

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv



Příprava a studium vlastností azaanalogů ftalocyaninů

Disertační práce

(soubor publikovaných vědeckých prací doplněný komentářem)



Mgr. Veronika Nováková

Hradec Králové 2011

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, červen 2011

.....

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli doc. PharmDr. Petru Zimčíkovi, Ph.D. za perfektní vedení mého PGS studia a za jeho podporu a trpělivost jak v pracovním, tak v osobním životě.

Děkuji i doc. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D., který dohlížel především na formální stránky mého PGS studia.

Za příjemné pracovní prostředí děkuji kolegům PharmDr. Kamilu Kopeckému, Ph.D., PharmDr. Miroslavu Miletínovi, Ph.D., PharmDr. Zbyňku Musilovi, Ph.D., Mgr. Lence Váchové a ostatním členům Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv. Nechtěla bych zapomenout ani na studenty Mgr. Šárku Franzovou, Mgr. Janu Ivincovou a Veroniku Krepsovou, se kterými jsem spolupracovala na některých projektech. Za podnětné konzultace děkuji PharmDr. Jaroslavu Rohovi, Ph.D. a doc. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D.

Poděkování patří i dalším spolupracovníkům, hlavně dr. Langovi z Akademie věd ČR, kolegům z Jihočeské Univerzity v Nových Hradech a dr. E. Mørkved (Trondheim, Norsko)

Můj velký dík patří grantovým agenturám (Grantové agentuře Akademie věd České Republiky (projekt KJB401100801), Grantové agentuře Univerzity Karlovy (projekty 41107/2007 a 57810/2010), Grantové agentuře České Republiky (projekt P207/11/1200) a grantu SVV 263 001), které zajišťovaly moji práci po stránce finanční.

Za výborné rodinné zázemí děkuji svým rodičům, Lukymu a Honzovi.

Obsah

1. Seznam zkratk	8
2. Přehled současného stavu řešené problematiky	9
2.1. Ftalocyaniny vs. azaftalocyaniny	9
Příprava prekurzorů	9
Cyklizační reakce	11
Agregace	13
Absorpční vlastnosti	13
2.2. Fotofyzikální a fotochemické parametry	16
2.3. Přenos elektronu: PET a ICT	19
2.4. Fotodynamická terapie	20
3. Cíl disertační práce	25
4. Výsledky a diskuse	26
4.1. Intramolekulární přenos náboje u AzaPc	26
Potvrzení procesu ICT	27
J-dimery a ICT	28
Blokování ICT protonizací	31
pH senzitivní PS a senzory	32
4.2. Syntetické problémy u AzaPc	34
Příprava AzaPc a Pc	34
Aryloxy- a alkyloxy substituované AzaPc	35
Homology s rozšířeným systémem konjugovaných vazeb	38
Konjugační reakce AzaPc s biomolekulami	41
5. Závěr	46
6. Abstrakt	47
7. Abstract	48
8. Seznam použité literatury	49
9. Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací	55
10. Přílohy	57

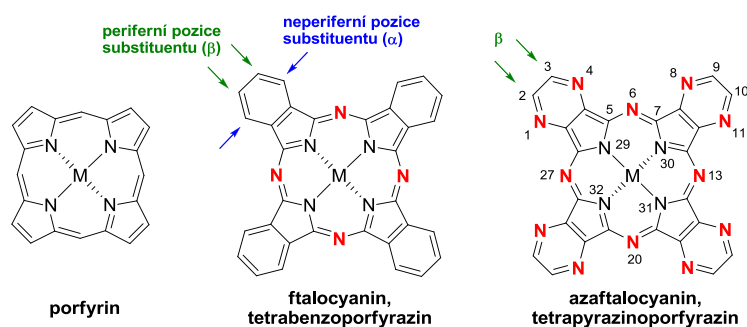
1. Seznam zkratek

A	akceptor
AMD	věkem podmíněná makulární degenerace (age-related macular degeneration)
ALA	kyselina aminolevulová (M-ALA a H-ALA jsou methyl- a hexylestery kyseliny aminolevulové)
AzaPc	azaftalocyanin (azaphthalocyanine)
CSS	„charge separate state“
CTC	„charge transfer complex“
D	donor
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DOPC	dioleylfosfatidylcholin
HOMO	nejvyšší obsazený molekulový orbital (highest occupied molecular orbital)
ICT	intramolekulární přenos náboje (intramolecular charge transfer)
Pc	ftalocyanin (phthalocyanine)
PDT	fotodynamická terapie (photodynamic therapy)
PET	světlem vyvolaný přenos náboje (photo-induced electron transfer)
PS	fotosenzitizér (photosensitizer)
RET	„resonance energy transfer“
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
LUMO	nejnižší neobsazený molekulový orbital (lowest unoccupied molecular orbital)
2,3-TQP	tetra[2,3]chinoxalinoporfyraziny
6,7-TQP	tetra[6,7]chinoxalinoporfyraziny

2. Přehled současného stavu řešené problematiky

2.1. Ftalocyaniny vs. azaftalocyaniny

Ftalocyaniny (Pc) jsou syntetické planární makrocyclické útvary odvozené od přírodních porfyrinů. Skládají se ze čtyř isoindolinových jednotek spojených navzájem azomethinovými můstky. Izosterní záměnou benzenových jader za pyrazinová lze odvodit tzv. tetrapyrazinoporfyraziny patřící do širší skupiny azaftalocyaninů (AzaPc) (Obr. 1).



Obr. 1. Struktura porfyrinu a od něj odvozených syntetických látek (M je kation kovu nebo 2H). Periferní a neperiferní pozice substituentů jsou diskutovány níže.

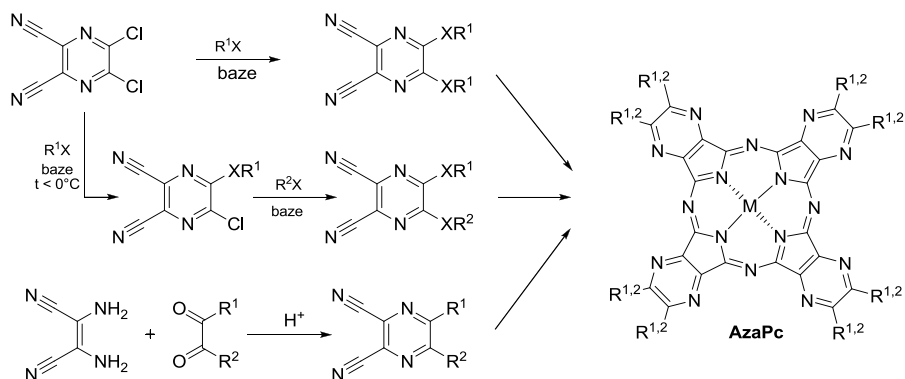
Díky zmíněné izosterní záměně se AzaPc oproti Pc obecně vyznačují nižší lipofilitou, lepší rozpustností a větší variabilitou periferní substituce vlivem snazší dostupnosti prekurzorů (viz dále). Nevýhodou může být jejich vyšší tendence k agregaci a posun hlavního absorpčního pásu k nižším vlnovým délkám (viz dále).

Příprava Pc i AzaPc je založena na shodných cyklizačních postupech, pouze výchozí látky jsou odlišné. V případě Pc se jedná o substituované deriváty kyseliny ftalové (anhydrid, imid, amid, nitril), přičemž nejčastěji se vychází ze substituovaných ftalonitrilů. Prekurzory pro AzaPc mají benzenové jádro vyměněno za izosterní pyrazin. Nitrilové skupiny se zúčastňují tvorby makrocycly, ostatní substituenty zůstávají na periférii Pc/AzaPc a podílí se na jejich finálních vlastnostech. Vzhledem k tomu, že reaktivita pyrazinu se liší od benzenu, jsou i syntetické postupy vedoucí k příslušným prekurzorům rozdílné.

Příprava prekurzorů

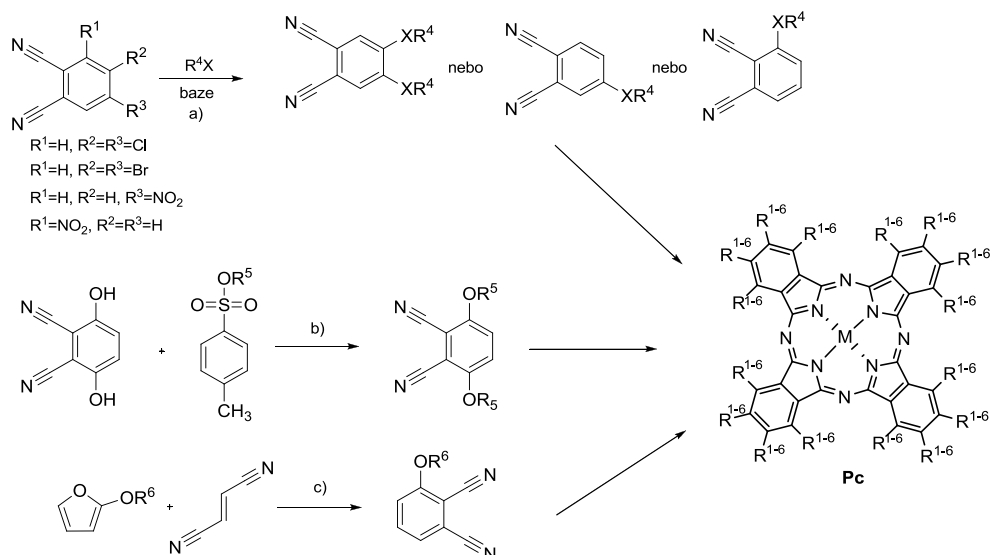
Pro syntézu AzaPc prekurzorů rozlišujeme dva základní přístupy^[1] (Obr. 2). Prekurzory s periferním substituentem vázaným přes heteroatom (O, S, N) lze ve vysokých výtěžcích připravit nukleofilní substitucí z 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu^[2, 3]. Dusíky pyrazinového cyklu svým záporným indukčním efektem, stejně jako záporný mezomerní efekt nitrilových skupin vázaných v polohách 2 a 3, výrazně snižují elektronovou hustotu na uhlících 5 a 6. Tyto uhlíky jsou pak snadno napadány nukleofily

za vzniku 5,6-disubstituovaných pyrazin-2,3-dikarbonitrilů. Pokud do reakce vstupují výchozí látky v ekvimolárním poměru, lze připravit za chlazení reakční směsi i monosubstituované sloučeniny, které mohou následně v dalším kroku reakcí s jiným nukleofilem poskytnout nesymetrický prekurzor^[4]. Pro substituenty vázané C-C vazbou nelze tento postup využít, proto se připravují kondenzací 2,3-diaminomaleonitrilu s příslušnou vicinální dikarbonylovou sloučeninou v kyselém prostředí^[1, 5].



Obr. 2. Obecný postup přípravy AzaPc (R^1 , R^2 je alkyl nebo aryl, X je kyslík, síra nebo dusík, M je kation kvu nebo 2H.)

Nukleofilní substituci v aprotickém polárním rozpouštědle (dimethylformamid (DMF), dimethylsulfoxid (DMSO), acetonitril, atd.) v přítomnosti velkého přebytku uhličitanu draselného jako báze lze použít i pro syntézu alkyloxy-, aryloxy-, alkylsulfanyl- a arylsulfanyl- substituovaných ftalonitrilů, prekurzorů Pc. Odstupující skupinou v těchto případech je většinou NO_2^- , Br^- nebo Cl^- . Nejčastějšími výchozími látkami bývají komerčně dostupný 3-nitroftalonitril, 4-nitroftalonitril a 4,5-dichlorftalonitril^[6]. Alkyloxy a aryloxyderiváty lze získat i alkylací fenolických hydroxylových skupin^[7, 8] nebo Diels-Alderovou^[9] reakcí (Obr. 3). Pro nukleofilní substituci u alkylaminoderivátů se jako odstupující skupiny osvědčily NO_2^- a Br^- ^[6, 10]. Publikován byl i postup, kdy methylací 3- a 4-aminoftalonitrilu pomocí dimethyl sulfátu v aprotickém polárním rozpouštědle autoři získali 3- a 4-(*N,N*-dimethylamino)ftalonitril^[11]. Prekurzory se substitenty vázané C-C vazbou se nejčastěji připravují pomocí couplingových reakcí^[12]. Výše uvedené syntetické postupy nejsou absolutním výčtem všech možných postupů, ale zahrnují ty nejpoužívanější.

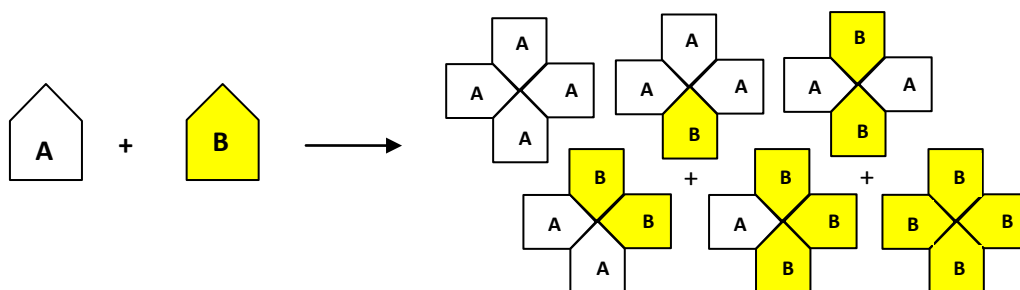


Obr. 3. Obecné postupy přípravy Pc nukleofilní aromatickou substitucí (a), alkyací fenolických hydroxyků (b) a Diels-Alderovou reakcí (c); (R¹⁻⁶ je alkyl nebo aryl, X je kyslík, síra nebo dusík, M je kation kovu nebo 2H)

Cyklizační reakce

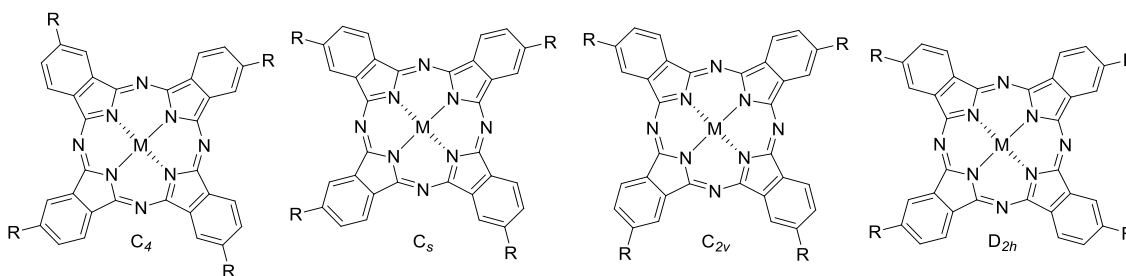
Při cyklizačních postupech Pc/AzaPc se uplatňují dva základní mechanismy. V prvním případě se využívá tzv. *templátového efektu centrálního kovu*. Prekurzor je zahříván ve vysokotepelném rozpouštědle (DMF, chinolin nebo dimethylaminoethanol) se solí určitého kovu. Tento kation kovu na sebe koordinačně váže čtyři prekurzory, které se tak dostatečně přiblíží k sobě a za vyšších teplot dojde k jejich spojení do makrocyklu. Kation kovu se zároveň chelatuje do jeho centra. Ve druhém případě slouží jako *iniciátor reakce alkoholát alkalického kovu nebo kovu alkalických zemin* a k výstavbě kruhu dochází postupným spojováním prekurzorů^[13]. I v tomto případě je produktem komplex Pc/AzaPc s kationem kovu použitým k tvorbě alkoholátu. Na podobném principu je založena i cyklizace v alkoholu se silnou bazí, nejčastěji se pro tento účel používají 1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-en a 1,5-diazabicyklo[4,3,0]non-5-en^[14].

Vstupuje-li do reakce pouze jeden prekurzor, vzniká symetrický Pc/AzaPc. V případě, že jsou použity dva různé prekurzory (A a B) se srovnatelnou reaktivitou, získáme statistickou směs Pc/AzaPc s různě nakombinovanými podjednotkami (AAAA, AAAB, ABAB, AABB, ABBB, BBBB), v této práci dále označované jako tzv. *kongenery*. Tato metoda přípravy nesymetrických Pc/AzaPc se označuje jako *statistická kondenzace* (Obr. 4). I když se jedná o neselektivní metodu, lze použitím vhodného poměru prekurzorů zvýšit podíl žádoucího kongeneru^[15] a ten následně oddělit chromatografickými metodami.



Obr. 4. Schéma vzniku směsi kongenerů Pc/AzaPc metodou statistické kondenzace ze dvou různých prekurzorů A a B

Pro úplnost je potřeba dodat, že nesymetrický Pc/AzaPc lze získat i v případě použití jednoho prekurzoru, který není symetrický. Tato reakce vede ke směsi polohových izomerů s různými typy symetrie (Obr. 5).



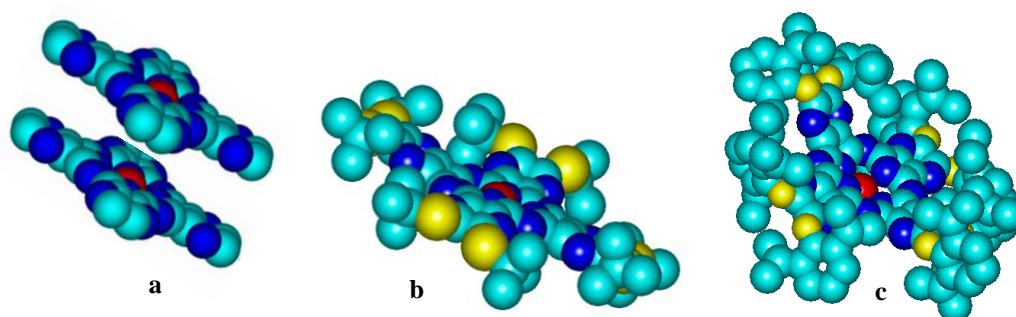
Obr. 5. Polohové izomery s označením příslušného typu symetrie (C_4 , C_s , C_{2v} a D_{2h}) vzniklé cyklizací nesymetrického prekurzoru (M je kation kovu nebo 2H; R je libovolný substituent)

V centru makrocyklu Pc je možno chelátovat přes 70 různých kationtů kovů (ať už kovů z hlavních skupin periodické tabulky nebo ze skupiny lanthanoidů a aktinoidů) a polokovů (např. Si, Ge, B)^[16]. Pokud se v centru nevyskytuje žádný kov, hovoříme o tzv. *bezkovových derivátech*. Velikost centrální dutiny Pc je shodná s AzaPc, lze tedy očekávat, že i v případě AzaPc bude možno docílit podobné variability. Četnost prací zabývajících se AzaPc je však výrazně nižší, a tedy tato oblast zatím není zdaleka tak prozkoumána. Centrální kation má velký vliv na finální vlastnosti celé molekuly, a tak výběrem určitého kationtu lze vhodně navrhovat molekuly pro jednotlivé aplikace.

Vhodným periferním substituentem můžeme jak u Pc tak u AzaPc ovlivnit následující parametry: objemností periferního substituentu *zamezit nežádoucí agregaci* (viz dále), *zvýšit rozpustnost* ve vodném nebo organickém rozpouštědle, protože nesubstituované makrocykly jsou obecně velice špatně rozpustné; *ovlivnit absorpční, fotochemické a fotofyzikální vlastnosti* (viz dále).

Agregace

Pc i AzaPc jsou planární makrocyclické útvary, které mají vlivem silných π - π interakcí tendenci k tvorbě dimerů a vyšších agregátů^[16, 17] (Obr. 6)[†]. Agregace je pro většinu aplikací nežádoucí jev, neboť v tomto případě nedochází k produkci singletového kyslíku ani emise fotonu (viz níže). Volbou vhodného periferního substituentu lze agregaci snížit na minimum. Jedním z možných způsobů je použití objemného substituentu^[18], který stericky zabrání přiblížení druhé molekuly Pc/AzaPc, a tím i vzniku dimeru či vyššího agregátu. Jinou možností je zavedení substituentů nesoucích náboje, které zajistí monomerizaci Pc/AzaPc vlivem elektrostatických odpuzivých sil^[19].

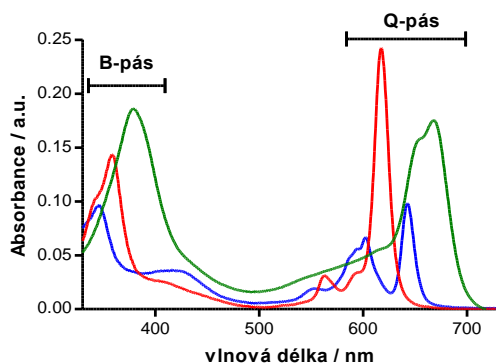


Obr. 6. Prostorové uspořádání molekuly AzaPc: dimer nesubstituovaného AzaPc (a), AzaPc s objemnými *tert*-butylsulfanylovými skupinami (b) a 2,6-diisopropylfenylsulfanylovými substituenty (c) bránícími agregaci molekul

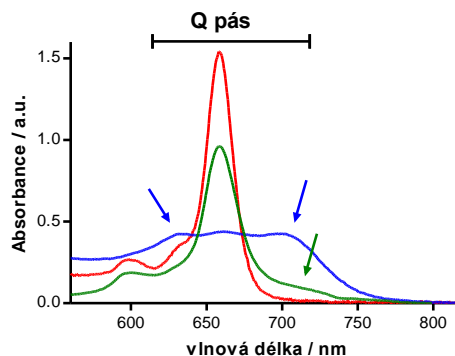
Absorpční vlastnosti

Absorpční, fotofyzikální a fotochemické vlastnosti Pc a AzaPc jsou vzhledem k podobné struktuře obdobné. Díky rozsáhlému systému konjugovaných vazeb absorbují světlo ve viditelné oblasti a mají tak intenzivní většinou modrozelené zbarvení. Absorpční spektra Pc mají dva hlavní absorpční pásy - nízkoenergetický Q pás v oblasti 650-720 nm a vysokoenergetický B pás v oblasti 320-380 nm^[16, 20]. U AzaPc (Obr. 7) je Q pás vzhledem k nižší efektivitě konjugace π systému posunut k nižším vlnovým délkám a objevuje se v rozmezí 620-670 nm^[1]. Zatímco B pás se u Pc i AzaPc příliš nemění, z tvaru Q pásu lze vyčíst mnoho informací o studované látce. Symetrické Pc/AzaPc s centrálním kationtem kovu mají jeden ostrý Q pás díky tomu, že se molekula nachází ve formě termodynamicky stabilního delokalizovaného dianiontu s vysokou mírou symetrie^[16]. Nesymetrické molekuly jsou naopak charakterizovány rozštěpením Q pásu^[1, 17] (Obr. 7). Tvar takového spektra pak závisí na vlastnostech periferních substituentů, čím je rozdílnější vliv substituentů, tím je i štěpení Q pásu výraznější. Pc a AzaPc ztrácí symetrii také v případě, že v centru není vázán žádný kation kovu (bezkovový derivát). Dva isoindolinové centrální dusíky váží u bezkovových Pc/AzaPc vodíkový atom, zatímco zbylé dva jsou ve formě iminu. Výsledkem je opět výrazné štěpení Q pásu^[16]. Vyskytují-li se před či za Q pásem další absorpční pásy, lze usuzovat buď na agregaci^[18, 21] molekul nebo na protonizaci azomethinových dusíků^[22-25] (Obr. 8).

[†] Struktury vymodelovány v programu HyperChemTM5.01



Obr. 7. Absorpční spektrum **symetrického** AzaPc s centrálním kovem a odpovídajícího **bezkovového** derivátu, **nesymetrického** AzaPc s centrálním kovem



Obr. 8. Absorpčního spektrum **monomerního** symetrického, **agregovaného** a **částečně protonizovaného** AzaPc

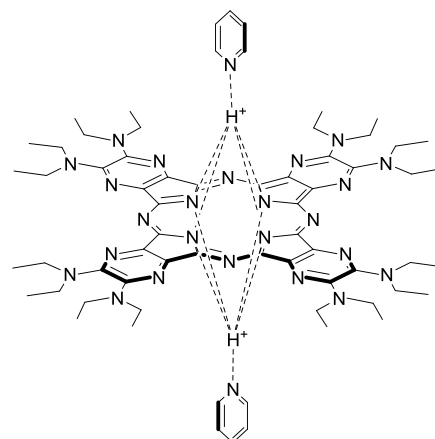
Posun Q pásu lze ovlivnit několika způsoby – kationtem kovu komplexovaným v centru, periferní substitucí, rozšířením konjugovaného systému vazeb anelací dalších cyklů anebo rozpouštědlem.

Volbou vhodného *centrálního kationtu kovu* můžeme posunout Q pás až v rozsahu 100 nm, přičemž roli hraje velikost atomu, jeho koordinační schopnosti a oxidační stav^[16]. Kationty kovů s plně obsazenými orbitaly (Li^{I} , Mg^{II} , Zn^{II}) mají u Pc Q pás v oblasti 670 nm. Pokud nejsou všechny orbitály plně obsazeny (Fe^{II} , Co^{II} , Ru^{II}) silně interagují s Pc kruhem a takovéto komplexy absorbují při nižších vlnových délkách. Vliv oxidačního stavu centrálního kovu dokládá např. posun absorpčních maxim $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Pc}$ (667 nm) oproti $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Pc}$ (685 nm)^[26] a $\text{Co}^{\text{I}}\text{Pc}$ (704 nm) oproti $\text{Co}^{\text{II}}\text{Pc}$ (658 nm) a $\text{Co}^{\text{III}}\text{Pc}$ (673 nm)^[27, 28].

Periferní substituenty s elektron-akceptorovými vlastnostmi (sulfonyl, karboxyl, fluor) způsobují posun k červené oblasti spektra. Elektron-donorové skupiny (amino-, alkoxy-, alkyl-) ovlivňují konjugovaný systém Pc/AzaPc méně a mají tedy méně výrazný vliv na posun Q pásu ve spektru^[16, 20]. U Pc lze oproti AzaPc rozlišovat tzv. periferní (β) a neperiferní (α) pozice substituentu (viz Obr. 1), přičemž substituce v α poloze má výrazně větší vliv na posun ve spektru. V případě AzaPc je v této poloze dusíkový atom pyrazinového cyklu, a proto lze AzaPc substituovat pouze „periferně“. Zajímavými substituenty jsou alkylamino skupiny, kde se ve spektru objevuje nový výrazný pás v oblasti 550 nm, za který jsou zodpovědné nevazebné $n-\pi^*$ interakce volného elektronového páru na dusíku^[29].

Výrazné *rozšíření konjugovaného systému vazeb*, a tím i posun o 80-120 nm k vyšším vlnovým délkám, lze docílit anelací dalších cyklů na periférii. Od Pc lze touto cestou získat naftalocyaniny, od AzaPc tetra[2,3]chinoxalinoporfyraziny (2,3-TQP)^[30, 31]. Případně u AzaPc vložením benzenových jader mezi pyrazin a porfyrazinový skelet lze odvodit tetra[6,7]chinoxalinoporfyraziny (6,7-TQP)^[32, 33]. Zajímavý je fakt, že 6,7-TQP se liší od izomerních 2,3-TQP posunem k červené části spektra zhruba o 40 nm^[33]. Vkládání benzenových jader má aditivní charakter. U Pc byl popsán bathochromní posun o 20-30 nm na jedno benzenové jádro^[34, 35], u AzaPc o 22 nm^[33].

Menší vliv na posun Q pásu má *rozpouštědlo* použité při měření absorpčního spektra. Tento posun se označuje jako solvatochromní a je závislý na tom, zda rozpouštědlo interaguje s molekulou Pc/AzaPc. Nežádoucí agregaci Pc a AzaPc lze minimalizovat použitím koordinujících rozpouštědel (pyridin, DMSO, DMF), která zajistí ostrý Q pás odpovídající monomeru látky. V případě bezkovových derivátů AzaPc je při volbě rozpouštědla potřeba vzít v úvahu i fakt, že v rozpouštědlech charakteru slabých organických bází (pyridin, DMF, DMSO) byl pozorován vznik tzv. *proton transfer komplexu* (Obr. 9), kdy molekula získává opět symetrický charakter a původně rozštěpený Q pás se mění na jeden ostrý^[24]. Takovýto komplex ovlivňuje pak i výsledné chování molekuly z hlediska fotofyzikálních a fotochemických parametrů.

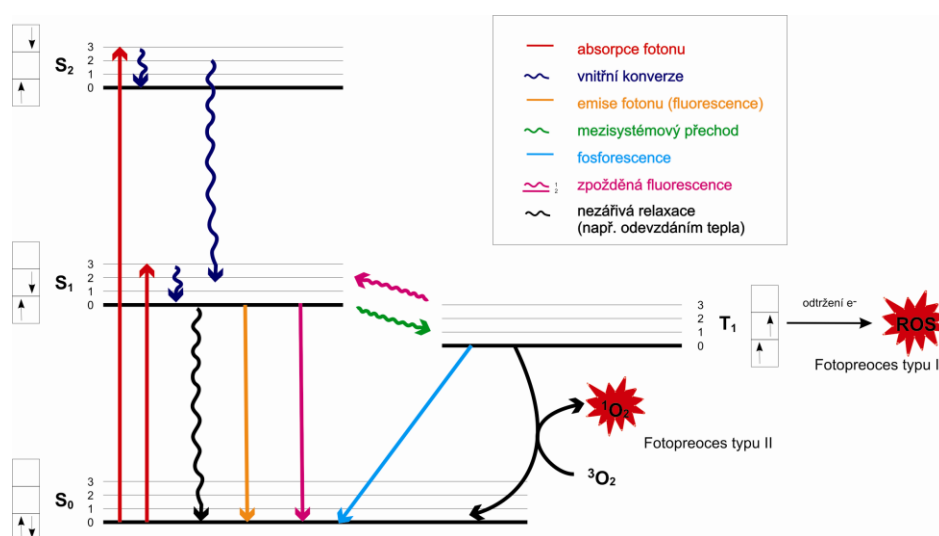


Obr. 9. Schematické znázornění proton transfer komplexu.

Extinkční koeficienty, které charakterizují sílu absorpce při dané vlnové délce, jsou u Pc a AzaPc srovnatelné. Pohybují se v řádech $1-3 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$, což výrazně převyšuje hodnoty porfyrinů, kde je absorpce v Q pásu nižší až o dva řády^[20].

2.2. Fotofyzikální a fotochemické parametry

Fotofyzikální a fotochemické vlastnosti sloučenin vycházejí z excitovaných stavů molekul, které nejlépe demonstruje Jablonského diagram. Původně znázorňoval pouze povolený přechod z nejnižšího excitovaného stavu molekuly zpět do základního stavu emisí fotonu (tedy fluorescence) a zakázaný přechod z metastabilního stavu o nižší energii fosforescencí^[36]. V současnosti ve své modifikované podobě (Obr. 10) zahrnuje i ostatní možné procesy vycházející z excitovaných stavů molekul. Horizontální linie odpovídají energetickým hodnotám excitovaných stavů. Excitační a relaxační procesy jsou vyznačeny vertikálními šipkami, přičemž pro zářivé přechody se používá rovná šipka a pro nezářivé vlnitá. Základní stav (S_0), stejně jako první (S_1) a druhý (S_2) excitovaný stav mají ještě tzv. vibrační energetické hladiny značené jako 0, 1, 2, atd.



Obr. 10. Modifikovaný Jablonského diagram (popis viz text).

Molekuly nacházející se v základním S_0 stavu přijmou absorpcí fotonu energii a dostávají se do některé z vibračních hladin excitovaného stavu S_1 , přičemž je dodrženo pravidlo zachování energie (energie absorbovaného fotonu musí být rovná rozdílu energií energetických hladin). Tento přechod trvá řádově 10^{-15} s. Molekuly následně ztrácejí část energie srážkami s okolními molekulami a dostávají se tímto na nejnižší vibrační hladinu S_1 stavu. Tento děj trvá přibližně 10^{-12} s a nazývá se *vnitřní konverze*. Molekuly mohou v S_1 stavu přijmout absorpcí fotonu další energii a dostat se tak do S_2 stavu, ze kterého se převážně vnitřní konverzí vrací opět za 10^{-12} s do některé vibrační hladiny S_1 stavu a za dalších 10^{-12} s pak do nejnižší vibrační hladiny S_1 stavu^[37]. Z S_1 stavu může molekula relaxovat do základního S_0 stavu několika následujícími mechanismy.

- **Emise fotonu (tj. fluorescence):**

Díky tomu, že doba života fluorescence je vyšší (řádově 10^{-8} s) než zmíněná vnitřní konverze, nachází se molekula před emisí fotonu vždy v nejnižší vibrační hladině S_1 stavu.

Fluorescencí se tak dostává do různých vyšších vibračních hladin S_0 , ze kterých se následně opět vnitřní konverzí (za 10^{-12} s) dostává až na nejnižší vibrační hladinu S_0 . Tento proces je zodpovědný za široká emisní spektra fluoroforů. Dalším zajímavým důsledkem je skutečnost, že emisní spektrum je většinou zrcadlovým obrazem absorpčního spektra přechodu $S_0 \rightarrow S_1$ ^[36, 37].

Emise fotonu probíhá při nižší energii (a tedy vyšší vlnové délce) než původní absorpce fotonu. Tento jev se označuje jako tzv. *Stokesův posun* (tj. rozdíl vlnových délek absorpčního a emisního maxima). Energetická ztráta mezi excitací a emisí je dána především ztrátou energie vnitřní konverzí z vyšších vibračních hladin S_1 na nejnižší hladinu S_1 . Vliv na Stokesův posun mohou mít i použité rozpouštědlo, reakce v excitovaných stavech, tvorba komplexů a přenos energie^[36].

Kromě emisního spektra je možné změřit i tzv. *excitační spektrum*, což je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce (nebo energii, vlnočtu, či frekvenci) při konstantní vlnové délce emitovaného záření. Toto spektrum je většinou totožné s absorpčním spektrem a lze jím nepřímo potvrdit, která ze složek emituje pozorovanou fluorescenci.

- **Nezářivé procesy**

- a) ztráta energie ve formě tepla
- b) ztráta energie srážkami/interakcemi s okolními molekulami

Okolní molekuly (rozpuštědla či jiné látky) mohou způsobit návrat excitovaných molekul do S_0 stavu různými mechanismy. Může se jednat o *fotochemické reakce*, *reakce excitovaných stavů*, *tvorbu komplexu v základním stavu* (statické zhášení), *kolizní zhášení* nebo o *přenos energie*^[36]. Poslední dva zmiňované děje se někdy souhrnně označují jako tzv. *dynamické zhášení*^[38]. Při statickém zhášení dochází k tvorbě intramolekulárního dimeru excitované látky a zhášeče. Takovýto dimer se svými vlastnostmi liší od vlastností obou složek a zůstává i po absorpci světelné energie v základním S_0 stavu. Při zhášení označovaném jako *Dextrovo* (kolizní zhášení) dochází po excitaci molekuly donoru k přenosu elektronu z jeho nejnižšího neobsazeného molekulového orbitalu (LUMO) na zhášeč (akceptor), který následně předá svůj elektron z nejvyššího obsazeného molekulového orbitalu (HOMO) zpět na donor. Akceptor tak zůstává v excitovaném stavu. Jiným způsobem přenosu energie je tzv. „*resonance energy transfer*“ (RET), kdy dochází k přenosu energie na malou vzdálenost. Elektron donoru se absorpcí světelné energie dostává z HOMO do LUMO, interakcí s akceptorem se vrací do základního stavu, přičemž elektron akceptoru se posune do orbitalu s vyšším excitovaným stavem. Pokud je akceptor fluoroforem, dochází následně k emisi fotonu, v opačném případě je energie vyzářena jinak, například ve formě tepla^[36]. Jak v případě kolizního, tak v případě RET zhášení je nezbytný překryv emisního spektra donoru s absorpčním spektrem akceptoru^[36].

Dalším důležitým mechanismem vedoucím ke zhášení excitovaných stavů je *světlem vyvolaný přenos elektronu* („photo-induced electron transfer“, PET) a *intramolekulární přenos náboje* („intramolecular charge transfer“, ICT), o kterých pojednává detailněji kapitola 2.3.

c) mezisystémový přechod („Intersystem crossing“)

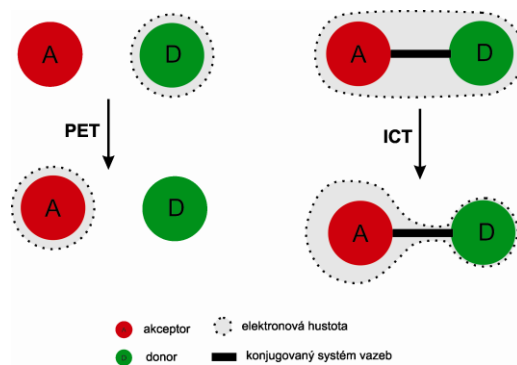
Mezisystémový přechod je poměrně vzácný jev, kdy se molekula dostává ze singletového S_1 stavu do nejnižší vibrační hladiny tripletového T_1 stavu. Jedná se o tzv. *spinově zakázaný děj* (Obr. 10). Elektronů ležících v nejvyšších energických hladinách singletových stavů S_0 , S_1 a S_2 mají opačný spin. Mezisystémovým přechodem se spin jednoho z elektronů mění a T_1 stav má tak elektrony orientované paralelně. Pravděpodobnost spinově zakázaného mezisystémového přechodu je závislá na tzv. spin-orbitalových interakcích mezi vlnovou funkcí singletového a tripletového stavu^[39]. Velikost spin-orbitalových interakcí roste s rostoucím atomovým číslem, a tím se zvyšuje i pravděpodobnost přechodu ze S_1 do T_1 stavu. Jako příklad bychom mohli uvést řadu $Mg < Ca < Zn < Sr < Cd < Ba < Hg$, kde hořčík má nejnižší a rtuť naopak nejvyšší pravděpodobnost přechodu z S_1 do T_1 stavu^[39]. Tento jev byl poprvé popsán McClurem^[40] a je označován jako tzv. *efekt těžkého atomu* („heavy atom effect“)^[36, 39]. Z tohoto důvodu lze volbou vhodného centrálního kationtu kovu posunout fotofyzikální a fotochemické děje u Pc/AzaPc žádoucím směrem. U hořečnatých komplexů je zpravidla pozorována vyšší fluorescence a naopak zinečnaté komplexy jsou známé jako výborní producenti singletového kyslíku^[32, 41, 42].

Díky tomu, že přechody mezi S a T stavy jsou zakázané, mají tripletové stavy poměrně dlouhou dobu života (mikrosekundy až sekundy)^[37]. Během této doby může dojít k interakci s okolním prostředím, například molekulárním kyslíkem, který má základní tripletový T_0 stav a může tak snadno přijmout energii excitované molekuly nacházející se v T_1 stavu. Vzniká tak velice reaktivní *singletový kyslík* (1O_2), který je hlavní cytotoxickou složkou fotodynamické terapie (PDT, viz kapitola 2.4.). Z tripletového T_1 stavu se může molekula vrátit do svého základního stavu dále i *fosforescencí* (10^{-2} až 10^2 s), případně může přijetím tepelné energie dojít k přechodu zpět na S_1 a k následnému vyzáření fotonu (tzv. *zpožděná fluorescence*)^[37, 43].

Relaxace z excitovaného S_1 stavu je kompetitivním procesem, který zahrnuje všechny výše zmíněné zářivé i nezářivé procesy. Pravděpodobnost návratu dané molekuly určitým mechanismem popisují tzv. *kvantové výtěžky*, které lze definovat jako počet dějů na počet přijatých fotonů. Například počet emitovaných fotonů na počet absorbovaných fotonů je označován jako kvantový výtěžek fluorescence (Φ_F) nebo jako počet molekul 1O_2 na počet absorbovaných fotonů jako kvantový výtěžek singletového kyslíku (Φ_Δ).

2.3. Přenos elektronu: PET a ICT

Jednou z možností zhášení excitovaných stavů molekuly je přenos elektronu z donoru (D) na akceptor (A). V případě *světlem vyvolaného přenosu elektronu* (PET) se tvoří komplex mezi D a A nazývaný „charge transfer complex“ (CTC). Takovýto komplex se do základního stavu může vrátit jinými mechanismy než vyzářením fotonu, i když i taková možnost není vyloučena. Látka původně excitovaná do S_1 nemusí být pouze donorem pro PET, výsledný směr přenosu elektronu je dán oxidoredukčním potenciálem základního a excitovaného stavu. Tak např. elektronově bohaté aminy (dimethylanilin, indol) mající roli zhášeců jsou donorem a aromatické látky (antrachinon, 2-kyannaftalen) akceptorem, zatímco ve dvojici indol (D) a RCOOH (A) nebo karbazol (D) a elektronegativní halogenuhlovodík (A) je donorem elektronu zhášeč. V případě procesu PET dochází vždy k „přeskoku“ elektronu na určitou vzdálenost, čímž se liší od *intramolekulárního přenosu náboje* (ICT), kde je D a A ve vzájemné konjugaci (Obr. 11). Místo CTC se při ICT tvoří tzv. „charge separate state“ (CSS), tedy stav, kdy dojde ke zvýšení elektronové hustoty u A na úkor D. I když se ICT a PET odlišuje mechanismem vzniku nábojů/parciálních nábojů v excitovaném stavu, důsledkem je vždy zhášení excitovaných stavů. Díky této podobnosti budou tyto dva děje v dalším textu diskutovány společně pod označením „přenos elektronu“.

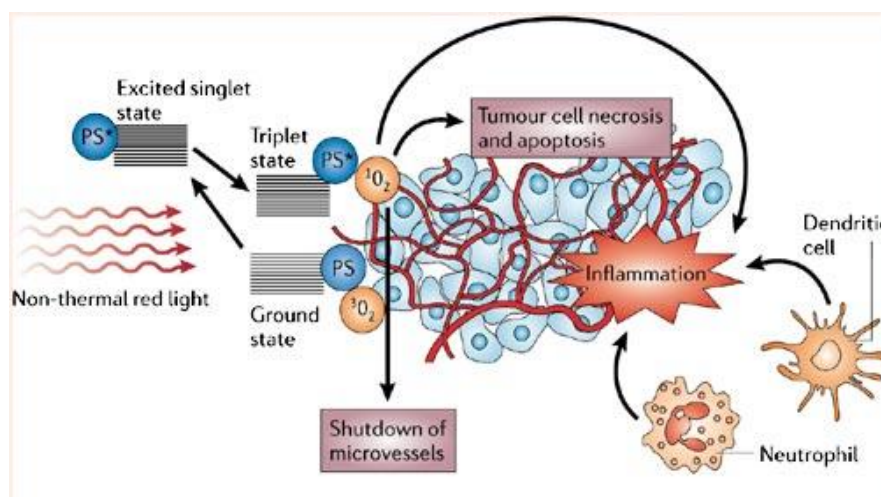


Obr. 11 Zjednodušené schéma přenosu elektronu PET vs. ICT

Energetická hladina, na které leží CTC a CSS, je nižší než S_1 stav, neboť část energie S_1 stavu je použita právě na tvorbu CTC a CSS^[36]. Účinnost přenosu elektronu může být ovlivněna různými faktory, z nichž nejvyšší pozornost si zaslouží polarita rozpouštědla, vzdálenost D-A a teplota. Výrazně polární rozpouštědla (methanol, acetonitril, DMF, DMSO) jsou schopna stabilizovat nabité komplexy CTC a CSS a výrazně tím podporují přenos elektronu^[44, 45]. Naopak v toluenu a benzenu je tento proces silně inhibován^[44]. Výraznější vliv rozpouštědla je pozorován u „ultrafast“ přenosu elektronu^[46, 47]. Rychlostní konstanta přenosu elektronu exponenciálně klesá s rostoucí vzdáleností mezi D a A. Přenos elektronu na vzdálenost větší než 5 Å je označována už jako „long-range“^[48]. Na vzdálenost větší než 20 Å přenos elektronu nebývá běžně pozorován^[46], i když speciální systémy s ještě většími vzdálenostmi přenosu elektronu byly popsány. V případě přenosu elektronu na větší vzdálenost se často mezi donor a akceptor vkládá rigidní spojovací článek, který umožní správnou orientaci donoru a akceptoru v prostoru, a usnadní tak přenos elektronu^[49, 50]. Vliv teploty na přenos elektronu byl popsán u biologických systémů už poměrně dávno^[51], ale příčiny a přesný mechanismus jsou stále zkoumány^[46].

2.4. Fotodynamická terapie

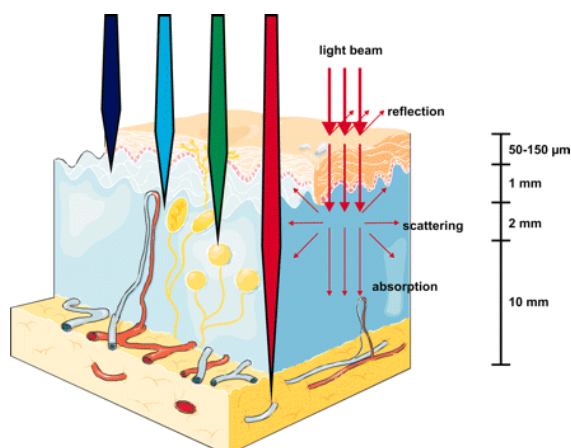
Stále větší incidence nádorových onemocnění vyžaduje neustálé hledání nových metod pro jejich léčbu. Chirurgické odstranění nádorové tkáně spolu s radio- a chemoterapií jsou třemi základními postupy běžně užívanými v praxi, každý z nich mající výrazné vedlejší nežádoucí účinky. Fotodynamická terapie (PDT) je mladá rychle se rozvíjející metoda, která se od roku 1993 stala další možností terapie některých kancerózních stavů^[52, 53]. Tato metoda je založena na současném působení tří složek – fotosenzitizéru (PS), světla a kyslíku (Obr. 12). Po aplikaci PS do organismu je oblast nádoru ozářena světlem vhodné vlnové délky, které excituje PS na vyšší energetickou hladinu. PS je schopen svoji energii následně předat tkáňovému kyslíku $^3\text{O}_2$, ze kterého se tak tvoří vysoce cytotoxický singletový kyslík $^1\text{O}_2$ (viz kapitola 2.2.). Vysoká selektivita účinku, která je zárukou minimálních vedlejších účinků, je dána tím, že k terapeutickému účinku dochází až *in situ* v přítomnosti všech tří složek. Kombinace pouze dvou složek nevede k žádnému účinku.



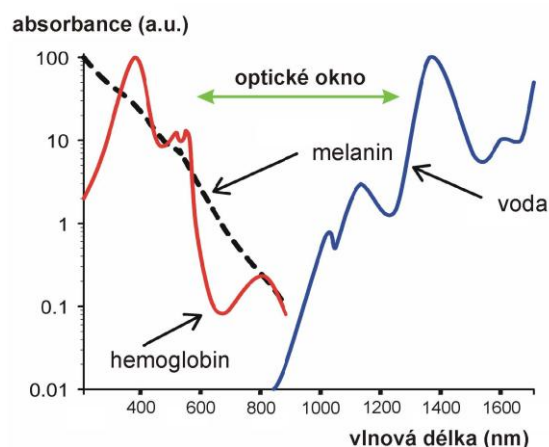
Obr. 12. Princip PDT (s dovolením autorů převzato z CASTANO A. P., MROZ P., HAMBLIN M. R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature Reviews Cancer*, 2006, vol. 6, no. 7, p. 535-545.)

Důležitým parametrem pro PDT světlo, zejména pak jeho vlnová délka použitá k excitaci PS. Světlo kratších vlnových délek (modré světlo) je výrazně pohlcováno endogenními chromofory (hemoglobin, myoglobin a melanin) a zároveň podléhá ve větší míře rozptylu. Tím je výrazně zhoršen jeho průnik tkáněmi (Obr. 13). Naopak červené světlo ($\lambda > 630$ nm) proniká do tkání hlouběji, a to v rozsahu od 1-3 mm (při 630 nm) až 2-6 mm (700-850 nm)^[54, 55]. V oblasti nad 1300 nm výrazně roste absorpce vody, a proto se udává tzv. „optické okno“ pro biologické tkáně 630-1300 nm (Obr. 14)^[56]. Vlnové délky vyšší než 800 nm jsou však pro PDT často nepoužitelné, neboť tripletový stav PS nemusí mít dostatečnou energii pro přeměnu tripletového kyslíku na singletový ($\Delta E_{\Delta} = 94 \text{ kJ mol}^{-1} = 0,97 \text{ eV}$)^[57]. Z uvedených důvodů se optické okno pro PDT zužuje na rozsah 630-800 nm, čím blíže k 800 nm tím lépe. Intenzita světla může také částečně ovlivnit výsledný terapeutický efekt PDT. Vzhledem k tomu, že tkáňový kyslík spotřebovává v PDT se

doplňuje pouze difúzí, mohlo by při užití příliš velkých intenzit světla docházet k depenci kyslíku a PDT efekt by se snížil nebo úplně ztratil^[58, 59].



Obr. 13. Průnik světla tkáněmi (s dovolením autorů převzato z Agostinis, P. et al. (2011), Photodynamic therapy of cancer: An update. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 61: n/a. doi: 10.3322/caac.20114.)



Obr. 14. Optické okno biologických tkání.

Tvorba singletového kyslíku se označuje jako *fotoproces typu II* a je považována za hlavní mechanismus cytotoxického působení při PDT. Zvýšená reaktivita singletového kyslíku je dána tím, že se jedná o vysoce polarizovaný zwitterion. Důsledkem jeho vysoké reaktivity je i velmi krátká doba života, která se pohybuje 10-100 μs v organických rozpouštědlech^[58]. Ve vodném, tedy i biologickém, prostředí se tato doba zkracuje až na 2 μs ^[58]. Z tohoto důvodu je jeho účinek vázán na velmi krátkou vzdálenost (akční rádius přibližně 155 nm). Dalším mechanismem zodpovědným za poškození nádorových buněk je tvorba radikálů přenosem elektronu z excitovaného PS na okolní biomolekuly a molekuly rozpouštědla. Tyto procesy se souhrnně označují jako *fotoproces typu I*. Radikálová reakce se kaskádovitě šíří na další molekuly a výsledkem je intenzivní tvorba tzv. *reaktivních forem kyslíku*, např. peroxidu vodíku, hydroxylového radikálu nebo superoxid anion radikálu. I v tomto případě je výsledkem poškození biomolekul a smrt nádorové buňky.

Fotosenzitizér může být endogenní nebo exogenní látka, která je zodpovědná za citlivost na světlo a hraje tak při PDT klíčovou roli. Dosud známé PS lze rozdělit podle několika hledisek^[60], nejčastěji se užívá třídění do generací. První generace PS je odvozená od látek přirozeně se vyskytujících v přírodě, jejich strukturním základem je porfyrinové jádro. Nejznámějším zástupce je porfimer sodný, což je směs asi šedesáti různých oligomerů, které vznikají během syntézy. Kromě nejednotného složení je nevýhodou této skupiny látek nízká vlnová délka excitace (okolo 630 nm), slabá absorpce ($\epsilon \sim 3000 \text{ cm}^{-1}\text{dm}^3\text{mol}^{-1}$) a vysoká retence PS v kůži způsobující dlouhodobou fotosenzitivitu pacienta na denní světlo^[61]. Ve druhé generaci PS se objevují kromě porfyrinových derivátů i další strukturní typy látek s rozšířeným konjugovaným systémem vazeb (ftalocyaniny, porfyceny, texafyryny), které mají výrazně vylepšené spektrální vlastnosti a lze k jejich excitaci použít tkáněmi lépe pronikající červené světlo (670-800 nm)^[61]. Z nejznámějších látek sem patří verteporfin, temoporfin, talaporfin, kys.

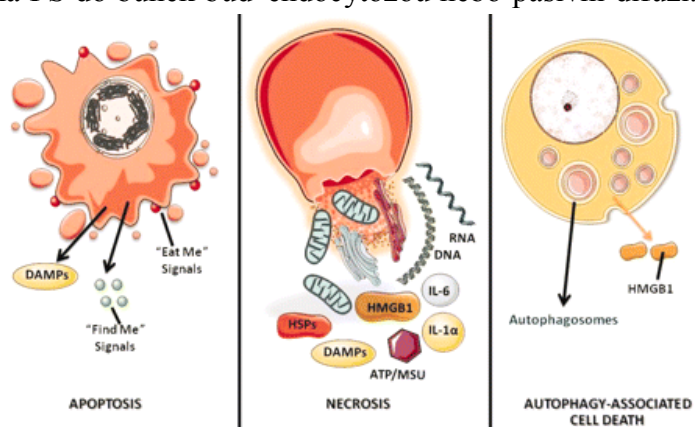
aminolevulová (ALA) a Photosens. První tři zmíněné látky patří do skupiny chlorinů, které se vyznačují absorpcí v oblasti 650-690 nm s extinkčními koeficienty okolo $40\,000\text{ cm}^{-1}\text{dm}^3\text{mol}^{-1}$. Strukturně podobné bakteriochloriny, odvozené od chlorinů redukcí jedné dvojnásobné vazby, mají posunutou absorpci až k 740-800 nm s extinkčními koeficienty $50\,000\text{ cm}^{-1}\text{dm}^3\text{mol}^{-1}$. ALA je zajímavá z hlediska toho, že se jedná o proléčivo, ze kterého se až po biosyntéze tvoří v organismu účinný PS protoporfyrin IX. Photosens patří do skupiny ftalocyaninů, pro které je typická velmi silná absorpce ($\epsilon \sim 200\,000\text{ cm}^{-1}\text{dm}^3\text{mol}^{-1}$) v oblasti 650-720 nm. Do třetí generace se pak řadí PS konjugované s další složkou (biomolekula, monoklonální protilátka, nanočástice, atd.), která má zajistit cílenější distribuci do nádorové tkáně^[61]. I když se v posledních letech intenzivně pracuje na vývoji nových PS, zatím ještě nebyl vyvinut optimální PS. Požadavky na ideální PS je potřeba posuzovat z několika hledisek^[62]:

- spektrální parametry* - výhodou je silná absorpce (míru absorpce vyjadřuje extinkční koeficient, ϵ [$\text{cm}^{-1}\text{dm}^3\text{mol}^{-1}$]) v oblasti 630-800nm. Takovéto parametry zajistí dostatečný průnik světla tkáněmi a účinnou fotodynamickou reakci při malých koncentracích PS. Porfyriny absorbují při vyšších vlnových délkách využívaných pro excitaci pouze slabě ($\epsilon \sim 2\,000\text{ cm}^{-1}\text{dm}^3\text{mol}^{-1}$), naopak chloriny ($\epsilon \sim 40\,000\text{ cm}^{-1}\text{dm}^3\text{mol}^{-1}$) a ftalocyaniny ($\epsilon \sim 200\,000\text{ cm}^{-1}\text{dm}^3\text{mol}^{-1}$) zde absorbují velice silně.
- fotochemické a fotofyzikální parametry* – vysoký kvantový výtěžek singletového kyslíku (Φ_{Δ}) pro dobrý terapeutický účinek PDT; schopnost fluorescence pro vizualizaci nádoru; nízký „photobleaching“ (tj. rozklad PS světlem) pro zachování účinnosti po dobu celé terapie.
- chemické* – vysoká stabilita, jednotné složení, chemicky čistá látka, jednoduchá a levná příprava, rozpustnost ve vodě, aby nebylo potřeba speciálních nosičových systémů (liposomy, emulze).
- biologické* – nízká toxicita ve tmě (tj. „dark toxicity“), rychlá eliminace z organismu, selektivní vychytávání v nádorových tkáních.

Po aplikaci do organismu proniká PS do buněk buď endocytózou nebo pasivní difúzí.

V závislosti na jeho rozdělovacím koeficientu se pak kumuluje v příslušných organelách^[56]. Obecně platí, že lipofilní PS jsou častěji lokalizovány v intracelulárních organelách jako mitochondrie, Golgiho aparát a endoplazmatické retikulum, zatímco hydrofilní PS se orientují

více do lysozómů. Lokalizace PS úzce souvisí s mechanismem destrukce na buněčné úrovni (Obr. 15)^[63, 64]. Žádoucím výsledným



Obr. 15. Základní možnosti smrti buňky jako odpovědi na PDT (s dovolením autorů převzato z Agostinis, P. et al, (2011), Photodynamic therapy of cancer: An update. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 61: n/a. doi: 10.3322/caac.20114.)

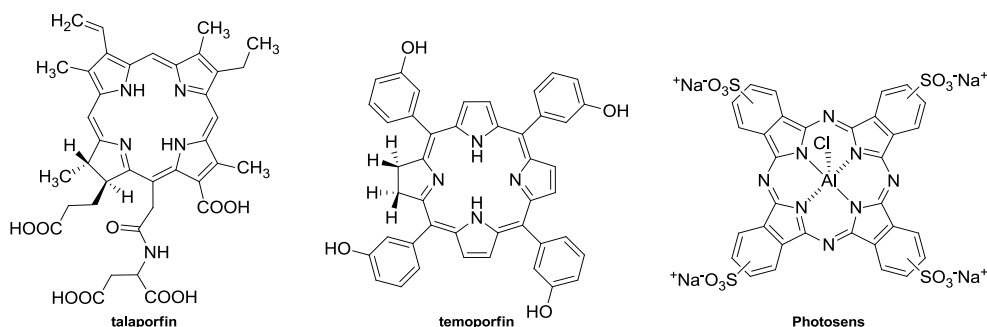
efektem při PDT je apoptóza nádorových buněk, tedy programovaná smrt buňky. Poprvé byla tato cesta ve vztahu k PDT popsána až v roce 1991^[65], kde byla nalezena spojitost mezi fragmentací DNA vyvolanou PDT a endonukleázovým štěpením, charakteristickým právě pro apoptózu. Později se tento způsob buněčné smrti po aplikaci PDT potvrdil i dalšími experimenty^[66-68]. Je-li PDT léčba příliš intenzivní, může docházet i k nekróze nádorových buněk, která je spojená s nežádoucími zánětlivými procesy^[69]. Zajímavou variantou odpovědi na PDT je autofagie, která se také může podílet na destrukci nádorové tkáně^[69-71].

Kromě terapie nádorových onemocnění nachází PDT uplatnění také v léčbě prekancerózních stavů (Barretův jícn, aktinická keratóza), v dermatologii nebo v oftalmologii k léčbě věkem podmíněné senilní makulární degenerace („age-related macular degeneration“, AMD)^[62]. AMD je nejčastější příčina slepoty starších lidí v západních civilizacích. Za zmínku stojí především to, že pro léčbu AMD, konkrétně její vlhkou formu, až donedávna neexistoval jiný způsob léčby, který by vedl k zastavení progresu nemoci. V současné době jsou pro terapii AMD používány kromě PDT i látky ovlivňující cévní růstový faktor jako například ranibizumab a pegaptanib. Další probíhající klinické testy založené na PDT se týkají např. léčby revmatoidní artritidy^[72] a prevence restenózy arterií po angioplastice^[73]. PS používané v praxi shrnuje Tab. 1 a Obr. 16:

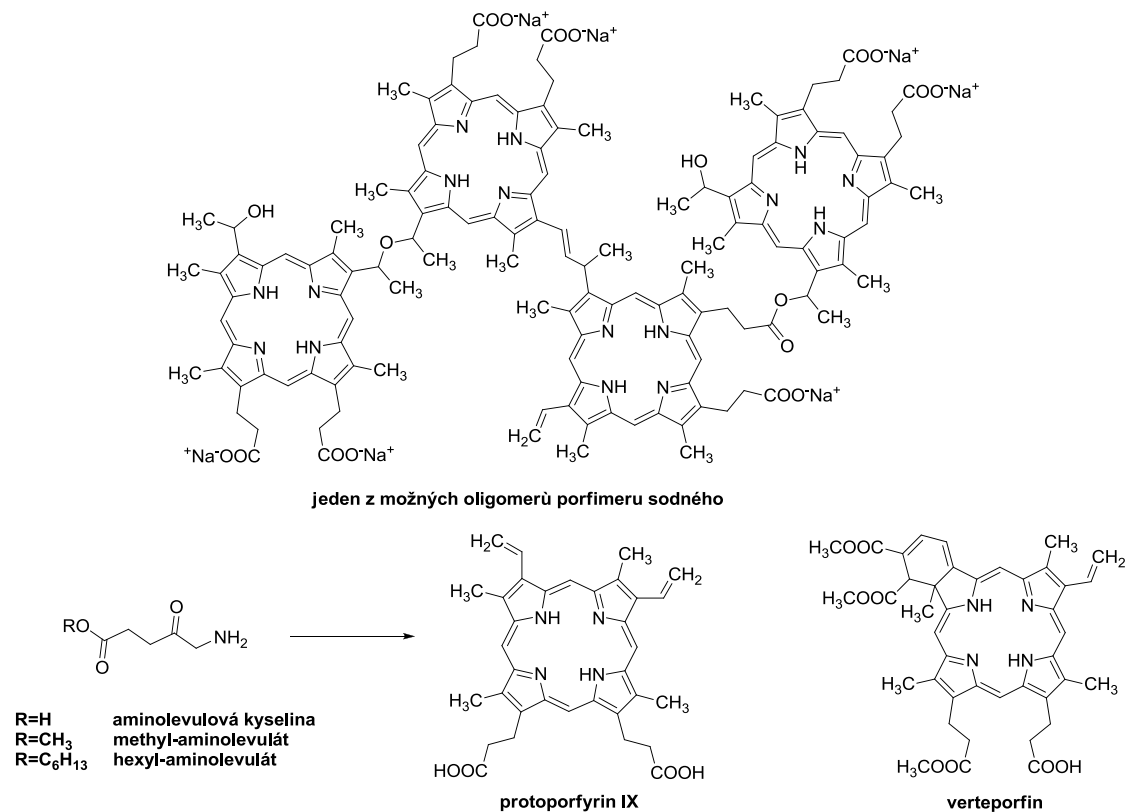
Tab. 1 Fotosenzitizéry užívané v klinické praxi^[60]

Fotosenzitizér	Chemická struktura	Q pás [nm]/ $\epsilon \times 10^3$ [cm ⁻¹ dm ³ mol ⁻¹]	Terapeutické využití
porfimer sodný (HpD)	porfyrin	633 / 3	rakovina močového měchýře, jícnu, plic, děložního čípku, žaludku
kys. aminolevulová (ALA)	porfyrin	630* / 3*	basaliom, aktinoidní keratóza, Bowenova choroba
M-ALA / H-ALA	porfyrin	630* / 3*	aktinoidní keratóza / fotodiagnóza
verteporfin	chlorin	690 / 35	senilní makulární degenerace (ADM)
temoporfin	chlorin	652 / 30	rakovina v oblasti hlavy a krku
talaporfin	chlorin	664 / 40	bronchopulmonální nádory
Photosens	ftalocyanin	675 / 200	nádory žaludku, kůže ústní dutiny

* data po biosyntéze na protoporfyrin IX; M-ALA a H-ALA jsou estery (methyl- a hexyl-) kyseliny aminolevulové



Obr. 16. Struktury klinicky používaných PS



Obr. 16. Struktury klinicky používaných PS – pokračování.

Z principu PDT lze odvodit její hlavní výhody oproti konvenčním terapeutickým metodám. Jedná se především o minimální vedlejší účinky díky vysoké selektivitě účinku, která je dána jednak nezbytností přítomnosti všech tří aktivujících složek, a jednak tím, že některé PS mají schopnost se výrazně kumulovat v nádorové tkáni^[52]. Další výhodou je fakt, že většina PS si zachovává alespoň minimální fluorescenci, kterou lze využít k vizualizaci nádorové tkáně a k jejímu následnému chirurgickému odstranění^[74]. Podstatnou výhodou je i to, že při terapii infekčních onemocnění pomocí PDT nebyl pozorován výskyt rezistence^[75]. Abychom byli objektivní, musíme zmínit i nevýhody PDT. Jednou z nich je možná jediný nežádoucí účinek, fotosenzitivita pacienta na denní světlo, která je ovšem pouze dočasná a eliminací PS z organismu se ztrácí. Hlavní limitující faktor PDT vyplývá z vysoké selektivity účinku. PDT není možné použít na metastazující nádory, neboť je velice obtížné najít všechna nádorová ložiska, která musejí být ozářena. Problematická je i léčba větších a hlubších nádorů, kdy světlo nemůže proniknout celou nádorovou tkáň a terapie se proto musí opakovat v několika cyklech. Komplikací může být i potřeba speciálního přístrojového vybavení, tedy zdroje světla a dalšího příslušenství.

3. Cíl disertační práce

Jak již bylo naznačeno výše, PDT je vedle chirurgické, radio- a chemoterapie perspektivním doplňkem pro léčbu některých nádorových onemocnění. I když z principu svého mechanismu přináší PDT výrazně vyšší selektivitu terapie s nižšími nežádoucími účinky, nebyl doposud připraven ideální fotosenzitizer mající optimální fotofyzikální, fotochemické a farmakokinetické parametry.

Azaftalocyaniny (AzaPc) díky rozsáhlému systému konjugovaných vazeb absorbují světlo v oblasti 620-680 nm s vysokými extinkčními koeficienty $2-3 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Jejich výhodou je vysoká variabilita periferní substituce, čímž lze snadno modulovat zmíněné parametry. Jejich poměrně vysoké kvantové výtěžky singletového kyslíku a fluorescence napovídají, že by se mohly stát nadějnými sloučeninami pro klinickou praxi. Z tohoto důvodu jsou v naší pracovní skupině dlouhodobě studovány jako potenciální PS^[76].

Z našich předchozích prací bylo patrné, že heteroatom spojující periferní řetězec s AzaPc makrocyklem hraje zásadní roli pro fotofyzikální a fotochemické vlastnosti AzaPc^[2]. Zmíněné vysoké hodnoty kvantových výtěžků byly pozorovány u alkylsulfanyl a alkyloxy derivátů AzaPc. Zavedení alkylamino substituentu vedlo však ke ztrátě účinku AzaPc ve smyslu PDT. Z rozboru literatury jsme došli k závěru, že by mohlo docházet ke zhášení excitovaných stavů na základě přenosu elektronu. Mým hlavním cílem bylo tedy připravit AzaPc, na kterých bude možno tento proces důkladně studovat a pomocí vhodných experimentů odhalit přesný mechanismus uvedeného jevu.

V další části své práce jsem se zaměřila na některé syntetické problémy u AzaPc. Mým cílem bylo najít postup pro přípravu vyšších homologů AzaPc, tzv. tetra[6,7]chinoxalinoporfyrinů, které by měly mít Q pás bathochromně posunutý do oblasti optimální pro PDT. Dalším cílem bylo vyvinout metodu přípravy jak symetrických tak nesymetrických aryloxy- a alkyloxy substituovaných AzaPc, které představují jistý syntetický oříšek. První symetrické aryloxy AzaPc byly publikovány teprve nedávno, nesymetrické nebyly zatím připraveny vůbec. Posledním cílem bylo najít vhodné konjugační reakce pro vazbu Pc/AzaPc na biomolekuly, které budou nádorovými buňkami přednostně vychytávány, a získat tak látky s cílenější distribucí v organizmu.

Všechny připravené sloučeniny byly studovány také z hlediska svých fotofyzikálních a fotochemických vlastností a výsledky široce diskutovány v kontextu s dříve publikovanými sloučeninami podobné struktury.

4. Výsledky a diskuse

V rámci svého doktorského studia jsem se zabývala přípravou, fotofyzikálními a fotochemickými vlastnostmi AzaPc. Stěžejní publikace, na kterých jsem uvedena jako první autor, jsou v následujícím textu pro přehlednost citovány jako [P1-P6]. Další tři práce [P7-P9], kde jsem také hlavním autorem, byly v době vzniku této disertační práce v oponentním řízení. Kromě zmíněných prací jsem spoluautorem dalších jedenácti publikací^[1, 4, 5, 24, 29, 77-82], které jsou zde citovány již běžným způsobem společně s ostatními odkazy na původní literaturu. Dále pak jsem spoluautorem jednoho přijatého patentu^[83].

Kapitola Výsledky a diskuze je rozdělena na dvě hlavní témata. První část zahrnuje komentář k publikacím zabývajícím se studiem ICT u AzaPc. Druhá část pak komentuje práce, které byly zaměřeny zejména na hledání vhodných syntetických cest pro alkyloxy/aryloxy deriváty AzaPc, různě substituované vyšší homology AzaPc a konjugáty AzaPc s biomolekulami. U připravených Pc a AzaPc jsou také vždy popsány vztahy mezi strukturou a účinkem z hlediska spektrálních, fotofyzikálních a fotochemických parametrů.

4.1. Intramolekulární přenos náboje u AzaPc

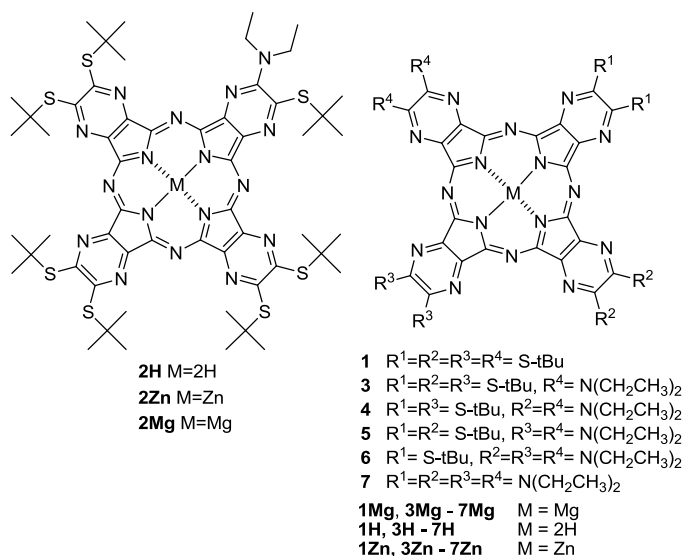
Jak bylo naznačeno v teoretickém úvodu, periferní substituce Pc a AzaPc hraje zásadní roli pro výsledné fotofyzikální (fluorescence) a fotochemické (produkce singletového kyslíku) vlastnosti těchto látek^[76]. Systematická pozorování kolegů naší pracovní skupiny vedla k závěru, že alkylamino deriváty AzaPc mají výjimečné postavení v této skupině látek, protože na rozdíl od alkylsulfanyl- a alkyloxy- derivátů vykazují prakticky nulové kvantové výtěžky jak fluorescence, tak singletového kyslíku^[2, 76]. V první fázi bylo toto zjištění velkým zklamáním, neboť alkylamino AzaPc nemohly být dále zkoumány pro využití v PDT. Záhy se však objevila zcela nová aplikace pro tyto látky jako zhášecí fluorescence v DNA sondách, která byla naší skupinou popsána a dále rozvíjena^[29, 82-84]. Jedná se o úplně nový strukturní typ zhášecí fluorescence, jejichž univerzálnost a vysoká účinnost je nadějí, že by se takovéto látky mohly dostat z výzkumné laboratoře až do praxe.

Pro lepší pochopení celého zhášecího procesu bylo potřeba odhalit, jak alkylamino AzaPc ztrácejí energii po jejich excitaci do S_1 stavu, co tento proces ovlivňuje a jaké jsou vztahy mezi strukturou a způsobem zhášení. Z literatury bylo zjištěno, že by se mohlo jednat o světlem vyvolaný přenos elektronu (PET). V naprosté většině publikovaných prací bylo Pc jádro donorem procesu PET (Pc-fulleren^[85-87], Pc-perylen^[88, 89], Pc-flavin^[90] a Pc-porfyrin^[91]). Pouze několik prací uvádělo Pc jádro jako akceptor^[92-95]. Mezi nimi Daraio a kol. navrhli, že excitované stavy Pc jsou zhášeny alifatickými a aromatickými aminy přítomnými v roztoku nebo micelách procesem PET^[96, 97]. Ve skupině AzaPc a Pc s kovalentně vázanými aminoskupinami se dosud touto problematikou nikdo systematicky nezabýval. Z počátku jsme se domnívali, že se i v případě alkylamino AzaPc jedná o PET mezi donorem (volný elektronový pár periferního dusíku) a akceptorem (makrocyclický systém AzaPc). Z tohoto důvodu jsme v první práci [P1] použili termín PET. Po

detailnějším prozkoumání přenosu elektronu u AzaPc jsme začali používat terminologicky přesnější termín - intramolekulární přenos náboje (ICT)[P2]. O procesu PET hovoříme, pokud není donorové centrum v konjugaci s akceptorem a dochází tedy k „přeskoku“ elektronu na určitou vzdálenost. U derivátů s donorovým aminem konjugovaným s akceptorovým aromatickým systémem, se jedná spíše o proces ICT (viz kapitola 2.3.).

Potvrzení procesu ICT

Na teoretickém základě popsaném v úvodu předchozího odstavce byla připravena série AzaPc **1-7** nesoucí na periférii žádnou, jednu, dvě, čtyři, šest a osm *N,N*-diethylaminových skupin (Obr. 17) [P2], u kongenerů typu A_2B_2 se dokonce podařilo odseparovat i polohové izomery ABAB (**4Zn**) a AABB (**5Zn**), což není v literatuře běžně popisované. Jednotlivé látky série pak byly zkoumány z několika hledisek. Počáteční experimenty byly založeny na jednoduchém předpokladu, že probíhá-li v molekule ICT, jsou excitované stavy účinně zhašeny a naměřené kvantové výtěžky fluorescence a singletového kyslíku by měly být nulové. Naopak při zablokování přenosu elektronu, by se kvantové výtěžky měly dostat zpět k vysokým hodnotám typickým pro tuto skupinu látek.

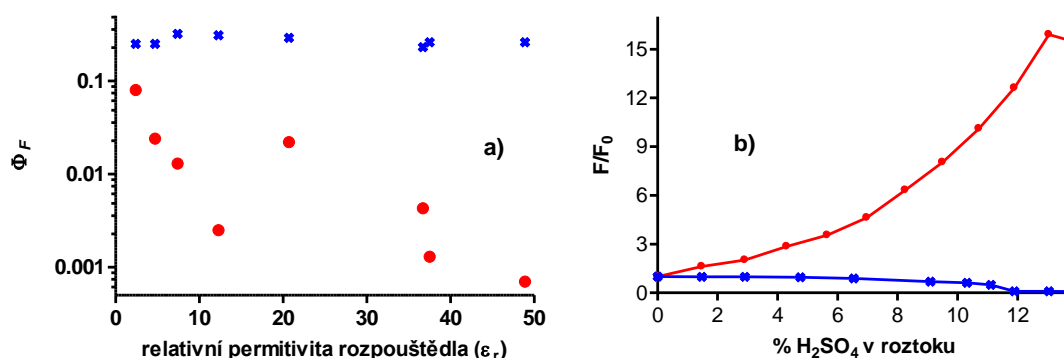


Obr. 17. Struktury AzaPc 1-7

V první řadě byla zkoumána účinnost zhašení excitovaných stavů v závislosti na počtu donorových skupin pro ICT [P2]. Bylo zjištěno, že už jedno donorové centrum pro ICT je zodpovědné za výrazný pokles kvantových výtěžků ($\Phi_{\Delta}=0,66$ a $\Phi_F=0,31$ (**1Zn**); $\Phi_{\Delta}=0,13$ a $\Phi_F=0,0025$ (**2Zn**) v pyridinu). Více donorových center (**3Zn-7Zn**) pak zajistilo hodnoty blízké nule ($\Phi_{\Delta}=0,02-0,01$; $\Phi_F < 0,0005$ v pyridinu). Z tohoto důvodu byly pro další experimenty vybrány zinečnaté komplexy AzaPc s žádným (**1Zn**), jedním (**2Zn**) a osmi (**7Zn**) donorovými centry, kde jsou rozdíly nejmarkantnější. Zinečnaté komplexy byly vybrány z důvodu optimálních kvantových výtěžků singletového kyslíku a fluorescence AzaPc **1Zn** (bez ICT), díky kterým byly jakékoliv změny vlivem zhašení ICT dobře pozorovatelné.

Účinnost přenosu elektronu je silně ovlivněna polaritou rozpouštědla, přičemž v polárním prostředí probíhá snadněji, v nepolárním naopak^[44]. Měřením kvantových výtěžků fluorescence u **2Zn** v rozpouštědlech o různé polaritě byla patrná výrazná změna fluorescence u rozpouštědel s vyšší polaritou (Obr. 18a). Na druhou stranu u kontrolního

AzaPc **1Zn** bez donorových *N,N*-diethylaminových skupin (tedy bez možnosti ICT) zůstala hodnota kvantového výtěžku neovlivněna.



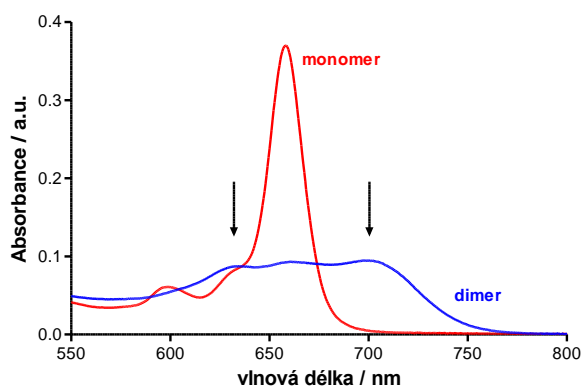
Obr. 18. a) Vliv polaritry rozpouštědla na Φ_F **2Zn** (●) (s donorem pro ICT) a **1Zn** (×) (bez ICT); b) Změna fluorescence v závislosti na procentuelním obsahu kyseliny sírové v DMSO roztoku **2Zn** (●) a **1Zn** (×) (F_0 počáteční fluorescence bez H_2SO_4 , F fluorescence při daném množství H_2SO_4).

Titrace DMSO roztoku **2Zn** kyselinou sírovou vedla k protonizaci *N,N*-diethylaminových donorových skupin pro ICT. Výsledkem byl vysoký nárůst fluorescence až na patnáctinásobek původní hodnoty díky blokování zhášecího procesu ICT zablokováním jeho donoru (volného elektronového páru na dusíku) (Obr. 18b). Kontrolní AzaPc **1Zn** si v uvedeném rozsahu koncentrací kyseliny sírové podle očekávání zachoval svoji hodnotu Φ_F beze změny.

Oba tyto nepřímé důkazy potvrdily zásadní roli volného elektronového páru na periferním dusíku a naznačily, že by se skutečně mohlo jednat o zhášení excitovaných stavů pomocí přenosu elektronu. Ve spolupráci s kolegy z Akademie věd České republiky (dr. Lang) a Jihočeské Univerzity (prof. Polívka) byla tato domněnka jednoznačně potvrzena pomocí časově rozlišených fluorescenčních experimentů (**1Zn**, **2Zn** a **7Zn**) a změřením oxido-redukčního chování **1Zn** a **7Zn**[P2].

J-dimery a ICT

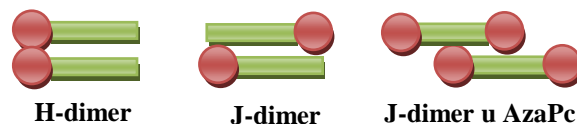
Hořečnaté a zinečnaté komplexy nesoucí více *N,N*-diethylaminových skupin (**6Mg**, **6Zn** a především **7Mg**, **7Zn**) vykazaly zajímavé agregační chování v nekoordinujících rozpouštědlech (toluen, chloroform, dichlormethan), které bylo podrobeno detailnějšímu zkoumání a ovlivnilo také proces ICT (viz dále) [P1 a P2]. V absorpčním spektru **7Zn** v toluenu se kromě značně zeslabeného Q pásu (658 nm) objevila dvě nová absorpční maxima při nižší (636 nm) a vyšší (700 nm) vlnové délce (Obr. 19).



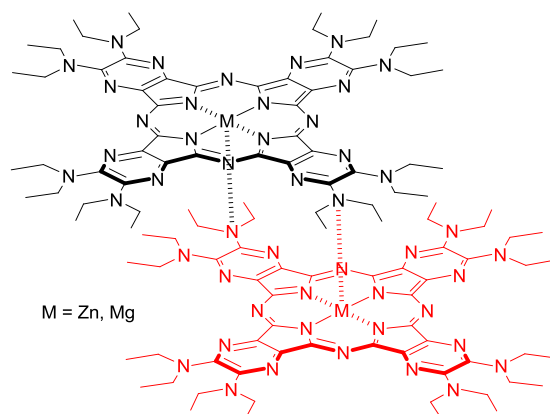
Obr. 19. Absorpční spektrum **7Zn** v pyridinu (monomer) a v toluenu (dimer)

Takovéto chování je u Pc a AzaPc obvykle přisuzováno tvorbě dimerů či vyšších agregátů. Rozlišují se dva základní typy agregátů, tzv. H- a J-dimery (Obr. 20). V případě H dimerů mají molekuly „head-to-head“ uspořádání, absorpční spektrum je posunuto hypsochromně a fluorescence je zeslabena. U J-dimerů se molekuly orientují jako „head-to tail“, absorpční spektrum je posunuto bathochromně a fluorescence bývá naopak zvýšena.

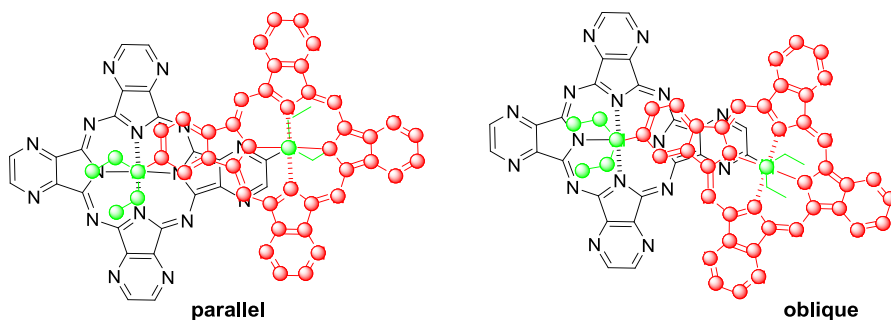
Zatímco H-dimery se vyskytují u Pc a AzaPc poměrně běžně a obvykle se rozvolní naředěním roztoku, J-dimery se tvoří velice zřídka a bývají vázány daleko pevnějšími silami. Vysoká stabilita agregátů tvořených **7Mg** a **7Zn** poukázala na skutečnost, že by v našem případě mohlo docházet k tvorbě neobvyklých J-dimerů. Supramolekulární struktura J-dimerů **7Zn** a **7Mg** založená na koordinační interakci centrálního kationtu kovu jedné molekuly s diethylaminovou skupinou jiné molekuly byla jednoznačně potvrzena pokročilými NMR experimenty (Obr. 21) [P1]. Zároveň byla odhalena přítomnost dvou izomerů označovaných jako „parallel“ a „oblique“ v poměru 2:3 (Obr. 22) [P1].



Obr. 20. Obecné znázornění H-, J-dimeru a J-dimeru u AzaPc



Obr. 21. Dimer **7Zn** a **7Mg**.



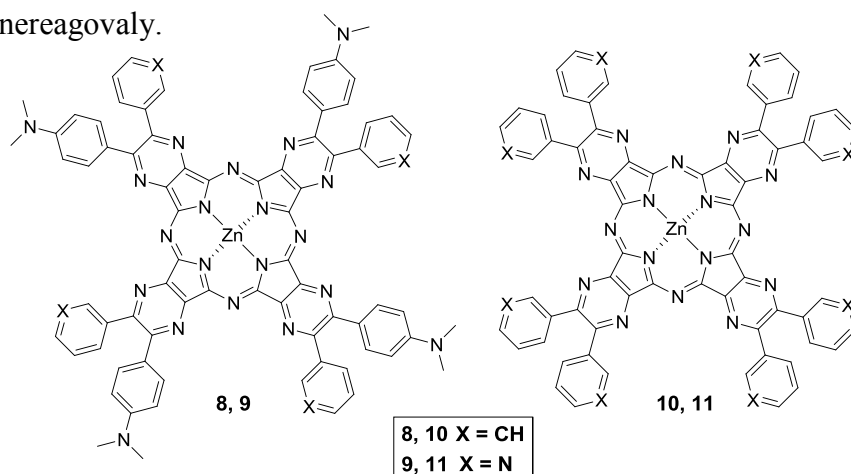
Obr 22. Prostorové uspořádání izomerů dimerů (pro větší přehlednost nejsou uvedeny ostatní *N,N*-diethylaminové skupiny neúčastnící se vazby mezi molekulami)

Díky přítomnosti osmi *N,N*-diethylaminových skupin by kvantové výtěžky singletového kyslíku i fluorescence měly být u **7Zn** a **7Mg** téměř nulové, protože by u nich mělo docházet k efektivnímu zhášení excitovaných stavů procesem ICT. Tyto látky však vykazovaly v toluenu poměrně vysoký Φ_{Δ} (0,29 (**7Zn**) a 0,10 (**7Mg**)) i částečnou fluorescenci (Φ_F 0,0071 (**7Zn**) a 0,0099 (**7Mg**)) [P1, P2]. Mohlo to být způsobeno sterickým bráněním přenosu elektronu díky tvorbě J-dimerů. Jako možné vysvětlení se však nabízela i možnost nižší účinnosti přenosu elektronu vlivem nižší polarizability

rozpouštědla (toluen ϵ_r 2.4). Tato varianta byla vyvrácena stanovením Φ_{Δ} a Φ_F v toluenu s 1% pyridinu, který zajistil plnou monomerizaci AzaPc, ale výrazně nezvýšil polaritu prostředí. Kvantové výtěžky se v tomto případě dostaly opět k nulovým hodnotám díky efektivním ICT, neboť vlivem monomerizace AzaPc nebyl stéricky bráněn přenos elektronu z donorového centra na makrocykl [P1].

Blokování ICT protonizací

Pro detailnější studium blokování ICT protonizací donorového dusíkového atomu byla navržena struktura další skupiny látek. Bazicitu *N,N*-diethylaminových skupin vázaných přímo na pyrazinové jádro je značně snížena díky přímému zapojení volného elektronového páru donorového dusíku do konjugovaného systému celého makrocyklu a dosud popsané látky **2-7** jsou pro tento účel méně vhodné ($pK_a(\text{diethylamin})=10,76$; $pK_a(5,6\text{-bis(diethylamino)-pyrazin-2,3-dikarbonitril}) = -0,75$)[‡]. Byly proto připraveny takové AzaPc (Obr. 23), kde je mezi AzaPc jádro a donorové centrum vložen linker, který by „odfiltroval“ vliv pyrazinového jádra a celého makrocyklu na bazicitu donorového centra[P3]. Pro zachování ICT bylo nezbytné zachovat konjugaci volného elektronového páru donoru s AzaPc makrocyklem, proto bylo vybráno benzenové jádro jako linker. Zároveň byly připraveny dva AzaPc podobné struktury bez donorového centra (**10** a **11**) sloužící jako kontroly bez ICT. Postupná protonizace periferních dusíků **8** a **9** (titrace DMF roztoků kyselinou sírovou) byla sledována pomocí změn v absorpčních spektrech (pokles Q pásu 654 a 660 nm a nárůst absorpce v 682 a 684 nm). Zároveň byly během této titrace měřeny kvantové výtěžky fluorescence a singletového kyslíku AzaPc **8-11** (Tab. 2). V DMF bez přidání kyseliny sírové byly hodnoty Φ_{Δ} a Φ_F látek **8** a **9** menší než 0,005 díky zhášení excitovaných stavů vlivem ICT. Změnou pH do kyselé oblasti došlo k jejich nárůstu až o dva řády (viz Tab. 2) a vyrovnaly se tak hodnotám kontrol **10** a **11**, které na pH prostředí nereagovaly.



Obr. 23. Struktury AzaPc **8-11**.

Tab. 2. Fotofyzikální a fotochemická data AzaPc **8-11**.

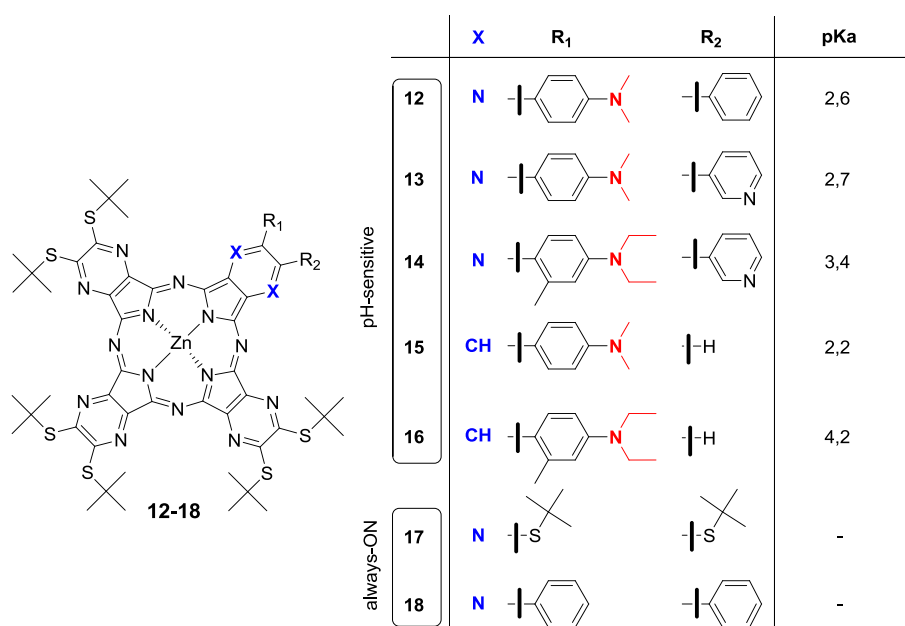
AzaPc	Φ_{Δ} (DMF)	Φ_{Δ} (DMF+ 10 % H ₂ SO ₄)	nárůst Φ_{Δ}	Φ_{Δ} (pyridin)	Φ_F (DMF)	Φ_F (DMF+ 10 % H ₂ SO ₄)	Nárůst Φ_F	Φ_F (pyridin)
8	0,0024	0,23	96	0,0030	0,00095	0,13	137	n.d.
9	0,0016	0,14	88	0,0048	0,0014	0,14	100	n.d.
10	-	-	-	0,49	0,12	0,12	1,0	0,24
11	0,47	0,77	1,6	0,51	0,11	0,12	1,1	0,19

[‡] hodnoty vypočteny v ACD/Labs Software V11.02, © 1994-2011 ACD/Labs

pH senzitivní PS a senzory

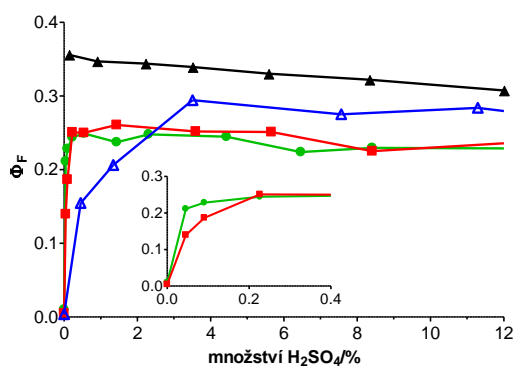
Z výsledků publikovaných prací P1-P3 tedy vyplynulo, že alkylamino deriváty AzaPc po excitaci z S_0 do S_1 stavu podléhají přechodu na tzv. „charge separate state“, ze kterého relaxují zpět do S_0 stavu přenosem elektronu z dusíku (donor) na AzaPc makrocyklus (akceptor). Celý proces ICT je velice rychlý (řádově pikosekundy), takže konkurenční děje (emise fotonu, mezisystémový přechod, apod.), nejsou preferovány pro návrat do základního stavu [P2]. Jak bylo ukázáno, ICT lze zablokovat sterickým bráněním přenosu elektronu [P1] nebo protonizací donorového centra [P2, P3], kdy se kvantové výtěžky Φ_{Δ} a Φ_F vyrovnají strukturně podobným látkám bez možnosti ICT. Účinnost zhášení excitovaných stavů AzaPc je při ICT vysoká natolik, že už jedno donorové centrum v molekule zajistí pokles Φ_{Δ} a Φ_F v polárních rozpouštědlech prakticky k nulovým hodnotám [P2].

Na získaných poznatech byla navržena nová skupina AzaPc emitujících v červené oblasti spektra s fotofyzikálními a fotochemickými vlastnostmi kontrolovanými pH prostředím (Obr. 24) [P7]. Odhalením vztahů struktura-účinek a pochopením celého procesu ICT jsme tak došli k úplně nové další aplikaci AzaPc derivátů. Takovéto látky totiž mohou najít uplatnění v oblasti senzorů a zobrazovacích technik, především při vizualizaci tumorů^[98] nebo k vyšší selektivitě nádorové terapie pomocí PDT. V nedávné době byla publikována práce^[99], kde byla testována možnost zvýšení selektivity PDT pomocí pH senzitivity. Tato teorie je založena na předpokladu, že pH v nádorové tkáni je posunuto lehce do kyselejší oblasti (6,8) oproti pH zdravé tkáně (7,4). Podobně jiní autoři využili vlivu nízkého pH v lysosómech na donorové centrum modifikovaných barviv BODIPY (z anglického „boron-dipyrromethene“) pro vizualizaci živých nádorových buněk *in vivo* a jejich odlišení od buněk mrtvých^[100].

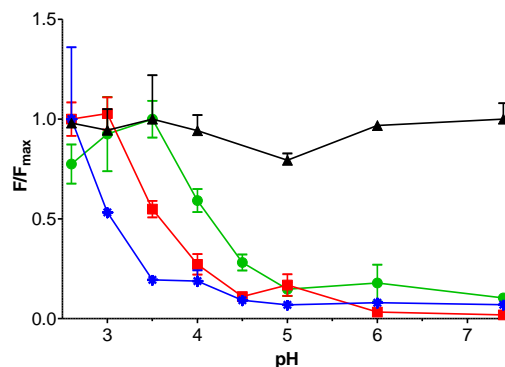


Obr. 24. Struktury pH senzitivních AzaPc (**12-16**) a kontrol bez možnosti ICT (**17-18**). Hodnoty pK_a stanoveny inkorporací **12-18** do liposomů a sledováním intenzity fluorescence v prostředí o různém pH.

V práci P7 bylo připraveno pět nesymetrických AzaPc nesoucích jedno donorové dusíkaté centrum o různé bazicitě. Rozdílné bazicity bylo dosaženo jednak různou substitucí na dusíku (dimethyl vs. diethyl) a jednak náhradou pyrazinového cyklu v AzaPc za benzenový kruh. Zbylé periferní substituenty, konkrétně *tert*-butylsulfanylové skupiny, díky své objemnosti zajišťovaly plnou monomerziaci ve všech zkoušených organických rozpouštědlech. Síra jako spojovací heteroatom a zinečnatý kation chelatovaný v centru molekuly zajistily vysoké hodnoty Φ_{Δ} a Φ_F po aktivaci molekuly v kyselém pH. Kromě pH sensitivních AzaPc byly připraveny i dvě látky obdobné struktury bez periferních dusíkových atomů sloužící jako kontroly bez možnosti zhášení excitovaných stavů vlivem ICT. Acidobazická citlivost látek **12-18** byla nejprve otestována v organických rozpouštědlech (titrace DMF roztoků kyselinou sírovou), kdy byl pozorován nárůst fluorescence i produkce singletového kyslíku až o dva řády (Obr. 25) [P7] podobně jako v předchozí práci [P3]. Pro ověření účinnosti pH sensitivity v biologicky relevantním prostředí a stanovení příslušných pK_a byly AzaPc **12-18** inkorporovány do liposomů, které jsou považovány za jednoduchý model biologické membrány^[101] a byl pozorován vliv pH v rozmezí 2,6-7,4 na intenzitu fluorescence. Podle předpokladu, látky **12-16** reagovaly na nižší pH výrazným zvýšením intenzity fluorescence. Hodnoty pK_a látek **12-16**, které byly zjištěny ze závislosti intenzity fluorescence na pH za pomoci Henderson-Haselbalchovy rovnice se pohybovaly v rozmezí 2,2-4,2, kontrolní látky **17** a **18** na změnu pH nereagovaly (Obr. 26). Těmito experimenty bylo potvrzeno, že takovéto AzaPc by bylo možné využít jako pH sensitivní senzory nebo fotosenzitizéry v oblastech, kde je selektivita při nižším pH upřednostňována (např. v lysosómech)^[100]. Velkou výhodou AzaPc pak je jejich silná emise v červené oblasti spektra ($\lambda_{em} = 660-680$ nm), což je činí velice perspektivním pro použití v *in vivo* aplikacích, kde je světlo delších vlnových délek přednostní díky nižšímu rozptylu a nižšímu pohlcování endogenními chromofory.



Obr. 25 Závislost Φ_F **12** (Δ), **14** (\blacksquare), **16** (\bullet) a **17** (\blacktriangle) v DMF na přidávek H₂SO₄. Inset: zvětšená oblast grafu.



Obr. 26. Změna intenzity fluorescence **14** (\blacksquare), **15** (*), **16** (\bullet) a **18** (\blacktriangle) v DOPC v pufrách o různých pH.

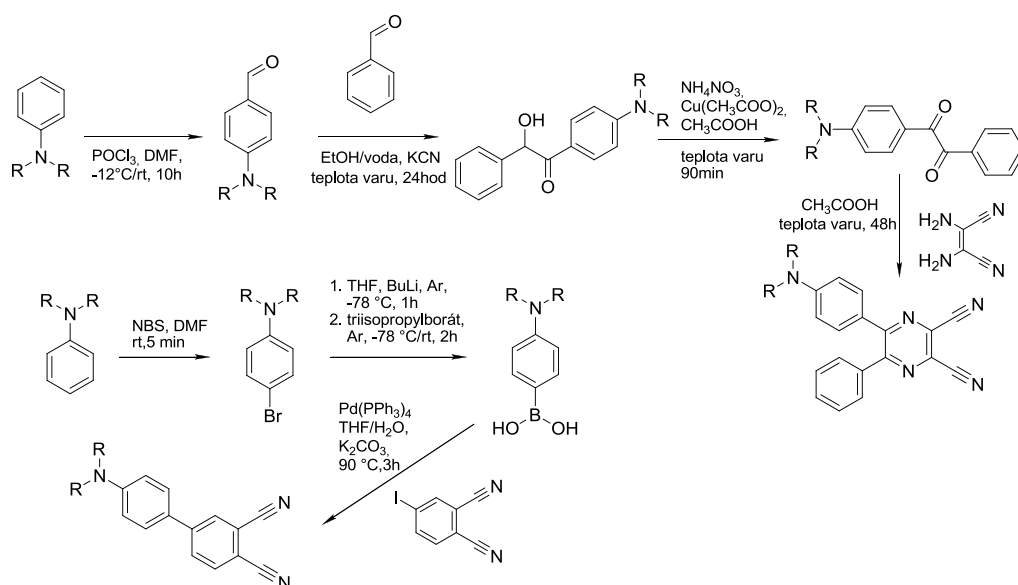
Vysoká variabilita periferních substituentů u AzaPc spolu s neobvykle vysokou účinností zhášení excitovaných stavů díky ICT je velkou nadějí do budoucna. Z poznatků, které jsme doposud nashromáždili, je patrné, že vhodným navržením cílové molekuly AzaPc je možné kontrolovat jejich fotofyzikální a fotochemické vlastnosti a žádoucím směrem tak měnit finální vlastnosti AzaPc vzhledem k požadavkům kladeným v různých aplikacích.

4.2. Syntetické problémy u AzaPc

V této kapitole bych se nejprve ráda zmínila obecněji o jednotlivých syntetických postupech použitých pro přípravu AzaPc a Pc. Samostatné kapitoly pak budou věnovány přípravě aryloxy/alkyloxy substituovaným AzaPc, přípravě rozšířených homologů AzaPc a přípravě konjugátů AzaPc pomocí „click“ chemie.

Příprava AzaPc a Pc

Jako výchozí látky pro cyklizace byly nejčastěji použity příslušně 5,6-disubstituované pyrazin-2,3-dikarbonitrily připravené buď nukleofilní substitucí z 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu [P1, P2, P5, P6, P7] nebo kondenzací diaminomaleonitrilu s příslušným diketonem [P3, P5, P7] za použití reakcí zmíněných již v Teoretické části (Obr. 2 nahoře). Diketony byly získány několika krokovou syntézou začínající obvykle Vilsmeier-Haackovou formylační reakcí, následovanou benzoinovou kondenzací aromatických aldehydů a oxidací acyloinu na příslušný diketon pomocí mědnatých kationtů [P3, P7] (Obr. 27) V jedné z prací bylo potřeba připravit i prekurzory odvozené od ftalonitrilu [P7]. Tyto látky byly získány pomocí Suzukiho couplingu, kterému předcházela bromace substituovaného anilinu, a dále pak příprava boronové kyseliny (Obr. 27).



Obr. 27. Postupy používané pro přípravu prekurzorů (R je ethyl nebo methyl)

Pro podrobnější studium vlastností u AzaPc bylo potřeba kromě v literatuře častějších symetrických cyklotetramerizací vycházejících pouze z jednoho prekurzor [P1, P3, P4, P5] použít i syntézy vedoucí k nesymetrickým AzaPc [P2, P6, P7, P9]. Bylo zjištěno, že metoda vyvinutá Linsteadem ve 40. letech 20. století využívající alkoholátu kovu jako iniciátoru reakce (v našem případě butanolátu hořečnatého) je pro nesymetrické syntézy

výhodnější než metoda templátového efektu kovu [P2]. Dalším důležitým poznatkem byl fakt, že hořečnaté komplexy kongenerů vzniklých při nesymetrické cyklizaci vykazovaly často téměř identické R_f hodnoty ve všech zkoušených mobilních fázích, jejichž důsledkem byla nemožnost oddělení jednotlivých hořečnatých kongenerů pomocí sloupcové chromatografie [P2, P7]. Z tohoto důvodu se ukázalo výhodné nejprve odstranit slabě vázaný centrální hořečnatý kation z centra všech kongenerů působením kyseliny (*p*-toluensulfonové nebo trifluoroctové) a až poté pomocí sloupcové chromatografie oddělit požadovaný bezkovový nesymetrický kongener. V posledním kroku pak byl do centra makrocyclu chelátován zinečnatý kation zahříváním bezkovového AzaPc ve vhodném rozpouštědle (DMF, pyridin, CHCl_3) s bezvodým octanem zinečnatým. Zinečnaté komplexy Pc/AzaPc byly vybrány z důvodu výhodných fotofyzikálních a fotochemických parametrů díky tzv. efektu těžkého atomu (viz kapitola 2.2).

Aryloxy- a alkyloxy substituované AzaPc

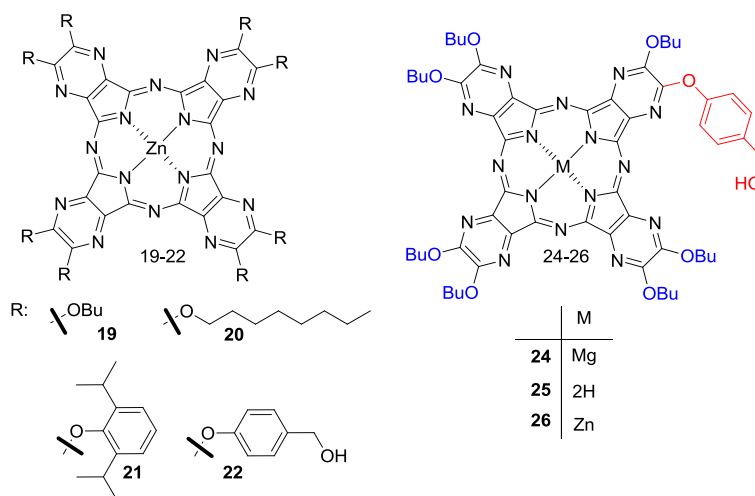
Aryloxy a alkyloxy substituované Pc^[102-104] se v literatuře vyskytují poměrně často, na rozdíl od stejně substituovaných AzaPc. Důvodem je nestabilita etherové vazby na pyrazinovém jádře za podmínek cyklotramerizace dle Linsteadova. Uhlíky 5 a 6 pyrazinového cyklu prekursoru jsou silně elektron deficitní a jsou napadány alkoholátovým aniontem použitým jako iniciátorem reakce. Výsledkem je nežádoucí transesterifikační reakce a vznik AzaPc s periferními substituenty odpovídajícími alkoholátu použitého na cyklotetramerizaci. Tento problém lze řešit shodou alkoholátu a periferního řetězce. Aryloxy AzaPc takto připravit nelze. Teprve nedávno bylo publikováno několik prací popisujících úspěšnou přípravu aryloxy a alkyloxy substituovaných AzaPc zahříváním pyrazin-2,3-dikarbonitrilů se solí kovu v chinolinu pod inertní atmosférou^[3, 105-107] nebo cyklotetramerizací v tavenině s chloridem bis(chinolináto)zinečnatým^[108]. Obě tyto metody jsou založeny na templátovém efektu kovu.

Cyklotetramerizace v tavenině s chloridem bis(chinolináto)zinečnatým komplexem byla úspěšně použita na přípravu série symetrických AzaPc zahrnující jak alkyloxy, tak aryloxy substituované deriváty ve výtěžcích 14-44 % (**19-22**) (Obr. 28) [P4]. Jedna z připravených látek (**22**) nesla na periferii volnou funkční skupinu (konkrétně hydroxylovou). Zavádění funkčních skupin je důležité z hlediska možné další vazby AzaPc na biomolekuly k zajištění např. cílenější distribuce v organismu či zlepšení rozpustnosti v biologickém prostředí. Pro tento účel je však výhodné, aby byla na periferii AzaPc pouze jedna nebo dvě takovéto skupiny, čímž omezíme možné polymerizační reakce.

Z tohoto důvodu byly stejné podmínky nalezené v předchozím případě pro **19-22** aplikovány na reakci dvou různých prekursorů s cílem připravit nesymetrický aryloxy AzaPc nesoucí pouze dvě funkční skupiny na periferii [P8]. Vznikly však pouze symetrické AzaPc **21** a **22**, což mohlo být způsobeno tím, že reakce probíhala v tavenině a ne v roztoku, kde dojde k lepšímu promísení reaktantů. Byla proto vyzkoušena cyklizace v chinolinu pod inertní atmosférou s octanem zinečnatým. V tomto případě hmotnostní

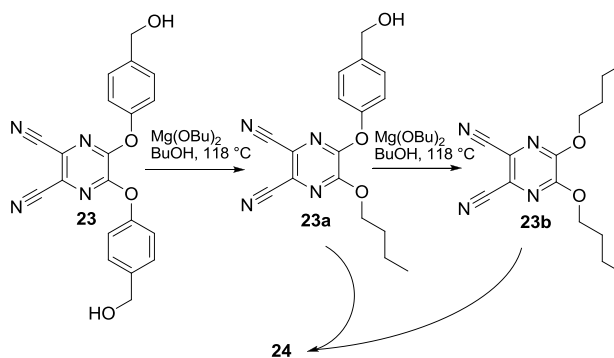
spektrometrie a TLC analýza ukázaly vznik požadovaného nesymetrického kongeneru typu AAAB, výtěžky však nebyly dostatečné pro použití tohoto postupu ve větším měřítku [P8].

Koncept zavedení jedné funkční skupiny do molekuly alkyloxy/aryloxy AzaPc byl proto změněn a byla vytvořena úplně nová teorie pro přípravu nesymetrických alkyloxy/aryloxy AzaPc, která doposud v chemii Pc a AzaPc nemá obdoby. Bylo zde využito transesterifikační reakce, původně považované za nežádoucí jev u AzaPc. Metoda je založena na předpokladu, že u libovolného alkyloxy nebo aryloxy substituovaného pyrazin-2,3-dikarbonitrilu dojde v prostředí butanolátu hořečnatého k postupné výměně periferních substituentů za butoxy skupinu/y a zároveň k zacyklení molekuly za vzniku nesymetrického AzaPc.



Obr. 28. Struktury připravených symetrických (19-22) a nesymetrických (24-25) aryloxy/alkyloxy AzaPc.

Tato teorie byla detailně studována s využitím prekurzoru **23** (Obr. 29). Očekávali jsme, že dojde k postupné výměně 4-(hydroxymethyl)fenoxylových skupiny za butoxy skupiny a k současné cykлизaci za vzniku příslušných nesymetrických kongenerů. Hmotnostní spektrometrie reakční směsi ukázala na přítomnost symetrického AzaPc **19** nesoucího osm butoxy skupin, ale zároveň i signifikantní podíl nesymetrických AzaPc majících jednu 4-(hydroxymethyl)fenoxylou a sedm butoxy skupin (**24**), společně s AzaPc nesoucím 2×4-(hydroxymethyl)fenoxylou a 6×butoxy skupinu. Následná kinetická studie podpořila naznačený možný průběh mechanismu. Transesterifikační reakce probíhá pravděpodobně velice rychle už na prekurzoru **23** dávající vznik látkám **23a** a **23b** (Obr. 29). Tyto dvě látky následně podléhají statistické



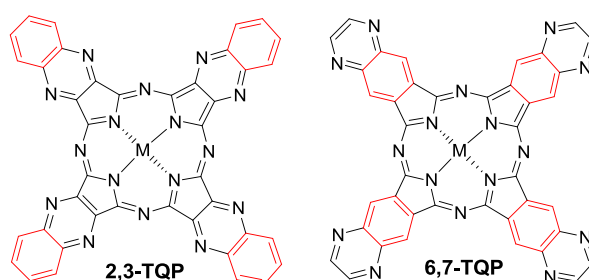
Obr. 29. Navržený mechanismus vzniku nesymetrického AzaPc **24**.

kondenzaci za vzniku symetrické **19** (ve výtěžku 25 %) a nesymetrické **24** (ve výtěžku 10 %) [P8]. Jedná se o první úspěšně připravený nesymetrický AzaPc nesoucí alkyloxy/aryloxy substituenty na periférii makrocyklu. Z nesymetrického AzaPc **24** byly následně připraveny bezkovový derivát **25** a zinečnatý komplex **26**.

Všechny symetrické i nesymetrické AzaPc (**19-22** a **24-26**) byly studovány z hlediska fotofyzikálních a fotochemických parametrů. Všechny tyto AzaPc absorbují silně v oblasti 620 až 640 nm, ($\epsilon \sim 1,5-2,2 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Kvantové výtěžky singletového kyslíku (zinečnaté komplexy $\sim 0,44-0,61$; hořečnaté komplexy $\sim 0,26$) a fluorescence (zinečnaté komplexy $\sim 0,30-0,51$; hořečnaté komplexy $\sim 0,65-0,90$) ukazují na širokou možnost uplatnění takovýchto látek v různých oblastech [P4, P8].

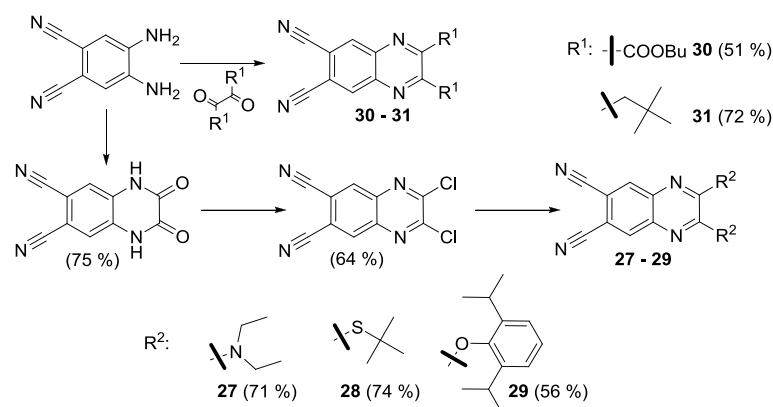
Homology s rozšířeným systémem konjugovaných vazeb

Světlo vyšších vlnových délek je méně pohlcováno endogenními chromofory a lépe tedy proniká tkáněmi, zároveň podléhá v menší míře rozptylu světla. Z těchto důvodů je pro PDT žádoucí posunout vlnovou délku, při které fotosenzitizér absorbuje k červené části spektra (až k 800 nm) (viz kapitola 2.4.). Nejlepší možností jak toho dosáhnout je rozšíření konjugovaného systému vazeb přikondenzováním dalších benzenových jader (viz kapitola 2.1.). Anelací benzenových jader na periferii získáme tetra[2,3]chinoxalinoporfyraziny (2,3-TQP), vložení mezi pyrazinové cykly a základní porfyrazinový skelet pak tetra[6,7]chinoxalinoporfyraziny (6,7-TQP) (Obr. 30). 6,7-TQP se vyznačují posunem asi o 40 nm k vyšším vlnovým délkám oproti izomerním 2,3-TQP, které byly popsány v několika pracích^[13, 30, 31]. Na druhou stranu 6,7-TQP, které se zdají být ze spektrálních hledisek výhodnější, byly donedávna publikovány pouze dvakrát^[32, 33], a proto se staly předmětem našeho zájmu. Naším cílem bylo připravit sérii 6,7-TQP s periferními substituenty vázanými na makrocykl přes heteroatom (O, S, N) nebo C-C vazbou a sledovat vliv těchto substituentů na absorpční, fotofyzikální a fotochemické parametry v této skupině látek. Zároveň jsme chtěli porovnat tyto vlastnosti s AzaPc, tedy nižšími homology, nesoucími shodné substituenty. Takovéto systematické sledování vlastností 6,7-TQP nebylo do té doby publikováno.



Obr. 30. Obecná struktura 2,3-TQP a 6,7-TQP (M je centrální kation kovu)

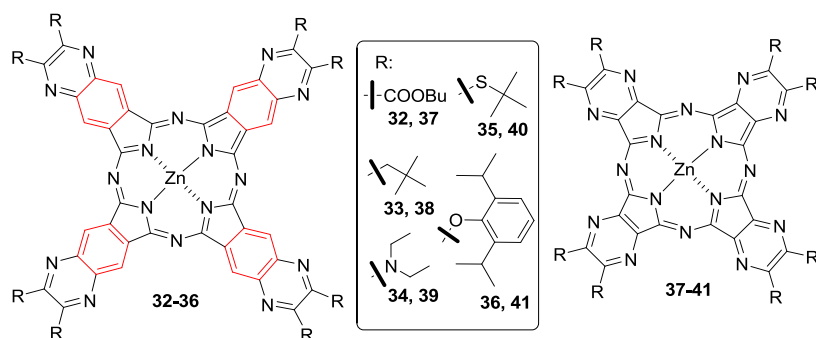
Důvodem pro malý počet prací na toto téma byla problematická syntéza 4,5-diaminoftalonitrilu, klíčového meziprojektu pro přípravu prekurzorů 6,7-TQP. Tento problém byl nedávno vyřešen a 4,5-diaminoftalonitril byl použit na přípravu 2,3-dichlorchinoxalinu-5,6-dikarbonitrilu^[33]. Tato látka má obdobné vlastnosti jako 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril a nukleofilní substitucí poskytla prekurzory **27-29** [P5]. Obdobně jako při přípravě pyrazinových prekurzorů, kondenzací 4,5-diaminoftalonitrilu s příslušnou vicinální dikarboxylovou sloučeninou byly připraveny prekurzory **30-31** (Obr. 31).



Obr. 31. Schéma přípravy prekurzorů pro 6,7-TQP

Z prekurzorů **27-31** byly cyklotetramerizací připraveny finální 6,7-TQP (**32-36**) (Obr. 32). Aby bylo možno porovnat vlastnosti 6,7-TQP, byly do série zahrnuty i AzaPc s odpovídající substitucí (**37-41**). Ze syntetického hlediska se i v tomto případě jako nejvýhodnější ukázala Linsteadova metoda s alkoholátem hořečnatým jako iniciátorem reakce, odstranění hořečnatého kationtu v kyselém prostředí a chelatace centrálního zinečnatého kationtu v posledním kroku (výtěžky kolem 20 %, počítáno na prekurzor). Tato metoda nemohla být použita pro přípravu **36** a **41** vzhledem k nežádoucí transesterifikační reakci (viz výše). Tyto látky byly připraveny ve výtěžku 23% (**36**) a 60% (**41**) cyklotetramerizací v tavenině s chloridem bis(chinolináto)zinečnatým.

Porovnáním fotochemických a fotofyzikálních vlastností látek **32-41** bylo zjištěno (Tab. 3), že rozšířením konjugovaného systému vazeb bylo docíleno silného batho- (přibližně o 100 nm) a hyperchromního (hodnoty ϵ 1,3 až 2× vyšší) posunu oproti odpovídajícím AzaPc. Pozitivní vliv byl patrný na produkci singletového kyslíku (Φ_{Δ} 0,50-0,74 oproti AzaPc 0,020-0,65), což bylo na úkor nižší emise fotonů ($\Phi_F < 0,08$). Jako zajímavý se ukázal fakt, že 6,7-TQP **34** nesoucí *N,N*-diethylaminové skupiny na periférii vykázal kvantové výtěžky singletového kyslíku (Φ_{Δ} 0,63) i fluorescence (Φ_F 0,032) srovnatelné s ostatními látkami v sérii, na rozdíl od AzaPc **39** (Φ_{Δ} 0,020, fluorescence nedetekována vůbec), kde jsou excitované stavy účinně zhašeny vlivem ICT. Pravděpodobným vysvětlením může být rozdílné uspořádání energetických hladin 6,7-TQP oproti AzaPc, kdy v případě 6,7-TQP není tvorba „charge separate state“ termodynamicky výhodným dějem.



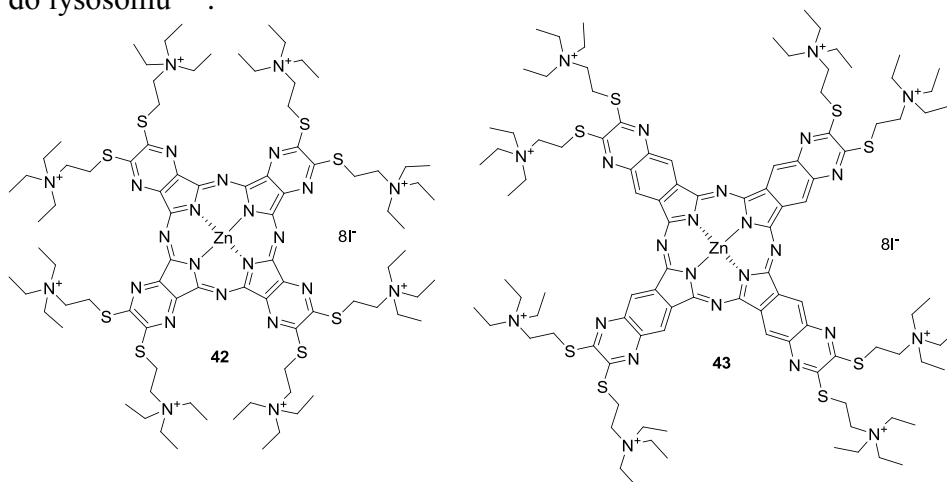
Obr. 32. Struktura připravených 6,7-TQP (**32 - 36**) a odpovídajících AzaPc (**37 - 41**)

Tab. 3 Fotofyzikální, fotochemické a spektroskopické parametry látek **32-41** změřené v pyridinu [P5]

Substituence	Látka	$\lambda_{\max} / \text{nm}$ ($\epsilon / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	$\Delta\lambda / \text{nm}$	Φ_{Δ}	Φ_F (λ_F / nm)
C (COOBu)	32	770 (247 000)	112	0,50	0,015 (780)
	37	658 (158 400)		0,52 ^a	0,11 (672) ^a
C (neopentyl)	33	750 (174 000)	108	0,64	0,039 (755)
	38	642 (227 400)		0,56	0,24 (648)
N	34	754 (223 600)	90	0,63	0,032
	39	664 (183 100)		0,020 ^b	n.d. ^{b,c}
S	35	754 (510 000)	97	0,74	0,042 (759)
	40	657 (298 000)		0,65 ^b	0,30 (663) ^b
O	36	730 (411 000)	102	0,69	0,075 (735)
	41	628 (200 200)		0,61	0,29 (637)

^a data publikována už dříve^[109]; ^b data publikována už dříve[P1]; ^c nedetekovatelné

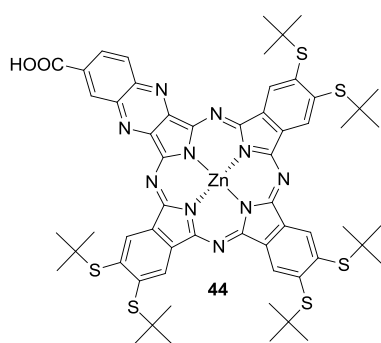
Silná absorpce 6,7-TQP v oblasti 730-770 nm se stala společně s vysokou produkcí singletového kyslíku slibným začátkem pro vývoj fotosenzitizérů založených na jejich struktuře. Práce na těchto látkách pokračovala v naší laboratoři dále. Byly připraveny ve vodě rozpustné AzaPc (**42**) a odpovídající 6,7-TQP (**43**) (Obr. 33) ^[79]. Testy na *in vitro* fotodynamickou aktivitu na rakovinných buňkách hrtanu (Hep2) ukázaly vysokou aktivitu ($\text{IC}_{50} = 104 \text{ nM}$ (**42**) a 220 nM (**43**)) s nízkou toxicitou ve tmě ($\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{M}$)^[79]. Zároveň byly provedeny testy na subcelulární lokalizaci, které odhalily, že se tyto látky přednostně orientují do lysosomů^[79].



Obr. 33. AzaPc a 6,7-TQP testované na *in vitro* fotodynamickou aktivitu na Hep2 buňkách.

Konjugační reakce AzaPc s biomolekulami

Vazba fotosenzitizéru na vhodný nosič může zajistit lepší farmakokinetické parametry (např. cílenější distribuci v organismu vazbou na monoklonální protilátky, oligonukleotidy,



Obr. 34. Pc s optimálními
fotofyz. a fotochem. vlastnostmi

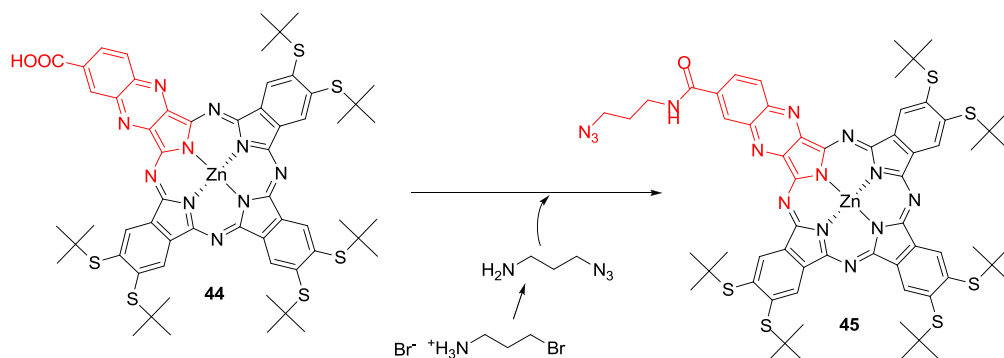
steroidy) nebo fyzikálně-chemické parametry (např. lepší rozpustnost v biologickém prostředí vazbou na sacharidy). Takovéto konjugáty jsou označovány jako fotosenzitizéry třetí generace. Pro tento účel byl připraven nesymetrický Pc (**44**)^[78] (Obr. 34) nesoucí jednu modifikovatelnou funkční skupinu (karboxylovou) pro vazbu na biomolekuly. *tert*-Butylsulfanylové substituenty a zinečnatý kation v centru zajistily optimální fotofyzikální a fotochemické parametry tohoto derivátu ($\Phi_{\Delta}=0,80$ a $\Phi_{F}=0,06$). Díky Pc jádru rozšířeného navíc vložením jednoho pyrazinového jádra se absorpce v Q pásu posunula až k 726 nm^[78].

Příprava stavebních jednotek pro „click“ reakce

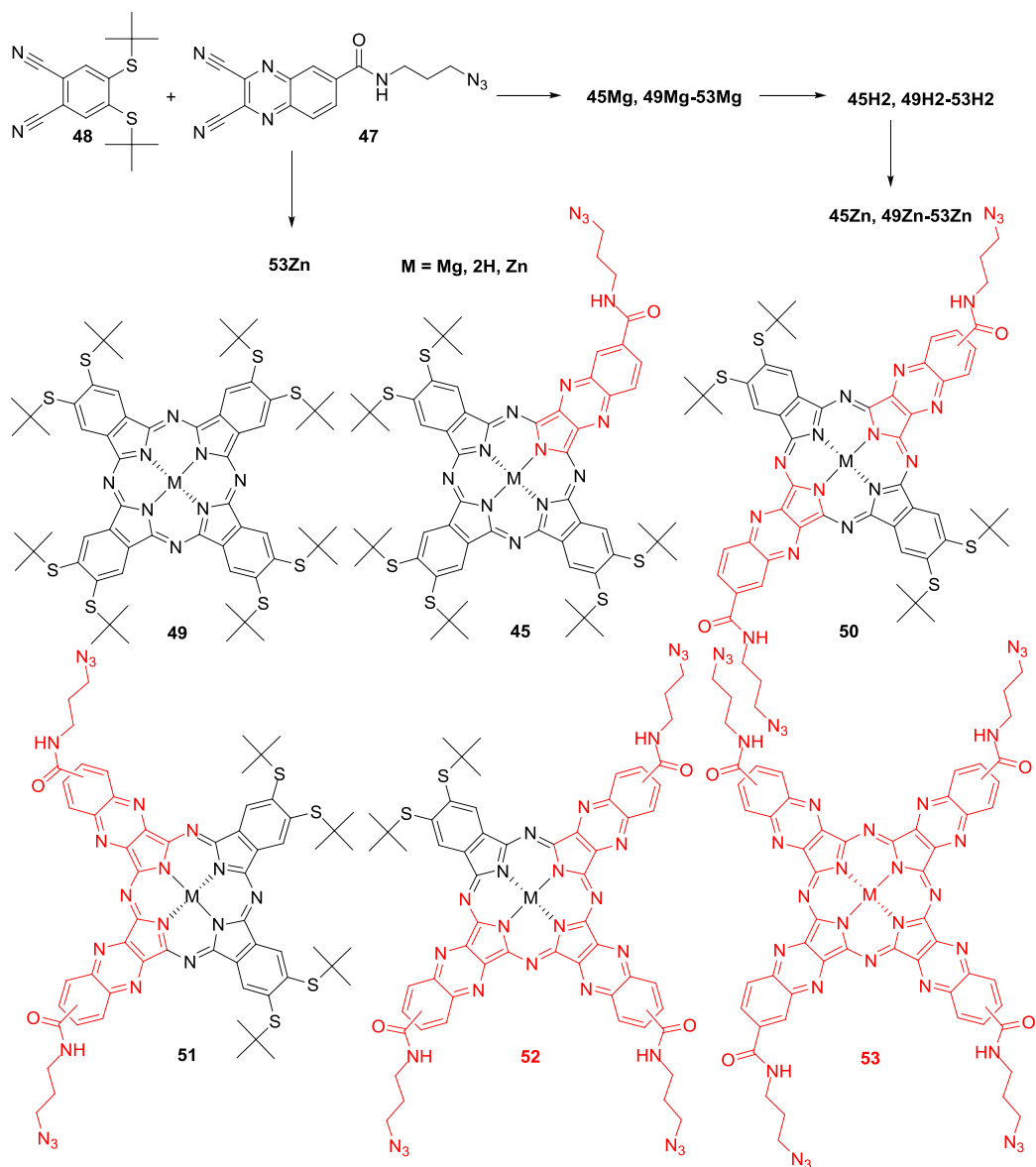
Uvedený Pc **44** sloužil jako výchozí látka pro přípravu derivátu vhodného pro konjugaci s mestranolem. Takovýto konjugát by mohl být selektivněji vychytáván v estrogen-dependentních nádorových tkáních tato látka by se tak mohla stát fotosenzitizérem třetí generace [P6]. Pc **44** byl v prvním kroku modifikován tak, aby mohl být použit pro 1,3-azid alkyn cykloadiční reakce podle Huisgena, někdy nazývané jako „click“ chemie (Obr. 35). Izolace nesymetrické **44** pomocí sloupcové chromatografie je díky volné karboxylové skupině problematická vzhledem k silné vazbě na silikagel a výtěžek **44** je pouze 11 % (počítáno na prekurzory)^[78]. I když následná amidace na Pc **45** probíhá kvantitativně, ukázalo se z hlediska výtěžnosti Pc **45** výhodnější zavedení azidové skupiny už na prekurzor 2,3-dikyanochinoxalin-6-karboxylovou kyselinu (**46**) za vzniku *N*-(3-azidopropyl)-2,3-dikyanochinoxalin-6-karboxamid (**47**). Jeho následná statistická kondenzace s 4,5-bis(*tert*-butylsulfanyl)ftalonitrem (**48**) poskytla směs kongenerů **49Mg**, **45Mg**, **50Mg-53Mg**, ze kterých byly pomocí sloupcové chromatografie odseparovány symetrický Pc **49Mg**, kongener typu AAAB **45Mg** a dále pak směs izomerů **51Mg** (ABAB) dohromady s **52Mg** (AABB). (Obr. 36). Další kongenery (**52Mg-53Mg**) nesoucí tři a čtyři azidové skupiny se bohužel nepodařilo tímto postupem získat, neboť se silně vázaly na silikagel. Z Pc **45Mg** a směsi **50Mg+51Mg** byly poté připraveny bezkovové deriváty (**45H2**, **50H2+51H2**) a z nich následně příslušné zinečnaté komplexy. Polohové isomery **50Zn** a **51Zn** byly od sebe rozděleny až jako zinečnaté komplexy a získány v celkovém výtěžku 2 % (**50Zn**) a 5 % (**51Zn**) (počítáno na prekurzory). Výtěžek **45Zn** získaný tímto postupem byl 26 % [P9].

Symetrický Pc **53Zn** byl připraven ve výtěžku 26 % přímou cyklotetramerizací prekurzoru **47** s využitím templátového efektu kovu. V sérii tedy chybí pouze Pc **52Zn**

nesoucí tři azidové skupiny, který nelze připravit jinak než nesymetrickou cyklizací a následnou separací pomocí sloupcové chromatografie (Obr. 35).

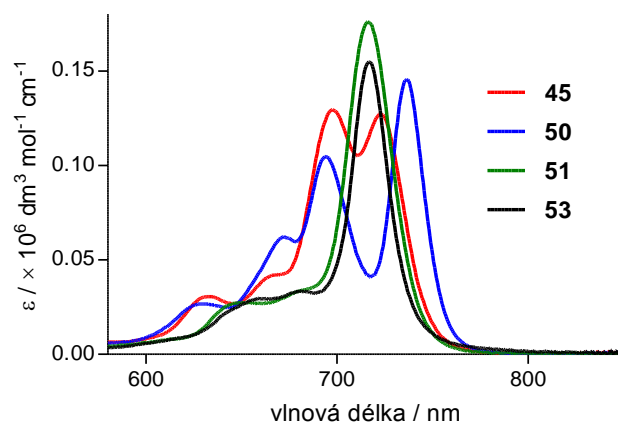


Obr. 35. Příprava Pc 45 vhodného pro „click“ reakce.



Obr. 36. Příprava Pc nesoucích více reaktivních skupin vhodných pro „click“ reakce.

Zinečnaté komplexy **45Zn** a **50Zn-53Zn** mají díky rozšířenému systému konjugovaných vazeb oproti AzaPc Q pás posunutý přes 700 nm, tedy na vlnovou délku vhodnou pro excitaci PS v PDT (Obr. 37 a Tab. 4). Vlivy chinoxalinových a *tert*-butylsulfanylových skupin vázaných na benzenové jádro jsou podobné, a proto mají všechny látky v sérii velice podobný posun Q pásu. Díky nesymetrii molekuly mají Pc **45Zn** a **50Zn** Q pásy rozštěpeny na dva pásy (typ symetrie C_{2h} , viz Obr. 5). U izomeru **51Zn** je pouze jeden neštěpený Q pás, i když má molekula také nesymetrický charakter (typ symetrie C_{2v} , viz Obr. 5). Podobný tvar spekter byl pro „adjacent“ izomery popsán už v dřívějších experimentálních pracích^[33, 110, 111], stejně jako v pracích zabývajících se teoretickými výpočty spektrálních vlastností^[34]. Jeden neštěpený Q pás u **53Zn** je pak v souladu se symetrií molekuly. Mezi zinečnatými komplexy **45Zn** a **50Zn-53Zn** nebyl pozorován signifikantní rozdíl v produkci singletového kyslíku a intenzity fluorescence. Všechny látky v sérii jsou výbornými producenty singletového kyslíku (Φ_{Δ} 0,63-0,79) na úkor nižší emise fotonů (Φ_F 0,029-0,061)[P6, P9].



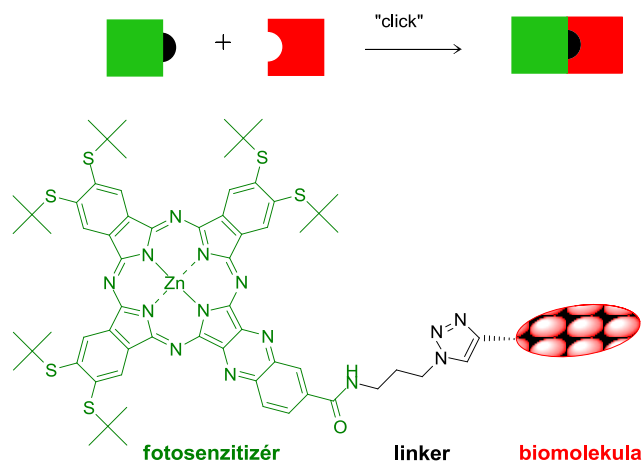
Obr. 37. Absorpční spektrum (oblast Q pásu) Pc **45** a **52-54** vhodných pro „click“ reakce

Tab. 4. Fotofyzikální, fotochemické a spektroskopické parametry látek **45** a **52-54** v DMF

Látka	λ_{\max}/nm ($\epsilon / 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$)	Φ_{Δ}	Φ_F	λ_F/nm
45	723 (1,29), 698 (1,31)	0,63	0,029	733
50	737 (1,47), 694 (1,06)	0,79	0,037	742
51	716 (1,78)	0,69	0,061	728
53	717 (1,58)	0,68	0,037	724

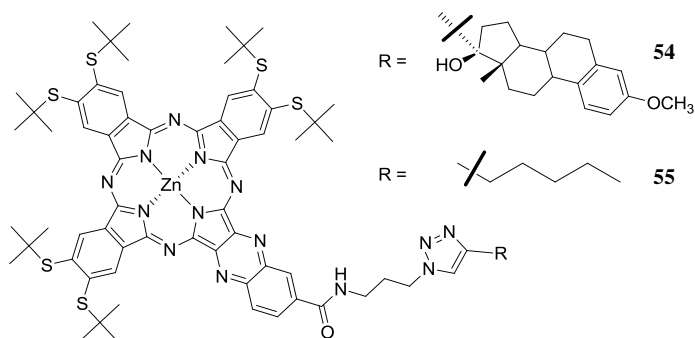
Vlastní „click reakce“

Látka **45** se stala výchozí stavební jednotkou pro konjugaci reakce s mestranolem a hept-1-ynem metodou 1,3-azid alkyň cykloadice. Principem této reakce je mědnými ionty katalyzovaná adice azidové skupiny na terminální alkyňovou skupinu za vzniku 1,2,3-triazolového cyklu (Obr. 38). Jedná se o vysoce účinnou, regioselektivní metodu vhodnou i pro poměrně složité makromolekuly. I v našem případě bylo dosaženo téměř kvantitativních



Obr. 38. Schematické znázornění „click“ reakce

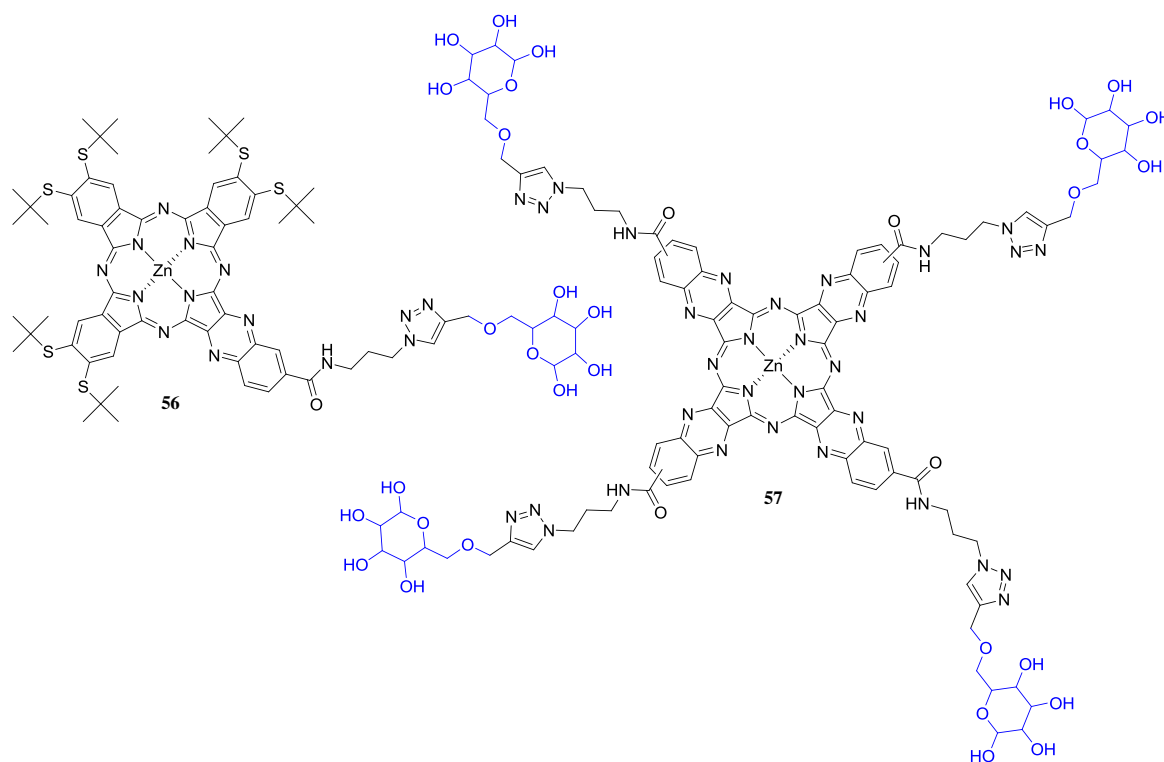
výtěžků konjugace 86 % (**54**) a 97 % (**55**) (Obr. 39). Konjugáty **54** a **55** dosáhly srovnatelných nebo i vyšších kvantových výtěžků singletového kyslíku a fluorescence oproti výchozím látkám **44** a **45**, absorpční vlastnosti zůstaly beze změny [P6]. V budoucnu by tyto dvě látky měly být otestovány na selektivitu k estrogen- dependentním nádorovým tkáním, kdy druhá ze jmenovaných látek by měla sloužit jako negativní kontrola pro cílenou distribuci. Nejprve však bude potřeba vyřešit aplikační formu pro podávání do biologického prostředí, neboť připravené deriváty jsou vysoce lipofilní.



Obr. 39. Struktury Pc připravených „click“ reakcí

Látka **45Zn** společně s ostatními ze série (**50Zn**, **51Zn** a **53Zn**) jsou v současné době využívány pro přípravu konjugátů s galaktózovými jednotkami na periferii opět pomocí zmíněných cykloadičních reakcí. Příklad dvou takových látek (**56** a **57**) ukazuje Obr. 40. Výsledkem tohoto projektu by měly být konjugáty Pc nesoucí různý počet cukerných jednotek v molekule, z čehož vyplývají i různé rozdělovací koeficienty mezi organickým a vodným prostředím. Vzhledem k vyšší metabolické aktivitě nádorových buněk jsou cukerné jednotky nádorovými buňkami ve vyšší míře vychytávány jako zdroj energie pro buněčné procesy. Touto cestou bychom tedy chtěli získat nejen látky cíleněji distribuované

k nádorovým tkáním, ale i látky rozpustné ve vodném prostředí. Druhá ze zmiňovaných výhod je očekávána až u konjugátu **57** nesoucího více polárních hydroxylových skupin.



Obr. 40. Příklad připravovaných konjugátů s cukerními jednotkami

5. Závěr

Tato disertační práce shrnuje v Teoretické části současný stav studované problematiky. Je zde popsána příprava a vlastnosti Pc/AzaPc, dále pak fotofyzikální a fotochemické děje vycházejících z excitovaných stavů molekul. Jedna kapitola je věnována fotodynamické terapii jako hlavní aplikace mnou připravovaných sloučenin. Část Výsledky a diskuze je pak komentářem k publikovaným vědeckým pracím.

V rámci této práce byla připravena řada AzaPc i Pc, na nichž byly studovány fotofyzikální a fotochemické vlastnosti této skupiny látek. V první části jsem se zabývala příčinou nulových kvantových výtěžků singletového kyslíku a fluorescence u alkylamino derivátů AzaPc. Bylo zjištěno, že u těchto AzaPc probíhá intramolekulární přenos náboje (ICT), který je zodpovědný za relaxaci excitovaných stavů zpět do základního stavu S_0 [P2]. Bylo také zjištěno, že ICT lze u AzaPc zablokovat buď stéricky (tvorba J-dimerů, [P1]) nebo protonizací periferního dusíkového atomu [P2, P3], který je donorem pro proces ICT. Velice vysokou účinnost zhašení dokazuje fakt, že už jedno donorové centrum způsobí pokles kvantových výtěžků v polárním prostředí prakticky k nulovým hodnotám [P2]. Na uvedených poznacích byla připravena série AzaPc, jejichž fotofyzikální a fotochemické vlastnosti lze řídit pH prostředím [P7].

Druhá část práce řešila některé syntetické problémy u AzaPc. Byl nalezen vhodný obecný postup přípravy jak symetrických aryloxy a alkyloxy AzaPc [P4], tak nesymetrických alkyloxy/aryloxy AzaPc, jejichž příprava byla popsána úplně poprvé [P8]. Rozšíření konjugovaného systému vazeb vedoucím k výraznému posunu absorpčního maxima bylo dosaženo přípravou 6,7-TQP [P5]. V této práci byl studován i vliv periferní substituce 6,7-TQP na jejich fotofyzikální a fotochemické vlastnosti. V neposlední řadě byly nalezeny podmínky pro přípravu konjugátů AzaPc s biomolekulami pomocí 1,3-dipolární azid alkyn cyklodice, které by jako fotosenzitizéry třetí generace měly být cíleněji distribuované v organismu [P6]. Zároveň byly připraveny další AzaPc vhodné jako výchozí látky pro 1,3-azid alkyn cykloadice, na které jsou v současné době vázány cukerné jednotky [P9]. U těchto látek by se kromě cílenějšího vychytávání v nádorových tkáních měla výrazně zlepšit i rozpustnost v biologickém prostředí.

Práce na Pc, AzaPc a dalších strukturně podobných látkách rozhodně nekončí. V budoucnu bude porovnána účinnost ICT (donor je v konjugaci s akceptorem) s procesem PET (elektron „přeskakuje“ na určitou vzdálenost). Principu blokování ICT by mělo být využito při přípravě nesymetrických AzaPc nesoucích aza-crown na periférii, sloužících jako fluorescenční senzory pro kationty kovů. Bude pokračováno v „click“ reakcích na přípravě již zmíněných konjugátů se sacharidy. V neposlední řadě bude ve spolupráci s kolegy z Katedry anorganické a organické chemie věnována velká pozornost přípravě úplně nových AzaPc odvozeným od 3,8-disubstituovaných [1,2,4]triazolo[4,3-*a*]pyrazin-5,6-dikarbonitrilů.

6. Abstrakt

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát **Mgr. Veronika Nováková**

Školitel **doc. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.**

Název disertační práce **Příprava a studium vlastností azaanalogů ftalocyaninů**

Ftalocyaniny (Pc) a jejich azaanalogy azaftalocyaniny (AzaPc) jsou ploché makrocyclické útvary s výrazným absorpčním pásem v oblasti 620-720 nm nacházející uplatnění např. v oblasti fotodynamické terapie, chemické katalýzy a solárních článků. Pro tyto aplikace jsou důležité jejich fotofyzikální (fluorescence) a fotochemické (produkce singletového kyslíku) parametry. Periferní substituenty Pc/AzaPc hrají v tomto případě klíčovou roli. Alkylsulfanyl a alkyloxy deriváty Pc/AzaPc vykazují vysoké kvantové výtěžky jak fluorescence (Φ_F), tak singletového kyslíku (Φ_Δ). Na druhou stranu u alkylamino derivátů se tyto hodnoty blíží nule, a proto tyto sloučeniny našly uplatnění v oblasti DNA sond jako zhasiče fluorescence.

V první části této disertační práce bylo popsáno, že důvodem nulových kvantových výtěžků alkylamino AzaPc je tzv. intramolekulární přenos náboje (ICT), kde volný elektronový pár periferního dusíku je donorem tohoto procesu a makrocyclické jádro AzaPc akceptorem. Absorpcí světelné energie je AzaPc excitován na vyšší energetickou hladinu, velice rychle se tvoří tzv. „charge separated state“ a z něho se pak molekula vrací zpět do základního stavu. Tento děj kompetuje s ostatními možnými relaxačními mechanismy, a proto jsou Φ_F i Φ_Δ nulové. Účinnost ICT je u AzaPc vysoká, neboť už jedno donorové centrum na periférii je zodpovědné za pokles kvantových výtěžků téměř k nulovým hodnotám. Proces ICT lze zablokovat buď stericky (tvorbou J-dimerů) nebo protonizací donorového dusíku. V obou případech se Φ_F a Φ_Δ skokově zvýší a vyrovnají se hodnotám strukturně podobným AzaPc bez možnosti ICT. Ve finále této části studované problematiky pak byla příprava série AzaPc, jejichž Φ_F a Φ_Δ jsou řízeny pH prostředím. Tyto látky by mohly být využitelné v oblasti zobrazovacích buněčných technik, především tam, kde je vyšší citlivost k nižším pH žádoucí (např. lysosomy).

Druhá část práce se zabývala některými syntetickými problematikami u Pc/AzaPc a jejich vyšších homologů, 6,7-tetrachinoxalinoporfyrinů (6,7-TQP). Byly nalezeny metody pro syntézu symetrických aryloxy/alkyloxy AzaPc a zejména pak nesymetrických aryloxy/alkyloxy AzaPc, které byly připraveny úplně poprvé. Vliv periferního substituentu na vlastnosti 6,7-TQP (Φ_F , Φ_Δ , λ_{max} , ϵ) a srovnání těchto parametrů s odpovídajícími AzaPc byly publikovány také úplně poprvé. U další skupiny studovaných látek pak byla popsána 1,3-dipolární azid alkyn cykloadice jako vhodná metoda konjugace Pc/AzaPc s biomolekulami. Všechny připravené Pc/AzaPc byly studovány z hlediska svých spektrálních, fotofyzikálních a fotochemických parametrů a výsledky porovnány se strukturně podobnými sloučeninami.

7. Abstract

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Candidate **Mgr. Veronika Nováková**

Supervisor **doc. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.**

Title of Doctoral Thesis **Synthesis and study of properties of aza-analogues of phthalocyanines**

Phthalocyanines (Pc) and their azaanalogues azaphthalocyanines (AzaPc) are planar macrocyclic compounds with significant absorption band at 620-720 nm finding application in the areas such as photodynamic therapy, chemical catalysis and solar cells. Photophysical (fluorescence) and photochemical (singlet oxygen production) parameters are important in above mentioned applications. Peripheral substituents of Pc/AzaPc play key role in this case. Alkylsulfanyl and alkyloxy derivatives exerted high fluorescence quantum yields (Φ_F) as well as quantum yields of singlet oxygen (Φ_Δ). On the other hand, alkylamino substitution led to almost zero values of both Φ_F and Φ_Δ . These derivatives have recently found new application as dark quenchers in DNA hybridization probes.

The first part of this thesis demonstrated that intramolecular charge transfer (ICT) is responsible for zero values of quantum yields of alkylamino AzaPc and that the lone electron pair of peripheral nitrogen is a donor for ICT in AzaPc. Absorbing the energy of light, the AzaPc is excited to higher energy state from which the charge separated state is formed very rapidly followed by relaxation into the ground state. This process significantly competes with the other possible relaxation mechanisms, thus Φ_F and Φ_Δ are of zero values. The efficacy of ICT is very high, because only one donor centre is responsible for almost complete quenching of the excited states. ICT can be blocked either sterically (J-dimer formation) or by protonation of donor nitrogen. In both cases Φ_F a Φ_Δ increase of several orders and reached values of similar AzaPc without ICT. The final part of the thesis deals with a series of pH sensitive AzaPc, whose Φ_F a Φ_Δ were controlled by pH of environment. These compounds can find their application in the area of cell imaging, especially where the higher sensitivity to lower pH is desired (i.e. lysosomes).

The second part of the thesis was focused on some synthetic problems at Pc/AzaPc and their higher homologues, 6,7-tetraquinoxalinoporphyrazines (6,7-TQP). The suitable general methods for symmetrical aryloxy/alkyloxy AzaPc and unsymmetrical aryloxy/alkyloxy AzaPc were found. The latter ones were published for the first time. The effect of peripheral substituents on the properties of 6,7-TQP (Φ_F , Φ_Δ , λ_{max} , ε) was described also for the first time. 1,3-dipolar azide alkyne cycloaddition was showed as a suitable method for the conjugation reactions of Pc/AzaPc with biomolecules. All prepared final Pc/AzaPc were studied from the spectroscopic, photophysical and photochemical point of view and the results were compared with structurally similar compounds.

8. Seznam použité literatury

1. ZIMCIK P., NOVAKOVA V., MILETIN M., KOPECKY K. Azaphthalocyanines containing pyrazine rings with focus on the alkylheteroatom, aryl and heteroaryl substitution and properties important in photodynamic therapy *Macroheterocycles*, 2008, vol. 1, no. 1, p. 21-29.
2. ZIMCIK P., MILETIN M., KOSTKA M., SCHWARZ J., MUSIL Z., KOPECKY K. Synthesis and comparison of photodynamic activity of alkylheteroatom substituted azaphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol., A*, 2004, vol. 163, no. 1-2, p. 21-28.
3. MAKHSEED S., IBRAHIM F., BEZZU C. G., MCKEOWN N. B. The synthesis of metal-free octaazaphthalocyanine derivatives containing bulky phenoxy substituents to prevent self-association. *Tetrahedron Lett.*, 2007, vol. 48, no. 41, p. 7358-7361.
4. KOPECKY K., ZIMCIK P., NOVAKOVA V., MILETIN M., MUSIL Z., STRIBNA J. The synthesis and characterization of metal-free, unsymmetrical azaphthalocyanines with hydroxy groups and their complex formation with pyridine. *Dyes Pigm.*, 2008, vol. 78, no. 3, p. 231-238.
5. MØRKVED E. H., ANDREASSEN T., NOVAKOVA V., ZIMCIK P. Zinc azaphthalocyanines with thiophen-2-yl, 5-methylthiophen-2-yl and pyridin-3-yl peripheral substituents: Additive substituent contributions to singlet oxygen production. *Dyes Pigm.*, 2009, vol. 82, no. 3, p. 276-285.
6. KADISH K. M., SMITH K., GUILARD R., *Handbook of porphyrin science*. 1. vydání. Singapur: World Scientific, 2010. Vol. 3, 2000 s. ISBN 978-981-4280-16-7 (Set).
7. DURMUS M., AYHAN M. M., GUREK A. G., AHSEN V. Peripherally alpha(alpha)-substituted novel phthalocyanines. *Dyes Pigm.*, 2008, vol. 77, no. 3, p. 570-577.
8. GALANIN N. E., KUDRIK E. V., SHAPOSHNIKOV G. P. Synthesis and spectral characteristics of phthalocyanines of unsymmetrical structure containing fragments of 3,6-didecyloxyphthalonitrile and 2-methyl-5,6-dicyanobenzimidazole. *Russ. J. Org. Chem.*, 2008, vol. 44, no. 2, p. 225-230.
9. DE LA HOZ A., DIAZ-ORTIZ A., FRAILE J. M., GOMEZ M. V., MAYORAL J. A., MORENO A., SAIZ A., VAZQUEZ E. Synergy between heterogeneous catalysis and microwave irradiation in an efficient one-pot synthesis of benzene derivatives via ring-opening of Diels-Alder cycloadducts of substituted furans. *Synlett*, 2001, no. 6, p. 753-756.
10. NEGRIMOVSKII V. M., DERKACHEVA V. M., LUKYANETS E. A. New Octa-Substituted Phthalocyanines. *Russ. J. Gen. Chem.*, 1989, vol. 59, no. 7, p. 1688-1690.
11. MIKHALENKO S. A., DERKACHEVA V. M., LUKYANETS E. A. Phthalocyanines and Related-Compounds .19. Tetraamino-Substituted and Octaamino-Substituted Phthalocyanines. *Russ. J. Gen. Chem.*, 1981, vol. 51, no. 7, p. 1650-1657.
12. SUGIMORI T., OKAMOTO S., KOTOH N., HANDA M., KASUGA K. Phthalocyanines obtained from phthalonitriles with phenyl derivatives: A new method for the synthesis of the phthalonitriles by use of Suzuki-coupling reaction. *Chem. Lett.*, 2000, no. 10, p. 1200-1201.
13. KUDREVICH S. V., VAN LIER J. E. Azaanalogs of phthalocyanine: Syntheses and properties. *Coord. Chem. Rev.*, 1996, vol. 156, p. 163-182.
14. OHTA K., WATANABE T., HASEBE H., MORIZUMI Y., FUJIMOTO T., YAMAMOTO I., LELIEVRE D., SIMON J. Discotic Liquid-Crystals of Transition-Metal Complexes-9 - Synthesis and Properties of Discotic Liquid-Crystals of Tetrapyrazinoporphyrazine Derivatives. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 1991, vol. 196, p. 13-26.
15. DE LA TORRE G., CLAESSENS C. G., TORRES T. Phthalocyanines: The need for selective synthetic approaches. *Eur. J. Org. Chem.*, 2000, no. 16, p. 2821-2830.
16. CLAESSENS C. G., HAHN U., TORRES T. Phthalocyanines: From outstanding electronic properties to emerging applications. *Chem. Rec.*, 2008, vol. 8, no. 2, p. 75-97.
17. KADISH K. M., SMITH K., GUILARD R., *Handbook of porphyrin science*. 1. vydání. Singapur: World Scientific, 2010. Vol. 1-5. ISBN 978-981-4280-16-7; Vol 6-10. ISBN 978-981-4307-18-5.
18. KOSTKA M., ZIMCIK P., MILETIN M., KLEMERA P., KOPECKY K., MUSIL Z. Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol., A*, 2006, vol. 178, no. 1, p. 16-25.

19. ZIMCIK P., MILETIN M., MUSIL Z., KOPECKY K., KUBZA L., BRAULT D. Cationic azaphthalocyanines bearing aliphatic tertiary amino substituents-Synthesis, singlet oxygen production and spectroscopic studies. *J. Photochem. Photobiol., A*, 2006, vol. 183, no. 1-2, p. 59-69.
20. RIO Y., RODRIGUEZ-MORGADE M. S., TORRES T. Modulating the electronic properties of porphyrinoids: a voyage from the violet to the infrared regions of the electromagnetic spectrum. *Org. Biomol. Chem.*, 2008, vol. 6, no. 11, p. 1877-1894.
21. CHOI M. T. M., LI P. P. S., NG D. K. P. A direct comparison of the aggregation behavior of phthalocyanines and 2,3-naphthalocyanines. *Tetrahedron*, 2000, vol. 56, no. 24, p. 3881-3887.
22. DURMUS M., NYOKONG T. Synthesis and solvent effects on the electronic absorption and fluorescence spectral properties of substituted zinc phthalocyanines. *Polyhedron*, 2007, vol. 26, no. 12, p. 2767-2776.
23. DONZELLO M. P., ERCOLANI C., MANNINA L., VIOLA E., BUBNOVA A., KHELEVINA O. G., STUZHIN P. A. Synthesis and Spectroscopic Properties of Low-Symmetry Tribenzoporphyrazines with Annulated 6H-1,4-Diazepine Ring. *Aust. J. Chem.*, 2008, vol. 61, no. 4, p. 262-272.
24. PETRIK P., ZIMCIK P., KOPECKY K., MUSIL Z., MILETIN M., LOUKOTOVA V. Protonation and deprotonation of nitrogens in tetrapyrizinoporphyrazine macrocycles. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2007, vol. 11, no., p. 487-495.
25. GALPERN M. G., KUDREVICH S. V., NOVOZHILOVA I. G. Synthesis and spectroscopic properties of soluble aza analogs of phthalocyanine and naphthalocyanine. *Chem. Heterocycl. Compd.*, 1993, vol. 29, no. 1, p. 49-54.
26. KALZ W., HOMBORG H., KUPPERS H., KENNEDY B. J., MURRAY K. S. Preparation and Characterization of Biscyanophthalocyaninatoferrates(III). *Z. Naturforsch. (B)*, 1984, vol. 39, no. 11, p. 1478-1489.
27. DAY P., HILL H. A. O., PRICE M. G. Some Reactions of Cobalt Phthalocyanines. *J. Chem. Soc. A*, 1968, no. 1, p. 90-93.
28. STILLMAN M. J., THOMSON A. J. Assignment of Charge-Transfer Bands in Some Metal Phthalocyanines - Evidence for S = 1 State of Iron(II) Phthalocyanine in Solution. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, 1974, vol. 70, no. 5, p. 790-804.
29. KOPECKY K., NOVAKOVA V., MILETIN M., KUCERA R., ZIMCIK P. Solid-Phase Synthesis of Azaphthalocyanine-Oligonucleotide Conjugates and Their Evaluation As New Dark Quenchers of Fluorescence. *Bioconjugate Chem.*, 2010, vol. 21, no. 10, p. 1872-1879.
30. KUDREVICH S. V., GALPERN M. G., LUKYANETS E. A., VANLIER J. E. Substituted tetra 2,3-pyrazinoporphyrazines .1. Angular annelation of tetra-2,3-quinoxalinoporphyrazine. *Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim.*, 1996, vol. 74, no. 4, p. 508-515.
31. KUDREVICH S. V., VAN LIER J. E. Substituted tetra-2,3-pyrazinoporphyrazines. Part II. Bis(tri-n-hexylsiloxy)silicon derivatives. *Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim.*, 1996, vol. 74, no. 9, p. 1718-1723.
32. MITZEL F., FITZGERALD S., BEEBY A., FAUST R. Acetylenic quinoxalinoporphyrazines as photosensitisers for photodynamic therapy. *Chem.-Eur. J.*, 2003, vol. 9, no. 5, p. 1233-1241.
33. MUSIL Z., ZIMCIK P., MILETIN M., KOPECKY K., LENCO J. Synthesis, separation and UV/Vis spectroscopy of pyrazino-quinoxalino-porphyrazine macrocycles. *Eur. J. Org. Chem.*, 2007, no. 27, p. 4535-4542.
34. KOBAYASHI N., MIWA H., NEMYKIN V. N. Adjacent versus opposite type di-aromatic ring-fused phthalocyanine derivatives: Synthesis, spectroscopy, electrochemistry, and molecular orbital calculations. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, vol. 124, no. 27, p. 8007-8020.
35. KOBAYASHI N., MACK J., ISHII K., STILLMAN M. J. Electronic structure of reduced symmetry peripheral fused-ring-substituted phthalocyanines. *Inorg. Chem.*, 2002, vol. 41, no. 21, p. 5350-5363.
36. LAKOWICZ J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3. vydání. New York: Springer, 2006. 953 s. ISBN 978-0-387-31278-1.
37. NOOMNARM U., CLEGG R. M. Fluorescence lifetimes: fundamentals and interpretations. *Photosynth. Res.*, 2009, vol. 101, no. 2-3, p. 181-194.
38. JOHANSSON M. K., COOK R. M. Intramolecular dimers: A new design strategy for fluorescence-quenched probes. *Chem.-Eur. J.*, 2003, vol. 9, no. 15, p. 3466-3471.

39. BIRKS B. B., *Photophysics of Aromatic Molecules*. 1. vydání, Londýn: Wiley-Interscience, 1970. 704 s. ISBN 0-471-07420-9.
40. MCCLURE D. S. Triplet-Singlet Transitions in Organic Molecules - Lifetime Measurements of the Triplet State. *J. Chem. Phys.*, 1949, vol. 17, no. 10, p. 905-913.
41. SAKA E. T., DURMUS M., KANTEKIN H. Solvent and central metal effects on the photophysical and photochemical properties of 4-benzyloxybenzoxy substituted phthalocyanines. *Journal of Organomet. Chem.*, 2011, vol. 696, no. 4, p. 913-924.
42. FAUST R., WEBER C. Three-step synthesis and absorption and emission properties of peripherally peralkynylated tetrapyrrolic porphyrins. *J. Org. Chem.*, 1999, vol. 64, no. 7, p. 2571-2573.
43. IUPAC GOLD BOOK [online]. Poslední revize 2010-12-22 [cit. 2011-06-13]. Dostupné z <http://goldbook.iupac.org/D01579.html>.
44. FAJARI L., FORS P., LANG K., NONELL S., TRULL F. R. Intramolecular and intermolecular photoinduced electron transfer in isomeric mesoporphyrin nitrobenzyl esters: Structure and solvent effects. *J. Photochem. Photobiol., A*, 1996, vol. 93, no. 2-3, p. 119-128.
45. GARRERA H. A., COSA J. J., PREVITALI C. M. Solvent Effect and Activation Parameters in the Oxidative Quenching of Excited Tris(2,2'-Bipyridinium)Ruthenium(II) by Organic Acceptors. *J. Photochem. Photobiol., A*, 1991, vol. 56, no. 2-3, p. 267-274.
46. BARBARA P. F., MEYER T. J., RATNER M. A. Contemporary Issues in Electron Transfer Research. *J. Phys. Chem.*, 1996, vol. 100, no. 31, p. 13148-13168.
47. ROSSKY P. J., SIMON J. D. Dynamics of Chemical Processes in Polar-Solvents. *Nature*, 1994, vol. 370, no. 6487, p. 263-269.
48. MARCUS R. A., SUTIN N. Electron Transfers in Chemistry and Biology. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, vol. 811, no. 3, p. 265-322.
49. WASIELEWSKI M. R. Photoinduced Electron-Transfer in Supramolecular Systems for Artificial Photosynthesis. *Chem. Rev.*, 1992, vol. 92, no. 3, p. 435-461.
50. PADDONROW M. N., VERHOEVEN J. W. Towards the Rational Design of Systems Exhibiting Rapid Long-Range Intramolecular Electron-Transfer Processes Caused by through-Bond Coupling. *New J. Chem.*, 1991, vol. 15, no. 2-3, p. 107-116.
51. BIXON M., JORTNER J. Cytochrome Oxidation in Bacterial Photosynthesis - Comment. *J. Chem. Phys.*, 1988, vol. 89, no. 5, p. 3392-3393.
52. WAINWRIGHT M. Photodynamic therapy: The development of new photosensitisers. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, 2008, vol. 8, no. 3, p. 280-291.
53. CASTANO A. P., MROZ P., HAMBLIN M. R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat. Rev. Cancer*, 2006, vol. 6, no. 7, p. 535-545.
54. GARLAND M. J., CASSIDY C. M., WOOLFSON D., DONNELLY R. F. Designing photosensitizers for photodynamic therapy: strategies, challenges and promising developments. *Future Med. Chem.*, 2009, vol. 1, no. 4, p. 667-691.
55. AGOSTINIS P., BERG K., CENGEL K. A., FOSTER T. H., GIROTTI A. W., GOLLNICK S. O., HAHN S. M., HAMBLIN M. R., JUZENIENE A., KESSEL D., KORBELIK M., MOAN J., MROZ P., NOWIS D., PIETTE J., WILSON B. C., GOLAB J. Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA Cancer J. Clin.*
56. CASTANO A. P., DEMIDOVA T. N., HAMBLIN M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2004, vol. 1, no. 4, p. 279-293.
57. NYMAN E. S., HYNINEN P. H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol., B*, 2004, vol. 73, no. 1-2, p. 1-28.
58. MACDONALD I. J., DOUGHERTY T. J. Basic principles of photodynamic therapy. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2001, vol. 5, no. 2, p. 105-129.
59. VALKO M., IZAKOVIC M., MAZUR M., RHODES C. J., TELSER J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.*, 2004, vol. 266, no. 1-2, p. 37-56.
60. ALLISON R. R., SIBATA C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2010, vol. 7, no. 2, p. 61-75.

61. ZIMCIK P., MILETIN M., Photodynamic Therapy. In Lang, A. R. Dyes and Pigments: New Research, New York: Nova Science Publishers, Inc., 2009; pp. 1-62. ISBN: 978-1-60692-027-5.
62. WILSON B. C., PATTERSON M. S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys. Med. Biol.*, 2008, vol. 53, no. 9, p. R61-R109.
63. CASTANO A. P., DEMIDOVA T. N., HAMBLIN M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three - Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2005, vol. 2, no. 2, p. 91-106.
64. KADISH K. M., SMITH K., GUILARD R, *Handbook of porphyrin science*. 1. vydání. Singapur: World Scientific, 2010. Vol. 4, 2000 s. ISBN 978-981-4280-16-7 (Set).
65. AGARWAL M. L., CLAY M. E., HARVEY E. J., EVANS H. H., ANTUNEZ A. R., OLEINICK N. L. Photodynamic Therapy Induces Rapid Cell-Death by Apoptosis in L5178y Mouse Lymphoma-Cells. *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, no. 21, p. 5993-5996.
66. OLEINICK N. L., MORRIS R. L., BELICHENKO T. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2002, vol. 1, no. 1, p. 1-21.
67. MOAN J., PENG Q. An outline of the hundred-year history of PDT. *Anticancer Research*, 2003, vol. 23, no. 5A, p. 3591-3600.
68. AGOSTINIS P., BUYTAERT E., BREYSSSENS H., HENDRICKX N. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2004, vol. 3, no. 8, p. 721-729.
69. LUO Y., KESSEL D. Initiation of apoptosis versus necrosis by photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine. *Photochem. Photobiol.*, 1997, vol. 66, no. 4, p. 479-483.
70. BUYTAERT E., CALLEWAERT G., VANDENHEEDE J. R., AGOSTINIS P. Deficiency in apoptotic effectors bax and bak reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum. *Autophagy*, 2006, vol. 2, no. 3, p. 238-240.
71. KESSEL D., VICENTE M. G. H., REINERS J. J. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Lasers Surg. Med.*, 2006, vol. 38, no. 5, p. 482-488.
72. FUNKE B., JUNGEL A., SCHASTAK S., WIEDEMAYER K., EMMRICH F., SACK U. Transdermal photodynamic therapy - A treatment option for rheumatic destruction of small joints? *Lasers Surg. Med.*, 2006, vol. 38, no. 9, p. 866-874.
73. CHOU T. M., WOODBURN K. W., CHEONG W. F., LACY S. A., SUDHIR K., ADELMAN D. C., WAHR D. Photodynamic therapy: Applications in atherosclerotic vascular disease with motexafin lutetium. *Catheter. Cardiovasc. Interv.*, 2002, vol. 57, no. 3, p. 387-394.
74. KELTY C. J., BROWN N. J., REED M. W. R., ACKROYD R. The use of 5-aminolaevulinic acid as a photosensitizer in photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2002, vol. 1, no. 3, p. 158-168.
75. HAMBLIN M. R., HASAN T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2004, vol. 3, no. 5, p. 436-450.
76. ZIMCIK P.: *Interakce světelného záření s azaftalocyaninovými barvivy*. Habilitační práce. Hradec Králové: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2010. 364 s.
77. ZIMCIK P., MILETIN M., NOVAKOVA V., KOPECKY K., DVORAKOVA Z. Tetrapyrrozinoporphyrazines with different number of peripheral pyridyl rings. Synthesis, photophysical and photochemical properties. *Dyes Pigm.*, 2009, vol. 81, p. 35-39.
78. 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, vol. 62, no. 5, p. 425-433.
79. ZIMCIK P., MILETIN M., RADILOVA H., NOVAKOVA V., KOPECKY K., SVEC J., RUDOLF E. Synthesis, Properties and In Vitro Photodynamic Activity of Water-soluble Azaphthalocyanines and Azanaphthalocyanines. *Photochem. Photobiol.*, 2010, vol. 86, no. 1, p. 168-175.
80. ZIMCIK P., MØRKVED E. H., ANDREASSEN T., LENCO J., NOVAKOVA V. Syntheses of octasubstituted zinc azaphthalocyanines with thiophene or thiophene combined with sulfanyl, amino or imido substituents: Influence of the substituents on photochemical and photophysical properties. *Polyhedron*, 2008, vol. 27, no. 5, p. 1368-1374.

81. KOPECKY K., ŠATINSKÝ D., NOVAKOVA V., MILETIN M., SVOBODA A., ZIMCIK P. Synthesis of mono-, di-, tri- and tetracarboxy azaphthalocyanines as potential dark quenchers. *Dyes Pigm.*, 2011, vol. 91, no. 2, p. 112-119.
82. KOPECKY K., NOVAKOVA V., MILETIN M., KUČERA R., ZIMCIK P. Synthesis of new azaphthalocyanine dark quencher and evaluation of its quenching efficiency with different fluorophores. *Tetrahedron*, v tisku. Doi: 10.1016/j.tet.2011.06.038.
83. UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ a GENERI BIOTECH, s.r.o. *Nefluoresckující deriváty ftalocyaninů a azaftalocyaninů jako zhášče fluorescence*. Původce vynálezu: MILETIN M., ZIMCIK P., KOPECKY K., MUSIL Z., NOVAKOVA V., HALUZA R., BUNČEK M. Česká republika. 2009. Patent č. 300906.
84. KOPECKÝ K.: *Azaftalocyaniny jako nová skupina zháščů fluorescence*. Disertační práce. Hradec Králové: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2009. 118 s.
85. QUINTILANI M., KAHNT A., WOLFLE T., HIERINGER W., VAZQUEZ P., GORLING A., GULDI D. M., TORRES T. Synthesis and Photoinduced Electron-Transfer Properties of Phthalocyanine[60]Fullerene Conjugates. *Chem.-Eur. J.*, 2008, vol. 14, no. 12, p. 3765-3775.
86. NIEMI M., TKACHENKO N. V., EFIMOV A., LEHTIVUORI H., OHKUBO K., FUKUZUMI S., LEMMETYINEN H. Exciplex mediated photoinduced electron transfer reactions of phthalocyanine-fullerene dyads. *J Phys. Chem. A*, 2008, vol. 112, no. 30, p. 6884-92.
87. FUKUZUMI S., HONDA T., OHKUBO K., KOJIMA T. Charge separation in metallomacrocyclic complexes linked with electron acceptors by axial coordination. *Dalton Trans.*, 2009, no. 20, p. 3880-3889.
88. RODRIGUEZ-MORGADE M. S., TORRES T., ATIENZA-CASTELLANOS C., GULDI D. M. Supramolecular Bis(rutheniumphthalocyanine)-Perylenediimide Ensembles: Simple Complexation as a Powerful Tool toward Long-Lived Radical Ion Pair States. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, vol. 128, no. 47, p. 15145-15154.
89. FUKUZUMI S., OHKUBO K., ORTIZ J., GUTIERREZ A. M., FERNANDEZ-LAZARO F., SASTRE-SANTOS A. Formation of a long-lived charge-separated state of a zinc phthalocyanine-perylenediimide dyad by complexation with magnesium ion. *Chem. Commun.*, 2005, no. 30, p. 3814-6.
90. GOULOUMIS A., RAHMAN G. M. A., ABEL J., DE LA TORRE G., VAZQUEZ P., ECHEGOYEN L., GULDI D. M., TORRES T. Flavin Core as Electron Acceptor Component in a Zinc(II)-Phthalocyanine-Based Dyad. *Aust. J. Chem.*, 2008, vol. 61, no. 4, p. 256-261.
91. KOJIMA T., HONDA T., OHKUBO K., SHIRO M., KUSUKAWA T., FUKUDA T., KOBAYASHI N., FUKUZUMI S. A discrete supramolecular conglomerate composed of two saddle-distorted zinc(II)-phthalocyanine complexes and a doubly protonated porphyrin with saddle distortion undergoing efficient photoinduced electron transfer. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, vol. 47, no. 35, p. 6712-6.
92. TANNERT S., ERMILOV E. A., VOGEL J. O., CHOI M. T. M., NG D. K. P., RÖDER B. The Influence of Solvent Polarity and Metalation on Energy and Electron Transfer in Porphyrin-Phthalocyanine Heterotrimers. *J. Phys. Chem. B*, 2007, vol. 111, no. 28, p. 8053-8062.
93. BIAN Y. Z., CHEN X. H., WANG D. Y., CHOI C. F., ZHOU Y., ZHU P. H., NG D. K. P., JIANG J. Z., WENG Y. X., LI X. Y. Porphyrin-appended europium(III) bis(phthalocyaninato) complexes: Synthesis, characterization, and photophysical properties. *Chem.-Eur. J.*, 2007, vol. 13, no. 15, p. 4169-4177.
94. ERMILOV E. A., LIU J.-Y., NG D. K. P., RÖDER B. Spectroscopic study of electron and energy transfer in novel silicon phthalocyanine-boron dipyrromethene triads. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2009, vol. 11, p. 6430-6440.
95. ITO F., ISHIBASHI Y., KHAN S. R., MIYASAKA H., KAMEYAMA K., MORISUE M., SATAKE A., OGAWA K., KOBUE Y. Photoinduced electron transfer and excitation energy transfer in directly linked zinc porphyrin/zinc phthalocyanine composite. *J. Phys. Chem. A*, 2006, vol. 110, no. 47, p. 12734-12742.
96. DARAIO M. E., ARAMENDÍA P. F., SAN ROMÁN E. Fluorescence quenching kinetic model for a bound and partitioned quencher in micelles. *Chem. Phys. Lett.*, 1996, vol. 250, no. 2, p. 203-208.

97. DARAIO M. E., VOLKER A., ARAMENDIA P. F., SANROMAN E. Reaction of zinc phthalocyanine excited states with amines in cationic micelles. *Langmuir*, 1996, vol. 12, no. 12, p. 2932-2938.
98. KOBAYASHI H., OGAWA M., ALFORD R., CHOYKE P. L., URANO Y. New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging. *Chem. Rev.*, 2010, vol. 110, no. 5, p. 2620-2640.
99. JIANG X. J., YEUNG S. L., LO P. C., FONG W. P., NG D. K. P. Phthalocyanine -Polyamine Conjugates as Highly Efficient Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *J. Med. Chem.*, 2011, vol. 54, no. 1, p. 320-330.
100. URANO Y., ASANUMA D., HAMA Y., KOYAMA Y., BARRETT T., KAMIYA M., NAGANO T., WATANABE T., HASEGAWA A., CHOYKE P. L., KOBAYASHI H. Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH-activatable fluorescence probes. *Nat. Med.*, 2009, vol. 15, no. 1, p. 104-9.
101. NEW R. R. C., *Liposomes: a practical approach*. New York: Oxford University Press, 1990. 301 s. ISBN 0-19-963077-1.
102. YOUSSEF T. E., HANACK M. Asymmetrically fused heterocyclic phthalocyaninato nickel(II) adducts: synthesis and characterization. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2005, vol. 9, no. 1, p. 28-31.
103. WEITEMEYER A., KLIESCH H., WOEHRLE D. Unsymmetrically Substituted Phthalocyanine Derivatives via a Modified Ring Enlargement Reaction of Unsubstituted Subphthalocyanine. *J. Org. Chem.*, 1995, vol. 60, no. 15, p. 4900-4904.
104. MAKHSEED S., SAMUEL J. The synthesis and characterization of zincphthalocyanines bearing functionalized bulky phenoxy substituents. *Dyes Pigm.*, 2009, vol. 82, no. 1, p. 1-5.
105. MAKHSEED S., SAMUEL J., IBRAHIM F. Synthesis and characterization of non-aggregating octa-substituted azaphthalocyanines bearing bulky phenoxy substituents. *Tetrahedron*, 2008, vol. 64, no. 37, p. 8871-8877.
106. MAKHSEED S., IBRAHIM F., SAMUEL J., HELLIWELL M., WARREN J. E., BEZZU C. G., MCKEOWN N. B. Clathrate formation from octaazaphthalocyanines possessing bulky phenoxy substituents: A new cubic crystal containing solvent-filled, nanoscale voids. *Chem.-Eur. J.*, 2008, vol. 14, no. 16, p. 4810-4815.
107. IBRAHIM F., MAKHSEED S. Synthesis and spectral properties of tetrapyrizinoporphyrazinato metal complexes derived from a sterically hindered phenol. *Arkivoc*, 2008, p. 85-94.
108. MØRKVED E. H., AFSETH N. K., KJØSEN H. Zn(quinoline)₂Cl₂: an efficient reagent for synthesis of zinc azaphthalocyanines with thiomorpholine- or pyrazole substituents. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2006, vol. 10, p. 1301-1308.
109. MUSIL Z., ZIMCIK P., MILETIN M., KOPECKY K., PETRIK P., LENCO J. Influence of electron-withdrawing and electron-donating substituents on photophysical properties of azaphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol., A*, 2007, vol. 186, no. 2-3, p. 316-322.
110. IKEDA Y., KONAMI H., HATANO M., MOCHIZUKI K. Synthesis of Nonsymmetrically Benzo-Substituted Phthalocyanines and Their Electronic-Spectra. *Chem. Lett.*, 1992, no. 5, p. 763-766.
111. POLLEY R., LINßEN T. G., STIHLER P., HANACK M. Synthesis, Separation and Characterization of Naphthobenzo-condensed Porphyrinato Nickel(II) Complexes. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 1997, vol. 1, no. 2, p. 169-179.

9. Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací

První autor:

- P1 NOVAKOVA V., ZIMCIK P., KOPECKY K., MILETIN M., KUNEŠ J., LANG K.** Self-Assembled Azaphthalocyanine Dimers with Higher Fluorescence and Singlet Oxygen Quantum Yields than the Corresponding Monomers. *Eur. J. Org. Chem.*, 2008, vol. 2008, no. 19, p. 3260-3263.
- P2 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, vol. 12, no., p. 2555-2563.
- P3 NOVAKOVA V., MØRKVED E. H., MILETIN M., ZIMCIK P.** Influence of protonation of peripheral substituents on photophysical and photochemical properties of tetrapyrazinoporphyrazines. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2010, vol. 14, no., p. 582-591.
- P4 NOVAKOVA V., ZIMCIK P., MILETIN M., VUJTECH P., FRANZOVA S.** The synthesis, photochemical and photophysical properties of zinc aryloxy- and alkyloxy azaphthalocyanines. *Dyes Pigm.*, 2010, vol. 87, no. 2, p. 173-179.
- P5 NOVAKOVA V., ZIMCIK P., MILETIN M., KOPECKY K., MUSIL Z.** Tetra[6,7]quinoxalinoporphyrazines: The Effect of an Additional Benzene Ring on Photophysical and Photochemical Properties. *Eur. J. Org. Chem.*, 2010, vol. 2010, no. 4, p. 732-739.
- P6 NOVAKOVA V., ZIMCIK P., MILETIN M., KOPECKY K., IVINCOVÁ J.** A phthalocyanine-mestranol conjugate for photodynamic therapy prepared via click chemistry. *Tetrahedron Lett.*, 2010, vol. 51, no. 7, p. 1016-1018.
- P7 NOVAKOVA V., MILETIN M., KOPECKY K., ZIMCIK P.** Red emitting dyes with photophysical and photochemical properties controlled by pH. Zasláno k posouzení do *Chem. Eur. J.*
- P8 NOVAKOVA V., MILETIN M., KOPECKY K., FRANZOVÁ Š., ZIMCIK P.** Synthesis of Unsymmetrical Alkyloxy/Aryloxy Azaphthalocyanines Based on Transesterification Reaction. V tisku v *Eur. J. Org. Chem.*
- P9 NOVAKOVA V., KOPECKY K., MILETIN M., IVINCOVÁ J., ZIMCIK P.,** Photodynamically active phthalocyanine building blocks for click chemistry. Zasláno k posouzení do *J. Porphyrin Phthalocyanines*.

Spoluautor:

PETRIK P., ZIMCIK P., KOPECKY K., MUSIL Z., MILETIN M., LOUKOTOVA V. Protonation and deprotonation of nitrogens in tetrapyrazinoporphyrazine macrocycles. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2007, vol. 11, no., p. 487-495.

KOPECKY K., ZIMCIK P., **NOVAKOVA V.**, MILETIN M., MUSIL Z., STRIBNA J. The synthesis and characterization of metal-free, unsymmetrical azaphthalocyanines with hydroxy groups and their complex formation with pyridine. *Dyes Pigm.*, 2008, vol. 78, no. 3, p. 231-238.

ZIMCIK P., MØRKVED E. H., ANDREASSEN T., LENCO J., **NOVAKOVA V.** Syntheses of octasubstituted zinc azaphthalocyanines with thiophene or thiophene combined with sulfanyl, amino or imido substituents: Influence of the substituents on photochemical and photophysical properties. *Polyhedron*, 2008, vol. 27, no. 5, p. 1368-1374.

ZIMCIK P., **NOVAKOVA V.**, MILETIN M., KOPECKY K. Azaphthalocyanines containing pyrazine rings with focus on the alkylheteroatom, aryl and heteroaryl substitution and properties important in photodynamic therapy *Macroheterocycles*, 2008, vol. 1, no. 1, p. 21-29.

ZIMCIK P., MILETIN M., **NOVAKOVA V.**, KOPECKY K., DVORAKOVA Z. Tetrapyrazinoporphyrazines with different number of peripheral pyridyl rings. Synthesis, photophysical and photochemical properties. *Dyes and Pigments*, 2009, vol. 81, no., p. 35-39.

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, vol. 62, no. 5, p. 425-433.

MØRKVED E. H., ANDREASSEN T., **NOVAKOVA V.**, ZIMCIK P. Zinc azaphthalocyanines with thiophen-2-yl, 5-methylthiophen-2-yl and pyridin-3-yl peripheral substituents: Additive substituent contributions to singlet oxygen production. *Dyes Pigm.*, 2009, vol. 82, no. 3, p. 276-285.

ZIMCIK P., MILETIN M., RADILOVA H., **NOVAKOVA V.**, KOPECKY K., SVEC J., RUDOLF E. Synthesis, Properties and *In Vitro* Photodynamic Activity of Water-soluble Azaphthalocyanines and Azanaphthalocyanines. *Photochem. Photobiol.*, 2010, vol. 86, no. 1, p. 168-175.

KOPECKY K., **NOVAKOVA V.**, MILETIN M., KUCERA R., ZIMCIK P. Solid-Phase Synthesis of Azaphthalocyanine-Oligonucleotide Conjugates and Their Evaluation As New Dark Quenchers of Fluorescence. *Bioconjugate Chem.*, 2010, vol. 21, no. 10, p. 1872-1879.

KOPECKY K., ŠATINSKÝ D., **NOVAKOVA V.**, MILETIN M., SVOBODA A., ZIMCIK P. Synthesis of mono-, di-, tri- and tetracarboxy azaphthalocyanines as potential dark quenchers. *Dyes Pigm.*, 2011, vol. 91, no. 2, p. 112-119.

KOPECKY K., **NOVAKOVA V.**, MILETIN M., KUČERA R., ZIMCIK P. Synthesis of new azaphthalocyanine dark quencher and evaluation of its quenching efficiency with different fluorophores. *Tetrahedron*, v tisku. Doi: 10.1016/j.tet.2011.06.038.

Patent:

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ a GENERI BIOTECH, s.r.o. *Nefluoresckující deriváty ftalocyaninů a azaftalocyaninů jako zhášeče fluorescence*. Původce vynálezu: MILETIN M., ZIMCIK P., KOPECKY K., MUSIL Z., **NOVAKOVA V.**, HALUZA R., BUNČEK M. Česká republika. 2009. Patent č. 300906.

10. Přílohy

Jedná se o soubor stěžejních publikovaných prací [P1-P6] a prací, které byly v době vzniku této disertační práce odeslány k posouzení do vědeckých časopisů [P7-P9]. Práce jsou řazeny v pořadí, ve kterém jsou uvedeny v kapitole 9. Seznam vědeckých a odborných prací.