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (5), 2082-2093. DOI: 10.1021/jo402791c.
- (124) Chen, C. C.; Wu, R. J.; Tzeng, Y. Y.; Lu, C. S. Chemical Oxidative Degradation of Acridine Orange Dye in Aqueous Solution by Fenton's Reagent. *J. Chin. Chem. Soc.* **2009**, *56* (6), 1147-1155. DOI: 10.1002/jccs.200900165.
- (125) Chen, H.; Jin, X. L.; Zhu, K.; Yang, R. Q. Photocatalytic oxidative degradation of acridine orange in aqueous solution with polymeric metalloporphyrins. *Water Res.* **2002**, *36* (16), 4106-4112. DOI: 10.1016/s0043-1354(02)00116-1.
- (126) Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B. RATE CONSTANTS FOR THE DECAY AND REACTIONS OF THE LOWEST ELECTRONICALLY EXCITED SINGLET-STATE OF MOLECULAR-OXYGEN IN SOLUTION - AN EXPANDED AND REVISED COMPILATION. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1995**, *24* (2), 663-1021. DOI: 10.1063/1.555965.
- (127) Kuznetsova, N. A.; Gretsova, N. S.; Derkacheva, V. M.; Mikhalenko, S. A.; Solov'eva, L. I.; Yuzhakova, O. A.; Kaliya, O. L.; Luk'yanets, E. A. Generation of singlet oxygen with anionic aluminum phthalocyanines in water. *Russ. J. Gen. Chem.* **2002**, *72* (2), 300-306. DOI: 10.1023/a:1015402524813.
- (128) Luo, D. D.; Carter, K. A.; Razi, A.; Geng, J. M.; Shao, S.; Giraldo, D.; Sunar, U.; Ortega, J.; Lovell, J. F. Doxorubicin encapsulated in stealth liposomes conferred with light-triggered drug release. *Biomaterials* **2016**, *75*, 193-202. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.027.

10 Zoznam príloh

Ide o súbor publikovaných prác. Práce sú zoradené podľa výskytu v dizertačnej práci.

Kocisakova L, Rando C, Kozlikova M, Machacek M, Novakova V, Šindelář V, Zimcik P, Monomerization of Phthalocyanines in Water via Their Supramolecular Interactions with Cucurbiturils, *J. Org. Chem.*, **2023**, 88, 2, 988 – 1002.

Kocisakova L, Senipek MI, Zimcik P, Novakova V, Non-peripherally alkylamino-substituted phthalocyanines: Synthesis, spectral, photophysical and acid-base properties, *J. Porphyrins and Phthalocyanines*, **2019**, 23, 427 – 436.