

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej



Michał Kryjewski

**Synteza, badania strukturalne i fotochemiczne
koniugatów porfirazyn i ftalocyjanin z adamantanem**

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. Jadwiga Mielcarek

Promotor pomocniczy: dr hab. Tomasz Gośliński

Poznań 2014

Słowa kluczowe:

Adamantan

Ftalocyjanina

Porfirazyna

Terapia fotodynamiczna

Tlen singletowy

Część pracy realizowano w ramach projektu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (wcześniej Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego):

„Modyfikowane porfirynoidy o potencjalnym zastosowaniu w terapii oraz diagnostyce chorób nowotworowych i infekcji wirusem grypy”, nr N N404 069 440.

Doktorant uzyskał finansowanie na przygotowanie rozprawy doktorskiej z Narodowego Centrum Nauki w ramach programu Etiuda na podstawie decyzji numer DEC-2013/08/T/NZ7/00238.

Doktorant był stypendystą w ramach projektu pt.: „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej.

Część wyników została opublikowana i przedstawiona na konferencjach naukowych:

1. Kryjewski M., Nowak M., Kasprzycki P., Fita P., Radzewicz C., Gośliński T., Mielcarek J., *Synthesis and photochemical properties of unsymmetrical phthalocyanine bearing two 1-adamantylsulfanyl groups at adjacent peripheral positions*. Inorg. Chem. Commun. 2013, 27, 56-59.

IF 2,016 punkty MNiSW – 25

2. Kryjewski M., Tykarska E., Gdaniec M., Gośliński T., Mielcarek J. „*Synthesis and photochemical properties of novel porphyrazine bearing 2-adamantyl-5-phenylpyrrolyl substituents*” 7th Polish-German Symposium on Pharmaceutical Sciences. Gdańsk, 24-25.05.2013, P-167

Autor otrzymał nagrodę za najlepszą prezentację posteru.

3. Kryjewski M., Nowak M., Gośliński T., Mielcarek J. *Continuous-flow photoreactor packed with magnesium(II) 2,3-bis(1-adamantylsulfanyl)phthalocyanine immobilized on silica*. 15th JCF-Frühjahrssymposium. Berlin, 6-9.03.2013, P-143

4. Kryjewski M., Nowak M., Kasprzycki P., Fita P., Radzewicz C., Gośliński T., Mielcarek J., *Badania fotochemiczne i ocena oddziaływań z cyklodekstrynami magnez(II)-2,3-bis(1-adamantylosulfanylo)ftalocyjaniny*. I Międzynarodowa Konferencja Naukowa Oxygenalia "Tlen pierwiastkiem życia". Poznań, 26.10.2012, P 99-100

5. Kryjewski M., Nowak M., Kasprzycki P., Fita P., Radzewicz C., Gośliński T., Mielcarek J., *Synthesis and photochemical properties of unsymmetrical phthalocyanine bearing two 1-adamantylsulfanyl groups at adjacent peripheral positions*. Vth Konwersatorium Chemii Medycznej. Lublin, 13-15.09.2012.P-29

6. Kryjewski M., Nowak M., Gośliński T., Mielcarek J., 2011, *Synthesis and photophysical properties of phthalocyanine possessing adamantanylsulfanyl substituent*. IV Konwersatorium Chemii Medycznej. Lublin 8-10.09.2011, P-261

Praca została wykonana we współpracy z:

- Katedrą i Zakładem Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – w zakresie przeprowadzenia syntez związków
- Instytutem Fizyki Doświadczalnej Uniwersytetu Warszawskiego – w zakresie badań zaników fluorescencji otrzymanych porfirynoidów
- Instytutem Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu – w zakresie spektroskopii NMR
- Rega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit Leuven (Belgia) – w zakresie badań aktywności przeciwnowotworowej na liniach komórkowych otrzymanych porfirynoidów
- Zakładem Chemii Ogólnej i Analitycznej Politechniki Poznańskiej – w zakresie badań spektroelektrochemicznych
- Katedrą i Zakładem Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – w zakresie badań mikrobiologicznych otrzymanych porfirynoidów

*Pani Profesor **Jadwidze Mielcarek** składam serdeczne podziękowania za dużą życzliwość i okazaną pomoc oraz wszelkie porady i konsultacje udzielone w trakcie wykonywania pracy*

*Panu Profesorowi **Zenonowi Kokotowi** serdecznie dziękuję za umożliwienie wykonania pracy w Katedrze i Zakładzie Chemii Ogólnej i Nieorganicznej*

*Panu Doktorowi habilitowanemu **Tomaszowi Goślińskiemu** serdecznie dziękuję za cenne dyskusje i wsparcie udzielane w trakcie wykonywania pracy*

*Pani Profesor **Marii Gdaniec** i Pani Doktor **Ewie Tykarskiej** dziękuję za udostępnienie wyników analizy rentgenostrukturalnej*

*Pani Profesor **Zofii Gdaniec** i Pani Magister **Annie Teubert** dziękuję za udostępnienie wyników NMR*

*Panu Doktorowi **Piotrowi Fita** i Panu Magistrowi **Piotrowi Kasprzyckiemu** dziękuję za udostępnienie wyników badań zaniku fluorescencji*

*Pani Profesor **Marzenie Gajęckiej** dziękuję za umożliwienie wykonania badań mikrobiologicznych w Katedrze i Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej*

*Pani Doktor **Jolancie Długaszewskiej** i Pani **Magdalenie Ratajczak** serdecznie dziękuję za pomoc w przeprowadzeniu badań mikrobiologicznych oraz interpretacji wyników tych badań*

*Panu Profesorowi **Janowi Balzariniemu** i Pani **Lizette Van Berckelaer** dziękuję za umożliwienie i pomoc w przeprowadzeniu badań biologicznych i interpretacji wyników tych badań*

*Panu Doktorowi habilitowanemu **Grzegorzowi Milczarkowi** i Panu Magistrowi **Tomaszowi Rębisowi** dziękuję za pomoc przy wykonaniu pomiarów cyklicznej voltamperometrii i interpretacji wyników badań*

*Panu Profesorowi **Jackowi Gapińskiemu** i Panu Profesorowi **Adamowi Patkowskiemu** dziękuję za pomoc w przeprowadzeniu charakterystyki liposomów*

*Panu Magistrowi **Jarosławowi Piskorzowi** dziękuję za pomoc przy otrzymaniu liposomów*

Moim Rodzicom

Karolinie

WYKAZ SKRÓTÓW

Chol	- cholesterol
COSY	- (ang. <i>Corelation Spectroscopy</i>) – homojądrowa spektroskopia korelacyjna, wchodząca w zakres technik 2D NMR
DBU	- 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DMF	- N,N-dimetyloformamid
DMSO	- dimetylosulfotlenek
DOTAP	- chlorek N-[1-(2,3-dioleoiloksy)propylo]-N,N,N-trimetyloamoniowy
DPBF	- 1,3-difenyloizobenzofuran
ES	- (ang. <i>Electrospray Ionization</i>)
HMBC	- (ang. <i>Heteronuclear Multibond Correlation</i>) – heterojądrowa spektroskopia korelacyjna, badająca oddziaływania przez dwa lub więcej wiązań
HOMO	- (ang. <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>) – najwyższy zajęty orbital molekularny
HPLC	- (ang. High Performance Liquid Chromatography) - wysokosprawna chromatografia cieczowa
HSQC	- (ang. <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>) – heterojądrowa spektroskopia korelacyjna badająca oddziaływania sąsiednich atomów
LUMO	- (ang. <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>) – najniższy wolny orbital molekularny
MS	- (ang. <i>mass spectrometry</i>) – spektrometria mas
MALDI	- (ang. <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>) - desorpcja laserowa z udziałem matrycy
NMR	- (ang. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>) jądrowy rezonans magnetyczny
PM-β-CD	- per-O-metylowana β-cyklodekstryna
PG	- L-α-fosfatydylo-DL glicerol
PDT	- (ang. <i>Photodynamic Therapy</i>) - terapia fotodynamiczna
POPC	- 1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfocholina
RFT	- reaktywne formy tlenu
THF	- tetrahydrofuran
TPPS	- 5,10,15,20-tetrakis(4'-sulfofenylo)porfiryna
TLC	- (ang. <i>Thin Layer Chromatography</i>) – chromatografia cienkowarstwowa
Tt.	- temperatura topnienia
UV-Vis	spektroskopia w zakresie światła ultrafioletowego i widzialnego

Spis treści

I	WSTĘP	1
II	CEL PRACY	4
III	CZEŚĆ LITERATUROWA.....	6
III.1	Wprowadzenie do porfirynoidów	6
III.2	Reakcja fotodynamiczna jako podstawa terapii fotodynamicznej	7
III.3	Leki zawierające w cząsteczce grupę adamantylową stosowane klinicznie	9
III.4	Koniugaty ftalocyjanin z adamantanem	10
III.5	Kompleksy inkluzyjne i koniugaty cyklodekstryn z porfirynoidami	13
III.5.1	Cyklodekstryny w chemii supramolekularnej	13
III.5.2	Naśladowanie enzymów – biomimetyka.....	14
III.5.3	Procesy biomimetyczne pochodnych hemoglobiny	20
III.5.4	Transfer energii w układach antenowych.....	24
III.5.5	Terapia fotodynamiczna	26
III.5.6	Rozpad kompleksów porfirynoidów z cyklodekstrynami pod wpływem światła.....	33
IV	WYNIKI I DYSKUSJA	38
IV.1	Synteza i charakterystyka ftalocyjanin posiadających ugrupowanie 2-(1-adamantylo)etoksyłowe w pozycji nieperyferyjnej.....	38
IV.2	Synteza i charakterystyka ftalocyjanin posiadających ugrupowanie 1-adamantylosulfanyłowe w pozycji nieperyferyjnej wraz z badaniami fotochemicznymi	45
IV.3	Synteza i charakterystyka ftalocyjanin posiadających ugrupowanie 1-adamantylosulfanyłowe w pozycji peryferyjnej wraz z badaniami fotochemicznymi i biologicznymi.....	53
IV.4	Synteza i charakterystyka porfirazyny posiadającej ugrupowanie 2-(1-adamantylo)-5-fenilo-1 <i>H</i> -pirolilowe wraz z badaniami fotochemicznymi i biologicznymi	62
V	WNIOSKI.....	78
VI	CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	80
VI.1	Uwagi ogólne	80
VI.2	Stosowane rozpuszczalniki i reagenty.....	82
VI.3	Szczegółowe przepisy preparatywne otrzymanych związków	84
VI.3.1	Synteza ftalocyjanin z podstawnikiem 2-(1-adamantylo)etoksyłowym w położeniu nieperyferyjnym.....	84
VI.3.2	Synteza ftalocyjanin z podstawnikiem 1-adamantylosulfanyłowym w pozycji nieperyferyjnej.....	85

VI.3.3 Synteza ftalocyjanin z podstawnikiem 1-adamantylosulfanylowym w pozycji nieperyferyjnej.....	87
VI.3.4 Synteza porfirazyn z podstawnikiem 2-(1-adamantylo)-5-fenylo-1 <i>H</i> -pirolilowym	88
VI.4 Metodyka badań solwatacyjnych i generowanie tlenu singletowego	90
VI.5 Metodyka badania fotodegradacji	91
VI.6 Pomiary fluorescencji.....	91
VI.7 Pomiary elektrochemiczne	92
VI.8 Otrzymywanie liposomów	92
VI.9 Metodyka badań mikrobiologicznych	93
VI.10 Metodyka badań biologicznych ukierunkowanych przeciwko komórkom nowotworowym.....	94
VII STRESZCZENIE	95
VIII ABSTRACT	97
IX SPIS RYCIN, SCHEMATÓW I TABEL.....	99
X PIŚMIENNICTWO	103
XI SUPLEMENT.....	113

I WSTĘP

W dobie wzmożonej walki z chorobami prowadzi się intensywne badania, zmierzające do opracowania leków wykorzystujących nowe mechanizmy działania. Problem dotyczy w szczególności chorób nowotworowych oraz zakażeń bakteryjnych, wirusowych i grzybiczych. Coraz więcej uwagi poświęca się metodom leczenia, które mogą stanowić uzupełnienie tradycyjnie stosowanej farmakoterapii, chirurgii i radioterapii. W tym aspekcie, obok leków o działaniu receptorowym, biotechnologicznym, szczególnie cenne mogą okazać się posiadające zupełnie odmienny punkt uchwytu, bo działające w oparciu o mechanizm fizyko-chemiczny. Aktywność fotosensybilizatorów warunkowana jest mechanizmem reakcji fotodynamicznej, która jest podstawą terapii fotodynamicznej.

Szczególne perspektywy dla potrzeb terapii fotodynamicznej, wydają się stwarzać związki z grupy makrocykli porfirynoidowych. Ich struktura wywodzi się według Vogel'a z Sondheimer'owego [18]annulenu [1]. Wśród tej grupy makrocykli można wyróżnić wiele odrębnych podgrup, różniących się liczbą i sposobem połączenia pierścieni pirolowych. W strukturze porfirynoidów występują najczęściej cztery pierścienie pirolowe. Budowa porfiryn została po raz pierwszy określona w 1912 roku przez Wiliama Küster'a [2]. Od tamtego czasu obserwuje się intensywny rozwój badań w zakresie syntezy, modyfikacji, oceny fizyko-chemicznej oraz aktywności biologicznej makrocykli porfirynoidowych. Wiele nowych układów zostało w międzyczasie poznanych w sposób zupełnie przypadkowy, tak jak to miało miejsce w odniesieniu do ftalocyjanin otrzymanych w 1928 r. w fabryce *Scottish Dyes Ltd.* [2,3]. Porfirynoidy szybko stały się ważną i intensywnie rozwijaną grupą heterocykli, a informacje na ich temat znalazły się w wielu akademickich podręcznikach chemii, licznych monografiach naukowych, doniesieniach na konferencjach, wiodących czasopismach naukowych, a także czasopismach poświęconych wyłącznie ich tematyce, jak np. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*.

Największą grupę porfirynoidów stanowią pochodne (i) porfiryny, które występują naturalnie w przyrodzie np. hem - uczestniczący w transporcie tlenu, cytochrom C - biorący udział w metabolizmie ksenobiotyków, (ii) chloryny np. chlorofil i bakteriochlorofil – związki o dużym znaczeniu w procesach fotosyntezy oraz (iii) koryny np. witamina B₁₂ - biorąca udział w reakcjach biochemicznych [4]. Otrzymywane są także syntetyczne pochodne, które można traktować jako układy wywodzące się od porfiryny

i poddane różnorodnym procesom modyfikacji, jak np. podstawienie mostków metinowych, kontrakcję lub rozbudowę pierścienia. W ten sposób otrzymano m.in. odwrócone porfiryny, subftalocyjaniny, ftalocyjaniny, porfirazyny, norftalocyjaniny, korolazyny, teksafiryny, szafiryny [5,6].

Zasadniczym elementem odróżniającym tetraazaporfiryny (porfirazyny i ftalocyjaniny) od porfiryn jest pozycja *mezo*, zawierająca mostki azametinowe w miejsce grup metinowych [6]. Porfirazyny składają się z czterech pierścieni pirolowych połączonych mostkami azametinowymi. Ftalocyjaniny zbudowane są podobnie, z tym że wspomniane mostki łączą pierścienie izoindolowe. Pomimo podobieństwa strukturalnego, różne porfirynoidy syntetyzowane są odmiennymi sposobami. Porfiryny najczęściej otrzymuje się poprzez kondensację pirolu z aldehydami (reakcja Rothemunda) [7], natomiast porfirazyny i ftalocyjaniny syntetyzuje się odpowiednio z maleonitryli i ftalonitryli w podwyższonej temperaturze z wykorzystaniem soli dwuwartościowego metalu (makrocyclizacja Linstead) [8].

Makrocycłe porfirazynowe i ftalocyjaninowe można modyfikować na wiele sposobów. Największą popularnością cieszą się reakcje polegające na zamianie kationu w rdzeniu i dobudowywaniu podstawników peryferyjnych. W rdzeniu makrocycłu znajdują się dwa protony grup aminowych (NH), które łatwo ulegają podstawieniu jonami metali. Ponadto można otrzymać różne pochodne np. poprzez wprowadzenie podstawników peryferyjnych, co prowadzi do analogów różniących się barwą. Ta właściwość jest wykorzystywana w przemyśle barwników, gdyż uzyskiwane związki są bardzo stabilne termicznie i fotochemicznie oraz nierozpuszczalne w większości rozpuszczalników [9–11]. Ponadto otrzymywane związki posiadają unikatowe właściwości spektroskopowe (wysoki molowy współczynnik absorpcji), charakteryzują się luminescencją (fluorescencja, fosforescencja), właściwościami magnetycznymi (para- i diamagnetyzm), fotoprzewodnictwem i aktywnością powierzchniową [2]. Porfirynoidy stanowią więc ważną grupę związków, zarówno ze względu na rolę, jaką pełnią w organizmach żywych, jak i możliwe zastosowania w przemyśle, a ostatnio nanotechnologii [12]. Stwierdzono, że dzięki oddziaływaniu porfirynoidów z jonami metali, mogą tworzyć się również nowe struktury samoporzadkujące się i samoorganizujące, o potencjalnym zastosowaniu w nanotechnologii [13]. Związki z tej grupy stosuje się m.in. w sensorach zapachu, ogniwach słonecznych, fototranzystorach, katalizatorach, barwnikach oraz materiałach optycznych [14]. Reasumując, można

stwierdzić, że duża część badań dotyczących porfirynoidów wynika z faktu, że wiele pełni ważną rolę w przyrodzie, a część znalazła praktyczne zastosowanie w życiu codziennym.

Rosnące znaczenie porfirynoidów w medycynie, wynika z coraz częstszego zastosowania w terapii fotodynamicznej nowotworów (ang. *photodynamic therapy*, PDT), diagnostyce fotodynamicznej (ang. *photodynamic diagnosis*, PDD) oraz terapii fotodynamicznej skierowanej przeciw drobnoustrojom (ang. *photodynamic antimicrobial chemotherapy*, PACT). Obecnie w terapii PDT stosowane są powszechnie cztery fotosensybilizatory porfirynoidowe (w Stanach Zjednoczonych trzy), a większa liczba znajduje się w badaniach klinicznych. Niezwykle ważne, zwłaszcza w kontekście rosnącej w ostatnich latach liczby szczepów bakterii opornych na antybiotyki, w szczególności metycylinoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* (MRSA) oraz wankomycynoopornych szczepów *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* (VREF), wydaje się również zastosowanie porfirynoidów w terapii fotodynamicznej skierowanej przeciw mikroorganizmom, zarówno bakteriom, wirusom, grzybom, jak i pierwotniakom [15–17].

Pochodne adamantanu podstawione grupą aminową, stosuje się już od kilkudziesięciu lat w leczeniu grypy wywołanej wirusem typu A. Grupy adamantylowe okazały się potencjalnymi nośnikami leków przeciwdrgawkowych i przeciwnowotworowych. Wciąż duża zachorowalność i śmiertelność na grype, izolowanie form wirusa groźnych dla człowieka i zwierząt, skomplikowane powikłania pogrypowe implikują poszukiwania skutecznego leku i konieczność opracowywania w każdym sezonie nowych szczepionek, co sprzyja zainteresowaniu pochodnymi adamantanu [18–21].

Otrzymywanie koniugatów adamantanu ze związkami należącymi do innych grup terapeutycznych, wydaje się jednym ze sposobów potęgowania ich wzajemnej aktywności, co udowodniono dla koniugatów 4-tiazolidynowo-adamantanowych, wykazujących wzmożoną aktywność przeciwwirusową [22,23]. Znane z literatury koniugaty ftalocyjaninowo-adamantylowe, charakteryzują się silnie batochromowo przesuniętymi maksimami absorpcji, co ma istotne znaczenie z punktu widzenia potencjalnych zastosowań w PDT [24]. Wydaje się, że będące przedmiotem dysertacji doktorskiej synteza koniugatów porfirynoidowo-adamantylowych, stwarza szanse wzbogacenia tych potencjalnie aktywnych fotouczulaczy, w nowe właściwości fizykochemiczne użyteczne z farmakologicznego i farmakokinetycznego punktu widzenia.

II CEL PRACY

Brak skutecznej terapii przeciwnowotworowej pozostaje dla medycyny ciągle aktualnym wyzwaniem. Z tego względu PDT jest jedną z najintensywniej rozwijających się metod leczenia we współczesnej onkologii, zarówno w leczeniu paliatywnym, jak i w pierwotnym. Jednym z warunków skutecznej terapii oraz diagnostyki fotodynamicznej, jest posiadanie odpowiedniego fotouczulacza. Ze względu jednak na ogromne zróżnicowanie występujących jednostek chorobowych, dotychczas nie otrzymano fotosensybilizatora o uniwersalnym zastosowaniu. Z tego względu wciąż prowadzone są badania, których celem jest synteza nowych fotouczulaczy o odpowiednich właściwościach fotofizycznych, wykazujących większą selektywność, a tym samym bezpieczeństwo stosowania. Przegląd piśmiennictwa dotyczący aktualnego stanu badań na temat PDT, potwierdza, że poszukiwania idealnych fotouczulaczy, są bardzo często prowadzone w grupie metalowanych porfirynoidów, posiadających w centrum cząsteczki jony metali. Ze względu na znaczne możliwości zastosowania – w ostatnim czasie – podejmowane są próby zwiększenia skuteczności działania fotouczulaczy, poprzez projektowanie nowych porfirynoidów, szczególnie z grupy ftalocyjanin i porfirazyn, a także opracowanie odpowiednich formułacji.

W ramach niniejszej pracy, zaplanowano otrzymanie na drodze syntezy chemicznej nowych porfirynoidów z grupy porfirazyn i ftalocyjanin, posiadających podstawniki adamantylove w części peryferyjnej. Założono, że sprawdzenie przydatności dla potrzeb terapii fotodynamicznej, zostanie przeprowadzone poprzez szczegółową ocenę wybranych parametrów: (i) fotofizycznych, w tym solwatochromowych i właściwości emisyjnych, oraz (ii) fotochemicznych, takich jak zdolność generowania tlenu singletowego i ocenę trwałości fotochemicznej.

Uwzględniając dotychczasowe doniesienia piśmiennictwa, w ramach niniejszej pracy ustalono przeprowadzenie następującego programu badań:

1. Opracowanie syntezy i charakterystyka ftalocyjanin z ugrupowaniem 2-(1-adamantylo)etoksylowym
2. Opracowanie syntezy i charakterystyka ftalocyjanin z ugrupowaniem 1-adamantylosulfanylowym

3. Opracowanie syntezy i charakterystyka porfirazyn posiadających rozbudowane podstawniki 2-(1-adamantylo)-5-fenyl-1*H*-pirolilowe i dimetyloaminowe
4. Określenie właściwości emisyjnych i absorpcyjnych otrzymanych ftalocyjanin i porfirazyny
5. Pomiar wydajności kwantowej generowania tlenu singletowego
6. Określenie podatności otrzymanych związków makrocyklicznych na fotorozkład
7. Zbadanie aktywności biologicznej otrzymanych makrocykli względem komórek nowotworowych i bakteryjnych

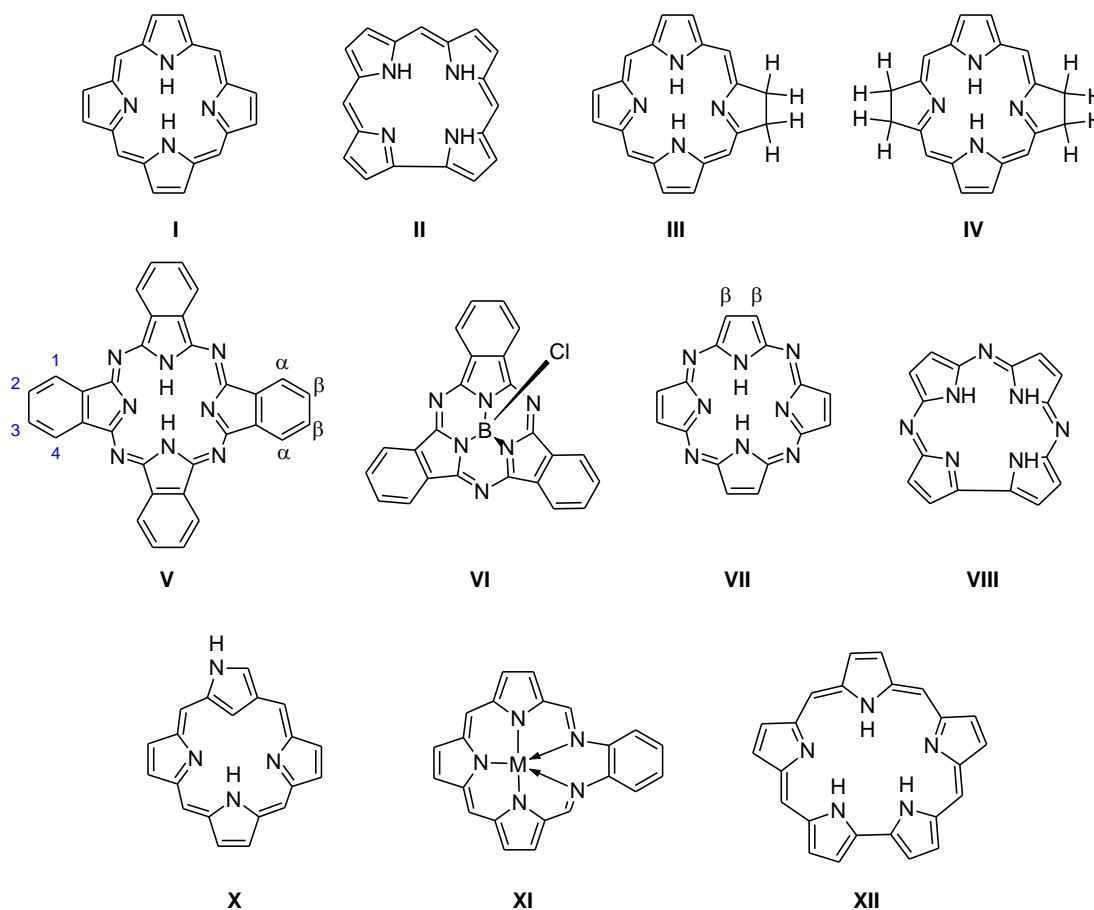
W części literaturowej pracy postanowiono podsumować aktualny stan wiedzy dotyczący:

1. koniugatów porfirazyn i ftalocyjanin z adamantanem;
2. stosowanych klinicznie leków, zawierających w cząsteczce ugrupowanie adamantyłowe;
3. kompleksów inkluzyjnych i koniugatów cyklodekstryn z porfirynoidami, wykazujących właściwości biomimetyczne, a także badanych jako fotosensybilizatory dla potrzeb terapii fotodynamicznej.

III CZĘŚĆ LITERATUROWA

III.1 Wprowadzenie do porfirynoidów

Porfirynoidy są naturalnymi lub syntetycznymi związkami makrocyklicznymi, zawierającymi w cząsteczce pierścienie pirolowe [5]. Do naturalnie występujących w przyrodzie należą porfiryny (I), które wchodzi m.in. w skład hemu biorącego udział w transporcie tlenu. W przyrodzie występują również: pochodne kobaltu (II), chloryny (III) i bakteriochloryny (IV). Syntetyczne makrocykle porfirynoidowe różnią się od porfiryny obecnością mostków azametynowych, liczbą oraz sposobem połączenia pierścieni pirolowych. Wśród syntetycznych porfirynoidów wyróżnia się m.in. aza-analogi porfiryny: ftalocyjaniny (V), subftalocyjaniny (VI), porfirazyny (VII), korolazyny (VIII), a ponadto odwrócone porfiryny (X), teksafiryny (XI), szafiryny (XII) (Ryc. 1).

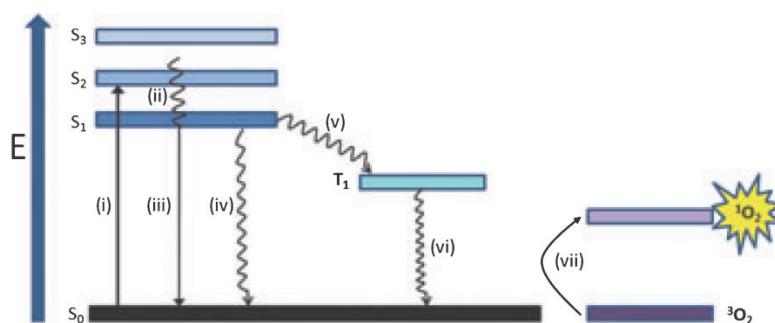


Ryc. 1. Wzory strukturalne naturalnych i syntetycznych porfirynoidów; M – jon metalu.

Badania dotyczące syntetycznych porfirynoidów dotyczą głównie możliwości ich zastosowania jako sztucznych enzymów [25] i katalizatorów, barwników w systemach fotowoltaicznych i związków o charakterze sensorów [9,10]. W medycynie porfirynoidy są wykorzystywane jako fotouczulacze w terapii fotodynamicznej.

III.2 Reakcja fotodynamiczna jako podstawa terapii fotodynamicznej

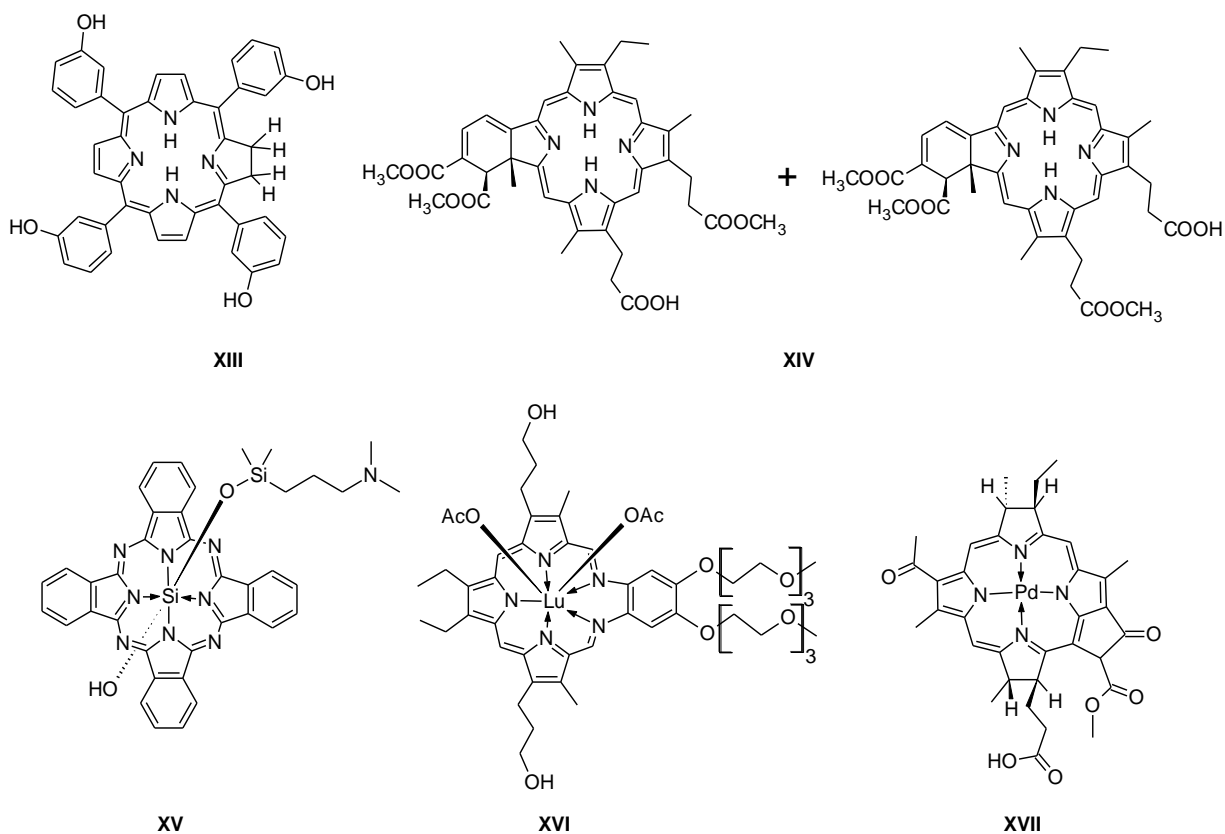
Terapia fotodynamiczna (ang. *photodynamic therapy*, PDT) jest budzącą nadzieję metodą leczenia takich stanów chorobowych jak nowotwory, degeneracja plamki żółtej, zakażenia bakteryjne. W PDT wykorzystuje się nietoksyczny fotouczulacz, który selektywnie gromadzi się w zmienionej tkance i po aktywacji światłem widzialnym ulega wzbudzeniu. Przeniesienie energii wzbudzenia na tlen trypletowy, powoduje jego aktywację do tlenu singletowego, który prowadzi do apoptotycznej lub nekrotycznej śmierci komórek [26,27].



Ryc. 2. Diagram Jabłońskiego przedstawiający możliwe procesy związane ze wzbudzeniem fotouczulacza; (i) wzbudzenie, (ii) konwersja wewnętrzna, (iii) przejście bezpromieniste, (iv) fluorescencja, (v) przejście międzysystemowe, (vi) fosforescencja, (vii) wzbudzenie tlenu do stanu singletowego.

Podstawą działania terapii fotodynamicznej jest szereg procesów, zachodzących w wyniku interakcji światła z fotouczulaczem, które schematycznie przedstawiono na **Ryc. 2** i określono mianem reakcji fotodynamicznej. Po absorpcji światła fotouczulacz ulega (i) wzbudzeniu ze stanu podstawowego S_0 do stanu singletowego S_1 . Wzbudzony fotouczulacz może powrócić do stanu podstawowego z równoczesną emisją światła (fluorescencja, iv) lub wydzieleniem ciepła w wyniku procesu bezpromienistego (iii), ale może też przejść do stanu trypletowego T_1 w wyniku przejścia międzysystemowego (v). Ze stanu T_1 fotouczulacz może powrócić do stanu S_0 z emisją fosforescencji (vi),

lub z przeniesieniem energii/elektronów na inne cząsteczki. Procesy zachodzące w PDT mogą przebiegać według mechanizmu I, w którym następuje przeniesienie elektronów z fotouczulacza na inne cząsteczki, m.in. lipid lub białko, a następnie dochodzi do wytworzenia form rodnikowych takich jak rodnik hydroksylowy OH^\cdot , czy anionrodnik nadadtlenkowy $\text{O}_2^{\cdot-}$. W mechanizmie II - następuje przeniesienie energii z fotouczulacza na cząsteczkę tlenu w podstawowym stanie trypletowym $^3\text{O}_2$, z wytworzeniem tlenu singletowego $^1\text{O}_2$, który uważa się za główny czynnik aktywny w terapii fotodynamicznej [28,29]. Niezależnie od mechanizmu powstawania reaktywnych form tlenu, dochodzi do uszkodzenia struktur komórkowych i śmierci komórki na drodze apoptozy bądź nekrozy. Wskazuje się również na ważną rolę miejscowych reakcji immunologicznych w zniszczeniu tkanki nowotworowej [30,31].

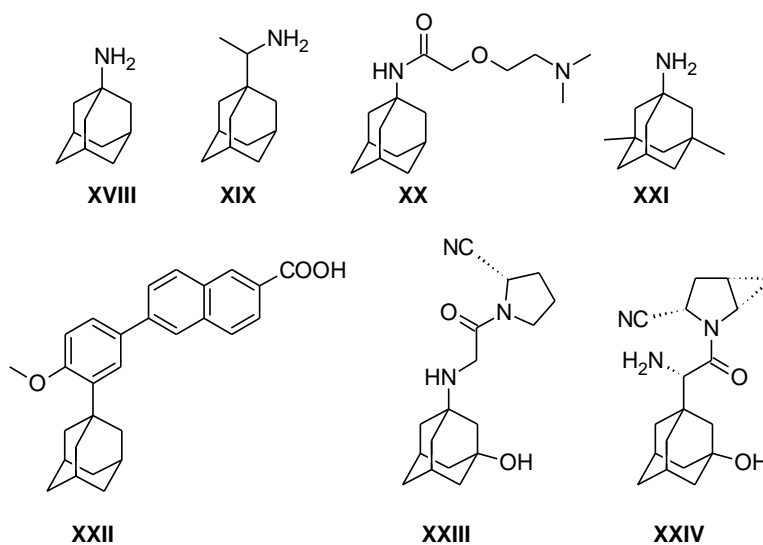


Ryc. 3. Fotouczulacze stosowane klinicznie oraz znajdujące się w badaniach klinicznych; temoporfina (Foscan®, **XIII**), werteporfiryna (Visudyne®, **XIV**). W badaniach klinicznych znajdują się ftalocyjanina Pc4 (**XV**), moteksafina lutetu (Lutex®, **XVI**) oraz padoporfina (Tookad®, **XVII**).

Stosowane klinicznie fotouczulacze z grupy porfirynoidów to m.in. temoporfina (Foscan®, **XIII**), werteporfiryna (Visudyne®, **XIV**). W badaniach klinicznych znajdują się obecnie m.in. ftalocyjanina Pc4 (**XV**), moteksafina lutetu (Lutex®, **XVI**) i padoporfina (Tookad®, **XVII**) (**Ryc. 3**).

Idealny fotouczulacz powinien być nietoksyczny, selektywnie gromadzić się w leczonej tkance i nie może powodować mutagenyzy. Powinien rozpuszczać się w wodzie (warunek umożliwiający podawanie dożylne), albo przenikać przez warstwę rogową skóry (po podaniu miejscowym). Powinien umożliwiać terapię w trybie ambulatoryjnym. Długość fali światła wykorzystywanego do wzbudzenia powinna być większa od 650 nm, gdyż promieniowanie o krótszych falach słabo penetruje tkanki, a ponadto jest absorbowane przez występujące w komórkach naturalne chromofory – hem, cytochromy. Natomiast po absorpcji światła powyżej 800 nm, stan trypletowy fotouczulacza ma zbyt niską energię, aby wzbudzić tlen do stanu singletowego [29,31].

III.3 Leki zawierające w cząsteczce grupę adamantylową stosowane klinicznie



Ryc. 4. Stosowane klinicznie leki (**XVIII-XXIV**) posiadające w cząsteczce podstawnik adamantylowy.

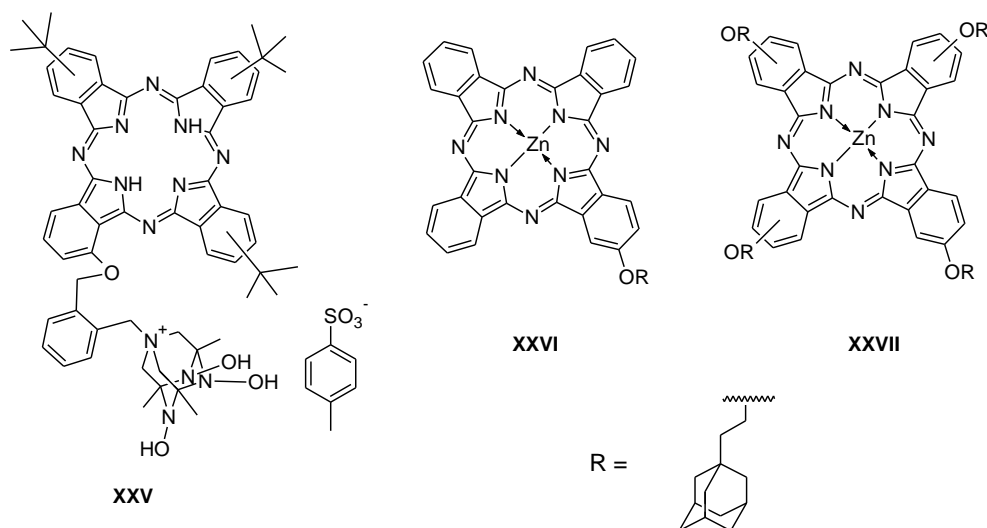
Grupa adamantylowa występuje w lekach stosowanych w takich stanach chorobowych jak [18,32]:

- infekcje wirusowe: amantadyna (Viregyt K®, **XVIII**, **Ryc. 4**), rimantadyna (Rimantin®, **XIX**), tromantadyna (Virus-Merz®, **XX**)
- choroba Parkinsona: amantadyna (Amantix®)

- choroba Alzheimera: memantyna (Ebixa®, **XXI**)
- trądzik różowaty: adapalen (Epiduo®, **XXII**)
- cukrzyca typu II: wildagliptyna (Galvus®, **XXIII**), saksagliptyna (Onglyza®, **XXIV**)

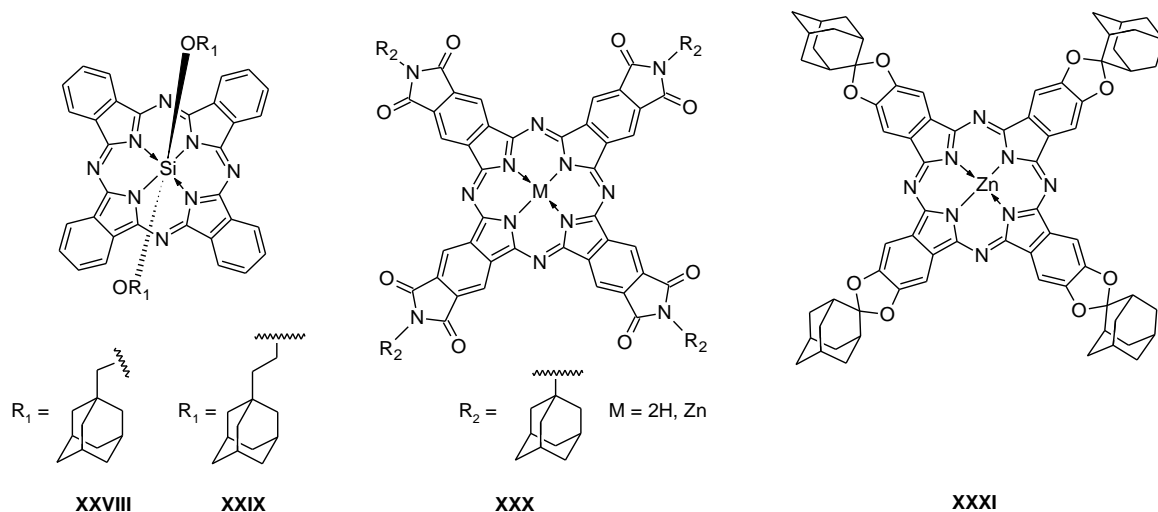
III.4 Koniugaty ftalocyjanin z adamantanem

Ftalocyjaniny zawierające podstawniki adamantylowe wykazują właściwości korzystne z punktu widzenia PDT, tj. wysoką fotostabilność, efektywne generowanie tlenu singletowego i brak tendencji do agregacji [33]. Jednym z ocenianych związków była ftalocyjanina podstawiona tetraazaadamantanem (**XXV**, **Ryc. 5**), którą poddano testom przeciwko wirusowi HIV [34]. Natomiast ftalocyjaniny cynkowe, posiadające jeden (**XXVI**) lub cztery (**XXVII**) podstawniki adamantyloetoksyłowe, były badane jako fotosensybilizatory *in vitro*. Jako modelowe komórki wybrano ludzkie eryocyty i obserwowano ich rozpad hemolityczny [35].



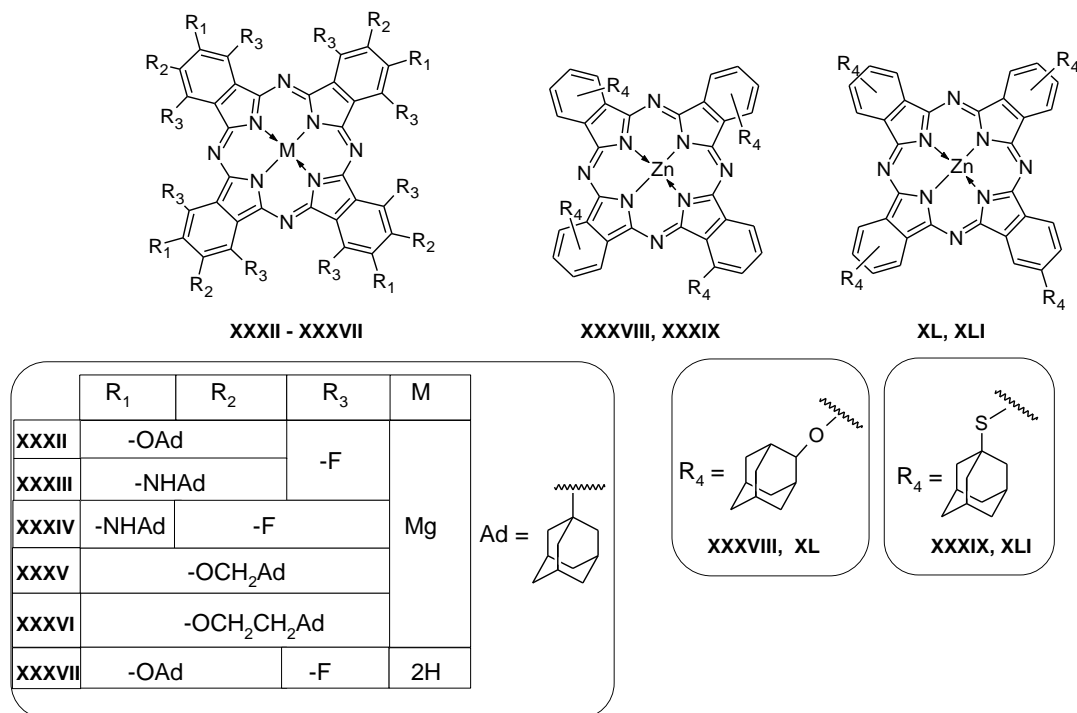
Ryc. 5. Ftalocyjaniny posiadające w strukturze ugrupowania tetraazaadamantyłowe i adamantyłowe **XXV** – **XXVII**.

Zespół badawczy Shen i wsp. uzyskał ftalocyjaniny **XXVIII** i **XXIX** zawierające centralnie wbudowany jon krzemu(IV), podstawiony grupami adamantyloetoksyłowymi lub adamantylometoksyłowymi [33] (**Ryc. 6**).



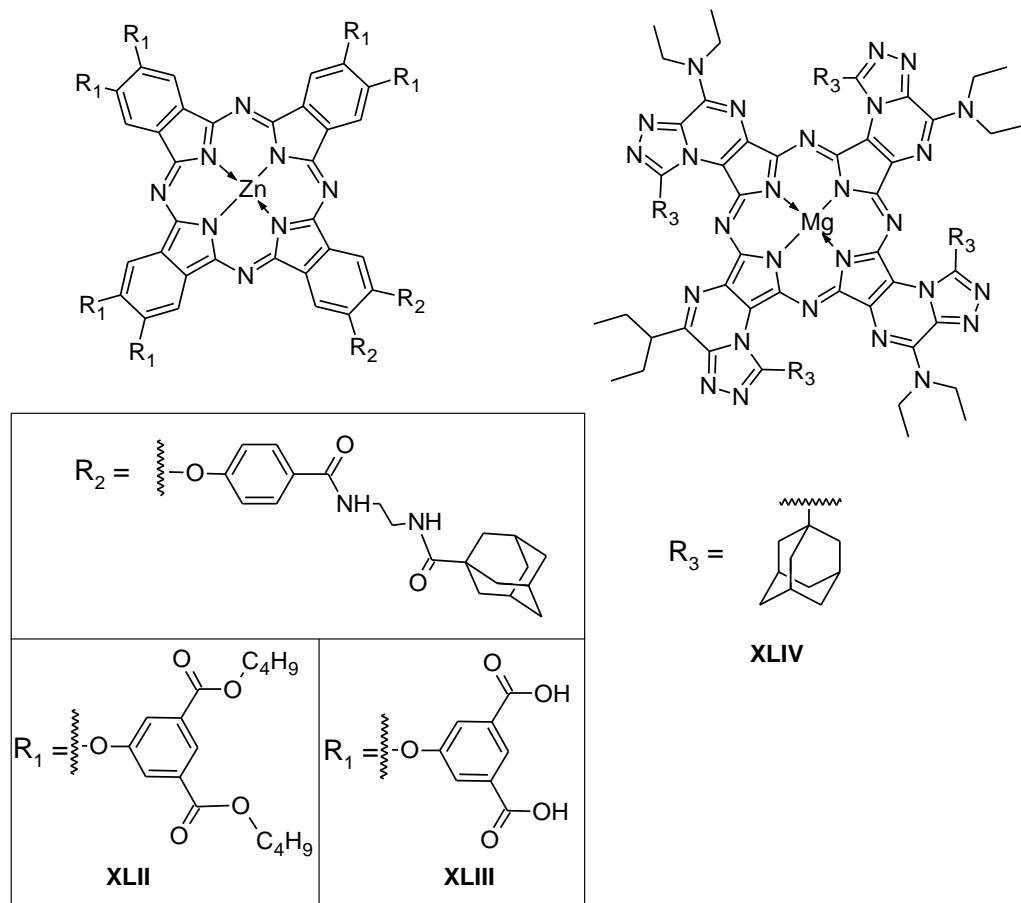
Ryc. 6. Ftalocyjaniny (**XXVIII-XXXI**) posiadające w strukturze grupy adamantylometoksyłowe, adamantylotoksyłowe jako podstawniki aksjalne i skoniugowane peryferyjne pierścienie zawierające grupę adamantylową.

Otrzymano również ftalocyjaniny posiadające skoniugowane pierścienie adamantanoimidowe (**XXX**) [36] lub adamantanoacetalowe (**XXXI**) [37]. Ftalocyjaniny podstawione pochodnymi adamantanu (**XXXII-XXXVII**) otrzymano w grupie badawczej Leznoff'a [24] (**Ryc. 7**).



Ryc. 7. Ftalocyjaniny (**XXXII-XLI**) zawierające ugrupowania adamantylowe jako podstawniki peryferyjne.

Natomiast Garcia Vior i wsp. otrzymali ftalocyjaniny z ugrupowaniami 2-adamantyloksylowymi (**XXXVIII**, **XL**) i 1-adamantylosulfanyłowymi (**XXXIX**, **XLI**) jako mieszaniny izomerów konstytucyjnych [38]. Związek **XLI** następnie został wbudowany w nanoemulsje [39] i liposomy [40]. Oceniono również wpływ przeprowadzonej modyfikacji na fotostabilność i wydajność generowania tlenu singletowego w nośnikach. Grupy adamantyłowe stanowią również fragment podstawników amidowych ftalocyjanin **XLII** i **XLIII**, otrzymanych przez Voskuhl i wsp. [41] (**Ryc. 8**). Bardzo ciekawy przypadek reprezentował związek **XLIV**, otrzymany przez Novakovą i wsp., który można rozpatrywać pod względem budowy jako azaftalocyjaninę, ale także jako porfirazynę ze skoniugowanymi pierścieniami pirazynowymi [42]. Jest to jednocześnie jedyny, odnotowany dotychczas w literaturze przykład porfirazyny, posiadającej ugrupowanie adamantyłowe.



Ryc. 8. Ftalocyjaniny (**XLII**, **XLIII**) i azaftalocyjanina (**XLIV**), zawierające ugrupowania adamantyłowe jako fragmenty rozbudowanych podstawników.

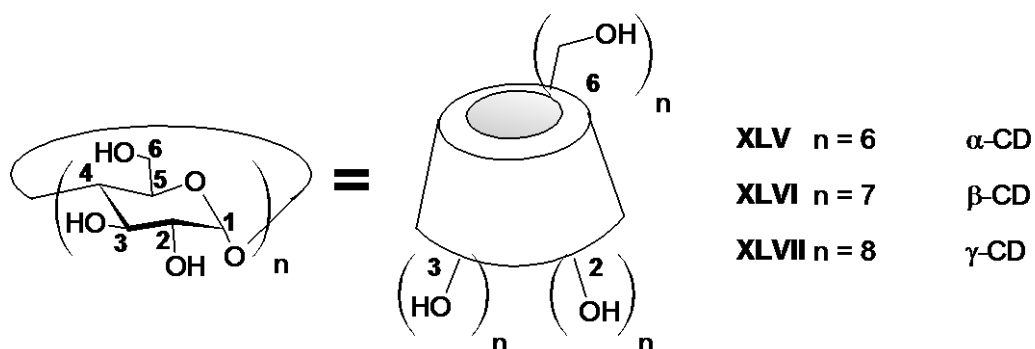
III.5 Kompleksy inkluzyjne i koniugaty cyklodekstryn z porfirynoidami

III.5.1 Cyklodekstryny w chemii supramolekularnej

Chemia supramolekularna to dział chemii zajmujący się strukturami „ponad cząsteczką”, a więc dużymi cząsteczkami złożonymi z mniejszych jednostek. Wykorzystuje cząsteczki jako składniki budulcowe, które oddziałują wzajemnie na zasadzie sił niewiążących, co wymusza „asocjację” cząsteczek. Wytworzone w ten sposób struktury, posiadają nowe często niezwykle właściwości, różne od sumy właściwości poszczególnych składników. Struktury supramolekularne pod względem budowy i funkcji, często przypominają naturalnie występujące cząsteczki, dlatego też są przedmiotem zainteresowania biomimetyki. Kluczowe procesy biologiczne, takie jak fotosynteza i transport tlenu, są zależne od złożonych, białkowych struktur zawierających cząsteczkę porfirynoidu. Tworzenie supramolekularnych struktur z wykorzystaniem porfiryn, wydaje się sposobem na uzyskanie materiałów o właściwościach nieosiągalnych innymi sposobami [13].

Jednymi z częściej wykorzystywanych w chemii supramolekularnej cząsteczek są cyklodekstryny (CD). Naturalne CD są cyklicznymi oligosacharydami, zawierającymi odpowiednio 6 (α -CD, **XLV**), 7 (β -CD, **XLVI**) lub 8 (γ -CD, **XLVII**) jednostek α -D-glukopiranozy, połączonych wiązaniami α -1,4-glikozydowymi (**Ryc. 9**). Cyklodekstryny mają kształt ściętego stożka o otwartych obu końcach. Szerszy z otworów stożka otoczony jest drugorzędowymi grupami hydroksylowymi, występującymi przy atomach węgla C2 i C3. Węższy otwór stożka otoczony jest bardziej polarnymi, pierwszorzędowymi grupami hydroksylowymi przy atomach węgla C6 glukozy. Wewnętrzne zagłębienie zawiera dwa pierścienie grup C-H, pomiędzy którymi znajdują się atomy tlenu wiązań glukopiranozowych. Rozpuszczalność CD w wodzie jest uwarunkowana obecnością grup -OH (przy atomach węgla C2, C3 i C6), a także wzajemnymi oddziaływaniami pomiędzy grupami hydroksylowymi sąsiednich jednostek glukozy. Obecność hydrofobowej wnęki umożliwia tworzenie kompleksów inkluzyjnych, a dzięki różnym rozmiarom wnęki, cyklodekstryny cechuje selektywność kompleksowania. Cyklodekstryny są związkami nietoksycznymi i niewchłanianymi w górnym odcinku przewodu pokarmowego. Cyklodekstryny – zarówno natywne jak i poddawane selektywnym modyfikacjom chemicznym – są wykorzystywane jako nośniki substancji leczniczych o ograniczonej rozpuszczalności w wodzie [43,44]. Ponadto modyfikowane

cyklodestryny są badane jako modele enzymów, z uwagi na hydrofobową wnękę wykazującą podobieństwo do miejsca aktywnego enzymu [45].

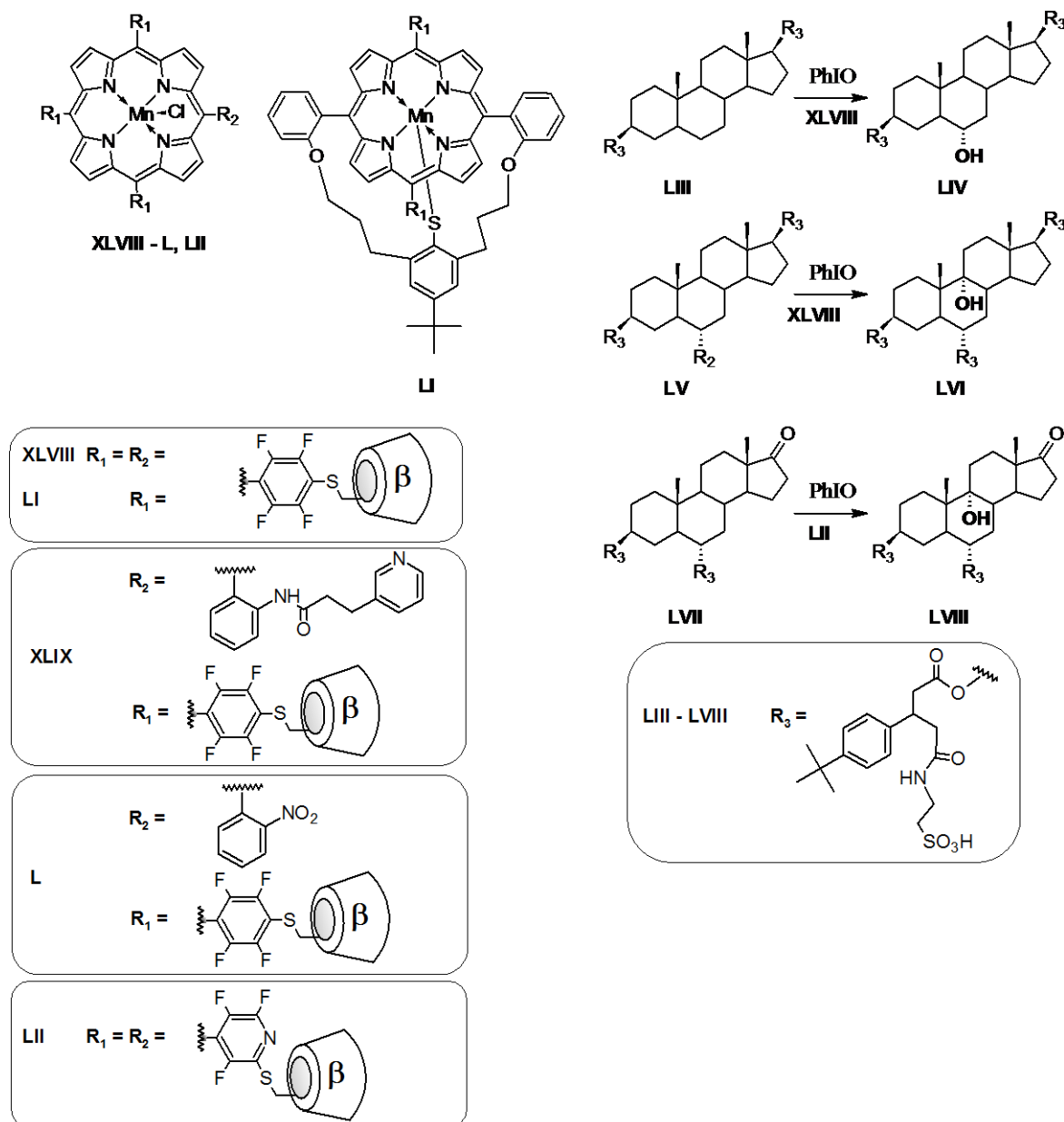


Ryc. 9. Cyklodekstryny (CD); α -CD XLV, β -CD XLVI, γ -CD XLVII.

III.5.2 Naśladowanie enzymów – biomimetyka

Zastosowanie metod syntezy chemicznej jest zależne od budowy cząsteczki, a szczególnie obecności określonych grup funkcyjnych. W celu uzyskania chemoselektywności reakcji często stosuje się grupy ochronne. Chemia biomimetyczna pozwala na naśladowanie naturalnej aktywności enzymów. Prowadzi to do lepszego zrozumienia mechanizmów reakcji enzymatycznych, otrzymywania dużych ilości metabolitów oraz prowadzenia syntezy chemicznej bez konieczności stosowania grup ochronnych.

Hem, będący kompleksem żelaza(II) z pochodną porfiryny – protoporfiryną IX, stanowi grupę prostetyczną tak ważnych białek jak hemoglobina, mioglobina, oksydaza cytochromu c, cytochrom P450. Funkcje tych cząsteczek zależą od apoenzymu, powodującego, że hem pełni określone funkcje. Cytochrom P450 (CYP450) stanowi jeden z enzymów o aktywności monooksygenaz, którego funkcją biologiczną w organizmie jest hydroksylacja takich cząsteczek jak hormony sterydowe, leki i inne ksenobiotyki. Hydroksylacja ksenobiotyków przez CYP450, nie zależy od obecności w utlenianych cząsteczkach grup funkcyjnych, jest możliwa w obecności wiązań podwójnych, a ponadto nie prowadzi do utlenienia grup hydroksylowych, już obecnych w cząsteczkach.



Ryc. 10. Porfiryny o aktywności biomimetycznej (**XLVIII-LII**) katalizujące reakcję hydroksylacji steroidów (**LIII-LVIII**).

Zespół badawczy Breslowa i wsp. otrzymał na drodze syntezy chemicznej serię analogów cytochromu P450 (**XLVIII - LII**), poprzez kowalencyjne przyłączenie od dwóch do czterech cząsteczek β -CD, do porfiryn zawierających jony manganu(III) [46–50] (**Ryc. 10**). Autorzy ocenili aktywność katalityczną porfiryn **XLVIII - LII** w reakcjach hydroksylacji steroidów. Głównym celem badań było zlokalizowanie miejsca hydroksylacji steroidu, poprzez kontrolę geometrii połączenia substrat-katalizator. Dodatkowo oceniono efektywność katalizatorów, a analizowanym parametrem była liczba obrotów katalizatora (ilość cykli katalitycznych), czyli stosunek liczby moli substratu

ulegającego reakcji w odniesieniu do liczby moli katalizatora. Substratem dla reakcji biomimetycznej była pochodna estrowa androstan-3,17-diolu (**LIII**), zawierająca ugrupowanie *tert*-butylofenylowe jako grupę wiążącą się z wnęką β -CD. W wyniku reakcji utlenienia jodozobenzenem, z wykorzystaniem **XLVIII** jako katalizatora, uzyskano produkt **LIV**, zawierający grupę hydroksylową w pozycji C-6 cząsteczki steroidu. Nie zaobserwowano tworzenia się ketonu, ani zachodzenia innych reakcji ubocznych. Selektyność hydroksylacji zapewniło wzajemne ułożenie substratu i katalizatora w kompleksie inkluzyjnym. Zmiana struktury katalizatora, mająca na celu jego ochronę przed utlenieniem, spowodowała wzrost liczby obrotów katalitycznych z 187 dla katalizatora **XLVIII**, do 2000 dla katalizatora **XLIX** i 3000 dla **L** [46]. Katalizator **LI** posiadający w strukturze ligand tiolowy, zajmujący piątą pozycję koordynacyjną jonu manganu(III), był aktywny z użyciem łagodnych utleniaczy (nadtlenek wodoru, chloran(I) sodu), bez konieczności stosowania jodozobenzenu [48].

Hydroksylacja steroidów w pozycji C-9 umożliwia otrzymanie w wyniku dalszych modyfikacji 9-fluorokortykosteroidów, związków ważnych z punktu widzenia medycznego. Powyższą reakcję hydroksylacji wykorzystali Yang i Breslow, wprowadzając grupę -OH do pozycji C-9 związku **LV**, zawierającego trzy podstawniki wiążące się z β -CD. Dodatkowa grupa wiążąca w porównaniu z wcześniej omówioną pochodną androstanu **LIII**, wpływa na inne ułożenie substratu w kompleksie, a to warunkuje zmianę miejsca hydroksylacji [49]. Breslow i wsp. uzyskali zwiększenie liczby obrotów katalizatora, stosując związek **LVII** z dwiema grupami wiążącymi. Jako katalizator wykorzystano porfiryne **LII**, posiadającą ugrupowanie β -CD związane z pierścieniem pirydylowym w pozycji *mezo* porfiryny [47].

Zespół Breslowa z powodzeniem wykorzystał katalizator **XLVIII** do wprowadzenia grupy hydroksylowej w pozycję C-15 steroidu. Natomiast zmianę preferowanego miejsca reaktywnego (C-15), osiągnięto stosując analog substratu **LIII**, posiadający inne grupy wiążące się z β -CD. Hydroksylacja w pozycji C-15 była procesem dominującym, ale nie uzyskano selektywności porównywalnej z poprzednimi przykładami [50].

β -Karoten **LXI** jest ważnym składnikiem diety, posiada właściwości antyoksydacyjne. W organizmach zwierzęcych β -karoten jest przekształcany w retinal **LXII** przez odpowiednią oksygenazę, posiadającą niehemowe jony żelaza w centrum aktywnym [51] (**Ryc. 11**).

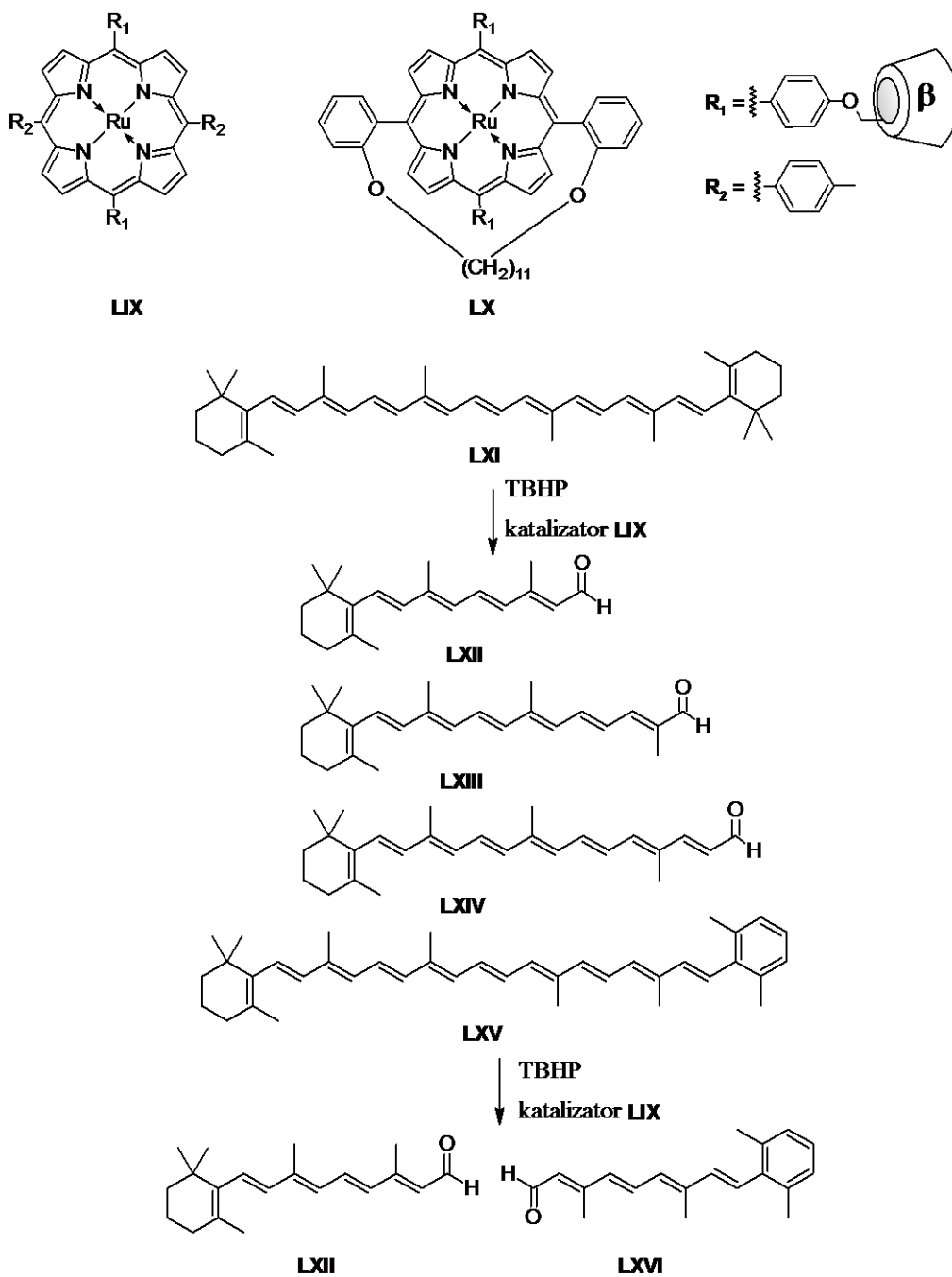
French i wsp. otrzymali porfiryne **LIX**, zawierającą dwie cząsteczki β -CD na przeciwległych pozycjach *mezo* i sprawdzili możliwość użycia do katalitycznego „cięcia” β -karotenu [52]. Reakcja zachodziła w obecności wodoronadtlenku *tert*-butylu jako utleniacza. W wyniku katalitycznego utlenienia oprócz retinalu **LXII**, otrzymywano również dwa inne apokarotenale **LXIII** i **LXIV**. Wyniki potwierdziły, że porfiryne **LIX** nie katalizowała utlenienia β -karotenu selektywnie. Aby wyjaśnić to zjawisko zaproponowano i przetestowano dwie hipotezy, w których założono, że:

(I) jednostki β -CD porfiryne **LIX** znajdują się w konformacji, w której karoten jest wiązany tylko przez jedno ugrupowanie β -CD

(II) karoten wiąże się z dwoma jednostkami β -CD porfiryne **LIX**, ale może się przemieszczać w obrębie ugrupowań β -CD, co umożliwia utlenienie innych niż centralne wiązania podwójne

Celem przetestowania hipotezy I otrzymano porfiryne **LX**, w której przeciwległe grupy fenyłowe połączono łańcuchem alkilowym, wymuszającym konformację, w której obie jednostki β -CD znajdują się po tej samej stronie płaszczyzny pierścienia porfiryneowego i są dostępne dla β -karotenu. W reakcji katalitycznego utlenienia z zastosowaniem porfiryne **LX** uzyskano mieszaninę produktów, co zaprzeczyło hipotezie I.

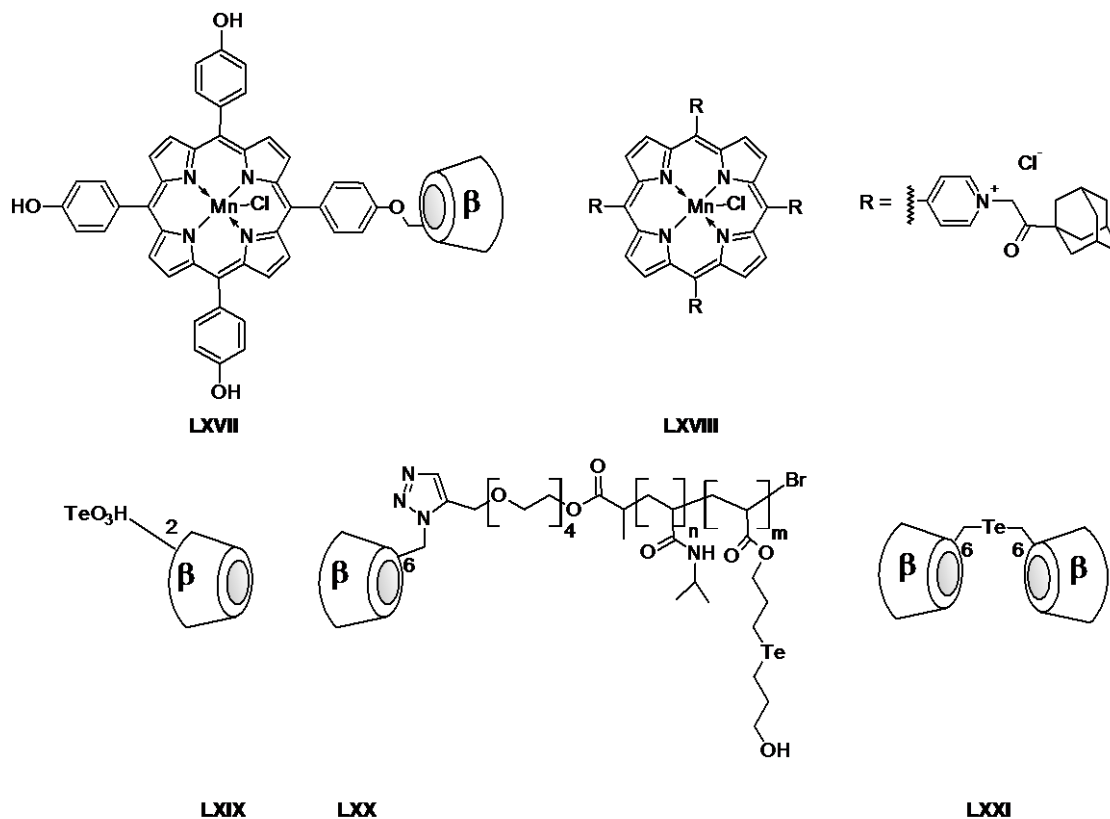
Aby przetestować hipotezę II, jako substrat dla reakcji biomimetycznej zastosowano analog karotenu **LXV**, w którym jedną z grup cykloheksenowych zastąpiono grupą 2,6-dimetylofenylową. Produktami reakcji biomimetycznej **LXV** z porfiryne **LIX** jako katalizatorem, były retinal **LXII** i aldehyd **LXVI**, co potwierdziło selektywną reakcję utlenienia, tylko centralnego wiązania podwójnego w analogu karotenu **LXV**. Przyczyny tej selektywności można się dopatrywać w silniejszym wiązaniu terminalnej grupy aromatycznej związku **LXV** do wnęki β -CD, w porównaniu do grupy cykloheksenowej, co stabilizuje powstający kompleks.



Ryc. 11. Porfiryny o aktywności katalitycznej (**LIX**, **LX**) i katalizowane przez nie procesy utlenienia karotenoidów (**LXI** do **LXII-LXIV**, **LXV** do **LXII** i **LXVII**).

Dysmutaza ponadtlenkowa (ang. *superoxide dismutase*, SOD), peroksydaza glutationu (ang. *glutathione peroxidase*, GPx) i katalaza są ważnymi enzymami chroniącymi komórki przed stresem oksydacyjnym. SOD katalizuje rozpad anionu ponadtlenkowego O_2^- do nadlenku wodoru H_2O_2 i molekularnego tlenu O_2 . Nadtlenek wodoru jest rozkładany na wodę i tlen przez katalazę lub do wody przez GPx, z wytworzeniem dimeru glutationu. Anion ponadtlenkowy silnie wpływa na fizjologię komórki, dlatego też sztuczne enzymy o

aktywności SOD cieszą się dużym zainteresowaniem [53]. Wśród często stosowanych biomimetycznych enzymów są organiczne kompleksy manganu(III). Zespół badawczy Oliveri'ego przyłączył kowalencyjnie β -CD do mangan(III) tetrakis(4-hydroksyfenylo)porfiryny, otrzymując związek **LXVII** (Ryc 12). W porównaniu z niemodyfikowaną porfiryną, **LXVII** wykazała 15-krotnie wyższą aktywność enzymatyczną, a ponadto była lepiej rozpuszczalna w wodzie [54].



Ryc. 12. Porfiryny (**LXVII** i **LXVIII**) o aktywności enzymatycznej dysmutazy ponadtlenkowej i cyklodekstryny (**LXIX-LXXI**) o aktywności peroksydazy glutationu.

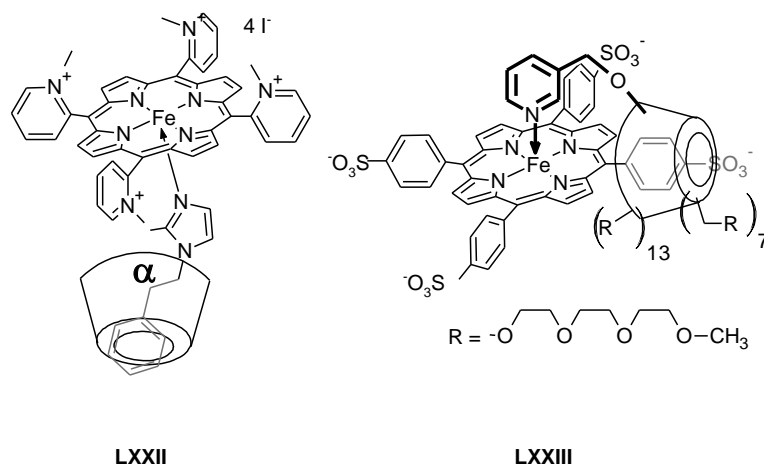
Zespół badawczy Yu i wsp. otrzymał supramolekularny kompleks, wykazujący zarówno aktywność SOD, jak i GPx [55]. Kompleks ten tworzyła porfiryna **LXVIII** zawierająca w centrum koordynacyjnym jon manganu(III), a w części peryferyjnej ugrupowania 1-(1-adamantylometylo)-4-pirydyniowe oraz β -CD modyfikowana kwasem tellurowym(IV) **LXIX** (Ryc. 12). Kompleks **LXVIII** z czterema cząsteczkami modyfikowanej β -CD **LXIX**, był stabilny z powodu silnego oddziaływania pomiędzy β -CD, a ugrupowaniem adamantyłowym. W otrzymanym kompleksie porfiryna odpowiadała za aktywność dysmutazy ponadtlenkowej i w porównaniu z naturalnym enzymem wykazała aktywność na poziomie 2,56%. Cyklodekstryna **LXIX** wykazywała aktywność

peroksydazy glutationu. Aktywność enzymatyczna otrzymanego kompleksu była 27 razy wyższa niż dla ebselenu, znanego związku o aktywności GPx [55]. W kolejnym badaniu β -CD zmodyfikowano chemicznie, przyłączając grupę poli(N-izopropylakrylamidową) zawierającą mostek tellurkowy, otrzymano związek **LXX**. Przyłączona grupa jest polimerem wykazującym odwracalne przejścia fazowe w wodzie, w odpowiedzi na zmiany temperatury. Supramolekularny kompleks porfiryny **LXVIII** i wspomnianej pochodnej **LXX**, posiadał biomimetyczną aktywność SOD i GPx. Ze względu na obecność ugrupowania polimerowego zarówno wielkość cząstek, jak i aktywność enzymatyczna była zależna od temperatury [56]. W kolejnym badaniu użyto dimeru β -CD **LXXI** zawierającego mostek tellurkowy. W wyniku oddziaływania z porfiryką **LXVIII**, otrzymano rozgałęziony supramolekularny polimer, który w porównaniu do wyjściowych składników użytych do syntezy, wykazywał wyższą aktywność GPx, a niższą SOD [57].

III.5.3 Procesy biomimetyczne pochodnych hemoglobiny

Wiązanie tlenu przez hem, stanowiący grupę prostetyczną hemoglobiny i mioglobiny, jest jednym z kluczowych procesów biologicznych. Pomimo, że za proces odpowiada hem, odpowiednia struktura białka hemo- i mioglobiny jest niezbędna, aby zapewnić wymaganą selektywność wiązania tlenu w porównaniu do tlenku węgla(II), a także zapobiegać tworzeniu się μ -okso dimerów, złożonych z porfiryn zawierających jony żelaza(II). Związki stanowiące funkcjonalne analogi powyższych białek, stanowią intensywny przedmiot badań i aby uzyskały status funkcjonalnych analogów hemoglobiny, muszą charakteryzować się odwracalnym wiązaniem tlenu, bez ubocznych procesów prowadzących np. do utlenienia jonów żelaza(II) do żelaza(III). Ponadto w badaniach uwzględnia się powinowactwo związków do tlenu i tlenku węgla(II). Warto zauważyć, że właściwości większości syntetycznych analogów hemoglobiny są oceniane w środowisku bezwodnym. Jak dotąd uzyskano zaledwie kilka związków odwracalnie wiążących tlen w środowisku wodnym [25]. Jednym z przykładów takiego zachowania jest jodek żelazo(II) tetrakis[2-(N-metylo)pirydynio]porfiryny, połączony z α -CD, za pomocą cząsteczki 2-metylo-1-(fenyloetylo)imidazolu. Część imidazolowa związku koordynuje jon żelaza(II) porfiryny, a fragment fenyloetylowy jest związany we wnęce α -CD. Otrzymany supramolekularny kompleks **LXXII**, odwracalnie wiązał O_2 w roztworze woda-dimetyloformamid (DMF) [58] (**Ryc. 13**). Inny model hemoproteiny (**LXXIII**) został skonstruowany z żelazo(II) 5,10,15,20-tetrakis(4'-sulfofenylo)porfiryny (Fe(II)TPPS) i β -CD modyfikowanej ugrupowaniami pirydylometylenowymi i łańcuchami

polieterowymi. Obecna w strukturze grupa pirydylowa koordynuje jon żelaza(II), a łańcuchy polieterowe (PEG) osłaniają powierzchnię pierścienia porfirynowego, chroniąc miejsce wiązania tlenu. Proces wiązania cząsteczek O₂ oraz CO był monitorowany spektrofotometrycznie, poprzez obserwację charakterystycznego przesunięcia pasma Soreta [59].



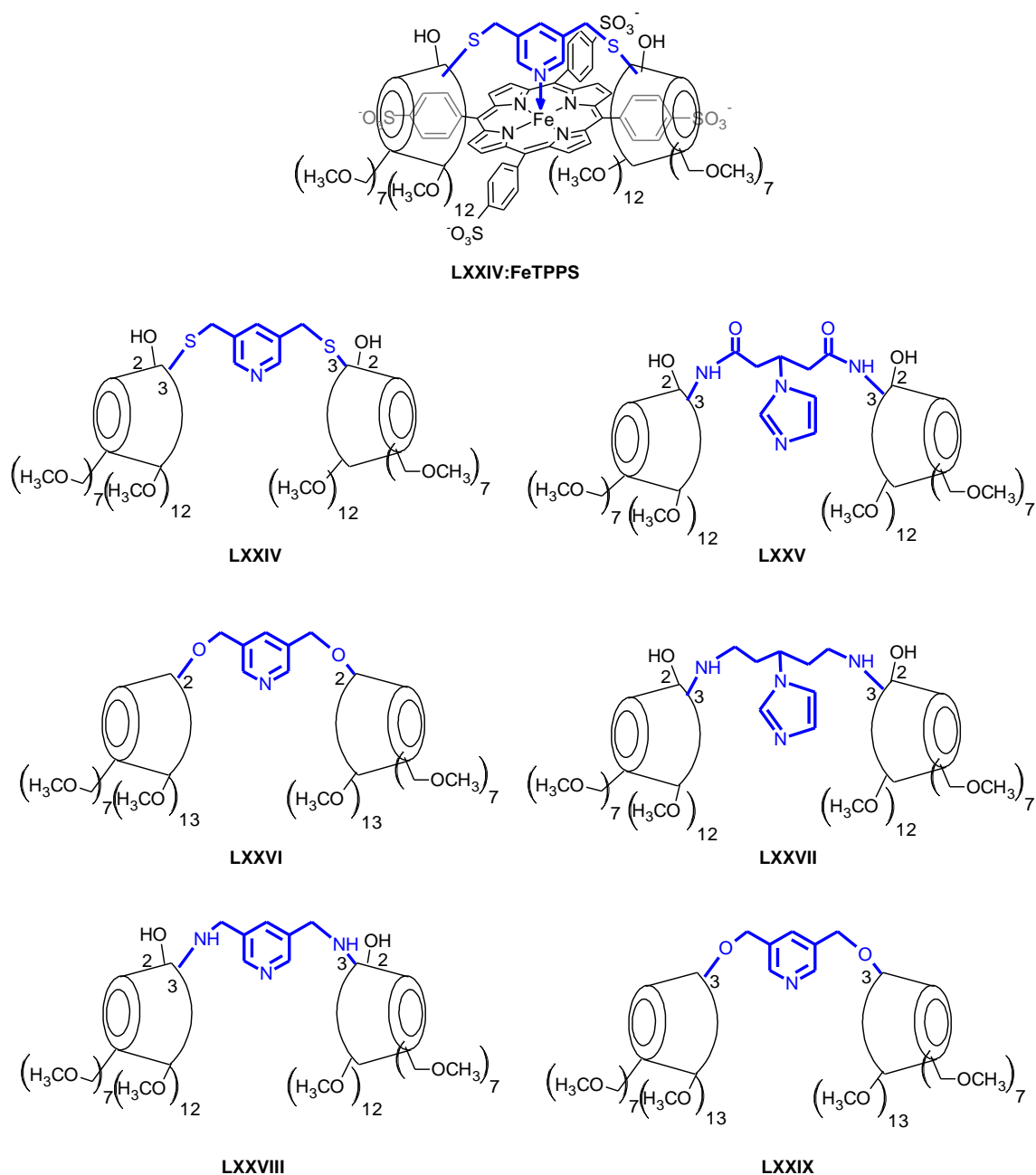
Ryc. 13. Kompleksy porfiryn z cyklodekstrynami (**LXXII** i **LXXIII**) wiążące odwracalnie tlen w środowisku wodnym.

Kano i wsp. [60–67] otrzymali serię modeli hemoprotein, złożonych z dimerów *O*-metylowych pochodnych β-CD (**LXXIV** – **LXXIX**, **Ryc. 14**) i porfiryn żelaza(II). Otrzymane kompleksy zbadano w roztworach wodnych, ustalając ich zdolność do wiązania tlenu, odwracalność tego procesu i trwałość kompleksów z tlenem. Ponadto określono powinowactwo kompleksów do tlenku węgla(II). Pierwszy z uzyskanych kompleksów, składał się z Fe(II)TPPS i dimeru częściowo metylowanej β-CD z linkerem pirydynowym (**LXXIV**). W kompleksie tym dwie grupy sulfofenylowe porfiryny znajdowały się wewnątrz wnęk β-CD, a linker pirydynowy koordynował centralny jon żelaza(II) porfiryny [60]. Kompleks ten odwracalnie wiązał tlen w roztworach wodnych, co potwierdzono różnymi technikami badawczymi, w tym spektroskopią Ramana i ¹H NMR. Paramagnetyczny kompleks po przyłączeniu cząsteczki O₂ lub CO, stawał się diamagnetyczny, co potwierdzono metodą ¹H NMR, a obserwowane zmiany przypisano przejściu jonu żelaza z formy wysokospinowej do niskospinowej, zawierającej odpowiednio pięć oraz sześć ligandów [60,61,63]. Jak wykazano, aby możliwe było efektywne wiązanie tlenu przez porfiryny żelaza(II), niezbędne jest bezwodne otoczenie pierścienia porfiryny. W kompleksach Fe(II)TPPS ze związkami **LXXIV**–**LXXIX**, β-CD

spełnia rolę osłaniającą pierścień porfiryny przed cząsteczkami wody. Z tego względu kompleksy wiążą tlen także w roztworach wodnych [61]. Związek **LXXV** będący analogiem **LXXIV**, wykazywał wyższe powinowactwo do tlenu. Badano również odwracalność wiązania tlenu, poprzez przepuszczanie przez badany roztwór gazowego azotu. W tym badaniu nie zaobserwowano dysocjacji związanego tlenu, ponieważ dochodziło do autoutlenienia kompleksu Fe(II)TPPS-**LXXV**. Ponadto stabilność układu w formie związanej z tlenem, była niższa niż w przypadku Fe(II)TPPS-**LXXIV** [63].

Kolejnym badanym analogiem **LXXIV** był związek **LXXVI**. Modyfikacja strukturalna kompleksu supramolekularnego, spowodowała zmniejszenie powinowactwa do cząsteczki O₂, przy jednoczesnym wzroście stabilności adduktu [64]. W podsumowaniu przeprowadzonych badań, zespół Kano i wsp. porównali powinowactwo do tlenu i okres półtrwania sześciu kompleksów, zawierających mostki pirydynowe lub imidazolowe. Największe powinowactwo do tlenu wykazywał kompleks Fe(II)TPPS:**LXXVII**, a najbardziej stabilny w formie związanej z tlenem był Fe(II)TPPS:**LXXVI** [68].

Jednocześnie badania Kano i wsp. wykazały możliwość zastosowania kompleksu Fe(II)TPPS:**LXXIV**, w celu wiązania tlenku węgla(II) będącego naturalnym produktem rozpadu hemu. W przeprowadzonych doświadczeniach podano szczurom dożylnie kompleks Fe(II)TPPS:**LXXIV**, który był wydalany z moczem w postaci związanej z tlenkiem węgla(II). Pomiar ilości wydalonego kompleksu, umożliwił oszacowanie szybkości wytwarzania CO w organizmie szczurów, bez zaburzenia funkcji życiowych. Zastosowanie Fe(II)TPPS:**LXXIV** może umożliwić usunięcie CO z organizmu, a także ułatwić badanie funkcji fizjologicznych tlenku węgla. Autorzy sugerują również możliwość zastosowania kompleksu do detoksykacji w przypadku zatruc tlenkiem węgla(II) [65].



Ryc. 14. Dimery cyklodekstryn (**LXXIV-LXXIX**), których kompleksy z porfiryną Fe(II)TPPS stanowią funkcjonalne modele hemoglobiny, np. **LXXIV-Fe(II)TPPS**; żelazo(II) 5,10,15,20-tetrakis(4'-sulfofenylo)porfiryna – Fe(II)TPPS.

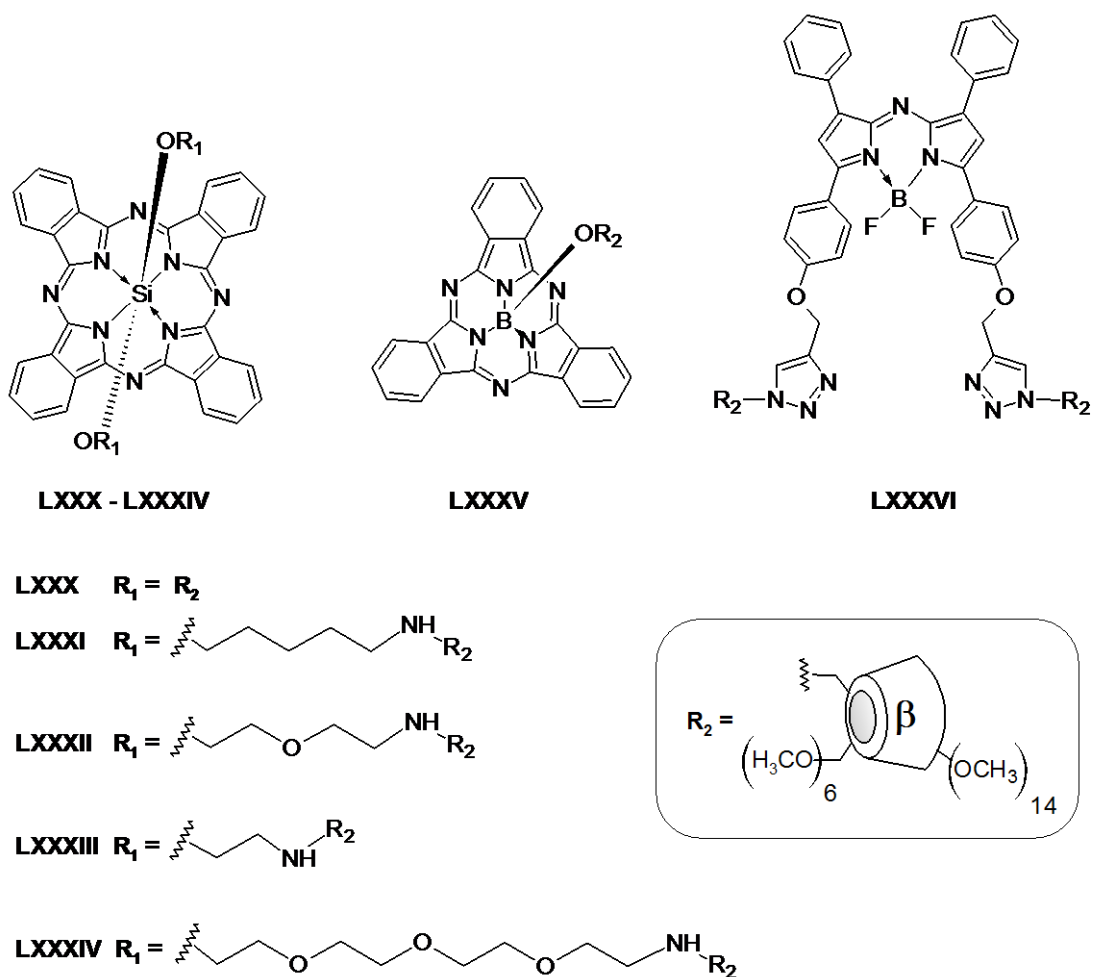
Methemoglobin jest utlenioną formą hemoglobiny, zawierającą w hemie jony żelaza(III). Methemoglobina efektywnie wiąże aniony cyjankowe, dlatego przy zatruciu cyjankami jako odtrutkę podaje się poszkodowanym azotany(III), w celu utlenienia części hemoglobiny i związania cyjanków. Jako odtrutka do zastosowania przy zatruciach cyjankami, został przetestowany charakteryzujący się dużą stabilnością kompleks Fe(III)TPPS:**LXXIX**, zawierający jony żelaza(III). W badaniu na modelu zwierzęcym

(szczury) wykazano, że zaaplikowanie kompleksu Fe(III)TPPS:**LXXIX**, przed podaniem cyjanku potasu, zapobiegało śmierci zwierzęcia [66]. Należy jednak podkreślić, że ewentualne zastosowania medyczne Fe(III)TPPS:**LXXIX** w leczeniu zatruc, wydają się mocno ograniczone, z uwagi na konieczność podania kompleksu przed zatruciem i dużą szybkość wydalania z moczem. W celu przedłużenia czasu życia kompleksów w ustroju, zespół badawczy Kano sfunkcjonalizował Fe(II)TPPS polietylenoglikolami (PEG). Koniugaty PEG-Fe(III)TPPS skompleksowano następnie ze związkiem **LXXIX**, a otrzymane połączenia podano szczurom. Masa cząsteczkowa otrzymanych kompleksów determinowała ich czas krążenia w krwioobiegu [67].

III.5.4 Transfer energii w układach antenowych

Fotosynteza to proces leżący u podstaw życia na naszej planecie. Chlorofil, naturalny składnik fotosystemów jest pochodną chloryny. Syntetyczne pochodne porfirynoidowe są intensywnie badane pod kątem użycia w sztucznej fotosyntezie, ponieważ charakteryzują się wysokimi współczynnikami absorpcji w zakresie światła widzialnego i w ultrafiolecie, znaczną stabilnością chemiczną oraz długim czasem życia stanu wzbudzonego [9].

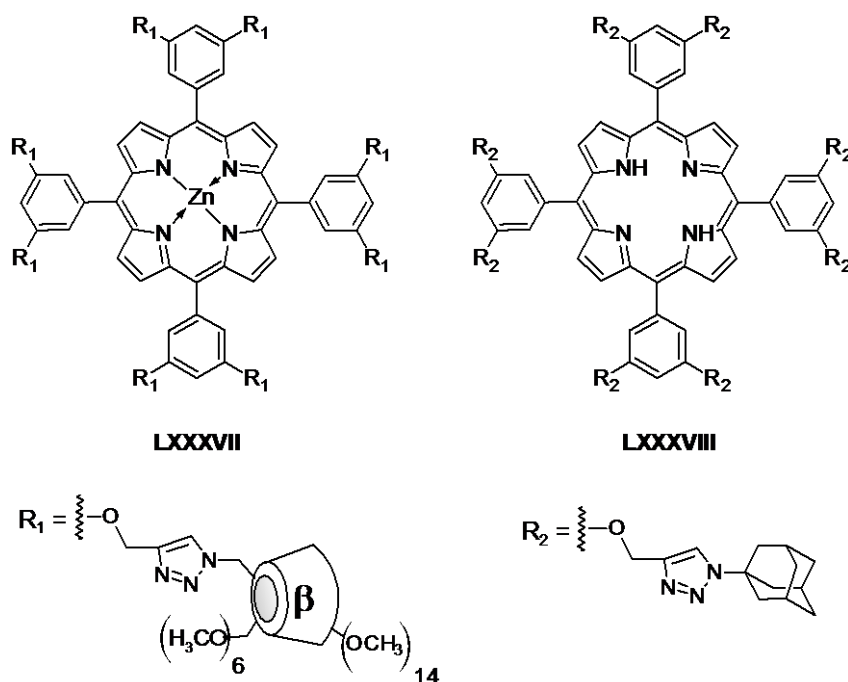
Najciekawsze przykłady kompleksów inkluzyjnych, w których zachodzą procesy transferu elektronów i energii, zostały zaprezentowane przez Ermilova i wsp. [69], którzy otrzymali połączenia inkluzyjne TPPS i permetylo- β -CD (PM- β -CD) skoniugowanych z ftalocyjaninami lub subftalocyjaninami. Część z tych układów poddano testom *in vitro*, jako potencjalne fotouczulacze w PDT. Leng i wsp. otrzymali krzem(IV) ftalocyjaninę podstawioną aksjalnie dwiema cząsteczkami PM- β -CD (**LXXX**), a następnie poddali oddziaływaniu z TPPS (**Ryc. 15**). W otrzymanym kompleksie stwierdzono występowanie związków TPPS i **LXXX** w proporcji 1:1, co pozwoliło na wysnucie hipotezy o tworzeniu się liniowych układów, z naprzemiennym ułożeniem ftalocyjaniny i porfiryny. Ponadto potwierdzono, że w uzyskanym kompleksie TPPS:**LXXX**, zachodzi transfer elektronów ze wzbudzonej porfiryny do ftalocyjaniny [70]. Natomiast Ermilov i wsp. otrzymali ftalocyjaniny **LXXXI** – **LXXXIV**, zawierające linker pomiędzy centralnym atomem krzemu i PM- β -CD, które również tworzyły z TPPS kompleksy o stechiometrii 1:1 [69].



Ryc. 15. Związki (LXXX-LXXXVI) skoniugowane z cząsteczkami PM- β -CD tworzące kompleksy inkluzyjne.

Kompleksy te różniły się znacznie pod względem właściwości optycznych. W kompleksach TPPS:LXXX i TPPS:LXXXIV zachodził transfer elektronów, a obecność TPPS wygaszała fluorescencję ftalocyjaniny. Natomiast w kompleksach TPPS z ftalocyjaninami LXXXI - LXXXIII, zachodził transfer energii pomiędzy TPPS i ftalocyjaniną. Procesowi kompleksowania z TPPS poddano również bor(III) subftalocyjaninę, podstawioną aksjalnie PM- β -CD (LXXXV). W przypadku tego kompleksu, obserwowano transfer energii z cząsteczki subftalocyjaniny do porfiryny [71]. Menting i wsp. otrzymali kompleks zawierający ftalocyjaninę LXXX, subftalocyjaninę LXXXV i TPPS, w którym obserwowano transfer energii z LXXXV do LXXX poprzez cząsteczkę TPPS [72]. Shi i wsp. otrzymali również koniugat aza-BODIPY z cząsteczkami PM- β -CD (LXXXVI), który poddano oddziaływaniu z porfirynami ZnTPPS i H₂TPPS, otrzymując kompleksy supramolekularne. Następnie badano procesy fotochemiczne zachodzące w kompleksach. W przypadku ZnTPPS:LXXXVI, dochodziło do transferu

elektronów z cząsteczki porfiryny do cząsteczki aza-BODIPY. W kompleksie $H_2TPPS:LXXXVI$, zaobserwowano transfer energii z cząsteczki H_2TPPS do **LXXXVI** [73].



Ryc. 16. Porfiryny **LXXXVII** i **LXXXVIII** tworzące supramolekularny polimer.

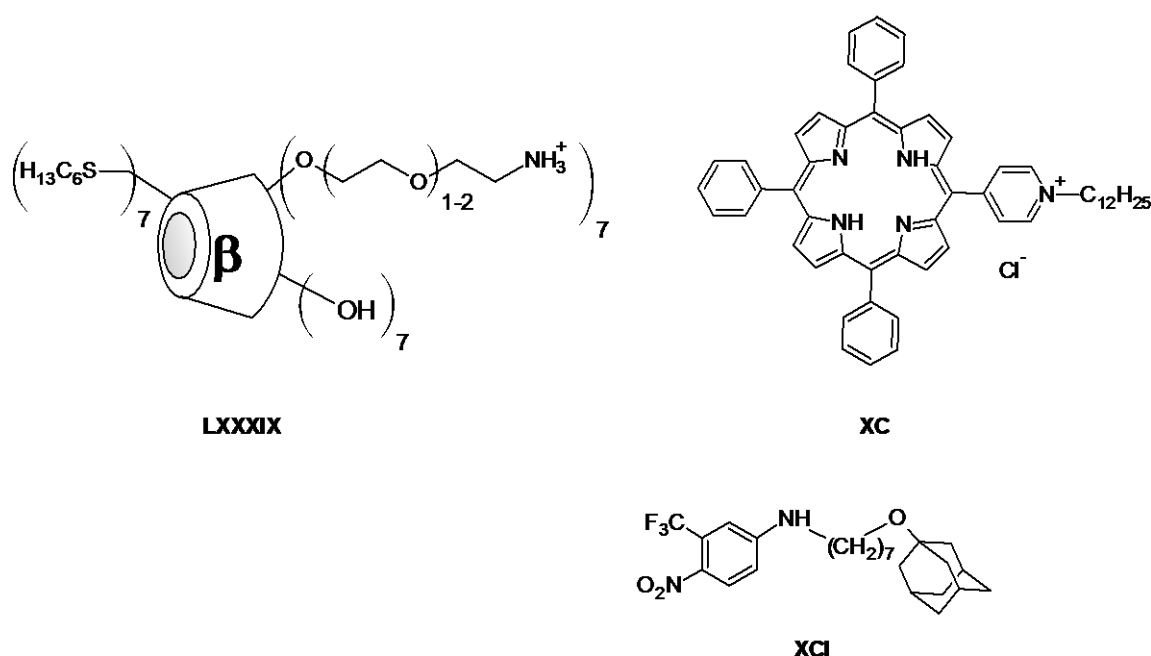
Zespół badawczy Fathalla i wsp. uzyskał porfiryny posiadające ugrupowania PM-β-CD (**LXXXVII**) i adamantyłowe (**LXXXVIII**). W wyniku wzajemnego oddziaływania związków otrzymano polimer, utrzymywany przez supramolekularne oddziaływanie jednostek β-CD i grup adamantyłowych. Polimer poddano badaniu metodami mikroskopii elektronowej (TEM) i sił atomowych (AFM), stwierdzając że występuje w formie nanoprzewodu o średnicy 3 nm. W obrębie polimeru dochodziło do transferu energii z porfiryny **LXXXVII** do **LXXXVIII**. Kompleks był stabilny i proces transferu energii zachodził nawet w temperaturze 80 °C [74].

III.5.5 Terapia fotodynamiczna

Układy porfirynoidowe są stosowane w terapii fotodynamicznej jako fotouczulacze. Skuteczność porfirynoidów jako fotouczulaczy obniża słaba rozpuszczalność i zjawisko agregacji w roztworze, która prowadzi do wygaszenia stanu trypletowego i w konsekwencji obniżonej zdolności generowania tlenu singletowego. Jedną z metod zwiększenia rozpuszczalności fotouczulacza w wodzie jest skoniugowanie lub utworzenie

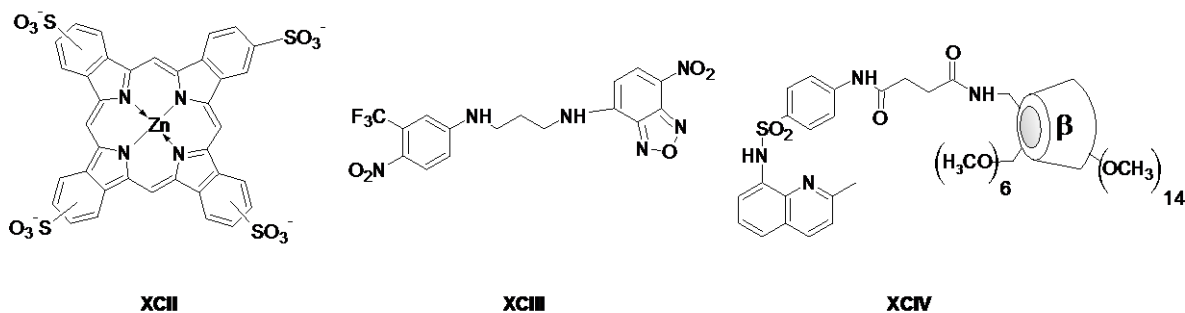
kompleksów inkluzyjnych z CD. Zastosowanie CD w bardzo wielu przypadkach zwiększa rozpuszczalność i zapobiega agregacji fotouczulacza, a ponadto fotouczulacz znajdujący się we wnętrzu CD, może wydajniej generować tlen singletowy, z uwagi na jej hydrofobowe otoczenie [75]. Potwierdzeniem takich zależności są wyniki badań Tau i wsp., którzy poddali ftalocyjaniny cynkowe kompleksowaniu z β -CD oraz hydroksypropylo- γ -CD, obserwując wzrost wydajności generowania tlenu singletowego i spowolnienie procesu fotodegradacji [76]. Natomiast Mosinger i wsp. podobnym badaniom poddali porfiryny ZnTPPS, PdTPPS i tetrakis(4-karboksyfenylo)porfiryne (TPPC), wykorzystując natywne oraz hydroksypropylowe pochodne α -, β - i γ -CD. Zastosowanie modyfikowanych CD spowodowało wzrost wydajności generowania tlenu singletowego, natomiast naturalnych nie wpłynęło znacząco na ten parametr [77].

Dentuto i wsp. [78] oraz Cosma i wsp. [79] nie zaobserwowali fototoksyczności chlorofilu *a* w obecności różnych CD, przeciwko limfocytom T ludzkiej białaczki (komórki Jurkat). Natomiast Kolarova i wsp. oceniali aktywność fotodynamiczną porfiryny ZnTPPS związanej z hydroksypropylo- β -CD i wykazali obecność uszkodzeń DNA w badaniach *in vitro*, na linii komórek czerniaka G361. Badanie prowadzono po ekspozycji komórek na światło, jednocześnie stwierdzono brak toksyczności w fazie ciemnej [80].



Ryc. 17. Składniki supramolekularnego kompleksu (LXXXIX - XCI).

Mazzaglia i wsp. otrzymali modyfikowaną, amfifilową CD **LXXXIX**, posiadającą hydrofobowe grupy heksylosulfanylowe i hydrofilowe 2- ω -amino-*O*-oligo(etoksyłowe) [81] (**Ryc. 17**). Wykazano, że modyfikowana CD **LXXXIX** może tworzyć micelle, agregaty lub dwuwarstwowe pęcherzyki i z tego względu była testowana jako nośnik różnych porfiryn. Jednocześnie udowodniono, że właściwości otrzymanych połączeń kompleksowych, są ściśle zależne od stosunku molowego porfiryny do CD **LXXXIX**. W przypadku TPPS, przy zastosowaniu proporcji porfiryne:**LXXXIX** (1:50), porfiryne jest umiejscowiona w fazie amfifilowej. Natomiast przy proporcji 1:2, anionowa porfiryne TPPS oddziałuje elektrostatycznie z powierzchnią nanopęcherzyków kationowej CD, co prowadzi do zmniejszenia produkcji tlenu singletowego. Jednocześnie jednak jak wykazano w badaniu na komórkach HEP-2, zwiększa ilość porfiryny dostarczonej do komórek [81]. Otrzymane nanopęcherzyki **LXXXIX** z wbudowaną TPPS, przetestowano następnie na komórkach HeLa w kierunku aktywności fotodynamicznej. Najefektywniejsze okazały się nośniki zawierające TPPS i **LXXXIX** w proporcji 1:10. Nie stwierdzono natomiast efektu toksycznego w fazie ciemnej [82]. W kolejnym badaniu, oddziaływaniu z **LXXXIX** poddano chlorek 5-[4-[1-dodekanylopirydynio]-10,15,20-trifenyloporfiryny (**XC**). Nanocząstki zawierające **XC** i **LXXXIX** w proporcji 1:10, okazały się szczególnie efektywne jako fotouczulacze w zwalczaniu metycylinoopornego gronkowca złocistego (MRSA). W badaniu z wykorzystaniem Gram-ujemnych bakterii *Escherichia coli* (szczep 04), uzyskano słabszy efekt fotodynamiczny. Skuteczność porfiryny **XC** związanej z **LXXXIX**, porównano z aktywnością nieskompleksowanej porfiryny i jej formacji liposomalnej. Najkorzystniejsze właściwości wykazała forma związana z **LXXXIX** [83]. Jako rozwinięcie powyższych badań wprowadzono do nanocząstek związek **XCI**, wiążący się z **LXXXIX** dzięki oddziaływaniu grupy adamantylowej z wnęką β -CD. Zaobserwowano uwalnianie z **XCI** pod wpływem światła tlenu azotu(II). Otrzymano nanocząstki, złożone z **LXXXIX**, TPPS i **XCI**, które pod wpływem światła uwalniały NO i generowały tlen singletowy. W badaniach biologicznych na komórkach HeLa, wykazano synergistyczny efekt cytotoksyczny, pochodzący od uwolnionych jednocześnie NO i tlenu singletowego [84].

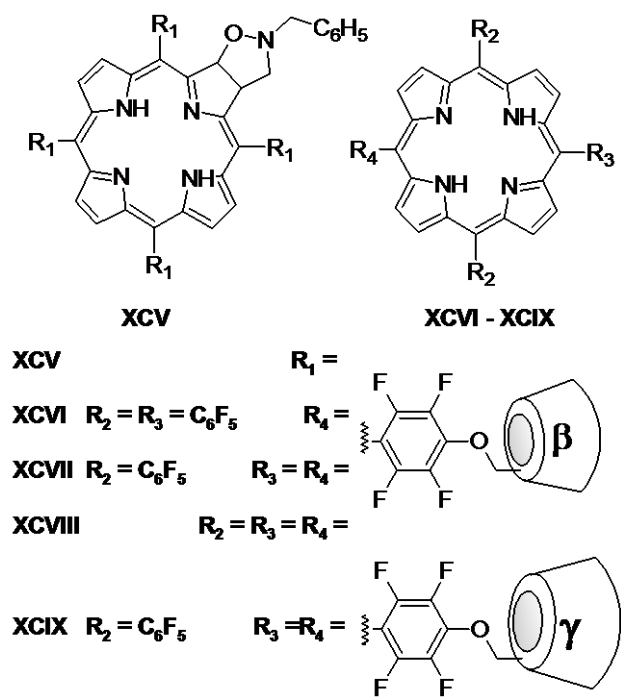


Ryc. 18. Związki wykorzystane przy tworzeniu supramolekularnych kompleksów **XCII-XCIV**.

W ramach dalszych badań Fraix i wsp. otrzymali nanocząstki złożone z polimeru zawierającego jednostki β -CD, cynk(II) tetrasulfonoftalocyjaniny **XCII** i związku **XCIII** (**Ryc. 18**). Nanocząstki efektywnie wnikały do komórek czerniaka, ich obecność w komórkach stwierdzono przy użyciu mikroskopu konfokalnego, obserwując czerwoną fluorescencję ftalocyjaniny i zieloną fluorescencję **XCIII**. Związki **XCII** i **XCIII** w nanocząstkach generowały również tlen singletowy i tlenek azotu(II) pod wpływem światła białego [85].

Zespół Yu i wsp. [86] uzyskał supramolekularny kompleks, złożony z trzech składników: PM- β -CD przyłączonej do chinoliny (**XCIV**), ZnTPPS i jonów cynku(II). Podatność kompleksu na rozpad badano z użyciem komórek drożdży (*S. cerevisiae*), i stwierdzono, że w kontakcie z komórkami doszło do rozpadu kompleksu **XCIV**:Zn²⁺:ZnTPPS. Autorzy sugerują, że proces ten zachodzi w błonie komórkowej, w wyniku konkurencyjnego wiązania się z jednostką PM- β -CD, cholesterolu i ZnTPPS. Należy zakładać, że kompleks **XCIV**-ZnTPPS-Zn²⁺, może służyć do efektywnego dostarczenia fotouczulacza do komórek.

Zespół Dong i wsp. opracował nanosystem złożony z α -CD modyfikowanej bezwodnikiem maleinowym i polimerem szczepionym - etyloceluloza-*graft*-poli(ϵ -kaprolakton). Nanocząstki utrzymywane były przez oddziaływania typu gość-gospodarz. W nanocząstki wbudowano tetrakis(4-hydroksyfenylo)porfiryne (THPP) i oceniano jej uwalnianie pod wpływem fenyloalaniny. W obecności fenyloalaniny w ciągu 6 godzin, z nanosystemu uwolniło się ponad 85% THPP, a przy braku aminokwasu w ciągu 300 godzin uwolniło się tylko 26% porfiryny. Skuteczność systemu w dostarczaniu leku, przetestowano następnie na komórkach raka piersi linii MCF-7. Stwierdzono, że efekt fototoksyczny był zależny od stężenia zarówno nanocząstek, jak i fenyloalaniny [87].



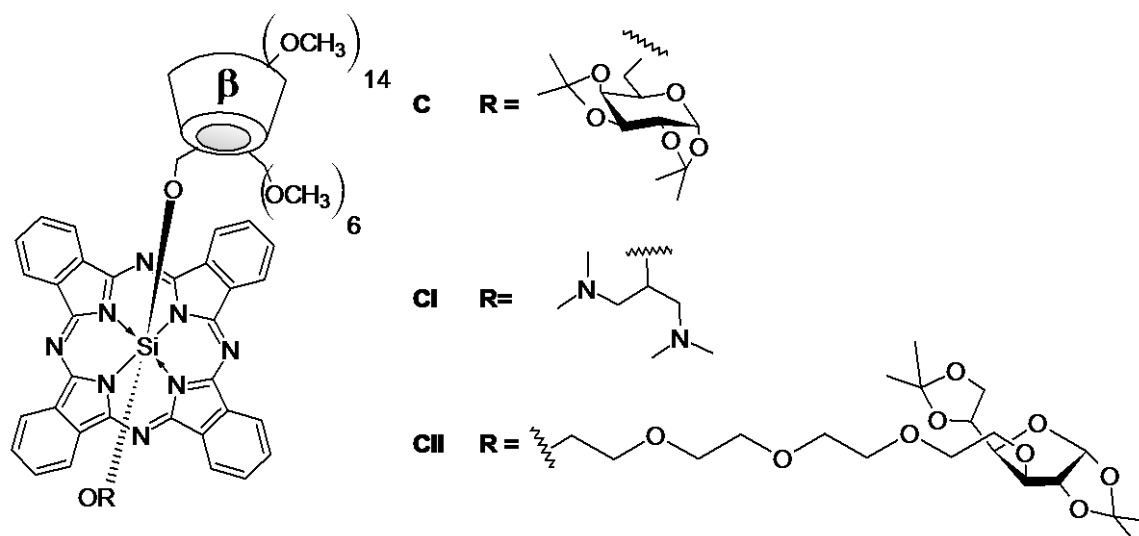
Ryc. 19. Chloryna (**XCV**) i porfiryny (**XCVI-XCIX**) zawierające ugrupowania CD.

Silva i wsp. opublikowali syntezę chloryny **XCV**, która zawierała cztery jednostki β -CD i generowała tlen singletowy z 40% wydajnością. Fototoksyczność **XCV** oceniono testem z wykorzystaniem keratynocytów linii NCTC 2544, stosując stężenie 5 μ M i naświetlanie w ciągu 30 minut (światło czerwone, moc światła = 15,2 mW·cm⁻²). Stwierdzono przeżywalność komórek na poziomie ~40% [88] (**Ryc. 19**).

Kralova i wsp. [89,90] otrzymali serię porfiryn (**XCVI – XCIX**), posiadających od jednego do czterech ugrupowań cyklodekstrynowych, a następnie oceniono ich aktywność jako fotouczulaczy oraz nośników leku. Porfiryny posiadające jedną (**XCVI**) lub dwie (**XCVII**) grupy β -CD-pentafluorofenyłowe, zostały przetestowane jako fotouczulacze na komórkach ludzkiej białaczki HL-60 i mysiego raka sutka 4T1. W testach *in vitro* związek **XCVI**, okazał się skuteczniejszy niż **XCVII**. Odwrotną zależność zaobserwowano w badaniu na modelu zwierzęcym (myszy BALB/c z podskórnie wszczepionym nowotworem 4T1), a mianowicie związek **XCVII** wykazał efektywniejsze działanie niż **XCVI**. Badano aktywność związków w zależności, od czasu pomiędzy podaniem fotouczulacza, a naświetlaniem. Największą efektywność stwierdzono przy dawce światła 100 J·cm⁻² i przy zastosowaniu **XCVI** w ilości 5 mg·kg⁻¹ m.c. oraz zachowaniu 6 godz. odstępu pomiędzy podaniem a naświetlaniem. Osiągnięto całkowitą eradykację nowotworu w ciągu 3 dni, bez nawrotu choroby do końca badań (35 dni). Związek **XCVI** tylko czasowo hamował wzrost guza [89].

W dalszych badaniach przetestowano związki **XCVI** - **XCIX**, jako potencjalne nośniki leków, poddając je kompleksowaniu z serią leków przeciwnowotworowych i wyznaczając wartości stałych kompleksowania. W przypadku pochodnych **XCVII** i **XCIX**, stałe wiązania leków uzyskiwały znaczne wartości w środowisku o pH = 7,34 i drastycznie spadały przy wartościach pH = 5,50. Obserwowana zależność jest korzystna ponieważ umożliwia uwolnienie leku wewnątrz komórek rakowych, których pH jest niższe od fizjologicznego. Wstępne testy *in vitro* przeprowadzono z wykorzystaniem linii mysiego raka sutka 4T1 i ludzkiej białaczki szpikowej K562. Jako fotouczulacze zastosowano kompleksy porfiryn **XCVII** - **XCIX** z lekami przeciwnowotworowymi, a wyniki porównano w odniesieniu do porfiryn i leków nieskompleksowanych. Połączenie terapii fotodynamicznej z dostarczaniem leku, było skuteczniejsze niż zastosowanie terapii fotodynamicznej lub samego leku. Badania kontynuowano z użyciem modelu zwierzęcego – myszy BALB/c z wszczepionymi podskórnie komórkami linii 4T1. Jako fotouczulacze zastosowano kompleksy **XCVII**-paklitaksel i **XCIX**-doksorubicyna, których skuteczność porównano z toksycznością kompleksu w fazie ciemnej i efektywnością terapii fotodynamicznej z wykorzystaniem wyłącznie **XCVII** i **XCIX**. Spośród wymienionych metod, najbardziej skuteczna okazała się terapia fotodynamiczna z wykorzystaniem kompleksów. W celu uzyskania jeszcze korzystniejszych efektów, przeprowadzono eksperyment, w którym myszy poddano terapii dwukrotnie, w odstępie jednego tygodnia. Pozwoliło to na niemal całkowitą eradykację nowotworu [90].

W celu rozwinięcia powyższych badań, Kejík i wsp. [91], uzyskali cynkowe kompleksy porfiryn **XCVII** i **XCIX**, które następnie poddano oddziaływaniu z białkiem IgG. Założono, że przyłączenie białka nastąpiło poprzez koordynację centralnego jonu cynku, przez imidazolową grupę histydyny. Supramolekularne kompleksy metalowanych porfiryn **XCVII** i **XCIX** z endoglobuliną, zostały użyte jako nośniki, odpowiednio dla paklitakselu i doksorubicyny. Myszy atymiczne (Nude mice) z wszczepionymi komórkami ludzkiego czerniaka bezbarwnikowego linii C32, poddano terapii trójskładnikowej (immoglobulina, PDT, lek) porównując jej skuteczność z efektami stosowania: (i) wyłącznie PDT, (ii) PDT wspomaganego lekiem, (iii) PDT wspomaganego endoglobuliną i (iv) brakiem terapii. Dawka porfiryn wynosiła $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ m.c.}$, przy zachowaniu odstępu między podaniem leku a naświetlaniem wynoszącego 6 godzin i dawce światła $100 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$. Zastosowanie terapii wykorzystującej trójskładnikowy kompleks IgG:porfiryne:lek, spowodowało spadek objętości guza [91].



Ryc. 20. Krzem(IV) ftalocyjaniny (**C-CII**) z ugrupowaniem PM- β -CD.

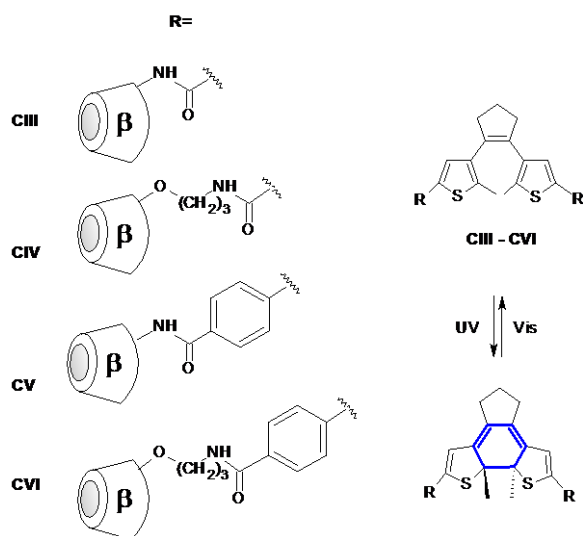
Leng i wsp. przetestowali ftalocyjaninę **LXXX**, TPPS oraz ich kompleks pod kątem aktywności fotodynamicznej, na komórkach ludzkiego gruczolaka jelita grubego linii HT29. Zastosowano światło o długości fali $\lambda > 610$ nm, w dawce $48 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$. Ze względu na znikomą absorpcję światła czerwonego, TPPS była nieefektywna. Stężenie hamujące wzrost w 50% (IC₅₀) wynosiło $0,15 \text{ }\mu\text{M}$ i $0,09 \text{ }\mu\text{M}$, odpowiednio dla ftalocyjaniny **LXXX** i kompleksu. Kompleks był rozpuszczalny w wodzie, natomiast ftalocyjanina była badana w postaci formułacji z Cremophorem EL [70]. W dalszych badaniach Lau i wsp. testowali aktywność biologiczną serii ftalocyjanin krzemu(IV) (**LXXXI** - **LXXXIV**), posiadających dwa podstawniki PM- β -CD oraz związków **XC** - **CII**, zawierających jedno ugrupowanie PM- β -CD (**Ryc. 20**). Do oceny aktywności fotodynamicznej wykorzystano linie komórkowe ludzkiego gruczolaka jelita grubego HT29 i ludzkiego raka wątrobowokomórkowego HepG2, stosując warunki naświetlania opisane powyżej. Spośród związków zawierających dwie grupy PM- β -CD, najaktywniejszy okazał się związek **LXXXI**, uzyskano wartości IC₅₀ równe $0,04$ i $0,05 \text{ }\mu\text{M}$, odpowiednio dla linii HT29 i HepG2. Wykazano również, że ftalocyjanina **LXXXI** kumulowała się w lizosomach, a nie w mitochondriach oraz że śmierć komórkowa następowała na drodze apoptozy. Testy *in vivo* przeprowadzono na myszach szczepu Balb/c, z wszczepionymi komórkami linii HT29. Dawka ftalocyjaniny wynosiła $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ m.c., a naświetlanie ($\lambda = 675 \text{ nm}$, dawka $30 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$) prowadzono po 12 godzinach od podania, skuteczność terapii monitorowano mierząc objętość nowotworu. Stwierdzono, że związek **LXXXI** redukował wzrost guza - w 15-tym dniu badania w grupie leczonej - średnia objętość wynosiła mniej niż połowę wartości, w porównaniu z grupą kontrolną. Spośród związków

zawierających jedno ugrupowanie β -CD, najefektywniejsza okazała się pochodna **C**, posiadająca jako drugi podstawnik izopropylidenową pochodną galaktozy. W tym przypadku wartości IC_{50} dla linii komórkowych HT29 i HepG2, wynosiły odpowiednio 0,021 i 0,026 μ M. Pochodną **C** poddano również badaniu *in vivo*, według protokołu dla związku **LXXXI**. Pomimo wyższej aktywności *in vitro*, związek **C** wykazał podobną skuteczność jak **LXXXI**, redukcja objętości guza wynosiła około 50% [92,93].

III.5.6 Rozpad kompleksów porfirynoidów z cyklodekstrynami pod wpływem światła

Szczególnie interesująca z punktu widzenia wykorzystania w terapii fotodynamicznej kompleksów inkluzyjnych porfirynoidów z CD, jest możliwość uwolnienia porfirynoidu z kompleksu pod wpływem światła. Po rozpadzie kompleksu dochodzi do wytrącenia fotouczulacza w naświetlonym miejscu. Kompleksowanie z CD ma zazwyczaj na celu poprawę rozpuszczalności potencjalnego fotouczulacza.

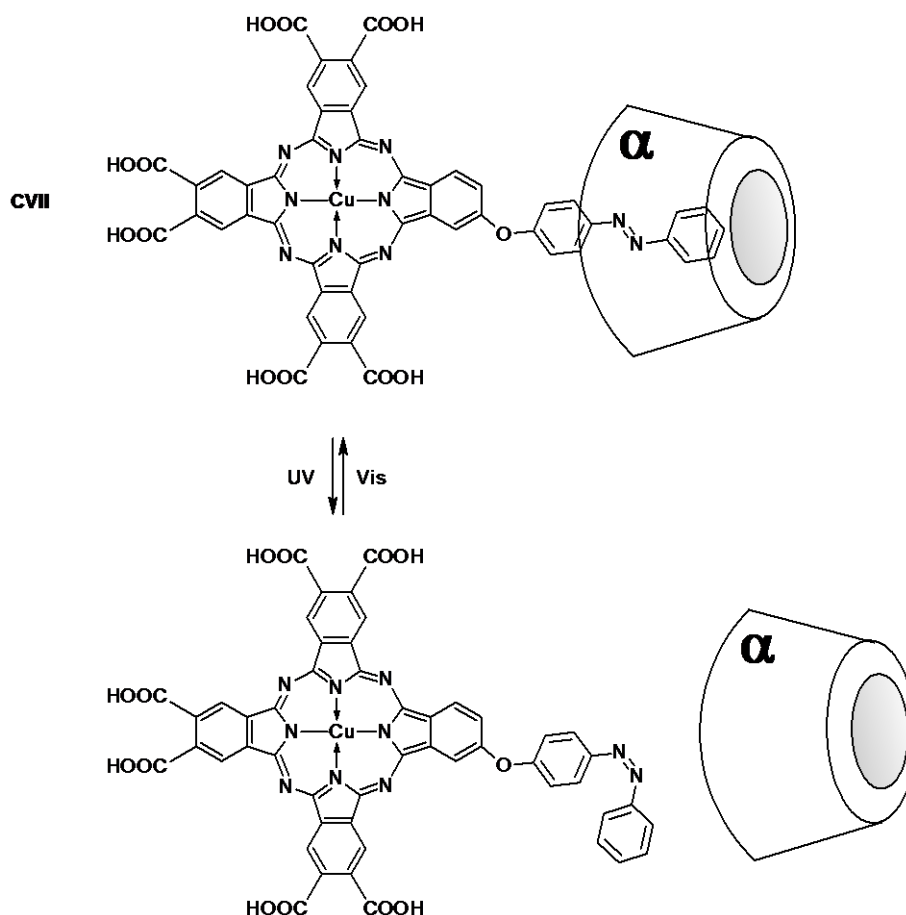
Ditienyloeteny są związkami, które ulegają odwracalnej izomeryzacji, a mianowicie pod wpływem promieniowania ultrafioletowego, forma otwarta przekształca się w zamkniętą, a odwrotny proces jest obserwowany pod wpływem światła widzialnego.



Ryc. 21. Ditienyloeteny (**CIII-CVI**) zawierające grupy β -CD. Pokazano schemat zachodzenia reakcji odwracalnej izomeryzacji.

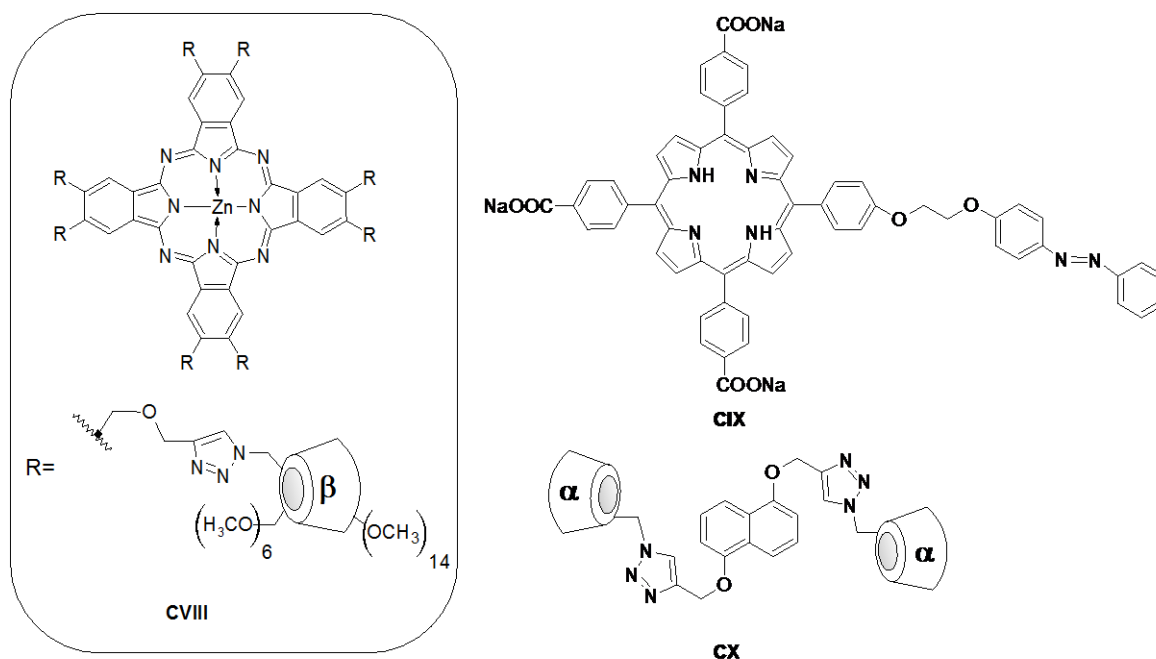
Mulder i wsp. otrzymali związki **CIII – CVI**, będące połączeniem dwóch ugrupowań β -CD oraz pochodnych ditienyloetenu, które ze względu na możliwość izomeryzacji mogą w różny sposób oddziaływać z cząsteczką „gościa” (**Ryc. 21**). Naświetlenie promieniowaniem UV powodowało fotochemiczne przekształcenie w formę zamkniętą.

W stanie równowagi 75% związków **CIII** i **CIV** oraz 92% **CV** i **CVI**, występowało w formie zamkniętej. Natomiast ekspozycja na promieniowanie widzialne powodowała otwarcie pierścienia, a kilkukrotne powtarzanie cyklu naświetlania, nie powodowało rozkładu związków. Następnie sprawdzano wpływ geometrii cząsteczki ditienuoetenu, na proces tworzenia kompleksów inkluzyjnych. Związki **CIII** - **CVI** poddano kompleksowaniu z TPPS i wyznaczono stałe wiązania, po czym poddano naświetlaniu promieniowaniem ultrafioletowym. Stwierdzono, że dla związków **CIII** i **CV** przekształcenie formy otwartej w zamkniętą, powoduje zmniejszenie stałej wiązania odpowiednio 35 i 8 razy. Natomiast związki **CIV** i **CVI**, nie wykazywały tak znacznej różnicy wartości stałych wiązania, co wynika z obecności łańcuchów propylowych umożliwiających rotację jednostek β -CD. Poddanie kompleksów **CIII**-TPPS i **CV**-TPPS naprzemiennemu naświetlaniu promieniowaniem UV i widzialnym, spowodowało naprzemienny rozpad i odtworzenie kompleksów. Warto dodać, że kompleksy zawierające związki **CIV** i **CVI** nie posiadały takich właściwości [94,95].



Ryc. 22. Ftalocyjanina z podstawnikiem azobenzenowym **CVII**, o właściwościach fotochromowych.

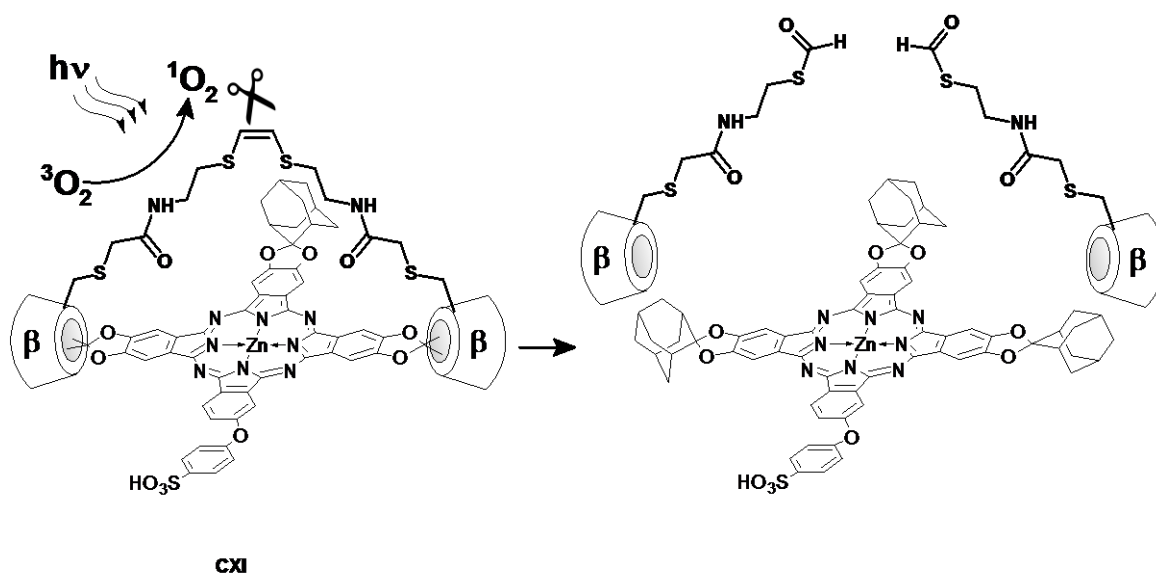
Właściwości fotochromowe wykazuje również azobenzen i jego pochodne, które po naświetleniu promieniowaniem UV, przechodzą z izomeru *trans* w *cis*. Odwrotny proces zachodzi pod wpływem światła widzialnego. Chen i wsp. otrzymali ftalocyjaninę **CVII** z ugrupowaniem azobenzenowym, której forma *trans* wydajnie wiązała się z α -CD, natomiast forma *cis* nie tworzyła kompleksu. Jak wykazano w badaniach metodą NMR, naświetlanie promieniowaniem UV formy *trans* **CVII** w kompleksie z α -CD, prowadziło do rozpadu kompleksu, a ponowna ekspozycja na promieniowanie widzialne powodowała jego odtworzenie [96].



Ryc. 23. Składniki supramolekularnego kompleksu o właściwościach fotochromowych (**CVIII** - **CX**).

Inny przykład rozpadu struktur supramolekularnych pod wpływem światła, został zaprezentowany przez zespół badawczy Li i wsp. [97,98]. Ftalocyjanina **CVIII** z przyłączonymi ośmioma grupami PM- β -CD, tworzyła kompleks z TPPS (**Ryc. 23**). W obrębie kompleksu zaobserwowano efektywny transfer energii, a po ekspozycji na promieniowanie o długości fali $\lambda = 514$ nm, pojawiła się fluorescencja z maksimum przy $\lambda = 692$ nm. Badanie metodą DLS (ang. *dynamic light scattering*, dynamicznego rozproszenia światła) wykazało powstawanie agregatów o średnicy ok. 130 nm. Obrazowanie przy użyciu mikroskopu elektronowego, zarówno techniką sił atomowych (AFM) jak i transmisyjną (TEM), potwierdziło obecność struktur supramolekularnych [97]. Supramolekularny kompleks o właściwościach fotochromowych, uzyskano poddając

ftalocyjaninę **CVIII**, kompleksowaniu z porfiryną **CIX** oraz pochodną **CX** 1,5-naftalenodiolu zawierającą dwie cząsteczki α -CD. Podstawniki karboksyfenylowe porfiryny **CIX** łączyły się z ugrupowaniem β -CD ftalocyjaniny **CVIII**, natomiast podstawnik azobenzenowy wiązał się z grupami α -CD związku **CX**. Badanie metodą DLS wykazało, że kompleks **CVIII:CIX:CX** ma średnicę 154 nm. Pod wpływem promieniowania o długości fali $\lambda = 365$ nm, następował proces izomeryzacji ugrupowania azobenzenowego, forma *trans* przekształcała się w *cis*, co było przyczyną rozpadu kompleksu **CVIII:CIX:CX**. Natomiast wykorzystanie promieniowania o długości fali $\lambda=450$ nm, powodowało odtworzenie kompleksu [98].



Ryc. 24. Supramolekularny kompleks dimeru β -CD z ftalocyjaniną **CXI**, ulegający rozpadowi pod wpływem światła.

Dotychczas przytoczone przykłady uwolnienia porfirynoidu z kompleksu z CD pod wpływem światła, wymagały użycia promieniowania ultrafioletowego. Nieodwracalny rozpad kompleksu pod wpływem światła widzialnego, byłby korzystniejszy z punktu widzenia PDT (terapia ta wykorzystuje światło o długości fali od 600 do 800 nm). Takie wymagania spełnia supramolekularny kompleks opracowany przez zespół Breslowa [37,99]. Autorzy otrzymali serię dimerów β -CD, różniących się długością łącznika pomiędzy jednostkami β -CD i miejscem podstawienia jednostki cyklodekstryny. Zsyntezowano również serię ftalocyjanin, posiadających podstawniki *tert*-butylofenylowe lub adamantylowe, zapewniające efektywne wiązanie się z β -CD. W wyniku naświetlania kompleksu ftalocyjanina-dimer (np. **CXI**, **Ryc. 24**), powstający tlen singletowy powodował utlenienie i rozpad dimeru w miejscu wiązania podwójnego. O selektywności

procesu świadczy fakt, że „cięcie” dimeru (rozpad wiązania podwójnego wskutek utlenienia przez tlen singletowy wygenerowany przez skompleksowaną ftalocyjaninę), prowadziło tylko do jednego rodzaju produktu. Gdy dimer poddano działaniu tlenu singletowego, generowanego przez błękit metylenowy, powstawało więcej produktów. W wyniku utlenienia dimeru dochodziło do rozpadu kompleksu supramolekularnego. Autorzy sugerują, że użycie kompleksu **CXI** *in vivo*, a następnie jego naświetlenie, spowodowałoby wytrącenie hydrofobowego fotouczulacza w miejscu naświetlania i wniknięcie do komórki. Jest to potencjalny mechanizm deponowania fotouczulacza w miejscu naświetlania.

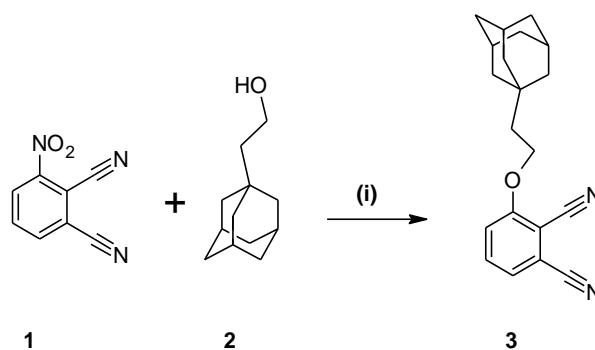
IV WYNIKI I DYSKUSJA

W ramach części eksperymentalnej niniejszej pracy, przeprowadzono syntezę i charakterystykę nowych adamantyl- funkcjonalizowanych makrocykli z grupy porfirazyn i ftalocyjanin. Biorąc pod uwagę znaczenie adamantanu i makrocykli porfirynoidowych w chemii leków, badane związki można również rozpatrywać jako koniugaty ftalocyjanino- i porfirazyno-adamantylowe. W celu realizacji zadania, otrzymano odpowiednie adamantylowe pochodne maleonitrylu i ftalonitrylu, które posłużyły jako substraty w reakcjach makrocyklizacji prowadzących do docelowych koniugatów.

Zagadnienia zostaną omówione poniżej w następującej kolejności: (i) synteza i charakterystyka ftalocyjanin posiadających ugrupowanie 2-(1-adamantyl)etoksyłowe w pozycji nieperyferyjnej; (ii) synteza i charakterystyka ftalocyjanin zawierających ugrupowanie 1-adamantylsulfanyłowe w pozycji nieperyferyjnej (pozycja α) wraz z badaniami fotochemicznymi; (iii) synteza i charakterystyka ftalocyjanin zawierających ugrupowanie 1-adamantylsulfanyłowe w pozycji peryferyjnej (pozycja β) wraz z badaniami fotochemicznymi i biologicznymi; (iv) synteza i charakterystyka porfirazyny posiadającej ugrupowanie 2-(1-adamantyl)-5-fenyl-1*H*-pirolilowe wraz z badaniami fotochemicznymi i biologicznymi.

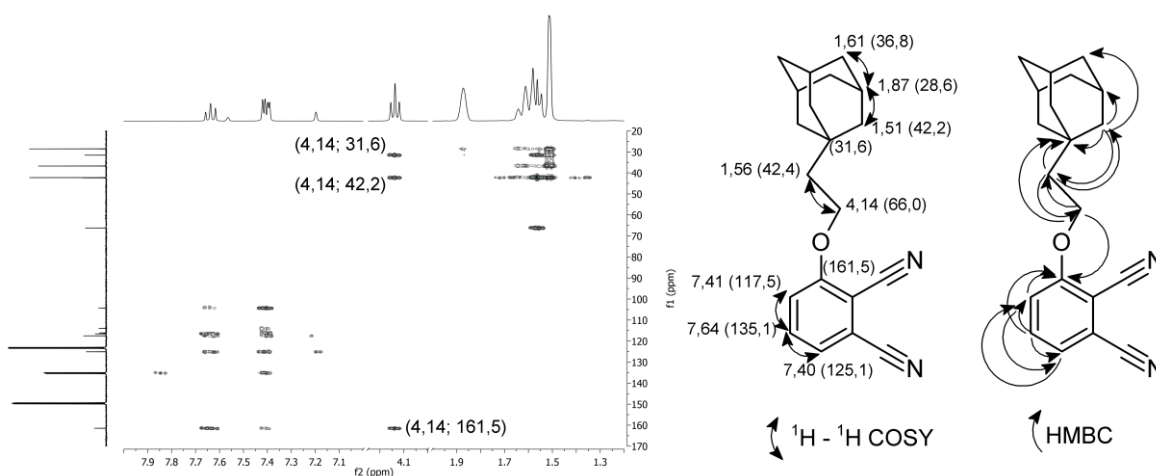
IV.1 Synteza i charakterystyka ftalocyjanin posiadających ugrupowanie 2-(1-adamantyl)etoksyłowe w pozycji nieperyferyjnej

Substratami do syntezy ftalocyjanin są pochodne kwasu ftalowego, spośród których najczęściej wykorzystywane są pochodne ftalonitrylu (1,2-dicyjanobenzenu). Pierwszym etapem na drodze do otrzymania ftalocyjaniny, posiadającej podstawniki 2-(1-adamantyl)etoksyłowe w pozycji nieperyferyjnej, była synteza odpowiedniej pochodnej ftalonitrylu. W tym celu zastosowano reakcję typu podstawienia grupy nitrowej (ang. *nitro group displacement*), która zachodzi według mechanizmu reakcji substytucji nukleofilowej w pierścieniu aromatycznym [100–102].



Schemat 1. Reagenty i warunki: (i) NaH, DMF, temp. pokojowa.

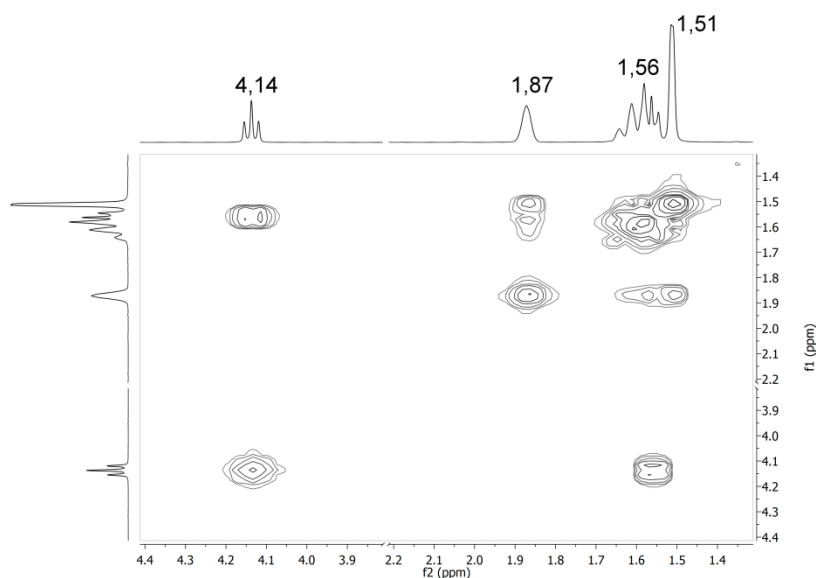
Reakcję przeprowadzono stosując komercyjnie dostępne substraty: 3-nitro-1,2-dicyjanobenzen **1** i 2-(1-adamantylo)etanol **2** w temperaturze pokojowej, w dimetyloformamidzie (DMF) jako rozpuszczalniku, wykorzystując wodorek sodu jako zasadę. Reakcję zakończono wylewając mieszaninę na wodę z lodem. Po odsączeniu, osad zawierający związek **3** oczyszczono na drodze krystalizacji z metanolu. Uzyskaną pochodną ftalonitrylu **3** scharakteryzowano wyznaczając temperaturę topnienia, wykorzystując chromatografię cienkowarstwową (R_f), jedno- i dwuwymiarowe techniki ^1H i ^{13}C NMR oraz ES MS.



Ryc. 25. Widmo $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HMBC związku **3**. Podano wartości przesunięć chemicznych dla atomów wodoru i węgla oraz sprzężenia zaobserwowane w cząsteczce.

Celem przypisania sygnałów przesunięć chemicznych odpowiednich atomów wodoru i węgla, zastosowano techniki dwuwymiarowego NMR, takie jak $^1\text{H}^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HSQC i $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HMBC (**Ryc. 25**). W widmie $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HMBC zaobserwowano sprzężenie pomiędzy atomami wodoru o przesunięciach chemicznych 7,64; 7,41 i 4,14 ppm, a atomem węgla o przesunięciu 161,5 ppm, co umożliwiło przypisanie sygnałów protonów

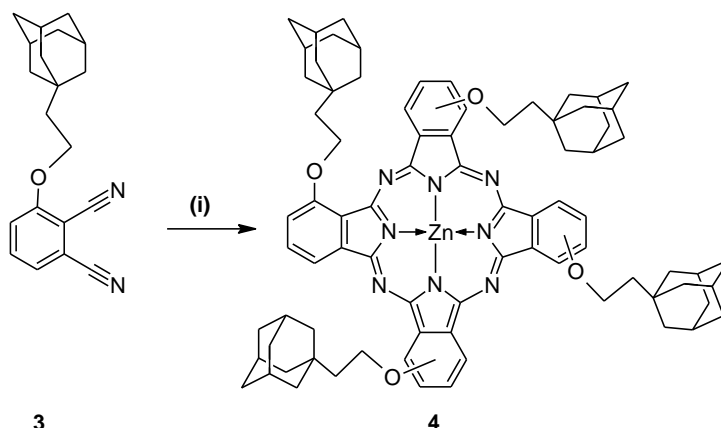
w pierścieniu aromatycznym cząsteczki. Obserwacja sprzężeń pomiędzy protonami jednej z grup metylenowych (4,14 ppm), a atomami węgla grupy adamantylowej (31,6; 42,4 ppm), pozwoliła na przypisanie przesunięć odpowiednim atomom węgla. Do interpretacji sygnałów pochodzących od atomów wodoru i węgla w alifatycznej grupie adamantylowej, bardzo użyteczne okazało się zastosowanie techniki $^1\text{H}^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HSQC, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HMBC. W widmie ^1H NMR zaobserwowano nakładanie się sygnałów protonów grupy adamantylowej (1,51 ppm) i jednej z grup metylenowych łańcucha etoksylogowego (1,56 ppm). W celu dodatkowego potwierdzenia poprawności interpretacji tej części widma, wykonano analizę $^1\text{H}^1\text{H}$ COSY (**Ryc. 26**). Zaobserwowano sprzężenia pomiędzy protonami grup metylenowych o przesunięciach chemicznych 4,14 i 1,56 ppm oraz sprzężenia protonów grupy adamantylowej, którym odpowiadały sygnały przy 1,87, 1,56 oraz 1,51 ppm.



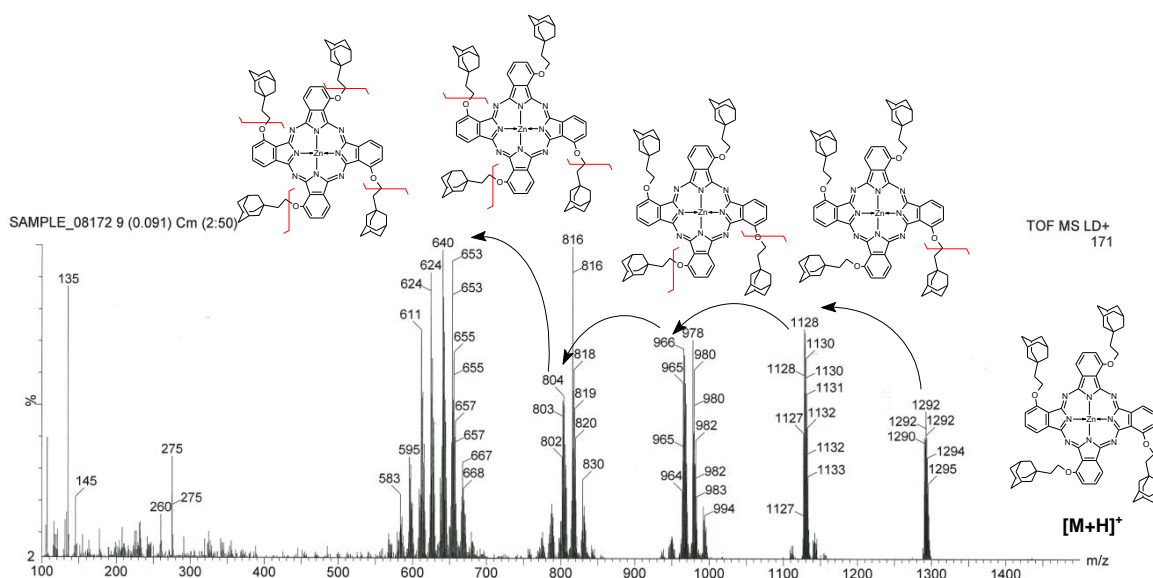
Ryc. 26. Widmo $^1\text{H}^1\text{H}$ COSY związku **3** (fragment).

Reaktywność nowego ftalonitrylu **3** oceniono w reakcji makrocyklizacji według procedury literaturowej, stosowanej w syntezie ftalocyjanin, a przedstawionej m.in. przez Vacus i wsp. [103]. Związek **3** poddano reakcji makrocyklizacji w obecności octanu cynku i 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-enu (DBU), w *n*-pentanolu w czasie 23 godzin, utrzymując temperaturę powyżej 116 °C (**Schemat 2**). Po zakończeniu reakcji, rozpuszczalnik odparowano azeotropowo z toluenem, a następnie suchą pozostałość poddano kilkakrotnie chromatografii kolumnowej w normalnym i odwróconym układzie faz. Wyizolowany związek **4** poddano charakterystyce metodą spektroskopii UV-Vis. Uzyskane wyniki potwierdziły powstanie związku makrocyklicznego, ponieważ w widmie

obserwowano pasmo B (Soreta) z maksimum absorpcji przy $\lambda = 318$ nm oraz pasmo Q z $\lambda_{\text{max}} = 700$ nm, które odpowiada przejściom $\pi \rightarrow \pi^*$.



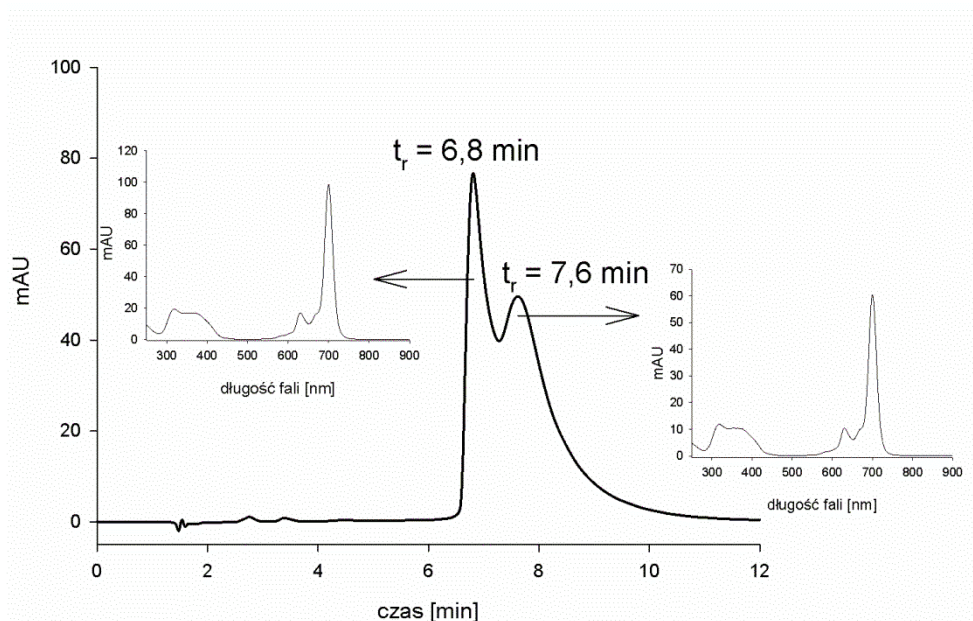
Schemat 2. Reagenty i warunki reakcji: (i) octan cynku, 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en (DBU), *n*-pentanol, temp. wrzenia, 23 godz.



Ryc. 27. Widmo MS MALDI ftalocyjaniny **4**; przedstawiono przebieg fragmentacji jonu molekularnego $[M+H]^+$ m/z 1290.

W widmie MS MALDI stwierdzono występowanie jonu molekularnego m/z 1290 $[M+H]^+$ oraz jonów fragmentacyjnych m/z 1127, 964, 802, 640 (**Ryc. 27**), powstających wskutek eliminacji grup adamantyloetylowych. Analiza czystości próbki została wykonana metodą HPLC (**Ryc. 28**). Na chromatogramie stwierdzono występowanie sygnałów pochodzących od związku **4** ($t_r = 6,8$ min) oraz jego formy zagregowanej ($t_r = 7,6$ min). Dowodem potwierdzającym agregację ftalocyjaniny **4**, jest identyczny przebieg widm UV-Vis wykreślonych dla związków, wykazujących czas retencji $t_r = 6,8$ min oraz $t_r = 7,6$ min

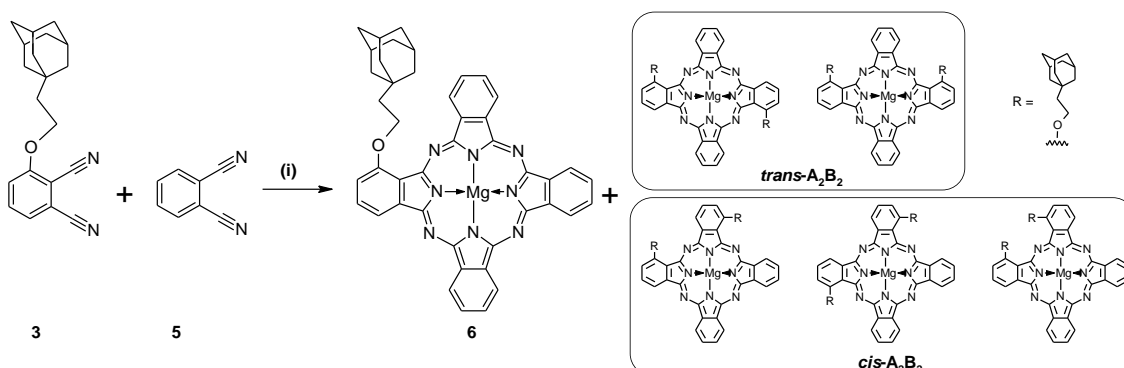
(Rys. 28). Jednocześnie wyniki analizy HPLC nie wskazywały na powstanie w reakcji makrocyklizacji różnych regioizomerów.



Ryc. 28. Chromatogram HPLC makrocyklu **4** otrzymany z zastosowaniem fazy ruchomej THF:acetonitryl:woda (56:37:7); wstawki przedstawiają widma UV-Vis związków wykazujących czas retencji $t_r = 6,8$ oraz $t_r = 7,6$ min.

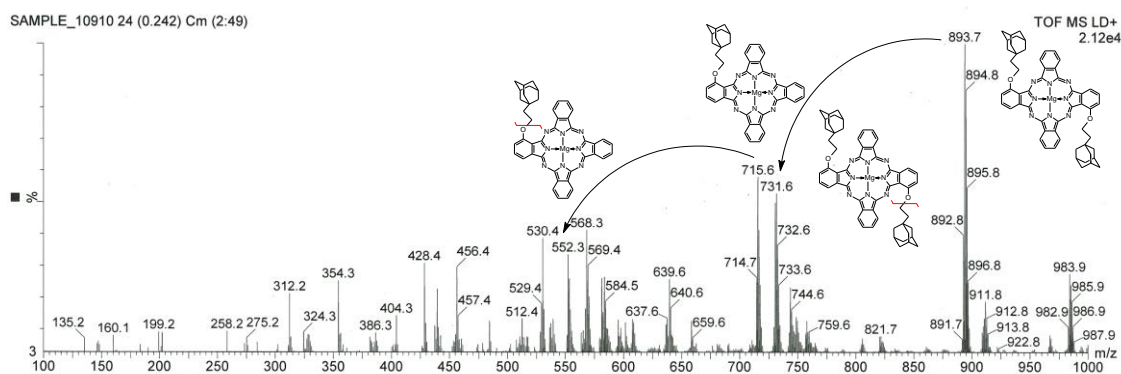
Problemy preparatywne przy izolacji makrocyklu **4** przyczyniły się do zastosowania innych rozwiązań syntetycznych. Postanowiono użyć pochodnej ftalonitrylu **3** w reakcjach makrocyklizacji prowadzących do ftalocyjanin, posiadających zróżnicowane otoczenie peryferyjne. Założono, że zmniejszenie liczby grup peryferyjnych 2-(1-adamantyl)etoksyłowych z czterech do jednej, przyczyni się do zmniejszenia tendencji makrocykli do agregowania. W związku z tym, w dalszych badaniach podjęto się syntezy ftalocyjanin z wykorzystaniem dwóch różnych ftalonitryli (pochodnej ftalonitrylu **3** oraz 1,2-dicyjanobenzenu **5**), przy czym użycie w nadmiarze 1,2-dicyjanobenzenu, miało prowadzić do ftalocyjanin typu A_3B oraz A_4 . Ftalocyjanina typu A_3B zawiera trzy niepodstawione jednostki izoindolowe i jedną jednostkę izoindolu z podstawnikiem 2-(1-adamantyl)etoksyłowym, natomiast ftalocyjanina A_4 zawiera w strukturze tylko jednostki izoindolowe. W reakcji mieszanej makrocyklizacji użyto związku **3** i 1,2-dicyjanobenzenu (**5**), we wrzącym *n*-butanolu, stosując *n*-butanolanu magnezu jako zasadę. Zastosowane warunki odpowiadały makrocyklizacji Linstead'a, z modyfikacją wprowadzoną później przez Schramma i Hoffmana, oraz Barretta i Hoffmana polegającą na zastosowaniu reakcji mieszanej makrocyklizacji z użyciem dwóch maleonitryli (**Schemat 3**) [8,104–106].

Natomiast w przeprowadzonych badaniach w miejsce oryginalnie użytego *n*-propanolu, jako rozpuszczalnik zastosowano *n*-butanol.



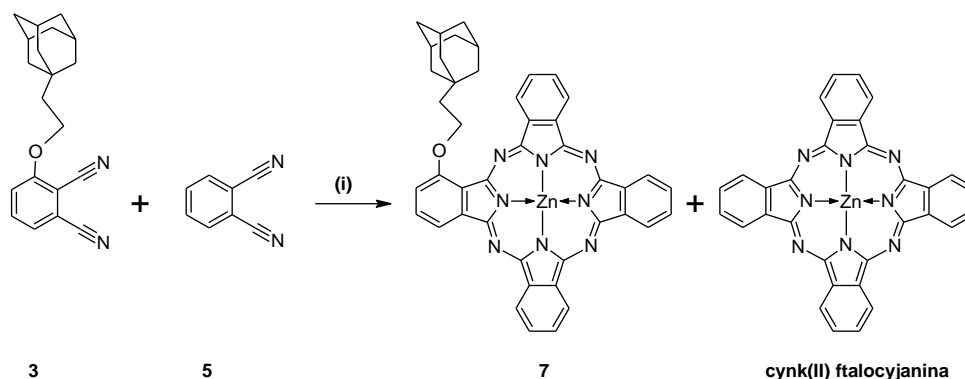
Schemat 3. Reagenty i warunki reakcji: (i) *n*-butanolan magnezu, *n*-butanol, temp. wrzenia, 23 godz. We wstawce przedstawiono możliwe, powstające ubocznie regioizomery.

Mieszaninę reakcyjną przesączono przez ziemię krzemkową, a przesącz odparowano azeotropowo z toluenem do suchej pozostałości. Rozdział chromatograficzny wykonano kilkakrotnie metodą krótkiej kolumny z użyciem żelu krzemionkowego. Wyizolowaną frakcję poddano analizie metodą MALDI MS, a uzyskane wyniki potwierdziły powstanie związku **6**, posiadającego m/z 715,6 $[M+H]^+$. Pojawienie się dodatkowego sygnału przy m/z 893,7 i jonu fragmentacyjnego przy m/z 731,6 wskazuje na powstanie ftalocyjaniny typu A₂B₂, zawierającej dwie niepodstawione jednostki izoindolowe i dwie jednostki izoindolu z podstawnikiem 2-(1-adamantylo)etoksyłowym (**Ryc. 29**).



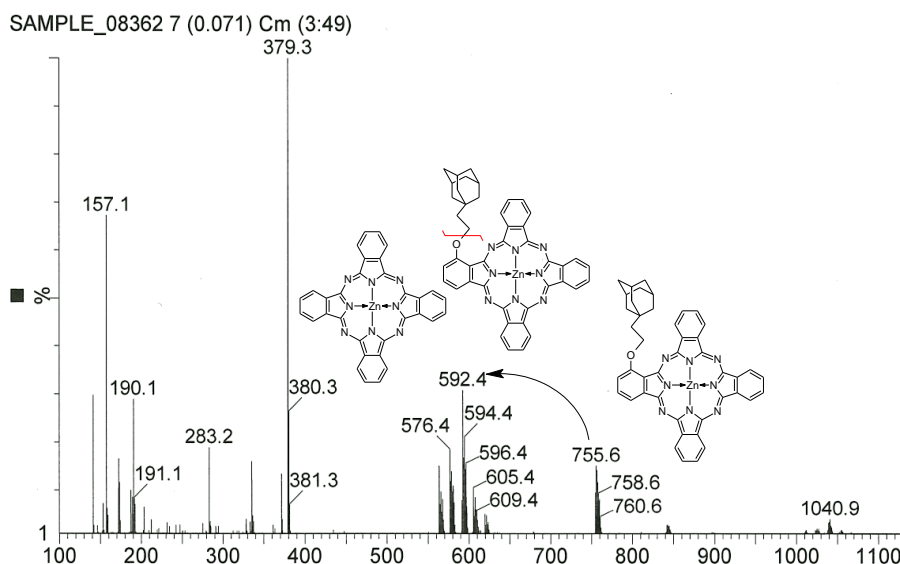
Ryc. 29. Widmo MS MALDI makrocyklu **6**, obrazujące przebieg fragmentacji jonu molekularnego $[M+H]^+$ m/z 715,6 i ftalocyjaniny typu A₂B₂ m/z 893,7 $[M+H]^+$ (przedstawiono jeden z możliwych izomerów).

Ze względu na możliwość występowania podjednostek izoindolu w tzw. położeniu *cis*- i *trans*-A₂B₂, możliwe jest występowanie pięciu regioizomerów, do identyfikacji których niezbędne są wyniki analizy rentgenostrukturalnej.



Schemat 4. Reagenty i warunki reakcji: (i) octan cynku, DBU, *n*-pentanol, temp. powyżej 106 °C, 23 godz.

Przeprowadzono również reakcję mieszanej makrocyklizacji z użyciem reagentów **3** i **5**, adaptując procedurę syntezy ftalocyjanin wg. Vacus i wsp. [103]. W tym celu zastosowano octan cynku w obecności DBU w pentanolu, w temp. powyżej 106 °C w czasie 23 godz. (**Schemat 4**). Następnie mieszaninę reakcyjną odparowano azeotropowo z toluenem i poddano kilkakrotnie chromatografii kolumnowej metodą krótkiej kolumny w normalnym i odwróconym układzie faz. Wyniki analizy MALDI MS potwierdziły obecność związku **7**, obserwowano pojawienie się jonu m/z 755,6 $[M+H]^+$ i jonu fragmentacyjnego m/z 592,4; powstałego w wyniku eliminacji grupy adamantyloetylowej, analogicznie jak w przypadku związku **4**. Zaobserwowano również jon m/z 576,4 $[M]^+$ potwierdzający powstanie niepodstawionej cynk(II) ftalocyjaniny (**Ryc. 30**). Rozdział uzyskanej mieszaniny poreakcyjnej sprawiał duży problem preparatywny i pomimo wielokrotnej chromatografii w normalnym i odwróconym układzie faz, nie udało się wydzielić jednorodnego produktu **7**, ponieważ zawsze zawierał domieszkę cynk(II) ftalocyjaniny.

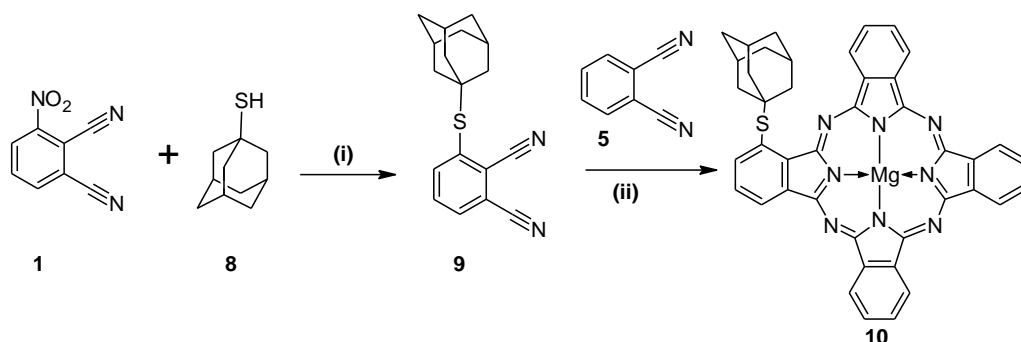


Ryc. 30. Widmo MS MALDI makrocyklu **7**. Przedstawiono przebieg fragmentacji jonu molekularnego $[M+H]^+$ m/z 755,6 i cynk(II) ftalocyjaniny m/z 576,4 $[M]^+$.

Należy podkreślić, że pochodna ftalonitrylu **3** w obu wyżej omówionych reakcjach wykazała zróżnicowaną reaktywność. W reakcji prowadzącej do **6**, ftalonitryl **3** wykazał znaczną aktywność, co umożliwiło uzyskanie makrocyklu typu A_2B_2 . Z kolei w reakcji prowadzącej do **7**, reaktywność była bardzo mała, dlatego jako główny produkt otrzymywano niepodstawioną cynk(II) ftalocyjaninę.

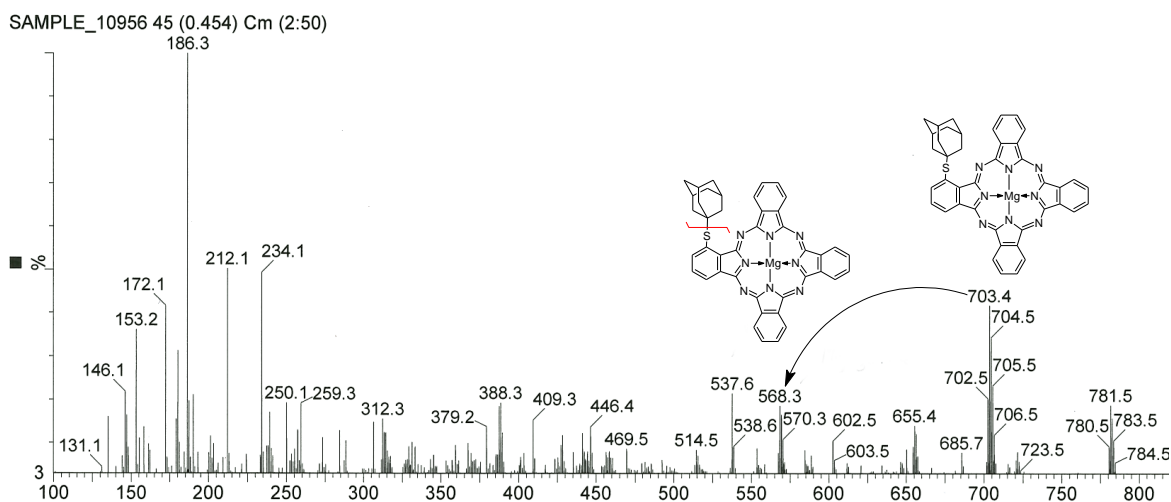
IV.2 Synteza i charakterystyka ftalocyjanin posiadających ugrupowanie 1-adamantylosulfanyłowe w pozycji nieperyferyjnej wraz z badaniami fotochemicznymi

Modyfikując procedurę literaturową otrzymano 3-(1-adamantylosulfanylo)-1,2-dicyjanobenzen (**9**) w reakcji 3-nitro-1,2-dicyjanobenzenu **1** z 1-admantanotiolem (**8**) [38] (Schemat 5). Proces prowadzono w środowisku DMF, wykorzystując węglan potasu jako zasadę. Mieszaninę reakcyjną wylano na wodę z lodem, odsączono osad związku **9**, który następnie oczyszczono przez ogrzewanie z metanolem. Zastąpiono w ten sposób podaną w literaturze metodę oczyszczania, opartą o chromatografię kolumnową [38]. Tożsamość związku **9** potwierdzono wyznaczając wartość R_f i oznaczając temperaturę topnienia.



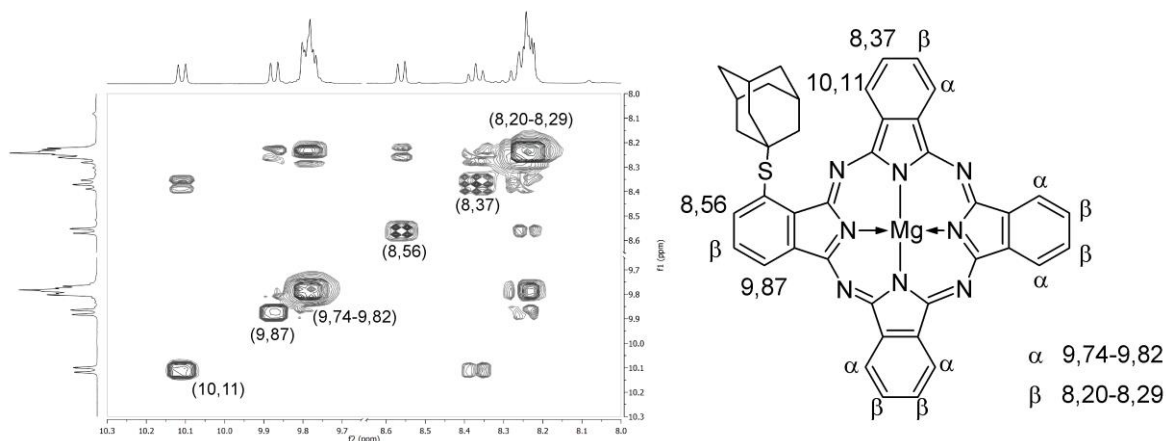
Schemat 5. Reagenty i warunki reakcji: (i) K_2CO_3 , DMF; (ii) *n*-butanolan magnezu, *n*-butanol, temp. wrzenia, 17 godz.

Związek **9** poddano reakcji mieszanej makrocyklizacji z 1,2-dicyjanobenzenem **5**, w obecności *n*-butolanu magnezu, we wrzącym *n*-butanolu (**Schemat 5**) według procedury opisanej w rozdz. IV.1 [8,104]. Następnie mieszaninę reakcyjną przesączono przez ziemię krzemkową, a rozpuszczalnik odparowano azeotropowo do suchej pozostałości. Rozdział chromatograficzny wykonano metodą krótkiej kolumny z użyciem żelu krzemionkowego, stosując dwa różne układy rozpuszczalników ($CH_2Cl_2:CH_3OH$ 50:1 do 4:1, *n*-heksan:octan etylu 7:1 do 7:2) w normalnym układzie faz. Ponadto wykonano rozdział chromatograficzny w odwróconym układzie faz ($CH_3OH:THF$ 10:1 do 5:1). Związek **10** otrzymano z 3% wydajnością i scharakteryzowano technikami spektrometrii mas (MS MALDI) i NMR (1H , $^1H^1H$ COSY, ^{13}C). W widmie MS MALDI stwierdzono występowanie jonu molekularnego $[M+H]^+$ $m/z = 703,4$ oraz jonu fragmentacyjnego $m/z = 568,3$ (**Ryc. 31**).



Ryc. 31. Wdimo MS MALDI ftalocyjaniny **10**. Pokazano przebieg fragmentacji jonu molekularnego $[M+H]^+$ $m/z = 703,4$.

W widmie ^1H NMR obserwowano sygnały pochodzące od protonów grupy adamantylowej przy 2,53, 1,86 i 1,45-1,55 ppm. Sygnały protonów aromatycznych występujących w części nieperyferyjnej (w położeniu α) zaobserwowano w zakresie 9,70-10,10 ppm, a w części peryferyjnej ftalocyjaniny (w położeniu β) w zakresie 8,20-8,60 ppm. W widmie ^{13}C NMR obecność grupy adamantylowej potwierdzają sygnały przy 50,7; 44,6; 36,4; 30,5 ppm. Dla atomów węgla w makrocyklicznym fragmencie cząsteczki, uzyskano sygnały występujące w trzech zakresach, tj. 153,4-155,1; 139,5-141,2; 125,9-130,12 ppm.

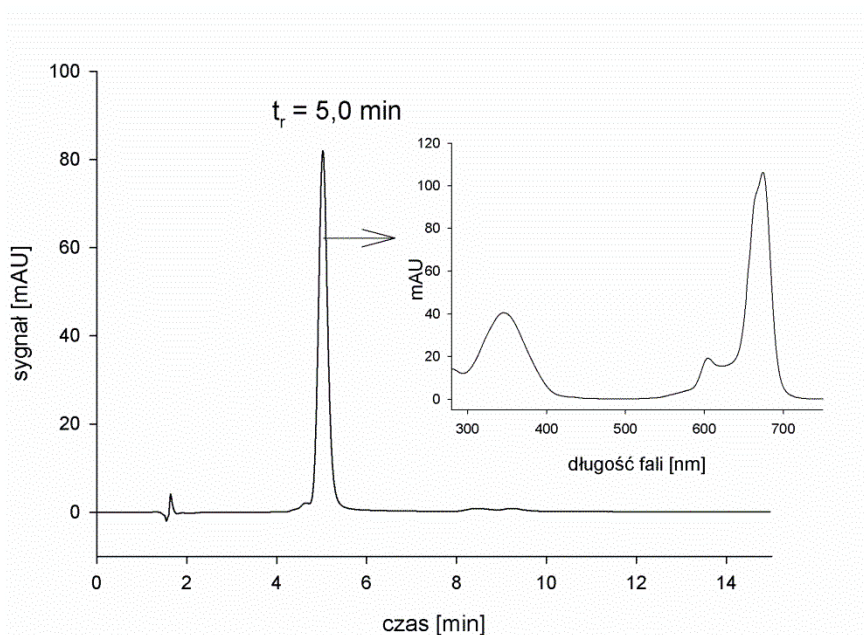


Ryc. 32. Fragment widma $^1\text{H}^1\text{H}$ COSY NMR związku **10** w zakresie 8,00-10,30 ppm wraz z przesunięciami chemicznymi przypisanymi sygnałom odpowiednich protonów.

Analiza $^1\text{H}^1\text{H}$ COSY NMR pozwoliła na przypisanie sygnałów do odpowiadających im atomów wodoru (**Ryc. 32**). Zgodnie z danymi literaturowymi [107], sygnały protonów w pozycji α mają większe przesunięcia chemiczne niż sygnały protonów w pozycji β . Spośród sygnałów odpowiadających atomom ^1H w położeniu β , jedynie dla sygnału 8,56 ppm nie zaobserwowano sprzężenia z atomem ^1H w położeniu α (**Ryc. 32**). Dlatego wartość tego przesunięcia przypisano atomowi wodoru, obecnemu w pozycji 2 ftalocyjaniny. Z kolei sygnał 8,56 ppm, przypisano atomowi wodoru położonemu w pozycji 3 pierścienia ftalocyjaniny, z uwagi na sprzężenie z jednym z protonów multipletu 8,20-8,29 ppm. Z protonem multipletu przy 8,20-8,29 ppm, sprzęga się proton o przesunięciu 9,87 ppm, znajdujący się w pozycji 4 pierścienia ftalocyjaniny. Sygnał przy 10,11 ppm, odpowiada silnie odsłanianemu atomowi wodoru w położeniu α pierścienia ftalocyjaniny, w jednostce izoindolowej sąsiadującej z grupą 1-adamantylosulfanylową. Należy zakładać, że obserwowana wartość przesunięcia sygnału tego protonu, jest skutkiem występującego oddziaływania przez przestrzeń z grupą adamantylosulfanylową. Natomiast z protonem posiadającym przesunięcie 10,11 ppm, sprzęga się proton dający

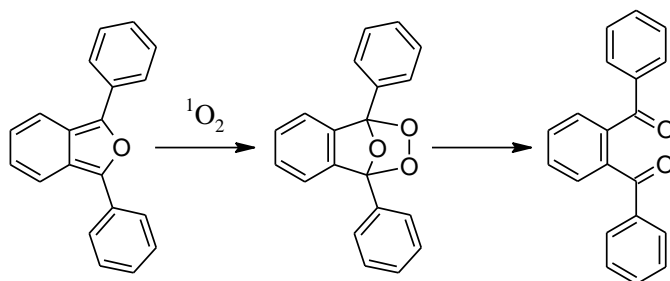
sygnał przy 8,37 ppm, odpowiadający sąsiedniemu atomowi w położeniu β . Pozostałe sygnały atomów w położeniach α i β makrocyklu, występują w zakresach odpowiednio 9,74-9,82 i 8,20-8,29 ppm.

Wykorzystując metodę HPLC z zastosowaniem jako fazy ruchomej mieszaniny rozpuszczalników $\text{CH}_3\text{OH}:\text{THF}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (90:5:50), określono czystość uzyskanego makrocyklu i stwierdzono zawartość ftalocyjaniny **10** na poziomie 97,5% (**Ryc. 33**).



Ryc. 33. Chromatogram HPLC związku **10**.

Badano zdolność ftalocyjaniny **10** do generowania tlenu singletowego, a uzyskane wyniki porównano z wartościami związku referencyjnego, którym była cynk(II) ftalocyjanina [108–110]. Wykorzystano 1,3-difenyilizobenzofuran (DPBF) jako chemiczny wygaszacz tlenu singletowego (**Ryc. 34**).



Ryc. 34. Schemat procesu utlenienia DPBF przez tlen singletowy.

Roztwory **10** i DPBF eksponowano na promieniowanie o długości fali, odpowiadającej maksimum absorpcji pasma Q ftalocyjaniny – odpowiednio $\lambda = 674$ nm oraz 677 nm,

dla roztworów w DMF i DMSO. Proces utleniania DPBF monitorowano spektrofotometrycznie, obserwując zanik absorpcji przy 417 nm (**Ryc. 35, 36**). Proces utlenienia DPBF zachodził zgodnie z procesem kinetycznym I-go rzędu. Każdorazowo wykreślano zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu, w celu wyznaczenia parametru k. Do obliczenia wydajności kwantowej wykorzystano metodykę literaturową [109]:

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta}^{\text{ZnPc}} \frac{k}{k^{\text{ZnPc}}} \cdot \frac{A^{\text{ZnPc}}}{A}$$

gdzie:

Φ_{Δ} – wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego ftalocyjaniny **10**

$\Phi_{\Delta}^{\text{ZnPc}}$ – wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego cynk(II) ftalocyjaniny [110]

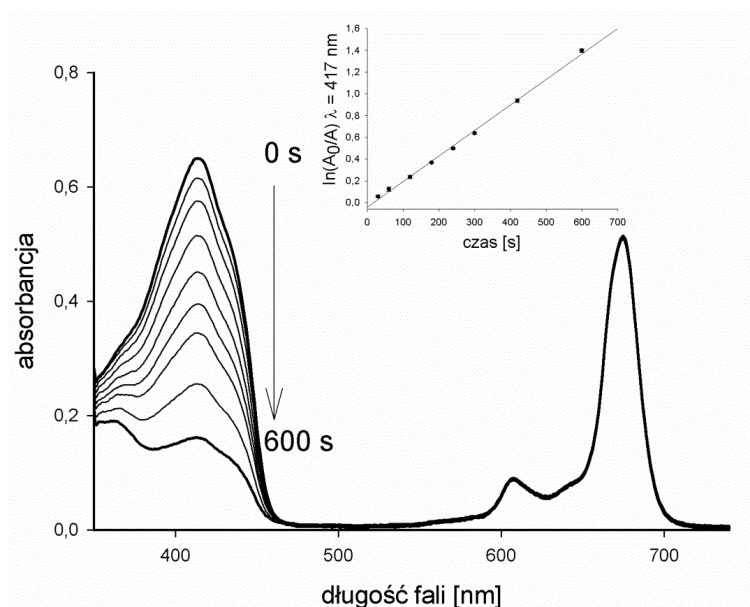
k – stała rozkładu DPBF w obecności badanej ftalocyjaniny **10**

k^{ZnPc} – stała rozkładu DPBF w obecności cynk(II) ftalocyjaniny

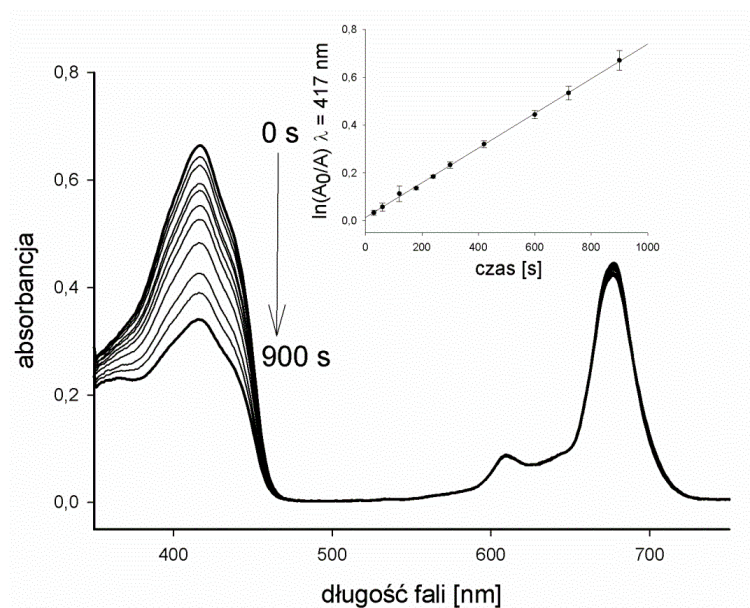
A – absorbancja ftalocyjaniny **10**

A^{ZnPc} – absorbancja cynk(II) ftalocyjaniny

Wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego dla związku **10** wyniosła $\Phi_{\Delta} = 0,32$ w DMF i $\Phi_{\Delta} = 0,25$ w DMSO.

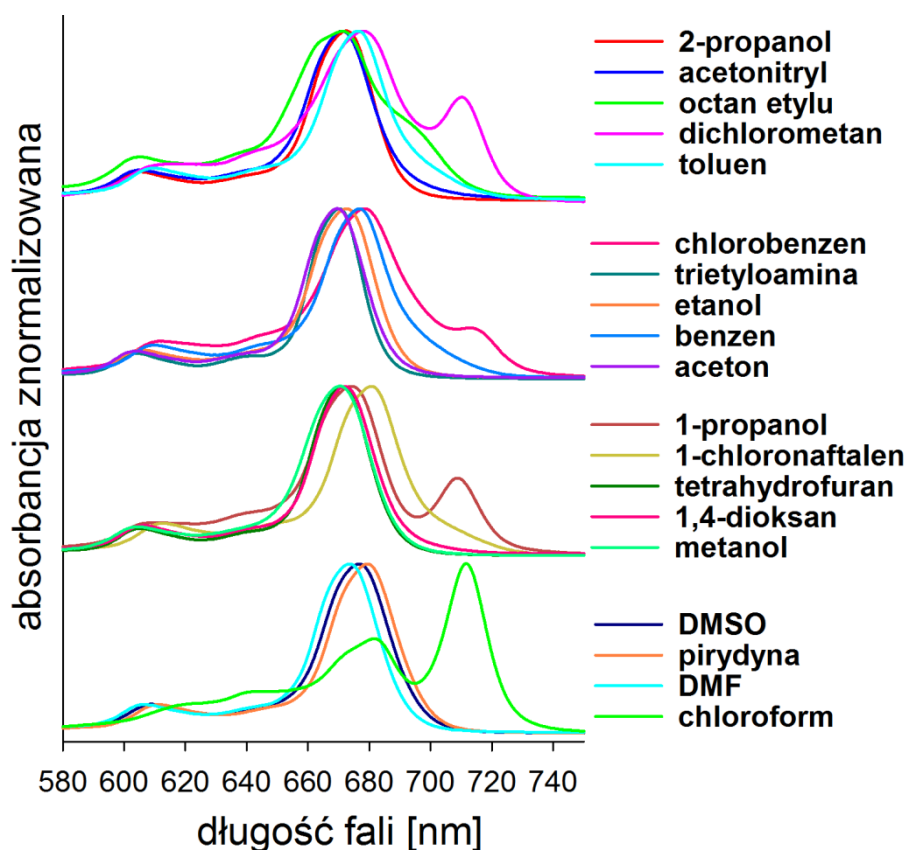


Ryc. 35. Zmiany widma absorpcji mieszaniny **10** i DPBF w DMF podczas ekspozycji na promieniowanie o $\lambda_{\text{max}} = 674$ nm, we wstawce przedstawiono zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu; pomiary wykonano przy $\lambda = 417$ nm.

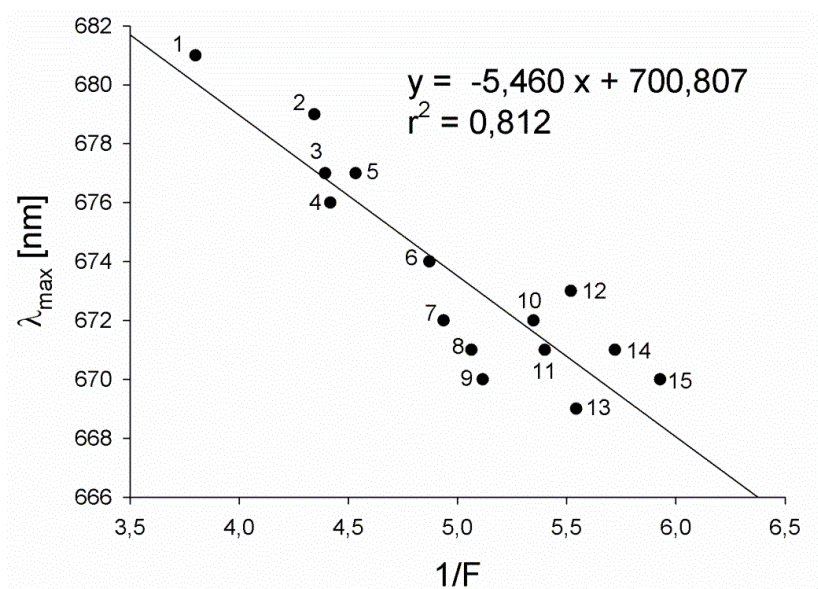


Ryc. 36. Zmiany widma absorpcji mieszaniny **10** i DPBF w DMSO podczas ekspozycji na promieniowanie o $\lambda_{\text{max}} = 677 \text{ nm}$, we wstawce przedstawiono zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu; pomiary wykonano przy $\lambda = 417 \text{ nm}$.

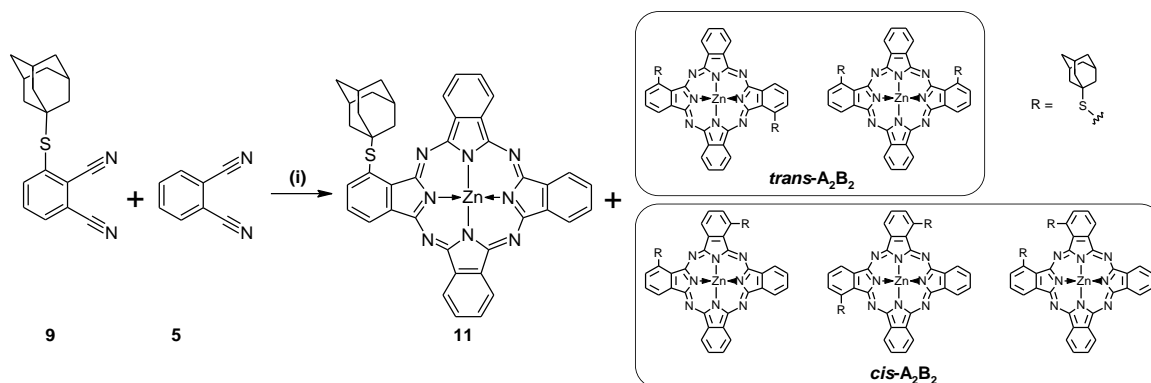
Ftalocyjaninę **10** poddano studiom solwatacyjnym, polegającym na wykreśleniu widm absorpcji UV-Vis w rozpuszczalnikach protycznych i aprotycznych. Analiza przebiegu widm UV-Vis wykazała obecność szerokich pasm Q, z maksimum absorpcji (λ_{max}) w zakresie 669-682 nm i pasm Soreta z λ_{max} w zakresie długości fal 344-350 nm (**Ryc. 37**). Dla roztworów ftalocyjaniny **10** w dichlorometanie, chlorobenzenie, 1-propanolu i chloroformie zaobserwowano powstawanie dodatkowego pasma absorpcji z maksimum przy $\lambda = 710 \text{ nm}$, które może świadczyć o powstawaniu agregatów typu *J* [111]. Spośród pozostałych rozpuszczalników, największą wartość maksimum pasma Q ftalocyjaniny **10** ($\lambda_{\text{max}} = 681 \text{ nm}$) zaobserwowano w chloronaftalenie, najmniejszą – 669 nm w acetonie. Wartości λ_{max} korelowano z parametrem $1/F$, obliczonym według wzoru $F = (n^2 - 1)/(2n^2 + 1)$, gdzie n to indeks refrakcji rozpuszczalnika [112–114]. Dla piętnastu rozpuszczalników stwierdzono liniową zależność pomiędzy λ_{max} , a parametrem $1/F$ ($R^2 = 0,812$) (**Ryc. 38**). Podobnej zależności nie stwierdzono pomiędzy wartościami λ_{max} , a wartościami momentu dipolowego. Uzyskane wyniki wskazują, że zmiany w widmie UV-Vis są skutkiem procesu solwatacji, a właściwości koordynacyjne rozpuszczalnika nie wpływają znacząco na λ_{max} pasma Q [112].



Ryc. 37. Przebieg widm absorpcji ftalocyjaniny **10** w różnych rozpuszczalnikach, przedstawiono zakres pasma Q.

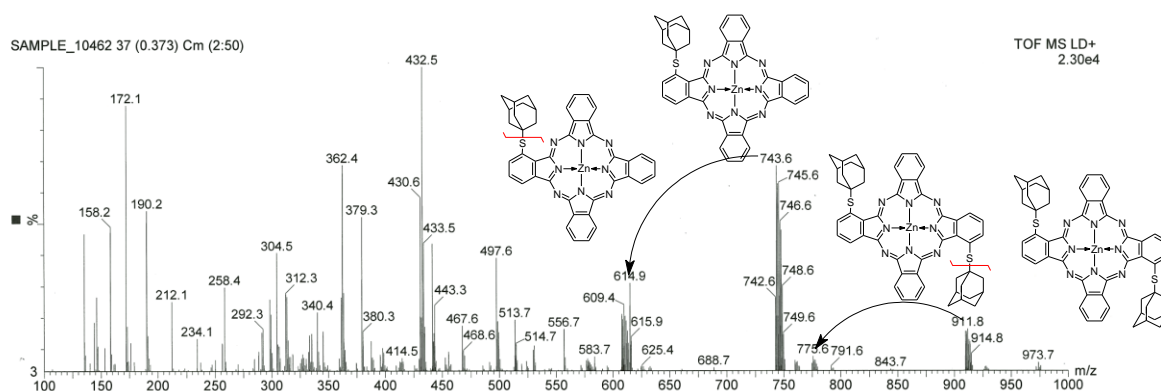


Ryc. 38. Korelacja pomiędzy λ_{\max} pasma Q ftalocyjaniny **10** i parametrem $1/F$. Rozpuszczalniki: (1) 1-chloronaftalen, (2) pirydyna, (3) benzen, (4) toluen, (5) DMSO, (6) DMF, (7) 1,4-dioksan, (8) THF, (9) trietyloamina, (10) 2-propanol, (11) octan etylu, (12) etanol, (13) aceton, (14) acetonitryl, (15) metanol.



Schemat 6. Reagenty i warunki reakcji: (i) octan cynku, DBU, *n*-pentanol, temp. wrzenia, 16 godz.

Przeprowadzono również reakcję mieszaną makrocyklizacji, adaptując procedurę syntezy ftalocyjanin wg Vacus i wsp. [103]. Zastosowano octan cynku w obecności DBU w *n*-pentanolu, w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika (**Schemat 6**). Następnie mieszaninę reakcyjną odparowano azeotropowo z toluenem i poddano kilkakrotnie chromatografii kolumnowej metodą krótkiej kolumny w normalnym i odwróconym układzie faz.



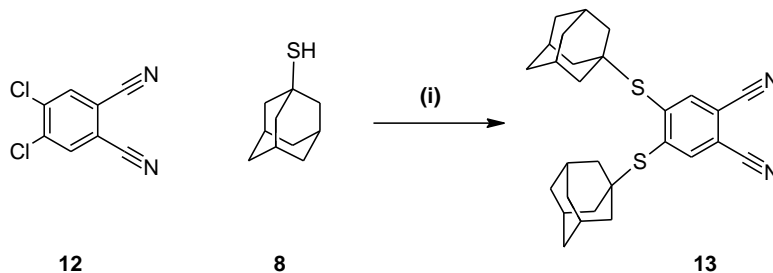
Ryc. 39. Widmo MS MALDI makrocyklu **11**. Przedstawiono przebieg fragmentacji jonu molekularnego $[M+H]^+$ m/z 743,6 i ftalocyjaniny typu A_2B_2 m/z 909,8 $[M+H]^+$ (przedstawiono jeden z możliwych izomerów).

Wyniki analizy MALDI MS wskazały na powstanie związku **11**, co potwierdza obecność jonu molekularnego $[M+H]^+$ m/z 743,6; jonu fragmentacyjnego m/z 608. Zaobserwowano także jon m/z 911,8 $[M+H]^+$ związku A_2B_2 , który może występować w postaci regioizomerów (**Ryc. 39**). Wydzielenie produktu **11** z mieszaniny reakcyjnej stanowiło duży problem preparatywny, gdyż mimo wielokrotnie powtarzanej chromatografii

w normalnym i odwróconym układzie faz, nie udało się uzyskać czystej ftalocyjaniny **11**, która zawsze zawierała domieszkę związku typu A₂B₂.

IV.3 Synteza i charakterystyka ftalocyjanin posiadających ugrupowanie 1-adamantylosulfanyłowe w pozycji peryferyjnej wraz z badaniami fotochemicznymi i biologicznymi

4,5-Dichloro-1,2-dicyjanobenzen (**12**) poddano reakcji substytucji nukleofilowej z 1-adamantaniolem (**8**), w obecności węglanu potasu jako zasady, w DMF jako rozpuszczalniku (**Schemat 7**). W tym celu zaadaptowano literaturową procedurę Wöhrle i wsp. [115]. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 20 godzin, po czym mieszaninę reakcyjną wylano na wodę z lodem. Zebrano **13** w postaci jasnożółtego osadu, który przemyto metanolem na gorąco, uzyskując końcowy produkt z wydajnością 99%.



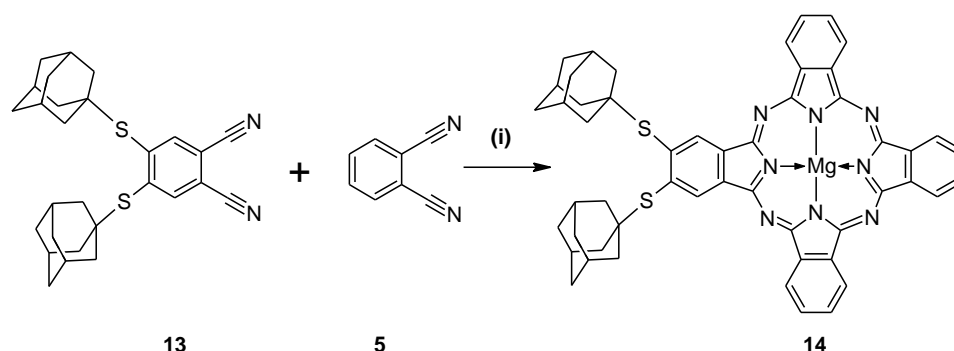
Schemat 7. Reagenty i warunki reakcji: (i) K₂CO₃, DMF, temp. pokojowa, 20 godz.

Związek **13** scharakteryzowano wyznaczając temperaturę topnienia, współczynnik R_f, przeprowadzając analizę elementarną, wykorzystując spektrometrię mas oraz techniki ¹H i ¹³C NMR. W widmie ¹H NMR stwierdzono występowanie sygnału pochodzącego od protonów pierścienia aromatycznego przy 8,15 ppm, a także trzech sygnałów związanych z obecnością protonów grupy adamantyłowej przy 2,02; 1,89; 1,63 ppm. W widmie ¹³C NMR odnotowano występowanie ośmiu sygnałów.

Makrocyclizacja związku **13** - z uwagi na symetryczną budowę cząsteczki - pozwala na otrzymanie ftalocyjaniny typu A₄ o zdefiniowanej strukturze, bez możliwości powstawania izomerów konstytucyjnych. Reakcję makrocyclizacji związku **13** przeprowadzono w różnych warunkach w oparciu o procedury literaturowe [8,104,116]:

- (i) *n*-butanolan magnezu, *n*-butanol, temp. wrzenia, 19 godz.
- (ii) octan cynku, DBU, *n*-pentanol, temp. wrzenia, 18 godz.
- (iii) octan cynku, DBU, *n*-heksanol, temp. wrzenia, 13 godz.

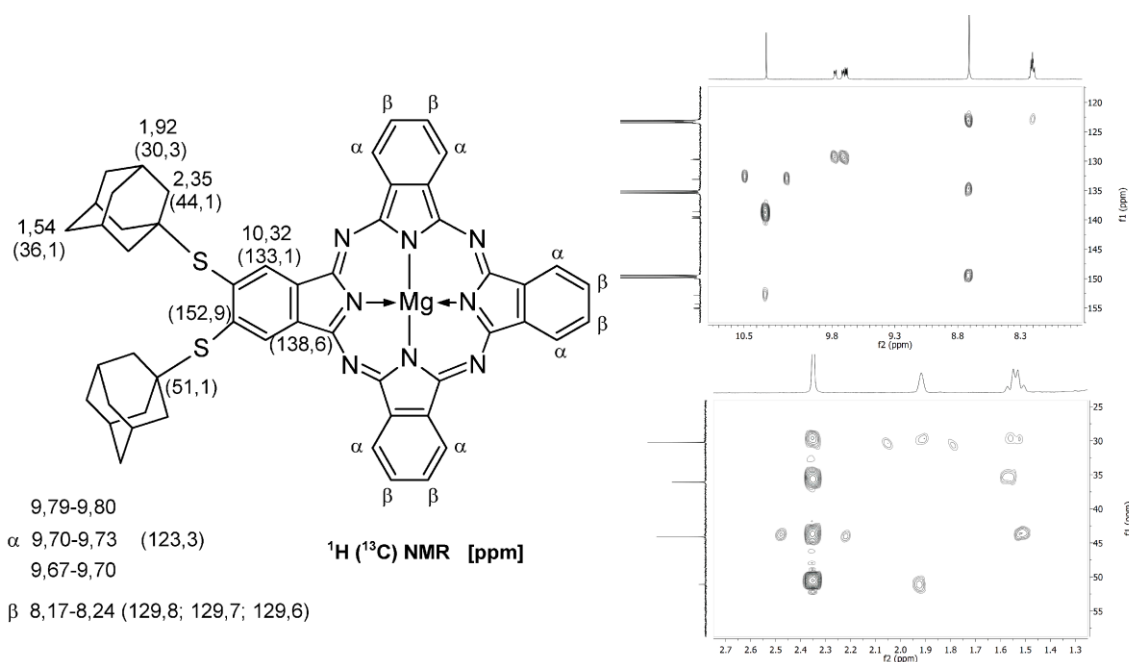
Mimo że, mieszanina reakcyjna przyjmowała kolor ciemnozielony podczas reakcji makrocyklizacji, co jest wskaźnikiem pośrednim zachodzenia reakcji, to powstały produkt ulegał fotodegradacji (ang. *photobleaching*).



Schemat 8. Reagenty i warunki reakcji: (i) *n*-butanolan magnezu, *n*-butanol, temperatura wrzenia, 19 godz.

Z uwagi na powyższe trudności, pochodną ftalonitrylu **13** poddano reakcji mieszanej makrocyklizacji z 1,2-dicyjanobenzenem (**5**), w *n*-butanolu, stosując *n*-butanolan magnezu jako zasadę (**Schemat 8**). Reakcję prowadzono przez 19 godzin, w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Następnie mieszaninę reakcyjną przesączono przez ziemię okrzemkową i odparowano. Suchą pozostałość poddano rozdzielowi chromatograficznemu metodą kolumnową, w normalnym i odwróconym układzie faz. Ftalocyjaninę **14**, którą otrzymano z 5% wydajnością, scharakteryzowano wyznaczając parametr R_f , metodami spektrometrii mas, ^1H i ^{13}C NMR, spektrofotometrycznie i fluorymetrycznie.

W widmie ^1H NMR, przypisano odpowiednie sygnały pochodzące od protonów α pierścienia ftalocyjaniny multipletom 9,79-9,80; 9,70-9,73; 9,67-9,70 ppm. Protonom β przypisano jeden szeroki multiplet 8,17-8,24 ppm, a obecność protonów w położeniu 1 i 4 ftalocyjaniny, sąsiadujących z grupami adamantylosulfanylowymi, była sygnalizowana jako singlet przy 10,32 ppm. Atomy wodoru grup adamantylowych generowały trzy sygnały przy 2,35; 1,92 i 1,54 ppm. Dzięki zastosowaniu technik HSQC i HMBC, możliwe było przypisanie przesunięć chemicznych atomom węgla grup adamantylowych i niektórych atomów pierścienia makrocyklicznego (**Ryc. 40**).

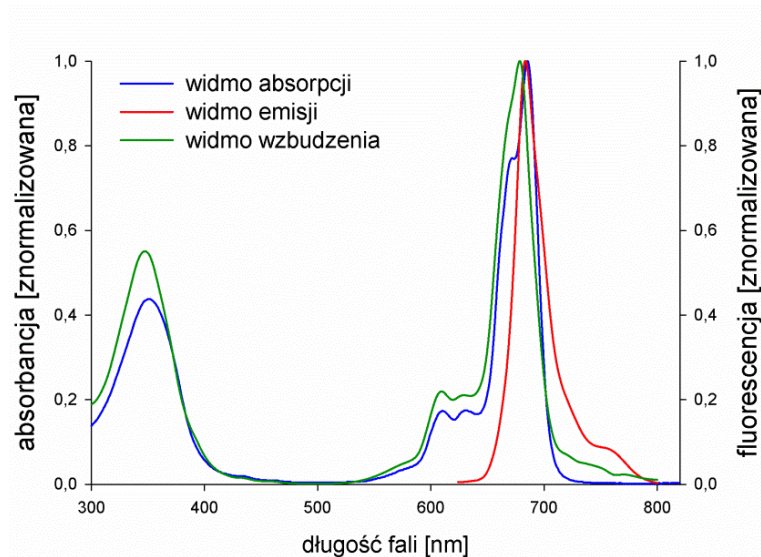


Ryc. 40. Wartości przesunięć chemicznych dla jąder ^1H i ^{13}C w cząsteczce związku **14**, oraz fragmenty widma $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HMBC.

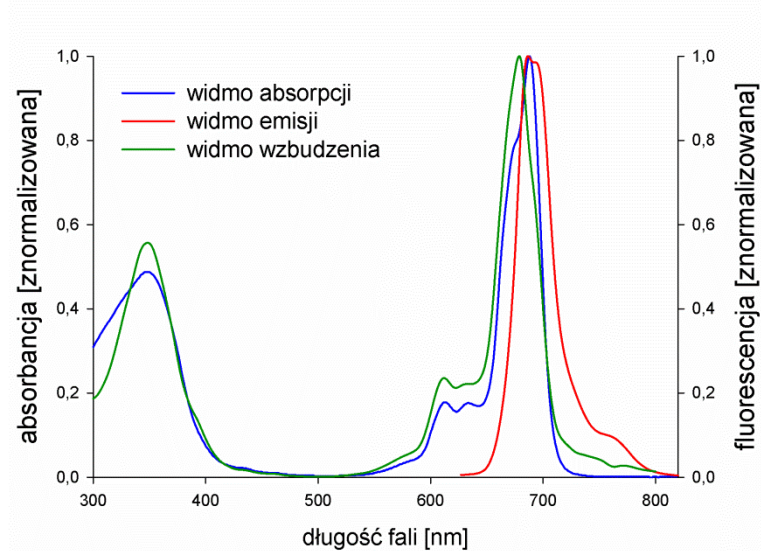
Widma absorpcji i fluorescencji **14** zarejestrowano w dimetyloformamidzie (DMF), dimetylosulfotlenku (DMSO) i tetrahydrofuranie (THF) (**Ryc. 41-43**). Wydajność kwantową fluorescencji Φ_f wyznaczono metodą porównawczą, stosując cynk(II) ftalocyjaninę (ZnPc) jako związek referencyjny, o znanej wydajności kwantowej fluorescencji (Tabela 1) [112].

Związek	Wydajność kwantowa Φ_f		
	DMF	DMSO	THF
14	0,28	0,31	0,33
ZnPc [112]	0,17	0,20	0,23

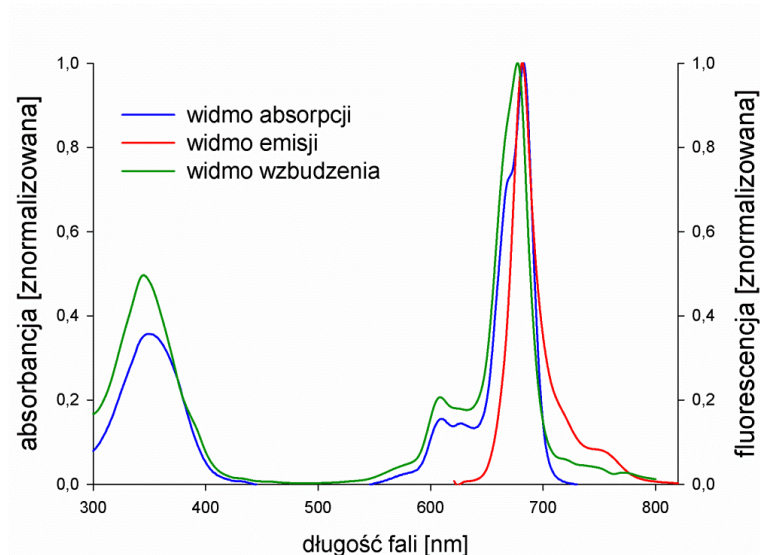
Tabela 1. Wydajność kwantowa fluorescencji Φ_f ftalocyjaniny **14** i cynk(II) ftalocyjaniny jako związku referencyjnego, w różnych rozpuszczalnikach.



Ryc. 41. Widma absorpcji, emisji i wzbudzenia związku **14** w DMF.

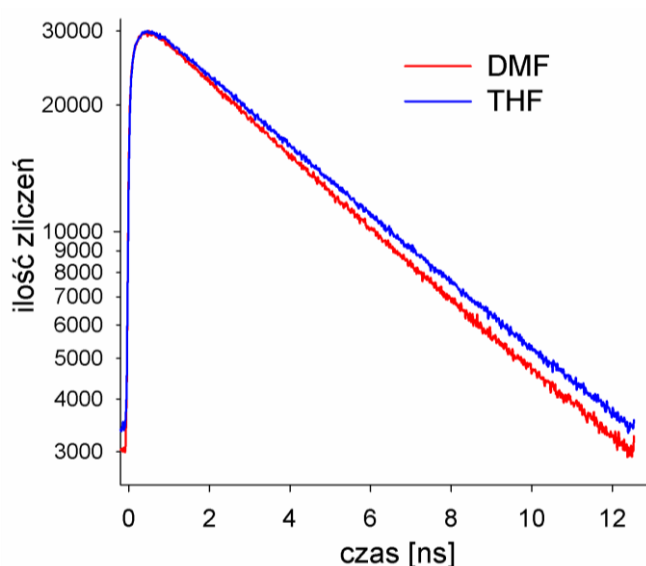


Ryc. 42. Widma absorpcji, emisji i wzbudzenia związku **14** w DMSO.



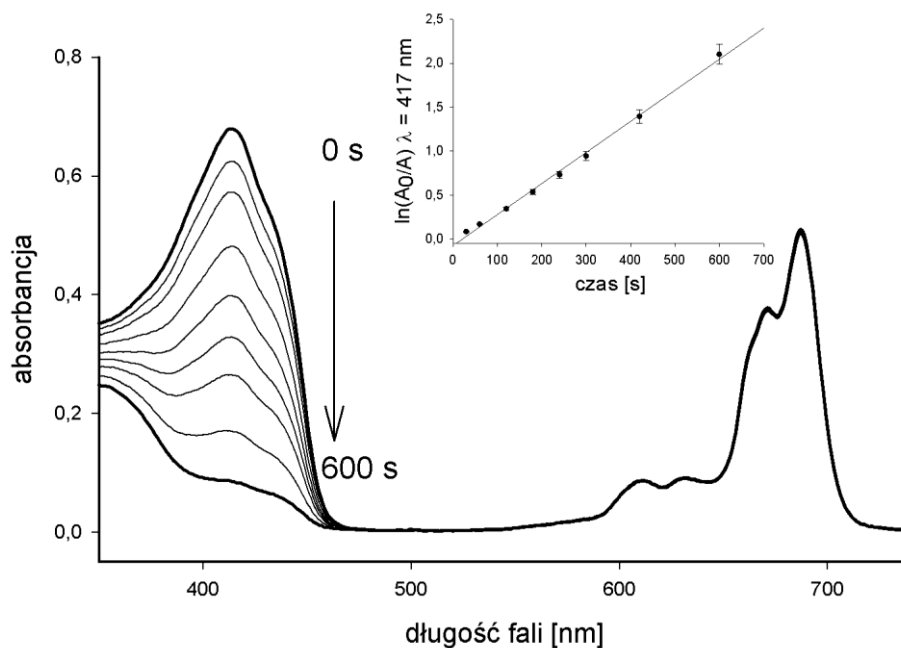
Ryc. 43. Widma absorpcji, emisji i wzbudzenia związku **14** w THF.

Badania zaniku fluorescencji związku **14** wykonano w Instytucie Fizyki Doświadczalnej (Uniwersytet Warszawski). Pomiar został wykonany w trzech rozpuszczalnikach: THF, DMF, DMSO. We wszystkich przypadkach, uzyskane wyniki wskazały na monoeksponencjalny zanik fluorescencji. Czas zaniku fluorescencji τ_{Fl} wynosił odpowiednio $5,2 \pm 0,1$ ns; $4,8 \pm 0,1$ ns; $4,7 \pm 0,1$ ns dla THF, DMF i DMSO. Niewielkie różnice wyników uzyskane dla trzech rozpuszczalników, wskazują na słabe oddziaływania cząsteczki ftalocyjaniny **14** z rozpuszczalnikiem. Otrzymane czasy fluorescencji są dłuższe niż w przypadku niepodstawionej cynk(II) ftalocyjaniny, który np. w DMSO wynosił 3,3 ns [117]. Należy jednocześnie podkreślić, że analizując wydajność kwantową fluorescencji związku **14**, także uzyskano większe wartości w porównaniu do cynk(II) ftalocyjaniny.

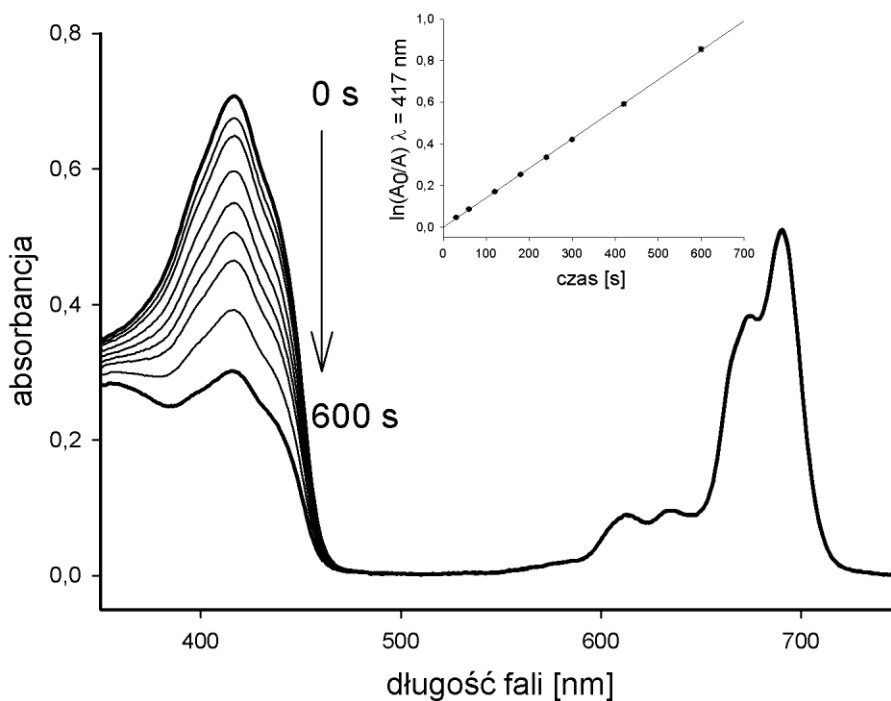


Ryc. 44. Wykres zaniku fluorescencji związku **14** w DMF i THF (wykresy dla DMSO i DMF pokrywają się).

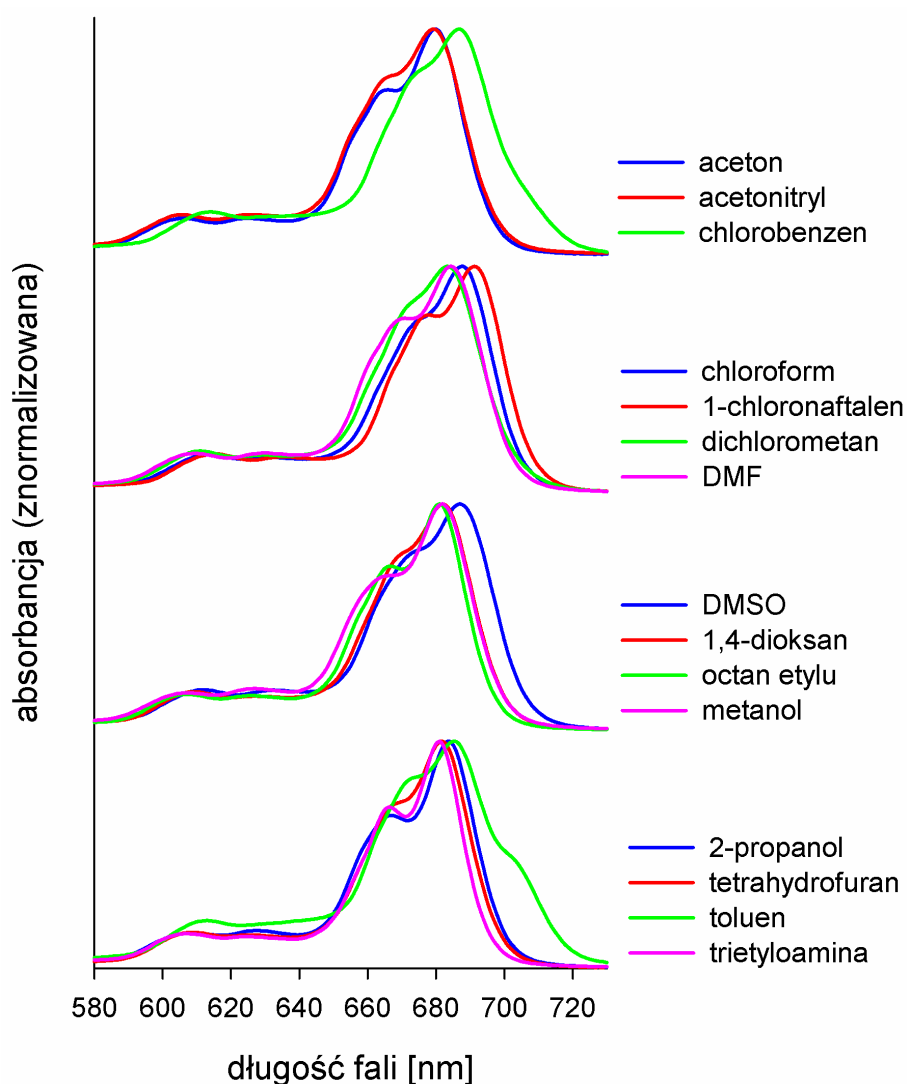
W odniesieniu do związku **14** przeprowadzono badania generowania tlenu singletowego, wykorzystując procedurę jak dla związku **10** [108–110]. Roztwory ftalocyjaniny **14** i DPBF, naświetlono promieniowaniem o długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji pasma Q ftalocyjaniny – odpowiednio 685 nm w DMF i 688 nm w DMSO. Proces utleniania DPBF monitorowano spektrofotometrycznie, obserwując zanik absorpcji przy 417 nm (**Ryc. 45, 46**). Porównując parametry kinetyczne procesu utleniania DPBF, obliczono wydajność kwantową generowania tlenu singletowego, która wynosiła $\Phi_{\Delta} = 0,49$ zarówno w DMF, jak i w DMSO.



Ryc. 45. Widmo absorpcji mieszaniny **14** i DPBF w DMF podczas ekspozycji na promieniowanie o długości fali $\lambda_{\text{max}} = 685 \text{ nm}$, we wstawce przedstawiono zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania; pomiary przeprowadzono dla długości fali $\lambda = 417 \text{ nm}$.

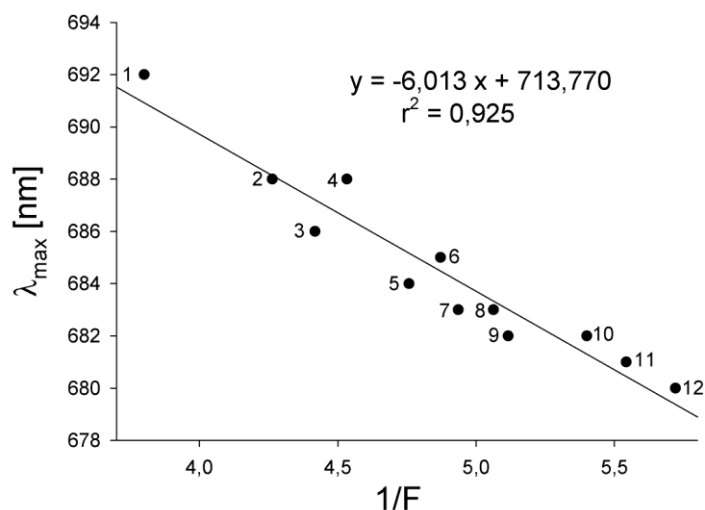


Ryc. 46. Widmo absorpcji mieszaniny **14** i DPBF w DMSO podczas ekspozycji na promieniowanie o długości fali $\lambda_{\text{max}} = 688 \text{ nm}$, we wstawce przedstawiono zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania; pomiary przeprowadzono dla długości fali $\lambda = 417 \text{ nm}$.



Ryc. 47. Przebieg widm absorpcji ftalocyjaniny **14** w różnych rozpuszczalnikach.

Ftalocyjaninę **14** poddano studiom solwatacyjnym, polegającym na wykreśleniu widm absorpcji UV-Vis w rozpuszczalnikach protycznych i aprotycznych (**Ryc. 47**). Analiza widm UV-Vis wykazała obecność szerokich pasm Q, z maksimum absorpcji (λ_{\max}) w zakresie 680-692 nm i pasm Soreta z λ_{\max} w zakresie długości fal 346-353 nm. Największą wartość $\lambda_{\max} = 692$ nm zaobserwowano dla roztworu **14** w chloronaftalenie, najmniejszą – 680 nm w acetonitrylu. Wartości λ_{\max} korelowano z parametrem $1/F$, analogicznie jak dla związku **10** (Rozdział IV.2). Dla dwunastu rozpuszczalników stwierdzono liniową zależność pomiędzy λ_{\max} , a parametrem $1/F$. Podobnej korelacji nie stwierdzono pomiędzy λ_{\max} , a wartościami momentu dipolowego. Uzyskane wyniki wskazują, że zmiany w widmie UV-Vis są skutkiem procesu solwatacji, a właściwości koordynacyjne rozpuszczalnika nie wpływają znacząco na położenie λ_{\max} pasma Q [112].



Ryc. 48. Korelacja pomiędzy λ_{\max} pasma Q ftalocyjaniny **14** i parametrem $1/F$. Rozpuszczalniki: (1) 1-chloronaftalen, (2) chlorobenzen, (3) toluen, (4) DMSO, (5) dichlorometan, (6) DMF, (7) 1,4-dioksan, (8) THF, (9) trietyloamina, (10) octan etylu, (11) aceton, (12) acetonitryl.

Ftalocyjanina **14** została również użyta do modyfikacji powierzchniowej żelu krzemionkowego i w tej formie poddana badaniom fotochemicznym [118].

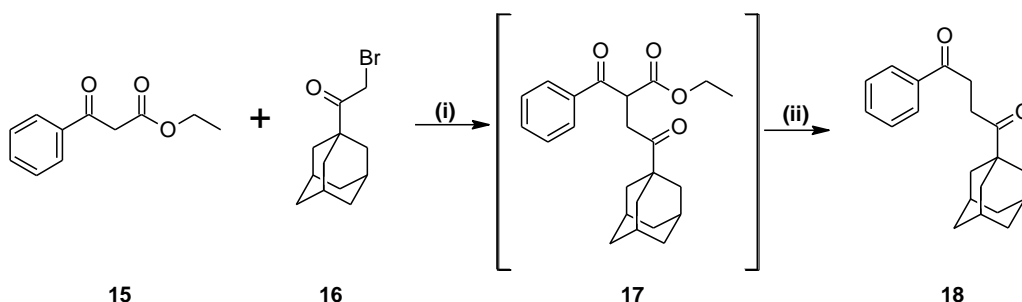
Ftalocyjaninę **14** poddano badaniom biologicznym z wykorzystaniem linii komórkowych CEM i HeLa, we współpracy z Rega Institute for Medical Research (Leuven, Belgia). Aktywność związku określono bez dostępu światła i po naświetleniu promieniowaniem o $\lambda_{\max} = 690$ nm (**Tabela 2**). Dla linii komórkowych CEM i HeLa zaobserwowano słabą aktywność fotodynamiczną związku, uzyskując wartość $IC_{50} = 21$ μ M.

	IC ₅₀ (μ M)			
	CEM		HeLa	
	faza ciemna	faza jasna	faza ciemna	faza jasna
14	> 25	21 \pm 3	> 50	21 \pm 4

Tabela 2. Wartości IC₅₀ uzyskane dla ftalocyjaniny **14** w fazie jasnej i ciemnej.

IV.4 Synteza i charakterystyka porfirazyny posiadającej ugrupowanie 2-(1-adamantyl)-5-fenyl-1*H*-pirolilowe wraz z badaniami fotochemicznymi i biologicznymi

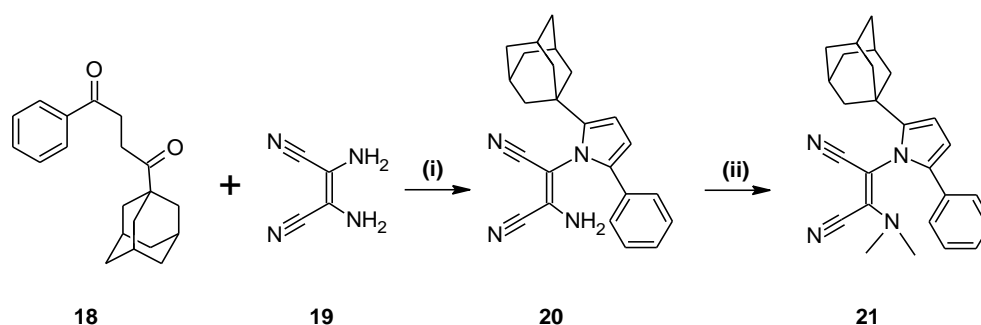
W światowym piśmiennictwie znane są doniesienia na temat koniugatów ftalocyjaninowo-adamantylowych, natomiast koniugat porfirazynowo-adamantylowy został otrzymany po raz pierwszy, w ramach badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej.



Schemat 9. Reagenty i warunki reakcji: (i) wodorek sodu, THF, -10 °C; (ii) wodny roztwór wodorotlenku sodu, etanol.

Modyfikując procedurę literaturową [119], w wyniku dwuetapowej syntezy uzyskano pochodną 1,4-butanodionu **18** (**Schemat 9**). W tym celu benzoilooctan etylu (**15**) poddano reakcji alkilowania 1-adamantyl-bromometyloketonem (**16**) w THF, stosując wodorek sodu jako zasadę. Po zakończeniu reakcji, rozpuszczalnik częściowo odparowano na wyparce, dodano wody i ekstrahowano octanem etylu. Po odparowaniu rozpuszczalnika uzyskano produkt pośredni **17** w postaci żółtego oleju, który poddano reakcji hydrolizy i następczej dekarboksylacji w wodno-etanolowym roztworze wodorotlenku sodu. Docelowy produkt **18** wyekstrahowano następnie z mieszaniny reakcyjnej octanem etylu, który odparowano na wyparce i oczyszczono przez krystalizację w metanolu.

Jak wiadomo z piśmiennictwa [117,120–122], reakcja typu Paala-Knorra była stosowana przez wielu autorów w celu uzyskania pochodnych diaminomaleonitrylu, zawierających pierścień pirolu, podstawiony w pozycji 2 i 5 grupami metylowymi, fenylowymi, bifenylowymi lub tienylowymi.

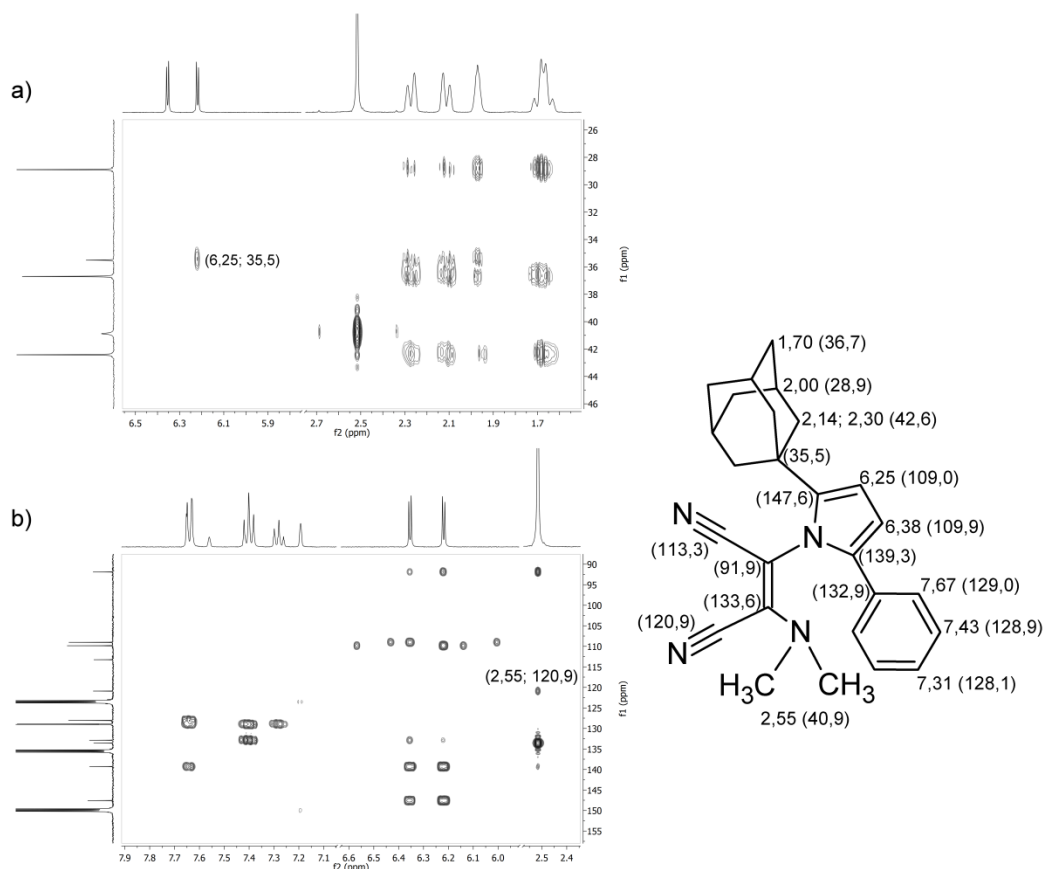


Schemat 10. Reagenty i warunki reakcji: (i) tlenek fosforu(V), metanol, temp. wrzenia, 24 godz.; (ii) wodorek sodu, siarczan(VI) dimetylu, THF, temp. od -12 °C do temp. pokojowej.

W przeprowadzonych badaniach wzorowano się na doniesieniach z piśmiennictwa - zgodnie z którymi - w celu syntezy pochodnej maleonitrylowej **20**, związek **18** poddano reakcji typu Paala-Knorra z diaminomaleonitrylem (**19**) w metanolu. Jednak opisaną procedurę [123,124] zmodyfikowano, a optymalizacja polegała na zastosowaniu jako katalizatorów substancji o właściwościach kwasowych, tj. kwasu szczawiowego, kwasu p-toluenosulfonowego, kwasu trifluorooctowego, tlenku fosforu(V) (**Schemat 10**). Najkorzystniejsze właściwości wykazał tlenek fosforu(V), z uwagi na właściwości zarówno kwasowe, jak i higroskopijne. Reakcję prowadzono we wrzącym metanolu przez 24 godziny. Następnie mieszaninę reakcyjną odparowano do suchej pozostałości, dodano dichlorometanu i odsączono nieprzereagowany **19** oraz produkty uboczne. Przesącz zagęszczono i poddano chromatografii kolumnowej otrzymując pochodną maleonitrylową **20**, którą scharakteryzowano wyznaczając temperaturę topnienia, współczynnik R_f , przeprowadzając analizę elementarną, technikami spektrometrii mas oraz technikami ^1H i ^{13}C NMR.

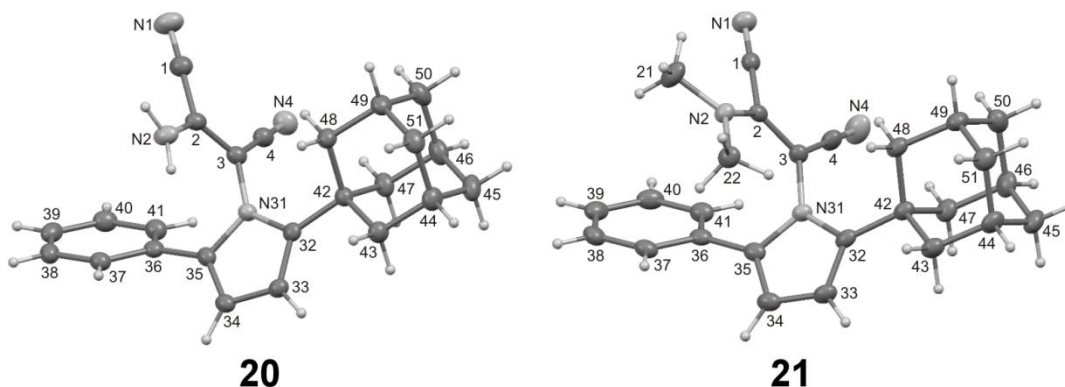
Pochodną maleonitrylową **20**, poddano reakcji metylowania przy użyciu siarczanu dimetylu w tetrahydrofuranie, stosując wodorek sodu jako zasadę wg procedury Beall i wsp. [125]. Po zakończeniu reakcji, mieszaninę reakcyjną wylano na wodę z lodem, a następnie ekstrahowano produkt **21** octanem etylu. Roztwór odparowano, a suchą pozostałość chromatografowano. Wyizolowano **21** w postaci krystalicznego, żółtego osadu i scharakteryzowano wyznaczając temperaturę topnienia, przeprowadzając chromatografię cienkowarstwową (współczynnik R_f), wykonując analizę elementarną, spektrometrią mas oraz technikami ^1H i ^{13}C NMR.

W widmie ^1H NMR zaobserwowano sygnały protonów pierścienia fenyloвого przy 7,67; 7,43 i 7,31 ppm. Sygnały atomów wodoru związanych z pierścieniem pirolu, występowały przy 6,25 i 6,38 ppm jako charakterystyczna para dubletów, z widocznym efektem dachowym. Sygnał protonów grup metylowych zaobserwowano przy 2,55 ppm jako singlet, a sygnały protonów grupy adamantylowej odnotowano przy 2,30; 2,14; 2,00; 1,70 ppm. Interesujące jest, że protony grup metylenowych sąsiadujących z czwartorzędowym atomem węgla, występują jako dwa dublety przy 2,30 i 2,14 ppm. W celu przypisania przesunięć chemicznych poszczególnym atomom, wykorzystano techniki dwuwymiarowego NMR. W widmie ^1H - ^{13}C HMBC zaobserwowano m.in. sprzężenie pomiędzy atomem wodoru w pierścieniu pirolowym (o przesunięciu chemicznym 6,25 ppm), a czwartorzędowym atomem węgla przy 35,5 ppm. Ponadto zaobserwowano sprzężenie pomiędzy atomami wodoru grup metylowych ($\delta = 2,55$ ppm), a jednym z atomów węgla grupy nitylowej ($\delta = 120,9$ ppm), co umożliwiło rozróżnienie grup nitylowych.



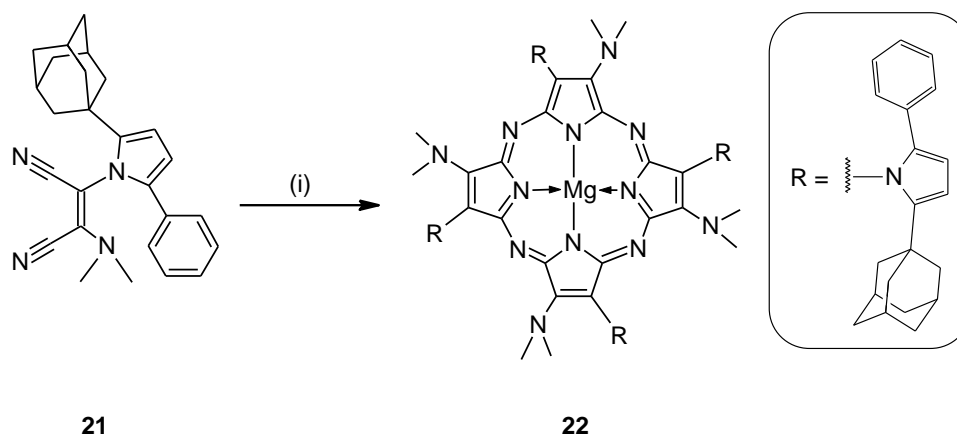
Ryc. 49. Widmo ^1H - ^{13}C HMBC NMR związku **21** w zakresie ^{13}C NMR: a) 26-46 ppm; b) 90-155 ppm; oraz zaobserwowane przesunięcia chemiczne dla jąder ^1H (^{13}C).

Na drodze powolnego odparowywania roztworów dichlorometanu otrzymano monokryształy związków **20** i **21**, które przekazano do badań rentgenostrukturalnych.



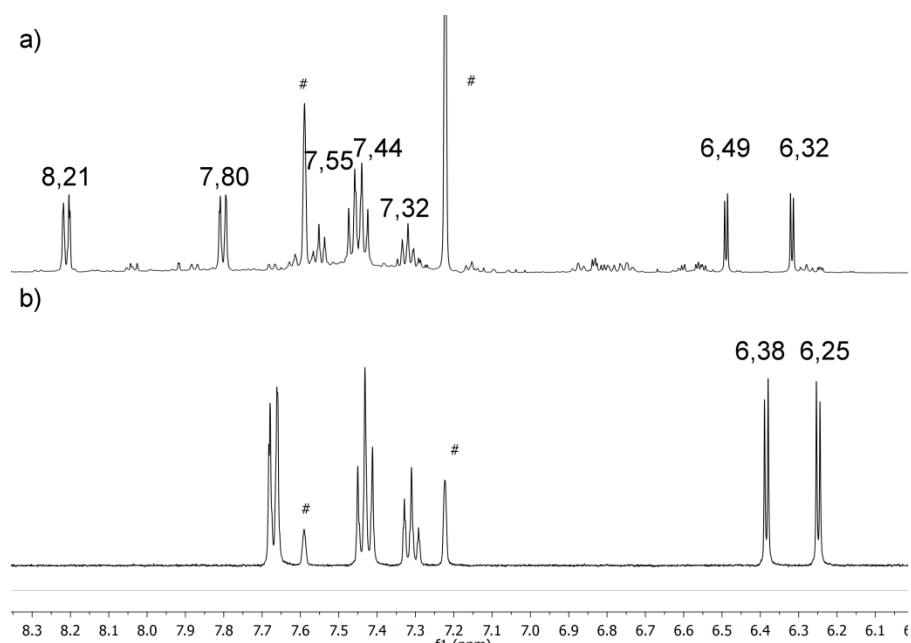
Ryc. 50. Struktury krystalograficzne związków **20** i **21**.

W strukturze pochodnych **20** i **21** wyróżnić można płaski fragment maleonitrylowy. Pierścień pirolowy ustawiony jest prawie prostopadle do płaszczyzny wyznaczonej przez atomy N1-C1-C2-C3-C4-N4 (**Ryc. 50**). Struktura maleonitrylu była przedmiotem badań prowadzonych m.in. przez Dwyer i wsp., które były oparte na pracach obliczeniowych [126,127]. Uwzględniając znaczne podobieństwo strukturalne związków analizowanych przez Dwyer i wsp. oraz otrzymanych pochodnych maleonitrylu **20** i **21**, można zakładać, że wolna para elektronowa grupy aminowej w **20** oraz grupy dimetyloaminowej w **21**, jest skoniugowana z mostkiem etenowym maleonitrylu.

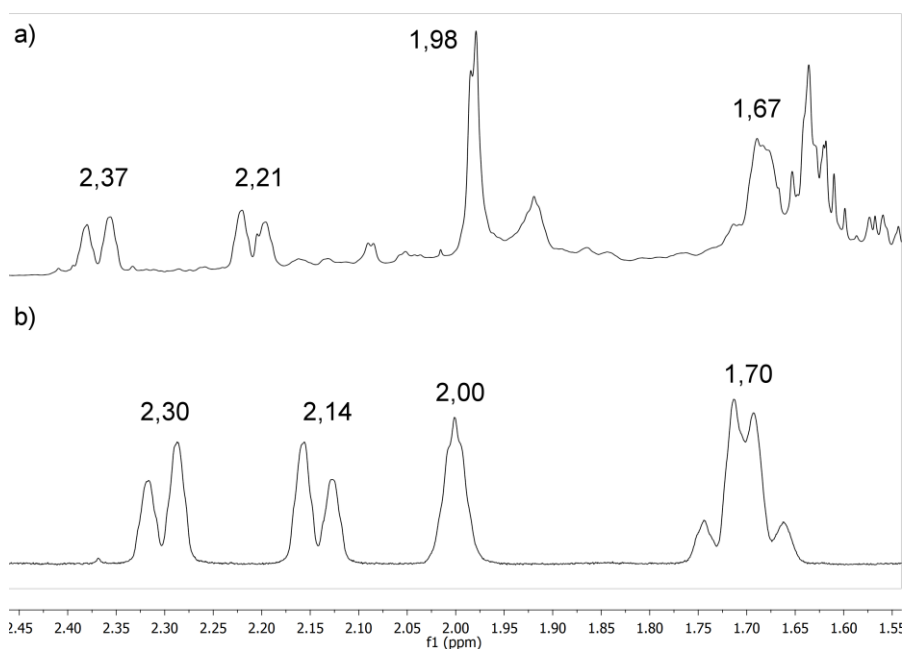


Schemat 11. Reagenty i warunki reakcji: (i) *n*-butanolan magnezu, *n*-butanol, temperatura wrzenia, 16 godz.

Pochodną maleonitrylową **21** poddano 16-godzinnej reakcji makrocyklizacji, wykorzystując *n*-butanolan magnezu w *n*-butanolu (Schemat 11). Po odparowaniu mieszaniny azeotropowej *n*-butanolu z toluenem i oczyszczeniu na drodze chromatografii kolumnowej, uzyskano porfirazynę **22** z wydajnością 15%. Na chromatogramie HPLC stwierdzono występowanie 3 pików, odpowiadających obecności związków posiadających identyczne widma UV-Vis, co sugeruje podatność makrocyklu **22** do agregacji. Analiza NMR **22** potwierdziła naprzemienny układ podstawników peryferyjnych, z diagnostycznym sygnałem pochodzącym od protonów czterech grup dimetyloaminowych przy 3,03 ppm. Sygnał ten ma duże znaczenie diagnostyczne w ustalaniu położenia podstawników, gdyż obecność innych regioizomerów generowałaby występowanie dwóch lub czterech sygnałów. Taki układ podstawników obserwowano dla opisanych w literaturze porfirazyn, zawierających grupy dimetyloaminowe i 2,5-ditienylo-1*H*-pirolilowe [121]. W celu dalszej identyfikacji porównano widma ¹H NMR porfirazyny **22** i maleonitrylu **21** (Ryc. 51). W widmie porfirazyny stwierdzono występowanie charakterystycznych sygnałów, pochodzących od protonów pierścienia pirolu w formie dwóch dubletów przy 6,49 i 6,32 ppm. Obserwowane przesunięcia chemiczne są zbliżone do stwierdzonych w dinitrylu **21**, które wynosiły odpowiednio 6,38 i 6,25 ppm. Natomiast sygnały protonów grupy fenylowej w porfirazynie **22**, występowały przy 8,21; 7,80; 7,55; 7,44; 7,32 ppm.



Ryc. 51. Fragmenty widm ¹H NMR a) porfirazyny **22** b) maleonitrylu **21** w zakresie 6,0-8,3 ppm; symbole # wskazują na sygnały resztkowe pirydyny.

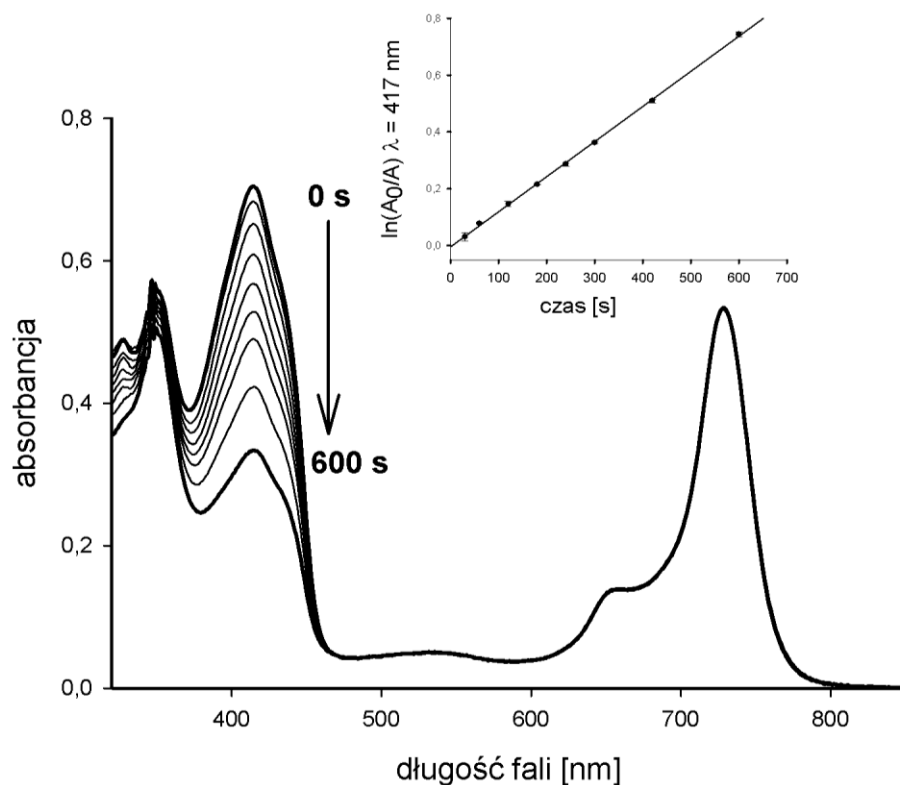


Ryc. 52. Fragmenty widm ^1H NMR a) porfirazyny **22** b) maleonitrylu **21** w zakresie 1,55-2,45 ppm.

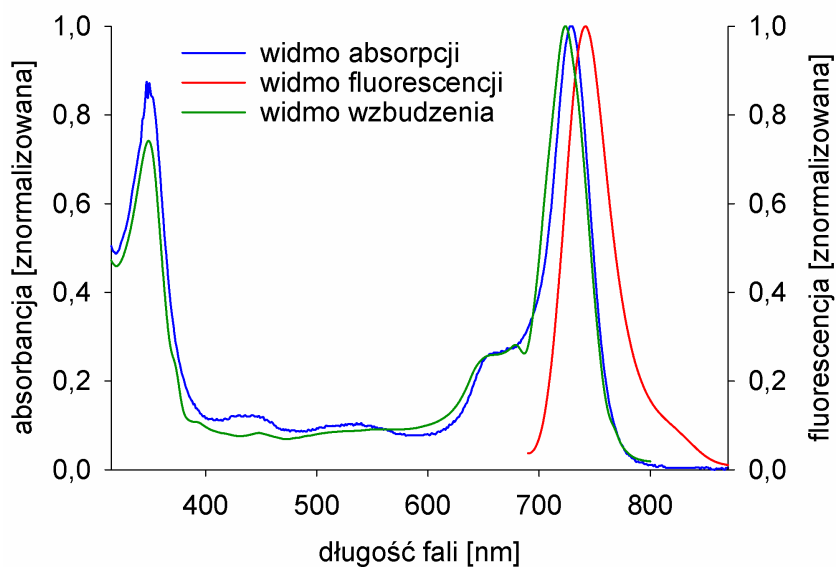
Analiza fragmentu widma ^1H NMR dotycząca grup adamantylowych porfirazyny **22** (**Ryc. 52**), wykazała obecność dwóch dubletów przy 2,37 i 2,21 ppm, odpowiadających sygnałom w widmie dinitrylu **21** przy 2,30 i 2,14 ppm. Ponadto zaobserwowano sygnały przy 1,98 i 1,67 ppm, analogiczne do sygnałów przy odpowiednio 2,00 i 1,70 ppm.

Wydajność kwantową generowania tlenu singletowego wyznaczono metodą opisaną w rozdziale IV.2. Roztwór porfirazyny **22** i DPBF w DMF, naświetlono promieniowaniem o długości fali $\lambda_{\text{max}}=729$ nm, odpowiadającym maksimum absorpcji pasma Q. Obliczona wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego porfirazyny **22** w DMF, wynosiła $\Phi_{\Delta} = 0,17$ (**Rys. 53**).

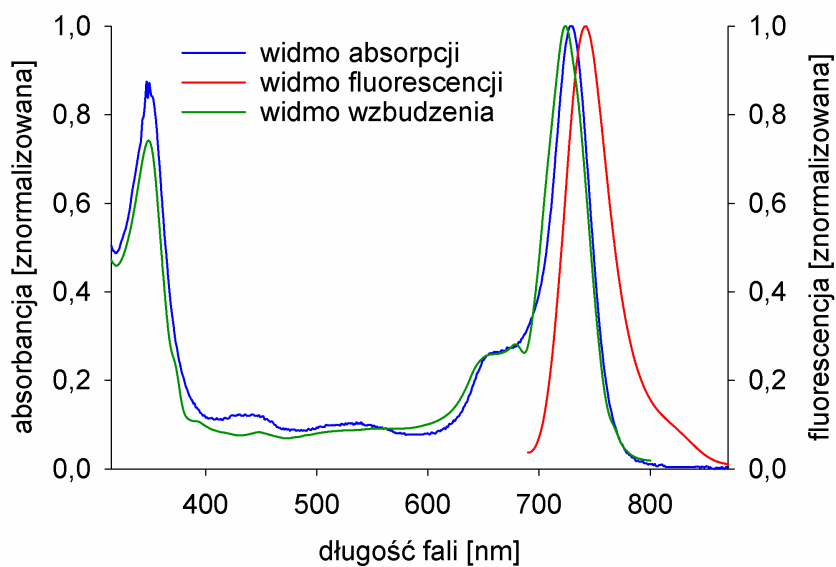
Widma fluorescencji makrocyklu **22** wykreślono w DMF i THF (**Ryc. 54 i 55**). Wydajność kwantową fluorescencji obliczono stosując cynk(II) ftalocyjaninę jako związek referencyjny, zgodnie z metodyką podaną w rozdziale IV.2. Uzyskane wydajności kwantowe (Φ_{F}) wynosiły 0,031 oraz 0,039, odpowiednio dla roztworów w DMF oraz THF. Jednocześnie stwierdzono niewielkie przesunięcia Stokesa, które przyjmowały wartości 240 cm^{-1} i 223 cm^{-1} , odpowiednio dla roztworów w DMF oraz THF i stanowią potwierdzenie niewielkich zmian geometrii cząsteczki makrocyklu, podczas przejścia ze stanu podstawowego S_0 do wzbudzonego S_1 .



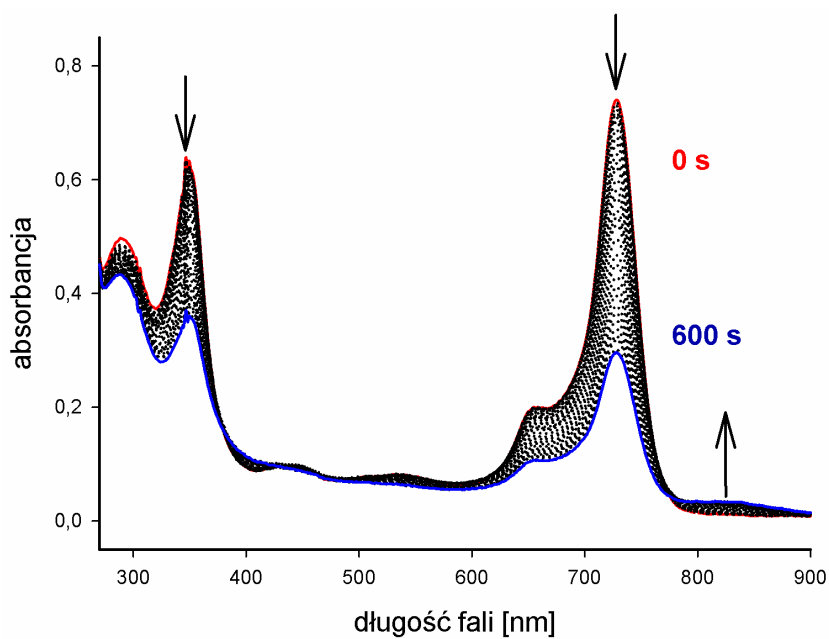
Ryc. 53. Widmo absorpcji mieszaniny **22** i DPBF w DMF podczas ekspozycji na promieniowanie $\lambda_{\text{max}} = 729 \text{ nm}$, we wstawce przedstawiono zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania; pomiary przy długości fali $\lambda = 417 \text{ nm}$.



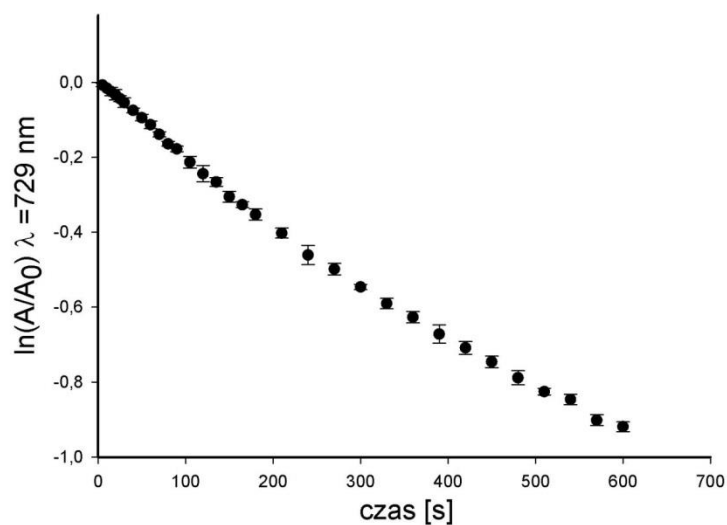
Ryc. 54. Widma absorpcji, emisji i wzbudzenia związku **22** w DMF.



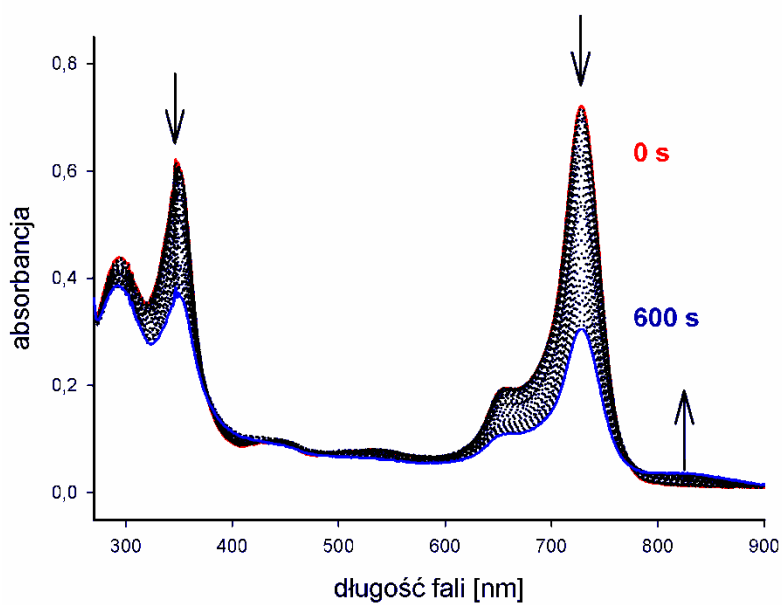
Ryc. 55. Widma absorpcji, emisji i wzbudzenia związku 22 w THF.



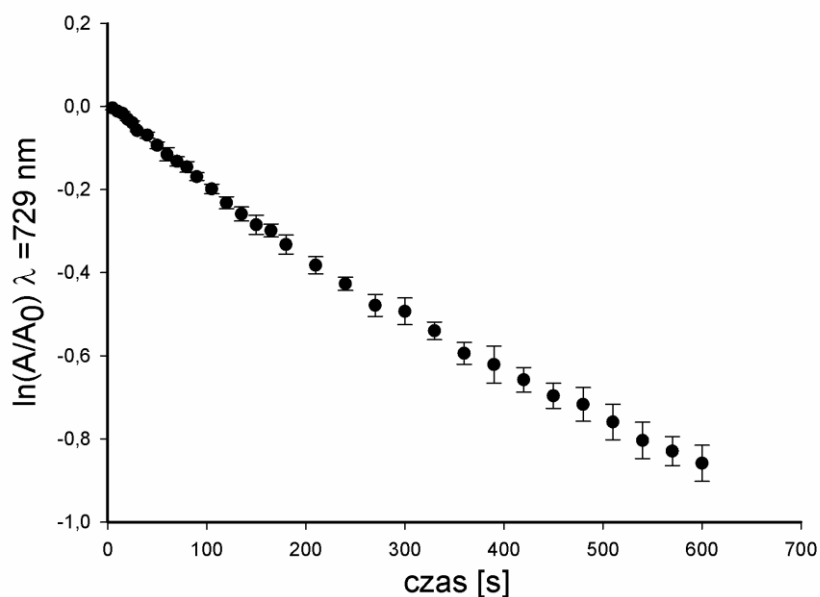
Ryc. 56. Zmiany widm absorpcji porfirazyny 22 w DMF po ekspozycji na promieniowanie w czasie od 0 do 600 s; warunki swobodnego dostępu tlenu.



Ryc. 57. Wykres przedstawiający zależność kinetyczną $\ln(A/A_0)= f(t)$ dla porfirazyny **22**; warunki swobodnego dostępu tlenu.



Ryc. 58. Zmiany widm absorpcji porfirazyny **22** w DMF po ekspozycji na promieniowanie w czasie od 0 do 600 s; po odtlenowaniu.



Ryc. 59. Wykres przedstawiający zależność kinetyczną $\ln(A/A_0) = f(t)$ dla porfirazyny **22**; warunki ograniczonego dostępu do tlenu.

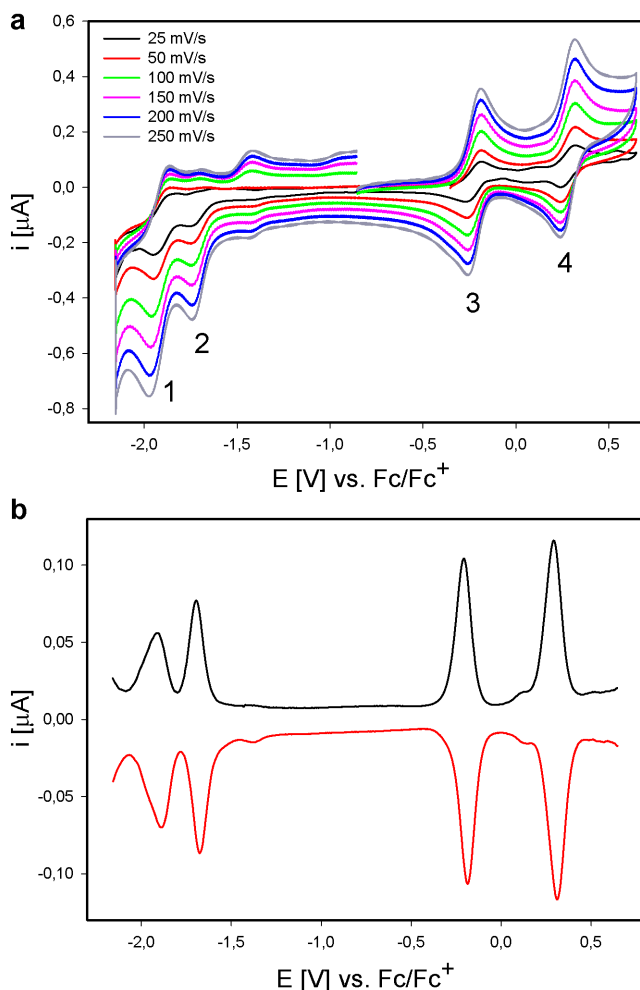
Fototrwałość **22** oceniono w DMF (**Ryc. 56-59**) zarówno w warunkach tlenowych, jak i przy ograniczonym dostępie tlenu. W obu przypadkach stwierdzono, że proces zachodzi w dwóch etapach, zgodnie z reakcją kinetyczną I rzędu. Parametry kinetyczne procesów przedstawiono w **Tabeli 3**. Zaobserwowano, że odtlenowanie roztworu powoduje zwolnienie I etapu reakcji rozkładu fotochemicznego.

Warunki	Etap	
	I $10^2 (k \pm \Delta k) [s^{-1}]$	II $10^3 (k \pm \Delta k) [s^{-1}]$
tlenowe	$0,90 \pm 0,06$	$1,26 \pm 0,06$
ograniczony dostęp tlenu	$1,00 \pm 0,08$	$1,20 \pm 0,07$

Tabela 3. Parametry kinetyczne fotorozkładu porfirazyny **22**.

Elektrochemiczne właściwości **22** zbadano przy użyciu cyklicznej woltamperometrii (ang. *cyclic voltammetry*, CV) i różnicowej pulsowej woltamperometrii (ang. *differential pulse voltammetry*, DPV). Wyniki zamieszczono w **Tabeli 3** i na **Ryc. 60**. Wyniki uzyskane

przy szybkości skanowania $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ wskazują, że makrocykl ulega dwóm procesom redukcyjnym przy $E_{1/2} = -1,96 \text{ V}$ (1) i $E_{1/2} = -1,75 \text{ V}$ (2), jak również dwóm procesom oksydacyjnym przy $E_{1/2} = -0,23 \text{ V}$ (3) i $E_{1/2} = 0,28 \text{ V}$ (4) (**Ryc. 60**). Na podstawie szerokości sygnału w metodzie DPV stwierdzono, że zachodzące procesy redoks są przemianami jednoelektronowymi, co jest zgodne z danymi literaturowymi [128,129].



Ryc. 60. a) cykliczne woltamogramy porfirazyny **22** przy różnych prędkościach skanowania; 1, 2 – procesy redukcyjne; 3, 4 – procesy oksydacyjne; b) różnicowe pulsowe woltamogramy (DPV) porfirazyny **22**, parametry DPV: amplituda modulacji 20 mV, prędkość przemiatania $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; Fc – ferrocen.

W przypadku kompleksów porfirynoidów zawierających nieaktywne elektrochemicznie jony metali, takie jak Mg^{2+} , procesy utleniania i redukcji będą prowadziły do form, odpowiednio π -kationorodnikowych i π -anionorodnikowych [128–130]. Dla związku **22** oba procesy redukcyjne wykazują słabą odwracalność elektrochemiczną, co potwierdza brak sygnałów anodowych przy zmianie potencjału od wartości ujemnych do dodatnich.

Stwierdzono liniową zależność pomiędzy wartością prądu pików, a pierwiastkiem kwadratowym z prędkości skanowania, co stanowi potwierdzenie, że proces jest kontrolowany dyfuzją. Wzrost szybkości skanowania nie powodował zmiany położenia sygnałów, które pozostawały stałe nawet dla dużych szybkości skanowania. Pomimo braku odwracalnych pików anodowych w analizie CV, w badaniu DPV można zaobserwować dobrze wykształcone sygnały, o stosunku prądów bliskim jedności.

Porfirazyna **22** wykazuje dwa odwracalne procesy redukcyjne. Stosunek wartości prądów pików anodowych do katodowych (i_a/i_c), jest bliski jedności dla obu procesów oksydacyjnych i nie zmienia się znacząco przy zwiększeniu prędkości skanowania. Różnica pomiędzy pikami zmierzona przy szybkości skanowania $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ wynosi 66 mV i 73 mV, odpowiednio dla procesów utlenienia $[\text{Mg(II)Pz(-2)}]/[\text{Mg(II)Pz(-1)}]^+$ i $[\text{Mg(II)Pz(-1)}]^+ / [\text{Mg(II)Pz(0)}]^{2+}$ i jest bliska wartości teoretycznej 60 mV dla układów odwracalnych. Prądy anodowe i katodowe dla układów $[\text{Mg(II)Pz(-2)}]/[\text{Mg(II)Pz(-1)}]^+$ i $[\text{Mg(II)Pz(-1)}]^+ / [\text{Mg(II)Pz(0)}]^{2+}$ zależą linowo od pierwiastka kwadratowego z prędkości skanowania, wskazując na reakcje kontrolowane dyfuzją. Uzyskane dane wskazują, że związek **22** łatwo się utlenia, z pierwszym procesem utlenienia przy $-0,23 \text{ V}$ (w stosunku do ferrocenu - Fc^+/Fc).

Można zakładać, że obserwowane korelacje są skutkiem obecności podstawników pierścienia porfirazynowego ponieważ grupy dimetyloaminowe posiadają właściwości elektronodonorowe, co ułatwia tworzenie się kationorodników i obniża potencjał oksydacyjny. Podobne zależności dla porfirazyn podstawionych grupami aminowymi zostały opisane w literaturze przez m.in. Nie i wsp.; Lange i wsp. [131–134]. W porównaniu do porfirazyn o podstawnikach sulfanylowych [128,135–137], porfirazyna **22** trudniej ulega procesom redukcji. Oceniając właściwości porfirazyny **22**, stwierdzono, że różnica pomiędzy pikami utlenienia i redukcji wynosi 1,52 V i można ją przypisać zróżnicowaniu poziomów energetycznych HOMO-LUMO. Uzyskana wartość jest zgodna z wartością przerwy energetycznej HOMO-LUMO równej 1,70 eV dla λ_{max} widma UV-Vis porfirazyny **22**, obliczonej przy wykorzystaniu równania $E = hc/\lambda$. Jest to zgodne z doniesieniami literaturowymi [138].

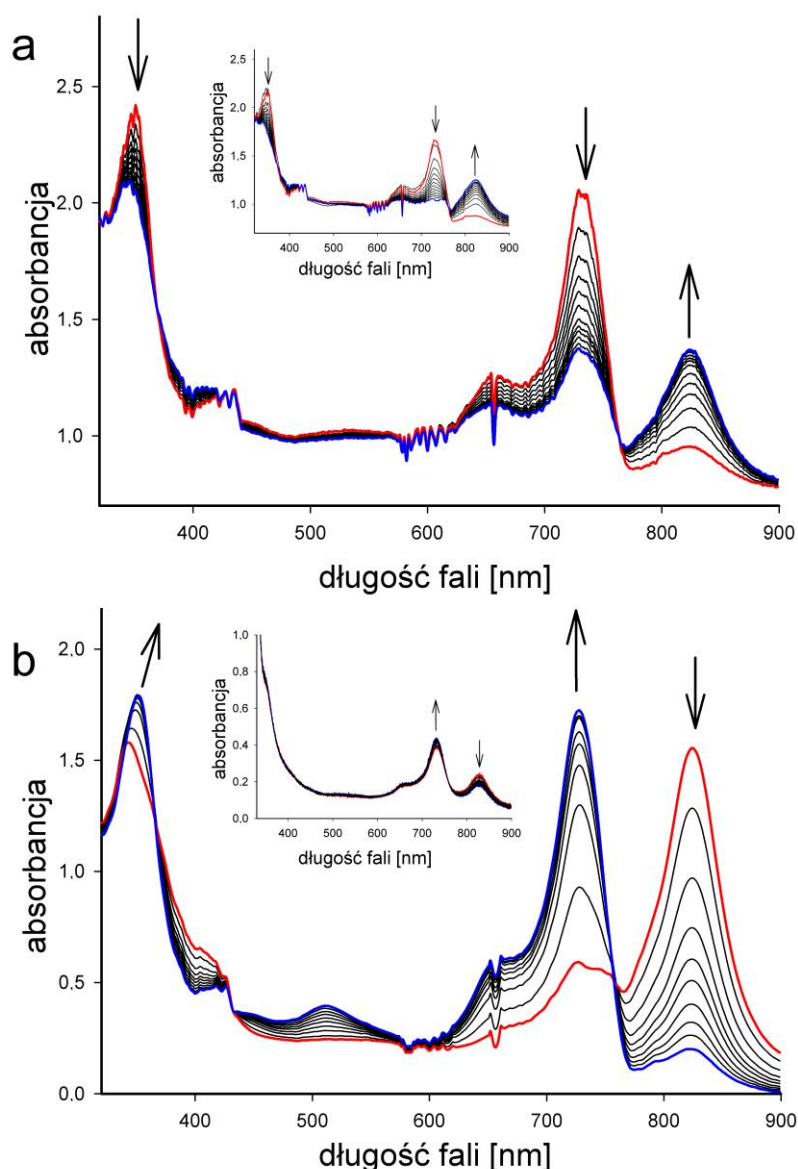
	$[\text{Mg(II)Pz(-3)}]^{1-} / [\text{Mg(II)Pz(-4)}]^{2-}$	$[\text{Mg(II)Pz(-2)}] / [\text{Mg(II)Pz(-3)}]^{1-}$	$[\text{Mg(II)Pz(-1)}]^{1+} / [\text{Mg(II)Pz(-2)}]$	$[\text{Mg(II)Pz(0)}]^{2+} / [\text{Mg(II)Pz(-1)}]^{1+}$
$E_{1/2}$ [V]	-1,96	-1,75	-0,23	0,28
ΔE_p [mV]	-	-	66	73
i_{pa} / i_{pc}	-	-	0,94	0,82

Tabela 4. Wyniki woltamperometryczne dla porfirazyny **22**, zarejestrowane dla prędkości skanowania $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Badania spektroelektrochemiczne

Ponieważ wyniki pomiarów woltamperometrycznych były bardzo obiecujące, związek został przekazany do dalszych pomiarów spektrowoltamperometrycznych w Zakładzie Chemii Ogólnej i Analitycznej, Politechniki Poznańskiej. Zastosowana technika polegała na rejestracji przebiegu widm UV-Vis w czasie przyłożenia potencjału.

Zmiany w przebiegu widma UV-Vis porfirazyny **22** (**Ryc. 61a**), zarejestrowane podczas przyłożenia stałego potencjału $0,14 \text{ V}$, wykazały spadek intensywności pasma Q posiadającego $\lambda_{\text{max}} = 729 \text{ nm}$, z jednoczesnym wykształceniem nowego pasma z maksimum przy 823 nm . Zaobserwowano punkty izosbestyczne przy $\lambda = 368$ i 760 nm . Podobne zmiany w przebiegu widm UV-Vis związku **22** zaobserwowano podczas przyłożenia potencjału $0,66 \text{ V}$ (**Ryc. 61a**, wstawka). Otrzymane wyniki, w tym brak przesunięcia maksimum pasma Q, wskazują na zachodzenie procesów utlenienia porfirazyny do form $[\text{Mg(II)Pz(-1)}]^{1+}$ i $[\text{Mg(II)Pz(0)}]^{2+}$. Natomiast podczas przyłożenia potencjałów $-1,79 \text{ V}$ i $-2,1 \text{ V}$ (**Ryc. 61b**) zaobserwowano m.in. pojawienie się nowego pasma przy $\lambda = 513 \text{ nm}$, które można przypisać przejściom $n \rightarrow \pi^*$. Powstanie tego pasma jest charakterystyczne dla form zredukowanych porfirazyn [136].



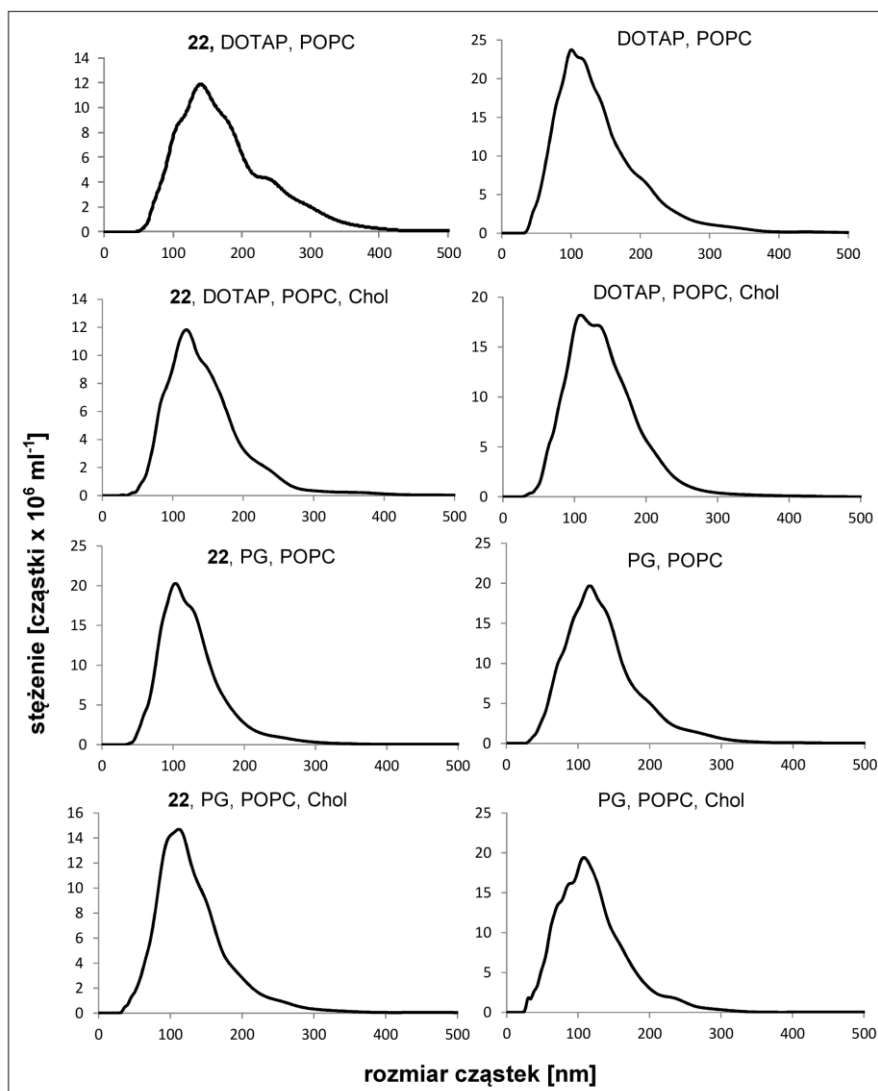
Ryc. 61. Zmiany widm UV-Vis porfirazyny **22** po przyłożeniu potencjału (a) $E_{app} = 0,14$ V, $E_{app} = 0,66$ V (wstawka); (b) $E_{app} = -1,79$ V, $E_{app} = -2,1$ V (wstawka).

Wyniki badań biologicznych

Porfirazyna **22** – w ramach wspólnie wykonanych badań - została poddana badaniom biologicznym w Katedrze i Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej UMP. Ponieważ porfirazyna **22** nie rozpuszczała się w DMSO, makrocykl został wbudowany w liposomy, w oparciu o opublikowaną procedurę [139], metodą hydratacji filmu lipidowego.

Przy wyborze liposomów jako nośników, uwzględniono, że są powszechnie stosowane jako nośniki substancji leczniczych, w tym również fotosensybilizatorów. Dwie

postacie liposomalne fotouczulaczy tj Visudyne, Foslip, znalazły już zastosowania komercyjne w terapii fotodynamicznej [140].



Ryc. 62. Rozkład wielkości liposomów zawierających porfirazynę **22** i wolnych; Chol – cholesterol; DOTAP – chlorek N-[1-(2,3-dioleoiloksy)propylo]-N,N,N-trimetyloamoniowy; PG – L- α -fosfatydylo-DL glicerol; POPC – 1-palmitoilo-2-oleoilo-*sn*-glycero-3-fosfocholina.

Porfirazyna **22** po enkapsulacji w liposomy, została poddana badaniom fototoksyczności ukierunkowanej przeciw mikroorganizmom (*Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy, PACT*) na szczepach *S. aureus* NCTC 4163 i *P. aeruginosa* NCTC 6749. Jednak zarówno w fazie ciemnej, jak i jasnej, badania nie wykazały fototoksyczności formułacji liposomalnych związku **22** (Tabela 5).

Formulacja liposomalna	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 4163		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 6749	
	Faza ciemna	Po naświetleniu	Faza ciemna	Po naświetleniu
22 , DOTAP, POPC	-0,49	-0,16	-0,24	0,05
DOTAP, POPC	-0,18	-0,13	-0,08	-0,32
22 , DOTAP, POPC, Chol	0,30	0,26	-0,08	-0,23
DOTAP, POPC, Chol	0,40	0,27	-0,11	-0,32
22 , PG, POPC	0,03	0,10	-0,29	-0,28
PG POPC	0,10	0,15	-0,18	-0,16
22 , PG, POPC, Chol	0,16	0,15	-0,11	-0,30
PG POPC CHOL free	0,25	0,27	-0,33	-0,25

Tabela 5. Wartości współczynnika redukcji (\log_{10}) w stosunku do próby kontrolnej dla formulacji liposomalnych porfirazyny **22**.

V WNIOSKI

1. Opracowane metody syntezy związków makrocyklicznych, pozwalają na otrzymanie następujących porfirynoidów ftalocyjanino-adamantylowych i porfirazyno-adamantylowych:

- a. cynk(II) {1(4),8(11),15(18),22(25)-tetrakis[2-(1-adamantylo)etoksy]ftalocyjaniny} **(4)**
- b. magnez(II) {1-[2-(1-adamantylo)etoksy]ftalocyjaniny} **(6)**
- c. cynk(II) {1-[2-(1-adamantylo)etoksy]ftalocyjaniny} **(7)**
- d. magnez(II) [1-(1-adamantylosulfanylo)ftalocyjaniny] **(10)**
- e. cynk(II) [1-(1-adamantylosulfanylo)ftalocyjaniny] **(11)**
- f. magnez(II) [2,3-bis(1-adamantylosulfanylo)ftalocyjaniny] **(14)**
- g. magnez(II) {2,7,12,17-tetrakis-[2-(1-adamantylo)-5-fenylo-1*H*-pirolilo]-3,8,13,18-tetrakis(dimetyloamino) porfirazyny} **(22)**

2. Reakcja typu Paala-Knorra była stosowana jak dotąd w celu uzyskania pochodnych diaminomaleonitrylu, zawierających pierścień pirolu, podstawiony w pozycji 2 i 5 grupami metylowymi, fenyłowymi, bifenyliłowymi lub tienyłowymi. W pracy zaprezentowano metodykę prowadzącą do uzyskiwania pochodnych diaminomaleonitrylu, zawierających pierścień pirolu, podstawiony w pozycji 2 i 5, odpowiednio grupą adamantylową i fenylową.

3. Duży podstawnik adamantylowy wchodzący w skład ftalonitryli i maleonitrylu wywiera wpływ na ich reaktywność w reakcjach makrocyklizacji prowadzących do pochodnych ftalocyjanin i porfirazyny. Podstawnik adamantylowy wywiera również wpływ na przesunięcia chemiczne sąsiadujących protonów w widmach NMR. Obecność grup adamantylowych w strukturze makrocykli przekłada się także na kierunek dróg fragmentacji w widmach MS.

4. Widma absorpcyjne wszystkich ftalocyjanin i porfirazyny wykazywały obecność dwóch charakterystycznych pasm, Soreta oraz pasma Q. Maksimum absorpcji pasma Q znajduje się w przedziale 600-800 nm, co pozwala rozpatrywać je jako potencjalne fotosensybilizatory w terapii fotodynamicznej.

5. Zmiany elektronowych widm absorpcji ftalocyjaniny **10** i **14**, są skutkiem procesu solwatacji, a właściwości koordynacyjne rozpuszczalnika, nie mają istotnego wpływu na położenie maksimum pasma Q.
6. Proces fotodegradacji porfirazyny **22** został zbadany na podstawie zmian elektronowych widm absorpcji. Stwierdzono, że zachodzi w dwóch etapach, zgodnie z reakcją kinetyczną I-rzędu. Obserwowano zjawisko „photobleachingu”, któremu towarzyszył zanik pasma Soreta oraz pasma Q.
7. Ftalocyjanina **14** generuje tlen singletowy ($\Phi_{\Delta} = 0,49$ w DMF i DMSO) z większą wydajnością niż ftalocyjanina **10** ($\Phi_{\Delta} = 0,32$ w DMF, $\Phi_{\Delta} = 0,25$ w DMSO), co świadczy o dodatnim wpływie podstawników adamantylosulfanylowych na wydajność generowania tlenu singletowego.
8. Wyniki badań emisyjnych ftalocyjaniny **14** i porfirazyny **22**, wskazują na niewielkie zmiany geometrii cząsteczki, podczas przejścia ze stanu podstawowego S_0 do wzbudzonego S_1 .
9. Ftalocyjanina **14** w porównaniu do związku referencyjnego - cynk(II) ftalocyjaniny, wykazuje większe wartości czasu zaniku oraz wydajności kwantowej fluorescencji (Φ_f).
10. Porfirazyna **22** ulega dwóm procesom redukcyjnym oraz dwóm procesom oksydacyjnym, a zachodzące procesy redoks są przemianami jednoelektronowymi. Oba procesy redoks wykazują odwracalność elektrochemiczną i są kontrolowane dyfuzją.
11. Porfirazyna **22** po enkapsulacji w liposomy, nie wykazuje fototoksyczności ukierunkowanej przeciw mikroorganizmom w odniesieniu do szczepów *S. aureus* NCTC 4163 i *P. aeruginosa* NCTC 6749.
12. Aktywność fotodynamiczna ftalocyjaniny **14**, względem linii komórkowych CEM i HeLa była na poziomie $IC_{50} = 21 \mu M$.

VI CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

VI.1. Uwagi ogólne

Temperatura topnienia – pomiary przeprowadzono na aparacie „Stuart” firmy Bibby Sterlin Ltd, przy użyciu otwartych kapilar, a otrzymane wyniki podano bez korekty.

Spektroskopia :

Widma w ultrafiolecie i zakresie widzialnym (UV-Vis) – wykonano na spektrofotometrze Hitachi UV/VIS U-1900 i Shimadzu UV-160A; λ_{\max} (ϵ), nm ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

Widma magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) – zastosowano aparaty Bruker (częstość robocza ^1H 400 i 500 MHz) w temp. pok. Widma wykonano we współpracy z Instytutem Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (badania finansowane z Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka dział. 2.1. nr umowy UDA-POIG.02.01.00-30-182/09). Wykonywano widma ^1H , ^{13}C NMR oraz dwuwymiarowe 2D ($^1\text{H}^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HSQC, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HMBC). Dla wartości przesunięć chemicznych zastosowano skalę δ (ppm) wobec sygnału rozpuszczalnika. W opisie użyto skrótów: s – singlet, b – szeroki, d – dublet, p – pseudo, t – triplet, m - multiplet.

Widma w podczerwieni (IR) – wykonano na aparacie Bruker FT-IR IFS 66/s, w Środowiskowym Laboratorium Unikalnej Aparatury Chemicznej przy Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Widma spektrometrii mas – analizy MS ES, MALDI TOF – wykonywano w Środowiskowym Laboratorium Unikalnej Aparatury Chemicznej przy Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Analiza rentgenostrukturalna – wyniki analizy rentgenostrukturalnej zostały udostępnione przez Zakład Krystalografii Wydziału Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Chromatografia:

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) – wykonywano techniką wstępującą na płytkach z żelą krzemionkowym F254 typ 60 firmy E. Merck.

Chromatografia preparatywna kolumnowa – wykonano metodą krótkiej kolumny, z zastosowaniem żelu krzemionkowego Kieselgel 60 H (40-60 μm) oraz 60 RP-18 (40-63) firmy E. Merck.

Wysokosprawna chromatografia ciekowa (HPLC) – wykonano stosując chromatograf ciekowy Agilent 1200 z detektorem UV-Vis DAD, z kolumną 150 mm × 4,6 mm, 5 μm (Eclipse XDB-C18, Agilent)

VI.2. Stosowane rozpuszczalniki i reagenty

Pełną informację na temat charakterystyki substancji chemicznych (MSDS) oraz dostęp do certyfikatów analizy wszystkich stosowanych reagentów firmy Aldrich, uzyskano dzięki usłudze eCommerce pod adresem internetowym: www.sigma-aldrich.com

- 1,2-dicyjanobenzen (ftalonitryl) (Aldrich)
- 1,3-difenyloizobenzofuran (DPBF) (Aldrich)
- 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en (DBU) (Alfa Aesar, Aldrich)
- 1-adamantanotiol (Aldrich)
- 1-adamantylbromometyloketon (Aldrich)
- 2-(1-adamantyl)etanol (Aldrich)
- 3-nitro-1,2-dicyjanobenzen (Aldrich)
- 4,5-dichloro-1,2-dicyjanobenzen (Aldrich)
- benzoilooctan etylu (Aldrich)
- diaminomaleonitryl (Aldrich)
- jod (POCH)
- kwas trifluorooctowy (Aldrich)
- magnez – wiórki (Aldrich)
- N,N-dimetyloformamid (Aldrich)
- *n*-butanol (Aldrich)
- *n*-heksanol (Aldrich)
- *n*-pentanol (Aldrich)
- octan cynku(II) (Aldrich)
- siarczan(VI) dimetylu (Aldrich)
- siarczan(VI) magnezu (POCh)
- tetrahydrofuran (Aldrich)
- tlenek fosforu(V)
- trietyloamina (POCH)
- węglan(IV) potasu (POCh)
- wodorek sodu jako 60% zawiesina w oleju mineralnym (Aldrich)

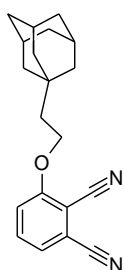
Odczynniki użyte do otrzymania liposomów Avanti Polar Lipids– INstruchemie (Delfezył, Holandia):

- 1-palmitoilo-2-oleoilo-*sn*-glycero-3-fosfocholina (POPC),
- L- α -fosfatydylo-DL glicerol (żółtko jaja kurzego, PG)
- chlorek N-[1-(2,3-dioleoiloksy)propylo]-N,N,N-trimetyloamoniowy (DOTAP)
- cholesterol (Chol)

VI.3 Szczegółowe przepisy preparatywne otrzymanych związków

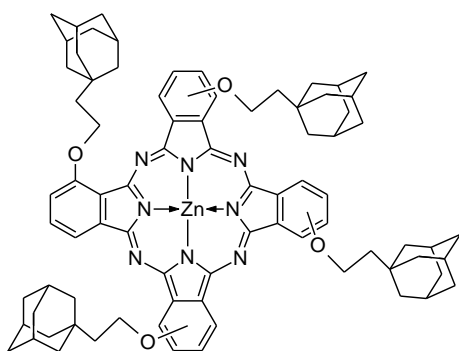
VI.3.1 Synteza ftalocyjanin z podstawnikiem 2-(1-adamantylo)etoksyłowym w położeniu nieperyferyjnym

3-[2-(1-Adamantylo)etoksy]-1,2-dicyjanobenzen **3**



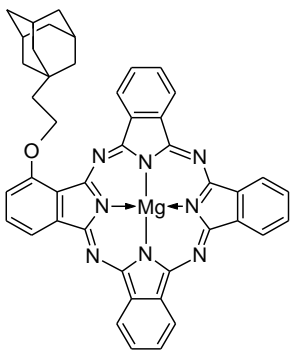
Wodorek sodu (156 mg, 6,50 mmol, 60% zawiesina w oleju mineralnym) mieszano w DMF (10 ml) przez 30 min. 2-(1-Adamantylo)etanol (1,08 g, 6,0 mmol) po rozpuszczeniu w DMF (10 ml), pobrano do strzykawki i dodawano porcjami do mieszaniny reakcyjnej przez 1 godzinę. Po kolejnych 30 minutach dodano 1,2-dicyjano-3-nitrobenzen (0,86 g, 5,0 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 5 dni, po czym wylano na wodę z lodem (1:1, 200 ml). Zebrano jasnoróżowy osad, który poddano na gorąco krystalizacji z metanolu, uzyskując biały osad (0,95 g, wyd. 62%). Tt. 138 °C z rozkł.; $R_f = 0,59$ (*n*-heksan:octan etylu 7:5); MS ES (*m/z*): 309 [M+Na]⁺, 345 [M+K]⁺; ¹H NMR (400 MHz, pirydyna-*d*₅) 7,64 (pt, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,41 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,40 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 4,14 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 1,87 (bs, 3H), 1,53-1,67 (m, 6H), 1,51 (pd, *J* = 1,5 Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, pirydyna-*d*₅) δ 161,5; 135,1 (ukryty); 125,1; 117,5; 116,6; 116,1; 114,0; 104,3; 66,2; 42,4; 42,2; 36,8; 31,6; 28,6.

Cynk(II) 1(4),8(11),15(18),22(25)-tetrakis[2-(1-adamantylo)etoksy]ftalocyjanina **4**



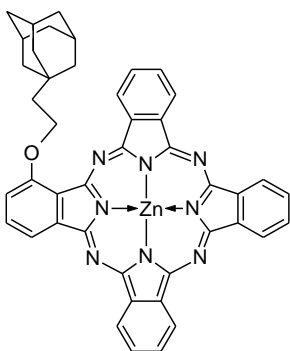
Ftalonitryl **3** (130 mg, 0,43 mmol), octan cynku (78 mg, 0,43 mmol), DBU (64 mg, 0,43 mmol) i *n*-pentanol (2 ml) ogrzewano w temp. wrzenia rozpuszczalnika przez 4 godz. Po tym czasie ogrzewanie kontynuowano w temp. 116 °C mieszając przez 19 godz. Następnie *n*-pentanol odparowano azeotropowo z toluenem (2 × 100 ml) i chromatografowano w normalnym (CH₂Cl₂:CH₃OH 50:1) i odwróconym (CH₂Cl₂:CH₃OH 1:1 RP-C18) układzie faz. Uzyskano **3** w formie zielonego osadu (15 mg, wyd. 11%). Analiza HPLC wykazała, że **3** występuje w formie wolnej i zagregowanej. $R_f = 0,09$ (CH₂Cl₂:CH₃OH 50:1); MS (MALDI) *m/z*: 1290 [M+H]⁺, 1127 [M-AdC₂H₄+2H]⁺.

Magnez(II) 1-[2-(1-adamantyl)etoksy]ftalocyjanina **6**



Wiórki magnezowe (153 mg, 6,29 mmol) ogrzewano z *n*-butanolem (15 ml) po dodaniu jodu (1 kryształek) przez 6 godz., w temp. wrzenia rozpuszczalnika. Następnie mieszaninę reakcyjną schłodzono i dodano pochodną ftalonitrylu **3** (175 mg, 0,57 mmol) i **5** (732 mg, 5,70 mmol) i ogrzewano przez kolejne 16 godz. w temp. wrzenia rozpuszczalnika. *n*-Butanol odparowano azeotropowo z toluenem (2 × 100 ml). Suchą pozostałość chromatografowano w normalnym układzie faz (CH₂Cl₂:CH₃OH 50:1, potem 100:1 do 50:1). Analiza przy zastosowaniu MS MALDI wykazała powstanie mieszaniny makrocyklu **6** oraz ftalocyjanin typu *cis* i *trans*-A₂B₂.

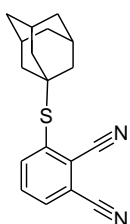
Cynk(II) 1-[2-(1-adamantyl)etoksy]ftalocyjanina **7**



Pochodną ftalonitrylu **3** (100 mg, 0,33 mmol), **5** (293 mg, 2,29 mmol), octan cynku (240 mg, 1,31 mmol), DBU (398 mg, 2,62 mmol) i *n*-pentanol (2 ml) ogrzewano w temp. wrzenia rozpuszczalnika przez 3 godz. Po tym czasie temp. obniżono do 106 °C i mieszano przez dalsze 18 godz. Następnie *n*-pentanol odparowano azeotropowo z toluenem i chromatografowano w normalnym (CH₂Cl₂:CH₃OH 20:1, następnie CH₂Cl₂:CH₃OH 50:1 do 10:1) i odwróconym układzie faz (dwukrotnie w CH₃OH:THF 10:1 RP-C18). Uzyskano **7** w formie zielonego osadu (21 mg). W widmie MS MALDI stwierdzono sygnały **7** m/z 755,6 [M+H]⁺ i cynk(II) ftalocyjaniny 576,4 [M+H]⁺.

VI.3.2 Synteza ftalocyjanin z podstawnikiem 1-adamantylosulfanylowym w pozycji nieperyferyjnej

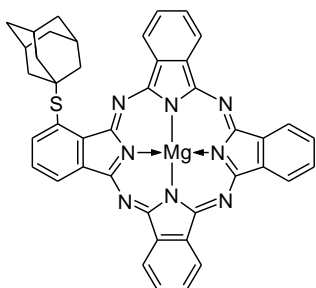
3-(1-Adamantylosulfanylo)-1,2-dicyjanobenzen **9** (modyfikacja metody literaturowej [38])



1-Adamantanotiol **8** (2,02 g, 12,0 mmol), 3-nitro-1,2-dicyjanobenzen **1** (1,73 g, 10,0 mmol) i K₂CO₃ (11,05 g, 80,0 mmol) mieszano w DMF (20 ml) przez 48 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną wylano na wodę z lodem (1:1, 300 ml) i zebrano jasnoróżowy osad. Osad ogrzewano w metanolu (20 ml)

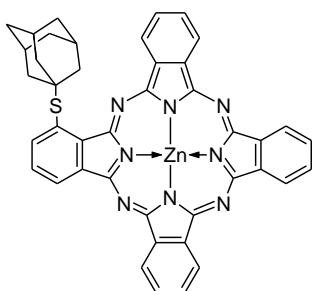
i odsączono na gorąco. Uzyskano **8** w formie białego osadu (1,83 g, wyd. 62%). Tt. 158-159 °C, wg danych literaturowych [38] 155-157 °C.

Magnez(II) 1-(1-adamantylosulfanylo)ftalocyjanina **10**



Magnez (136 mg, 5,61 mmol) ogrzewano z katalityczną ilością jodu we wrzącym *n*-butanolu (15 ml). Mieszaninę schłodzono do temperatury pokojowej, dodano **9** (150 mg, 0,51 mmol) i **5** (653 mg, 5,1 mmol), a następnie mieszano w temperaturze wrzącego *n*-butanolu przez 17 godzin. Mieszaninę reakcyjną przesączono przez ziemię okrzemkową i odparowano. Suchą pozostałość chromatografowano w normalnym (CH₂Cl₂:CH₃OH 50:1 do 4:1, *n*-heksan:octan etylu 7:1 do 7:2) i odwróconym (CH₃OH:THF 10:1 do 5:1) układzie faz. Otrzymano **10** jako zielono-niebieski film (10 mg, wyd. 3%). UV-Vis (DMSO): λ_{max}, nm (logε) 347 (4,38), 677 (4,86), ¹H NMR (400 MHz, pirydyna-d₅): δ = 10,11 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 9,87 (d, *J* = 7,6 Hz), 9,72-9,75 (m, 5H), 8,56 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 8,37 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 8,20-8,29 (m, 6H), 2,57 (bs, 6H) 1,90 (bs, 3H), 1,49-1,58 (bm, 6H). ¹³C NMR (100 MHz, pirydyna-d₅): δ = 155,05; 154,92; 154,87; 154,82; 154,53; 154,08; 153,57; 153,36; 141,15; 140,87; 140,57; 140,43; 139,90; 139,80; 139,76; 139,53; 130,12; 129,92; 129,81; 128,74; 125,93; 50,67; 44,62; 36,43; 30,53. MS MALDI: *m/z* 703,4 [M+H]⁺.

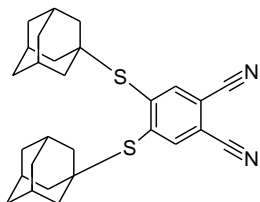
Cynk(II) 1-(1-adamantylosulfanylo)ftalocyjanina **11**



Pochodną ftalonitrylu **9** (0,69 g, 2,35 mmol), **5** (2,11 g, 16,45 mmol), octan cynku (1,72 g, 9,40 mmol), DBU (358 mg, 2,35) i *n*-pentanol (2,7 ml) ogrzewano w temp. wrzenia przez 16 godz. *n*-Pentanol odparowano azeotropowo z toluenem (2 × 100 ml), a następnie suchą pozostałość chromatografowano wielokrotnie w normalnym (*n*-heksan:octan etylu 7:5 do 7:1) i odwróconym układzie faz (CH₃OH:THF 10:1 RP-C18). Wyizolowaną frakcję z produktem makrocyklicznym **11**, poddano analizie metodą MS (MALDI) *m/z* 742,3 [M+H]⁺. W widmie ¹H NMR oprócz sygnałów pochodzących od związku **11**, stwierdzono występowanie sygnałów pochodzących od cynk(II) ftalocyjaniny.

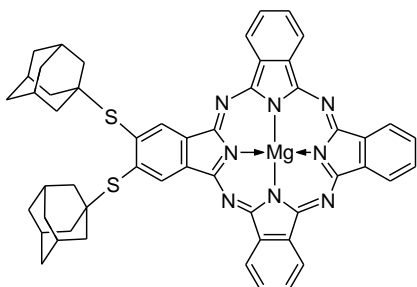
VI.3.3 Synteza ftalocyjanin z podstawnikiem 1-adamantylosulfanylowym w pozycji nieperyferyjnej

4,5-Di(1-adamantylosulfanylo)-1,2-dicyjanobenzen **13**



1-Adamantanotiol **8** (0,59 g, 3,0 mmol), 4,5-dichloro-1,2-dicyjanobenzen **12** (1,26 g, 7,50 mmol) rozpuszczono w DMF (18 ml). Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano K_2CO_3 (4,14 g, 30 mmol) w dwóch porcjach i mieszano przez 20 godzin. Mieszaninę reakcyjną wylano na wodę z lodem (1:1, 100 ml). Zebrano osad, który przemyto wodą i wysuszono, a następnie ogrzewano do wrzenia z CH_3OH (20 ml). Zebrano jasnożółty osad **13** (1,37 g, wyd. 99%). Tł. 219-221 °C; $R_f = 0,46$ (*n*-heksan:octan etylu 7:1). 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) $\delta = 8,15$ (s, 2H); 2,02 (bs, 6H); 1,89 (bs, 12H); 1,63 (bs, 12H). ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) $\delta = 144,8$; 139,0; 115,4; 112,8; 52,1; 42,90; 35,3; 29,5. MS (ES) m/z 483 $[M+Na]^+$, 499 $[M+K]^+$. Analiza elementarna obliczona dla $C_{28}H_{32}N_2S_2$: C 73,00; H 7,00; N 6,08; S 13,92. Znaleziono: C 72,88; H 7,00; N 6,06; S 14,01.

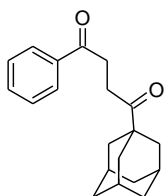
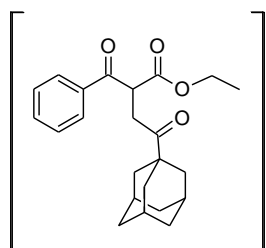
Magnez(II) 2,3-bis(1-adamantylosulfanylo)ftalocyjanina **14**



Wiórki magnezowe (88 mg, 3,63 mmol) ogrzewano z katalityczną ilością jodu we wrzącym *n*-butanolu (30 ml) przez pięć godzin. Mieszaninę ochłodzono do temperatury pokojowej i dodano pochodną ftalonitrylu **13** (150 mg, 0,33 mmol) i 1,2-dicyjanobenzen **5** (423 mg, 3,30 mmol). Całość ogrzewano w temperaturze wrzenia *n*-butanolu przez 19 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną przesączono przez ziemię okrzemkową. *n*-Butanol odparowano azeotropowo z toluenem (dodając 2×100 ml). Suchą pozostałość poddano chromatografii kolumnowej; dwukrotnie w normalnym ($CH_2Cl_2:CH_3OH$ 10:1) i w odwróconym ($CH_3OH:THF$ 4:1) układzie faz. Uzyskano **14** jako zielononiebieski osad (14 mg, wyd. 5%). UV-Vis (DMF): λ_{max} , nm ($\log \epsilon$) 351 (4,49), 685 (4,85). 1H NMR (500 MHz, pirydyna- d_5) $\delta = 10,32$ (s, 2H), 9,79-9,80 (m, 2H), 9,70-9,73 (m, 2H), 9,67-9,70 (m, 2H), 8,17 – 8,24 (m, 6H), 2,35 (s, 12H), 1,92 (bs, 6H), 1,54 (pq, 12H). ^{13}C NMR (125 MHz, pirydyna- d_5) $\delta = 155,1$; 155,0; 154,3; 152,9; 139,8; 139,6; 139,5; 139,5; 138,6; 133,1; 129,8; 129,7; 129,6; 123,3; 123,3; 123,3 (ukryty); 51,1; 44,1; 36,1; 30,3. MS (MALDI) m/z 869,5 $[M+H]^+$.

VI.3.4 Synteza porfirazyn z podstawnikiem 2-(1-adamantylo)-5-fenyl-1*H*-pirolilowym

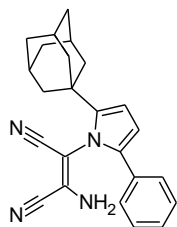
1-(1-Adamantylo)-4-fenyl-1,4-butanodion 18 przez **2-benzoilo-4-(1-adamantylo)-4-oksobutylny etyl 17** przez (wg metody literaturowej [119])



Wodorek sodu (576 mg, 24 mmol, 60% zawiesina w oleju mineralnym) mieszano w tetrahydrofuranie (15 ml) przez 1 godz. Benzoilooctan etylu **15** (3,84 g, 3 mmol) rozpuszczony w tetrahydrofuranie (7 ml) dodawano kroplami przez 30 min.

i kontynuowano mieszanie przez 45 min. Następnie dodawano kroplami roztwór 1-adamantylo-bromometyloketonu (**16**) (5,4 g, 21 mmol) w THF (15 ml) przez 30 min. Mieszanina reakcyjna zabarwiła się na żółto i zmętniała, mieszanie prowadzono przez 16 godzin. Do mieszaniny reakcyjnej dodano ostrożnie wodę (2 ml), po czym zagęszczono na wyparce. Warstwę organiczną rozcieńczoną octanem etylu przemyto wodą i solanką, osuszono bezwodnym siarczanem sodu i odparowano do suchej pozostałości. Związek **17** – produkt pośredni rozpuszczono w mieszaninie etanolu (21 ml) i 3 mol·l⁻¹ roztworu NaOH (80 ml), ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 6 godzin. Mieszaninę ochłodzono do temperatury pokojowej i ekstrahowano octanem etylu (3×50 ml). Warstwę organiczną osuszono bezwodnym siarczanem magnezu i odparowano uzyskując **18** w postaci żółtego oleju. Związek przekrystalizowano z metanolu.

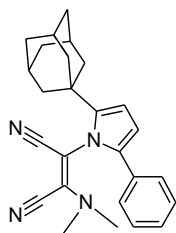
2-[2-(1-Adamantylo)-5-fenyl-1*H*-pirolilo]-3-amino(2*Z*)-buteno-1,4-dinitryl 20



1-(1-Adamantylo)-4-fenylbutano-1,4-dion (1,48 g, 5,0 mmol), diaminomalonitryl (540 mg, 5,0 mmol), P₂O₅ (190 mg) i metanol (60 ml) ogrzewano w temp. wrzenia rozpuszczalnika przez 2 godziny. Następnie, w ciągu kolejnych 2 godzin dodano P₂O₅ w trzech porcjach (łącznie 800 mg, 7,0 mmol). Mieszanie w temperaturze wrzenia kontynuowano przez 20 godz. Następnie metanol odparowano, a suchą pozostałość rozpuszczono w CH₂Cl₂, odfiltrowano nieprzereagowany diaminomaleonitryl i produkty uboczne, a przesącz odparowano i poddano chromatografii kolumnowej (CH₂Cl₂). Uzyskano żółty, krystaliczny osad **20** (556 mg, wyd. 30%); Tt. 190 °C z rozkł.; R_f = 0,43 (CH₂Cl₂).

MS (ES) m/z 391 $[M+Na]^+$. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7,85 (bs, 2H, NH₂), 7,31 – 7,45 (m, 5H, -C₆H₅), 6,24 (d, J = 3,5 Hz, 1H, pirol-H), 6,09 (d, J = 3,5 Hz, 1H, pirol-H), 1,94 - 2.16 (m, 6H, adamantan-H), 1,89 (d, J = 11,5 Hz, 3H, adamantan-H), 1,72 (q, J = 12,0 Hz, 6H, adamantan-H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 144,2; 135,8; 132,3; 131,7; 128,2; 128,1; 127,4; 118,3; 112,9; 110,0 107,8; 91,1; 40,9; 36,2; 34,1; 28,0. Analiza elementarna dla C₂₄H₂₄N₄, obliczono: C 78,23; H 6,57; N 15,21. Znaleziono: C 78,06; H 6,62; N 15,24. Dane krystalograficzne: C₂₄H₂₄N₄, M = 368,47, układ rombowy, grupa przestrzenna P2₁2₁2₁, a = 8,3432 (2) Å, b = 11,5355(2) Å, c = 20,5641(4) Å, V = 1979,15(7) Å³, Z = 4, D_c = 1,237 g·cm⁻³, μ (CuK α) = 0,579 mm⁻¹, T = 130 K, liczba refleksów zmierzonych 11267, liczba refleksów symetrycznie niezależnych 3879, R_{int} = 0,016, θ_{max} = 75,94°, R₁(obs.) = 0,028, wR₂(all) = 0,069, liczba udokładnianych parametrów 253.

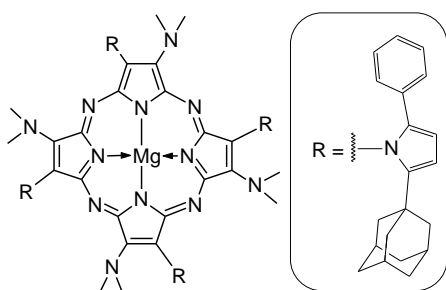
2-[2-(1-Adamantylo)-5-fenyl-1*H*-piroilo]-3-(dimetyloamino)-(2*Z*)-buteno-1,4-dinitryl 21



Wodorek sodu (264 mg, 1,1 mmol, 60% zawiesina w oleju mineralnym) zawieszono w THF (10 ml) w temperaturze (-12 °C) i mieszano. Następnie do mieszaniny reakcyjnej przez 30 min dodawano **20** (186 mg, 0,5 mmol) rozpuszczony w THF (6 ml) i całość mieszano przez 30 min., utrzymując temperaturę (-10 °C). Siarczan(VI) dimetylu (0,093 ml, 1,1 mmol) rozpuszczony w THF (2 ml) dodawano kroplami do mieszaniny reakcyjnej przez 30 min., następnie przez 1 godzinę kontynuowano reakcję w temperaturze (-10 °C). Mieszanie w temperaturze pokojowej prowadzono przez 16 godz., po czym do mieszaniny reakcyjnej ostrożnie dodano wodę (2 ml) i całość wylano na mieszaninę lodu i wody (1:1, 100 ml). Roztwór wodny ekstrahowano CH₂Cl₂, fazę organiczną osuszono bezwodnym MgSO₄, odparowano i chromatografowano (*n*-heksan:octan etylu 7:1) otrzymując **21** jako żółty, krystaliczny osad (151 mg, 75%). Tt. 155 °C, R_f = 0,27 (*n*-heksan:EtOAc 7:1). MS (ES) m/z 397 $[M+H]^+$, 419 $[M+Na]^+$. 1H NMR (400 MHz, pirydyna- d_5) δ = 7,67 (d, J = 7,0 Hz, 2H, 2',6'-C₆H₅), 7,43 (t, J = 7,5 Hz, 2H, 3',5'-C₆H₅), 7,31 (t, J = 7,5 Hz, 1H, 4'-C₆H₅), 6,38 (d, J = 4,0 Hz, 1H, pirol-H), 6,25 (d, J = 4,0 Hz, 1H, pirol-H), 2,55 (s, 6H, -CH₃), 2,30 (d, J = 11,5 Hz, 3H, adamantan-H), 2,14 (d, J = 11,0 Hz, 3H, adamantan-H), 2,00 (s, 3H, adamantan-H), 1,70 (q, J = 12,5 Hz, 6H, adamantan-H). ^{13}C NMR (100 MHz, pirydyna- d_5) δ = 147,6; 139,3; 133,6; 132,9; 129,0; 128,9; 128,1; 120,9; 113,3; 109,9; 109,0; 91,9; 42,6; 40,9; 36,7; 35,5; 28,9. Analizę elementarną

obliczono dla C₂₆H₂₈N₄: C 78,75; H 7,12; N 14,13. Znaleziono: C 78,66; H 7,31; N, 13,80. Dane krystalograficzne: C₂₆H₂₈N₄, M = 396,52, układ jednoskośny, grupa przestrzenna P2₁/n, a = 8,9116 (3) Å, b = 12,3745(4) Å, c = 19,4130(7) Å, β = 94,599(3)°, V = 2133,9(1) Å³, Z = 4, D_c = 1,234 g·cm⁻¹, μ(MoK_α) = 0,074 mm⁻¹, T = 130 K, liczba refleksów zmierzonych 16060, liczba refleksów symetrycznie niezależnych 3764, R_{int} = 0,033, θ_{max} = 25,03°, R₁(obs.) = 0,037, wR₂(all) = 0,085, liczba udokładnianych parametrów 273.

Magnez(II) [2,7,12,17-tetrakis(dimetyloamino)-3,8,13,18-tetrakis[2-(1-adamantylo)-5-fenyl-1H-pirolil]pofirazyna 22



Wiórki magnezowe (120 mg, 5 mmol) i katalityczną ilość jodu ogrzewano we wrzącym *n*-butanolu (45 ml) przez 6 godz. Mieszaninę schłodzono do temperatury pokojowej i dodano **21** (497 mg, 1,25 mmol) jako roztwór w DMF (2,5 ml). Całość ogrzewano w temperaturze wrzenia *n*-butanolu przez 16 godz.

Następnie mieszaninę reakcyjną przesączono przez ziemię okrzemkową. *n*-Butanol odparowano azeotropowo z toluenem (dodając 2 × 50 ml). Suchą pozostałość poddano dwukrotnie chromatografii kolumnowej, stosując jako fazę ruchomą CH₂Cl₂. Uzyskano **22** jako ciemnoniebieski osad (75 mg, wyd. 15%). R_f = 0,16 (CH₂Cl₂). IR (cm⁻¹) 1581, 1558, 1120, 1063. MS m/z (MALDI) 1611 [M+H]⁺. ¹H NMR (500 MHz, pirydyna-d₅) δ = 8,21 (d, J = 7,0 Hz, 5H); 7,80 (d, J = 7,0 Hz, 5H); 7,55 (m, 2H); 7,44 (m, 15H); 7,32 (m, 3H); 6,49 (d, J = 3,5 Hz, 4H, pirol); 6,32 (d, J = 3,5 Hz, 4H, pirol); 3,03 (s, 24H, -CH₃) 2,37 (d, J = 12 Hz, 12H, adamantan) 2,21 (d, J = 12 Hz, 12H, adamantan) 1,98 (bs, 24H, adamantan) 1,67 (m, 12H, adamantan). ¹³C NMR (125 MHz, pirydyna-d₅) δ = 145,27; 137,90; 137,83; 133,42; 133,02; 129,86; 129,61; 128,62; 128,60; 127,59; 119,39; 110,99; 110,09; 108,38; 42,09; 42,07; 38,93; 36,67; 36,56; 36,49; 36,37; 28,79; 28,68; 28,04.

VI.4 Metodyka badań solwatacyjnych i generowanie tlenu singletowego

Wydajność kwantową generowania tlenu singletowego ustalono w roztworach w DMSO i DMF (3,0 ml) stosując metodę pośrednią. Zastosowano cynk(II) ftalocyjaninę jako związek o znanej wydajności generowania tlenu singletowego i 1,3-difenyloizobenzofuran (DPBF) jako chemiczny wygaszacz tlenu singletowego [108–110,117]. Roztwór badanego

makrocyklu i DPBF w DMF lub DMSO, naświetlano w kuwecie kwarcowej o długości drogi optycznej 1 cm. Do naświetlania wykorzystywano wysokociśnieniową lampę ksenonową (150W, Optel) i monochromator M250/1200/U. Długość fali, przy której naświetlano roztwór odpowiadał maksimum absorpcji (λ_{\max}) związku makrocyklicznego w paśmie Q. Moc światła ustalono każdorazowo na $0,5 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Radiometr RD 0,2/2 z sondą TD, Optel). Stężenie związku makrocyklicznego dobierano w ten sposób, aby absorbancja w λ_{\max} wynosiła 0,5. Stężenie DPBF utrzymywano na poziomie ok. $3\times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, w celu uniknięcia reakcji łańcuchowych w obecności tlenu singletowego. W określonych odstępach czasu dokonywano pomiarów absorbancji, stosując spektrofotometr Shimadzu UV-160A. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono trzykrotnie, obliczenia wykonano dla wartości średniej z pomiarów.

VI.5 Metodyka badania fotodegradacji

Fotodegradacji poddano roztwór **22** w DMF. Stężenie związku zostało ustalone w ten sposób, aby wartość absorbancji przy długości fali odpowiadającej maksimum pasma Q wynosiła ok. 0,7. Analizowany roztwór przeniesiono do kuwety cylindrycznej o pojemności 2,8 ml i długości drogi optycznej $l = 1 \text{ cm}$. Naświetlanie prowadzono z wykorzystaniem wysokociśnieniowej łukowej lampy UV-Vis z palnikiem ksenonowym XBO-50, wyposażonej w filtr szklany. Natężenie promieniowania padającego na próbkę wynosiło $\sim 115 \text{ klux}$.

VI.6 Pomiary fluorescencji

Pomiarów fluorescencji dokonano stosując kuwety o długości drogi optycznej $l = 1 \text{ cm}$. Absorbancję roztworu przy maksimum absorpcji utrzymywano poniżej 0,15, aby zapobiec reabsorpcji emitowanego promieniowania.

Przygotowano roztwory ftalocyjaniny **14** w THF, DMF i DMSO. Absorbancja w maksimum absorpcji pasma Q wynosiła poniżej 0,15 (spektrofotometr Ocean Optics USB4000 ISS-UV-VIS z lampą deuterową i wolframową). Czasy życia fluorescencji zmierzono wykorzystując Multichannel Picoseconds Event Timer TCSPC Module HydraHarp400 (PicoQuant GmbH). Źródłem wzbudzenia był komercyjnie dostępny laser tytanowo-szafirowy (Mai Tai, Spectra Physics), o zakresie pracy 690-1020 nm, mocy ponad 2,5 W oraz czasie impulsu 100 fs przy częstotliwości pracy 80 MHz. Promień harmonicznej podstawowej, o długości fali $\lambda = 730 \text{ nm}$, przepuszczono przez kryształ generujący drugą pochodną (BBO), aby otrzymać promieniowanie o długości fali

$\lambda = 365$ nm, wykorzystane do wzbudzenia ftalocyjaniny **14** w paśmie Soreta. Zastosowanie filtru i zestawu zwierciadeł dichroicznych, pozwoliło wyeliminować niepożądane promieniowanie podstawowe. W pomiarach wykorzystano fotodiodę lawinową (Micro Photon Devices). Funkcję odpowiedzi instrumentu zmierzono poprzez rozproszenie światła wzbudzającego w zawieszynie koloidalnego tlenku tytanu.

VI.7 Pomiary elektrochemiczne

Wykonano badania elektrochemiczne metodami cyklicznej woltamperometrii i różnicowej pulsowej woltamperometrii. Pomiary przeprowadzono przy użyciu potencjostatu/galwanostatu ECO Chemie Autolab, z oprogramowaniem GPEC. Zastosowano układ trzech elektrod w temperaturze pokojowej. Elektrode roboczą stanowił dysk węgla szklatego o powierzchni $0,00785$ cm². Przed każdym pomiarem powierzchnia elektrody pracującej była polerowana zawiesziną tlenku glinu o wielkości cząstek poniżej $0,05$ μ m. Jako elektrodę pomocniczą zastosowano drut platynowy, a elektrodę pseudo-odniesienia stanowił drut srebrny. Ferrocenu użyto jako wzorca wewnętrznego. Jako elektrolit podstawowy zastosowano roztwór chloranu(VII) tetrabutylamoniowego (TBAP) w dichlorometanie. Stężenie analizowanego roztworu wynosiło ok. $0,5 \cdot 10^{-3}$ mol·l⁻¹. Przed każdym eksperymentem roztwór odgazowywano przez minimum 10 min. używając azotu, w celu usunięcia rozpuszczonego tlenu.

VI.8 Otrzymywanie liposomów

Przygotowano cztery różne formułacje liposomalne metodą hydratacji cienkiego filmu lipidowego [139,141,142]. Odpowiednie ilości roztworów w chloroformie (POPC – 25 mg·ml⁻¹; PG – 25 mg·ml⁻¹, DOTAP – 25 mg·ml⁻¹, Chol – 10 mg·ml⁻¹, **22** – $0,4$ mg·ml⁻¹), umieszczono w szklanych probówkach i odparowano do sucha używając wyparki rotacyjnej. Probówki zawierające na ściankach film lipidowy suszono przez 12 godzin pod zmniejszonym ciśnieniem, aby usunąć resztki chloroformu. Następnie, wysuszone filmy uwadniano, stosując burfor HEPES ($10 \cdot 10^{-3}$ mol·l⁻¹ HEPES - kwas (N-(2-hydroksyetylo) piperazyno-N'-(2-etanosulfonowy)), roztwór NaCl o stężeniu $140 \cdot 10^{-3}$ mol·l⁻¹, pH = 7,4) przy użyciu laboratoryjnej wytrząsarki (Vortex Genie 2 digital, Scientific Industries). Otrzymane liposomy przecięnięto 21 razy przez błonę poliwęglanową o średnicy porów 100 nm, używając ekstrudera strzykawkowego (Avanti Polar Lipids).

Formulacja liposomalna	Składniki				
	22	PG	POPC	DOTAP	Chol
22, PG, POPC	0,1	2	8		
22, PG, POPC, Chol	0,1	1,33	5,34		3,33
22, POPC, DOTAP	0,1		8	2	
22, POPC, DOTAP, Chol	0,1		5,34	1,33	3,33
PG, POPC		2	8		
PG, POPC, Chol		1,33	5,34		3,33
POPC, DOTAP			8	2	
POPC, DOTAP, Chol			5,34	1,33	3,33

Tabela 6. Stosunki molowe poszczególnych składników w formulacjach liposomalnych.

Rozkład wielkości liposomów zawierających **22**, jak i wolnych, ustalono stosując aparat NanoSight NS500.

VI.9 Metodyka badań mikrobiologicznych

W badaniu użyto szczepów bakteryjnych *Staphylococcus aureus* NCTC i *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749. Bakterie przechowywano w temp. $-70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ w probówkach Cryovial® (Microbank, Pro-Lab Diagnostics, Kanada). Bakterie inkubowano w warunkach tlenowych, stosując wyciąg mózgowo-sercowy (ang. *brain-heart infusion*, BHI) (bioMerieux, Francja) w temperaturze $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 20 godz. Komórki bakteryjne zebrano przez odwirowanie (3000 g przez 15 min) i zawieszono w 1,5 ml buforu PBS (ang. *phosphate buffered saline*, $10 \cdot 10^{-3}\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH = 7,0). Zawiesinę rozcieńczono w proporcji 1:100 buforem PBS, otrzymując końcowe stężenie ok. 10^7 jednostek tworzących kolonie (ang. *colony forming units*, CFU) w 1 ml.

W badaniach wykorzystywano płytki 96-dołkowe. Porcje zawiesiny komórek bakteryjnych (100 μl) umieszczono w dołkach i dodano równą objętość roztworu badanych liposomów zawierających porfirazynę **22**, uzyskując końcowe stężenie $5 \cdot 10^{-5}\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Kontrolę negatywną stanowiły: (i) dołki bez liposomów, do których dodano PBS;

(ii) dołki, do których dodano wolne liposomy. Wszystkie próbki inkubowano w temperaturze $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 30 minut. Następnie próbki naświetlono promieniowaniem o $\lambda_{\text{max}} = 735\text{ nm}$, (klaster diod LED, Roithner Lasertechnik). Moc światła wynosiła $3,0\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, naświetlanie prowadzono przez 20 min (dawka światła $3,6\text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$). Ponadto, równolegle jako tzw. kontrolę ciemną przeprowadzono eksperymenty, w których hodowlę komórek bakteryjnych chroniono przed światłem. Liczbę żywych bakterii określono, licząc jednostki tworzące kolonie, wyhodowane po odpowiednim rozcieńczeniu na płytkach z agarem tryptozowo-sojowym, po inkubacji w temperaturze $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

VI.10 Metodyka badań biologicznych ukierunkowanych przeciwko komórkom nowotworowym

W badaniach użyto komórek HeLa i komórek Cem. Jako medium hodowlanego użyto Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) z dodatkiem 10% Fetal Bovine Serum (Gibco), 1% glutaminy, 1% buforu HEPES ($1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) i 1% pirogronianu sodu. Do każdej ze studzienek wysiano ok. $6\cdot 10^4$ komórek. Po 24 i 48 godzinach dokonano naświetlania promieniowaniem o $\lambda_{\text{max}} = 690\text{ nm}$, o mocy $2\text{--}2,6\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ przez 30 min (dawka światła $3,60\text{--}4,68\text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$). Komórki zliczano z wykorzystaniem licznika Coulter, czwartego i piątego dnia, odpowiednio dla komórek Cem i komórek HeLa.

VII STRESZCZENIE

Synteza, badania strukturalne i fotochemiczne koniugatów porfirazyn i ftalocyjanin z adamantanem

W części teoretycznej pracy dokonano przeglądu piśmiennictwa na temat dotychczas uzyskanych koniugatów ftalocyjanin i porfirazyn z adamantanem, przedstawiono stosowane klinicznie leki zawierające w cząsteczce ugrupowanie adamantyłowe oraz opisano kompleksy i koniugaty cyklodekstryn z porfirynoidami.

W części eksperymentalnej przedstawiono wyniki badań dotyczących syntezy i właściwości fotochemicznych siedmiu nowych porfirynoidów ftalocyjanino-adamantyłowych i porfirazyno-adamantyłowych.

Zsyntezowano i podano pełną charakterystykę właściwości fizykochemicznych i fotochemicznych siedmiu związków:

- a. 3-[2-(1-adamantylo)etoksy]-1,2-dicyjanobenzen (**3**)
- b. magnez(II) [1-(1-adamantylosulfanylo)ftalocyjanina] (**10**)
- c. 4,5-di(1-adamantylosulfanylo)-1,2-dicyjanobenzen (**13**)
- d. magnez(II) [2,3-bis(1-adamantylosulfanylo)ftalocyjanina] (**14**)
- e. 2-[2-(1-adamantylo)-5-fenylo-1*H*-pirolilo]-3-amino-(2*Z*)-buteno-1,4-dinitryl (**20**)
- f. 2-[2-(1-adamantylo)-5-fenylo-1*H*-piroilo]-3-dimetyloamino-(2*Z*)-buteno-1,4-dinitryl (**21**)
- g. magnez(II) {2,7,12,17-tetrakis-[2-(1-adamantylo)-5-fenylo-1*H*-pirolilo]-3,8,13,18-tetrakis(dimetyloamino) porfirazyna} (**22**)

Otrzymano cztery nowe ftalocyjaniny zawierające w centrum koordynacyjnym jony cynku(II) lub magnezu(II), które scharakteryzowano przy wykorzystaniu spektrometrii mas MS MALDI:

- a. cynk(II) {1(4),8(11),15(18),22(25)-tetrakis[2-(1-adamantylo)etoksy]ftalocyjanina} (**4**)
- b. magnez(II) {1-[2-(1-adamantylo)etoksy]ftalocyjanina} (**6**)
- c. cynk(II) {1-[2-(1-adamantylo)etoksy]ftalocyjanina} (**7**)
- d. cynk(II) [1-(1-adamantylosulfanylo)ftalocyjanina] (**11**)

Zsyntezowano wg zmodyfikowanych metod literaturowych trzy substraty, wykorzystane następnie do otrzymania makrocykli:

- a. 3-(1-adamantylosulfanylo)-1,2-dicyjanobenzen (**8**)
- b. 2-benzoilo-4-(1-adamantylo)-4-oksobutylan etylu (**17**)
- c. 1-(1-adamantylo)-4-fenylo-1,4-butanodion (**18**)

Identyfikację związków przeprowadzono stosując metody spektrometrii mas MS ES i MALDI, spektroskopii ^1H i ^{13}C NMR, w tym również techniki dwuwymiarowego NMR - $^1\text{H}^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HSQC, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HMBC. Dla związków będących substratami w procesie

makrocyclizacji, tj. pochodnych maleonitrylowych **20** i **21** uzyskano monokryształy, które oceniono metodą analizy rentgenostrukturalnej.

Analiza właściwości spektroskopowych obejmowała charakterystykę widm elektronowych w rozpuszczalnikach organicznych o właściwościach protycznych i aprotycznych. Widma wszystkich związków makrocyclicznych wykazywały obecność dwóch charakterystycznych pasm, Soreta oraz pasma Q. Ftalocyjaniny **10** i **14** poddano studiom solwatochromowym i wykazano, że zmiany w przebiegu widm elektronowych są skutkiem procesu solwatacji, a właściwości koordynacyjne rozpuszczalnika nie mają istotnego wpływu na wartość λ_{\max} pasma Q. Ftalocyjaninę **14** oraz porfirazynę **22** poddano badaniom emisyjnym, które obejmowały ocenę widm fluorescencji, obliczenie przesunięć Stokes'a oraz wyznaczenie wydajności kwantowej procesów emisji.

Analiza właściwości fotochemicznych dotyczyła wyznaczenia wydajności kwantowej generowania tlenu singletowego (Φ_{Δ}). Proces oceniono metodą pośrednią, wykorzystując jako związek referencyjny niepodstawioną ftalocyjaninę cynkową (ZnPc), a 1,3-difenyloizobenzofuran jako wygaszacz tlenu singletowego. Testy trwałości fotochemicznej porfirazyny **22**, wykonano po ekspozycji na promieniowanie z zakresu pasma Q, stosując jako rozpuszczalnik DMF. Badanie przeprowadzono w warunkach tlenowych, jak również po odtlenowaniu azotem. Obserwowano zjawisko „photobleachingu”, któremu towarzyszył zanik pasma Soreta oraz pasma Q. Wykazano, że proces fotodegradacji porfirazyny **22** zachodzi w II etapach, zgodnie z reakcją kinetyczną I-rzędu. W odniesieniu do porfirazyny **22**, analizowano również właściwości oksydacyjno-redukujące z wykorzystaniem techniki cyklicznej voltamperometrii (CV) i różnicowej pulsowej voltamperometrii (DPV). Porfirazynę **22** wbudowano w liposomy i poddano badaniom biologicznym z wykorzystaniem bakterii *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*. W ocenie aktywności biologicznej ftalocyjaniny **14**, wykorzystano także linie komórkowe HeLa i CEM, i stwierdzono aktywność fotodynamiczną związku na niskim poziomie.

W posumowaniu należy stwierdzić, że właściwości fizykochemiczne oraz fotochemiczne wszystkich zsyntezowanych związków makrocyclicznych, pozwalają rozpatrywać je jako potencjalne fotosensybilizatory w terapii fotodynamicznej.

VIII ABSTRACT

Synthesis, structural and photochemical studies of porphyrazine- and phthalocyanine-adamantane conjugates

Literature part of the dissertation presents the adamantane-porphyrazine and adamantane-phthalocyanine conjugates as well as clinically applied drugs possessing adamantane moiety. In addition, both porphyrinoid and cyclodextrin complexes, and conjugates are reviewed.

In the experimental part, the results of synthesis and photochemical studies of novel adamantane-phthalocyanine and adamantane-porphyrazine conjugates are described. Seven compounds were originally synthesized, characterized with various physicochemical techniques and subjected to photochemical studies:

- a. 3-[2-(1-adamantyl)ethoxy]-1,2-dicyanobenzene (**3**)
- b. magnesium(II) [1-(1-adamantylsulfanyl)phthalocyanine] (**10**)
- c. 4,5-di(1-adamantylsulfanyl)-1,2-dicyanobenzene (**13**)
- d. magnesium(II) [2,3-bis(1-adamantylsulfanyl)phthalocyanine] (**14**)
- e. 2-[2-(1-adamantyl)-5-phenyl-1*H*-pyrrolyl]-3-amino-(2*Z*)-butene-1,4-dinitrile (**20**)
- f. 2-[2-(1-adamantyl)-5-phenyl-1*H*-pyrrolyl]-3-dimethylamino-(2*Z*)-butene-1,4-dinitrile (**21**)
- g. magnesium(II) {2,7,12,17-tetrakis-[2-(1-adamantyl)-5-phenyl-1*H*-pyrrolyl]-3,8,13,18-tetrakis(dimethylamino)porphyrazine} (**22**)

Four new phthalocyanines possessing zinc(II) or magnesium(II) ions in the central cavity were obtained and characterized by means of MALDI MS:

- e. zinc(II) {1(4),8(11),15(18),22(25)-tetrakis[2-(1-adamantyl)ethoxy]phthalocyanine} (**4**)
- f. magnesium(II) {1-[2-(1-adamantyl)ethoxy]phthalocyanine} (**6**)
- g. zinc(II) {1-[2-(1-adamantyl)ethoxy]phthalocyanine} (**7**)
- h. zinc(II) [1-(1-adamantylsulfanyl)phthalocyanine] (**11**)

Three substrates were synthesized by adapting the literature procedures and used in subsequent reactions:

- d. 3-(1-adamantylsulfanyl)-1,2-dicyanobenzene (**8**)
- e. 2-benzoyl-4-(1-adamantyl)-4-oxobutyric acid ethyl ester (**17**)
- f. 1-(1-adamantyl)-4-phenyl-1,4-butanedione (**18**)

Identification of the compounds was performed by means of ES and MALDI MS, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy, including 2D NMR experiments - $^1\text{H}^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HSQC, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HMBC. Moreover, maleonitrile substrates in porphyrazine synthesis - **20** and **21**, were subjected to crystallization and the obtained monocrystals were characterized using X-ray crystallography.

Assessment of spectroscopic properties involved analysis of their electronic spectra in protic and aprotic organic solvents. Spectra of all macrocyclic compounds possessed two characteristic bands – Soret and Q band. Phthalocyanines **10** and **14** were subjected to solvatochromic studies. Changes in their UV-Vis spectra resulted from solvation process. The coordinating strength of the solvent did not affect λ_{max} of their Q-bands. Phthalocyanine **14** and porphyrazine **22** were subjected to emission studies, which involved analysis of their fluorescence spectra, Stokes shift calculations and determination of fluorescence quantum yields.

Analysis of photochemical properties involved determining singlet oxygen quantum yield (Φ_{Δ}). This parameter was assessed by method with unsubstituted zinc(II) phthalocyanine (ZnPc) as a reference, and 1,3-diphenylisobenzofuran as a singlet oxygen scavenger (quencher). Tests of photochemical stability of porphyrazine **22** were conducted by its exposition to light at the Q-band range in DMF. Experiments were performed in aerobic conditions, and after deaeration of the solvent with nitrogen. Photobleaching of **22** was observed, and was accompanied by Soret and Q-band decrease. It was found that photodegradation of porphyrazine **22** took place in two stages, according to the first order kinetics. Redox properties of porphyrazine **22** were also analyzed, using cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV). Porphyrazine **22** was also incorporated into liposomes and tested against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria as photosensitizer. Biological activity of phthalocyanine **14** was tested against HeLa and CEM cell lines and revealed its low photodynamic activity.

In conclusion, physicochemical and photochemical properties of all synthesized macrocyclic compounds make them potential photosensitizers for photodynamic therapy.

IX SPIS RYCIN, SCHEMATÓW I TABEL

Ryc. 1. Wzory strukturalne naturalnych i syntetycznych porfirynoidów; M – jon metalu.....	6
Ryc. 2. Diagram Jabłońskiego przedstawiający możliwe procesy związane ze wzbudzeniem fotouczulacza; (i) wzbudzenie, (ii) konwersja wewnętrzna, (iii) przejście bezpromieniste, (iv) fluorescencja, (v) przejście międzysystemowe, (vi) fosforescencja, (vii) wzbudzenie.....	7
Ryc. 3. Fotouczulacze stosowane klinicznie oraz znajdujące się w badaniach klinicznych; temoporfina (Foscan®, XIII), werteporfiryna (Visudyne®, XIV). W badaniach klinicznych znajdują się ftalocyjanina Pc4 (XV), moteksafina lutetu (Lutex®, XVI) oraz padoporfina (Tookad®, XVII).....	8
Ryc. 4. Stosowane klinicznie leki (XVIII-XXIV) posiadające w cząsteczce podstawnik adamantylowy.	9
Ryc. 5. Ftalocyjaniny posiadające w strukturze ugrupowania tetraazaadamantylowe i adamantylowe XXV – XXVII.....	10
Ryc. 6. Ftalocyjaniny (XXVIII-XXXI) posiadające w strukturze grupy adamantylometoksylove, adamantylotoksylove jako podstawniki aksjalne i skoniugowane peryferyjne pierścienie zawierające grupę adamantylową.....	11
Ryc. 7. Ftalocyjaniny (XXXII-XLI) zawierające ugrupowania adamantylove jako podstawniki peryferyjne.....	11
Ryc. 8. Ftalocyjaniny (XLII, XLIII) i azaftalocyjanina (XLIV), zawierające ugrupowania adamantylove jako fragmenty rozbudowanych podstawników.....	12
Ryc. 9. Cyklodekstryny (CD); α -CD XLV, β -CD XLVI, γ -CD XLVII.....	14
Ryc. 10. Porfiryny o aktywności biomimetycznej (XLVIII-LII) katalizujące reakcję hydroksylacji steroidów (LIII-LVIII).....	15
Ryc. 11. Porfiryny o aktywności katalitycznej (LIX, LX) i katalizowane przez nie procesy utlenienia karotenoidów (LXI do LXII-LXIV, LXXV do LXII i LXVII).....	18
Ryc. 12. Porfiryny (LXXVII i LXXVIII) o aktywności enzymatycznej dysmutazy ponadtlenkowej i cyklodekstryny (LXXIX-LXXXI) o aktywności peroksydazy glutationu.....	19
Ryc. 13. Kompleksy porfiryn z cyklodekstrydami (LXXXII i LXXXIII) wiążące odwracalnie tlen w środowisku wodnym.....	21
Ryc. 14. Dimery cyklodekstryn (LXXXIV-LXXXIX), których kompleksy z porfiryń Fe(II)TPPS stanowią funkcjonalne modele hemoglobiny, np. LXXXIV-Fe(II)TPPS; żelazo(II) 5,10,15,20-tetrakis(4'-sulfofenylo)porfiryń – Fe(II)TPPS.....	23
Ryc. 15. Związki (LXXX-LXXXVI) skoniugowane z cząsteczkami PM- β -CD tworzące kompleksy inkluzyjne.....	25
Ryc. 16. Porfiryny LXXXVII i LXXXVIII tworzące supramolekularny polimer.....	26
Ryc. 17. Składniki supramolekularnego kompleksu (LXXXIX - XCI).....	27
Ryc. 18. Związki wykorzystane przy tworzeniu supramolekularnych kompleksów XCII-XCIV.....	29
Ryc. 19. Chloryna (XCV) i porfiryny (XCVI-XCIX) zawierające ugrupowania CD.....	30
Ryc. 20. Krzem(IV) ftalocyjaniny (C-CII) z ugrupowaniem PM- β -CD.....	32
Ryc. 21. Ditietyloeteny (CIII-CVI) zawierające grupy β -CD. Pokazano schemat zachodzenia reakcji odwracalnej izomeryzacji.....	33
Ryc. 22. Ftalocyjanina z podstawnikiem azobenzenowym CVII, o właściwościach fotochromowych.....	34
Ryc. 23. Składniki supramolekularnego kompleksu o właściwościach fotochromowych (CVIII - CX).....	35
Ryc. 24. Supramolekularny kompleks dimeru β -CD z ftalocyjaniną CXI, ulegający rozpadowi pod wpływem światła.....	36
Ryc. 25. Widmo $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HMBC związku 3. Podano wartości przesunięć chemicznych dla atomów wodoru i węgla oraz sprzężenia zaobserwowane w cząsteczce.....	39

Ryc. 26. Widmo $^1\text{H}^1\text{H}$ COSY związku 3 (fragment).....	40
Ryc. 27. Widmo MS MALDI ftalocyjaniny 4; przedstawiono przebieg fragmentacji jonu molekularnego $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 1290.	41
Ryc. 28. Chromatogram HPLC makrocyklu 4 otrzymany z zastosowaniem fazy ruchomej THF:acetonitryl:woda (56:37:7); wstawki przedstawiają widma UV-Vis związków wykazujących czas retencji $t_r = 6,8$ oraz $t_r = 7,6$ min.	42
Ryc. 29. Widmo MS MALDI makrocyklu 6, obrazujące przebieg fragmentacji jonu molekularnego $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 715,6 i ftalocyjaniny typu A_2B_2 m/z 893,7 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (przedstawiono jeden z możliwych izomerów).	43
Ryc. 30. Widmo MS MALDI makrocyklu 7. Przedstawiono przebieg fragmentacji jonu molekularnego $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 755,6 i cynk(II) ftalocyjaniny m/z 576,4 $[\text{M}]^+$	45
Ryc. 31. Widmo MS MALDI ftalocyjaniny 10. Pokazano przebieg fragmentacji jonu molekularnego $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 703,4$	46
Ryc. 32. Fragment widma $^1\text{H}^1\text{H}$ COSY NMR związku 10 w zakresie 8,00-10,30 ppm wraz z przesunięciami chemicznymi przypisanymi sygnałom odpowiednich protonów.	47
Ryc. 33. Chromatogram HPLC związku 10.	48
Ryc. 34. Schemat procesu utlenienia DPBF przez tlen singletowy.	48
Ryc. 35. Zmiany widma absorpcji mieszaniny 10 i DPBF w DMF podczas ekspozycji na promieniowanie o $\lambda_{\text{max}} = 674$ nm, we wstawce przedstawiono zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu; pomiary wykonano przy $\lambda = 417$ nm.	49
Ryc. 36. Zmiany widma absorpcji mieszaniny 10 i DPBF w DMSO podczas ekspozycji na promieniowanie o $\lambda_{\text{max}} = 677$ nm, we wstawce przedstawiono zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu; pomiary wykonano przy $\lambda = 417$ nm.	50
Ryc. 37. Przebieg widm absorpcji ftalocyjaniny 10 w różnych rozpuszczalnikach, przedstawiono zakres pasma Q.	51
Ryc. 38. Korelacja pomiędzy λ_{max} pasma Q ftalocyjaniny 10 i parametrem 1/F. Rozpuszczalniki: (1) 1-chloronaftalen, (2) pirydyna, (3) benzen, (4) toluen, (5) DMSO, (6) DMF, (7) 1,4-dioksan, (8) THF, (9) trietyloamina, (10) 2-propanol, (11) octan etylu, (12) etanol, (13) aceton, (14) acetonitryl, (15) metanol.	51
Ryc. 39. Widmo MS MALDI makrocyklu 11. Przedstawiono przebieg fragmentacji jonu molekularnego $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 743,6 i ftalocyjaniny typu A_2B_2 m/z 909,8 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (przedstawiono jeden z możliwych izomerów).	52
Ryc. 40. Wartości przesunięć chemicznych dla jąder ^1H i ^{13}C w cząsteczce związku 14, oraz fragmenty widma $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HMBC.	55
Ryc. 41. Widma absorpcji, emisji i wzbudzenia związku 14 w DMF.	56
Ryc. 42. Widma absorpcji, emisji i wzbudzenia związku 14 w DMSO.	56
Ryc. 43. Widma absorpcji, emisji i wzbudzenia związku 14 w THF.	57
Ryc. 44. Wykres zaniku fluorescencji związku 14 w DMF i THF (wykresy dla DMSO i DMF pokrywają się).	58
Ryc. 45. Widmo absorpcji mieszaniny 14 i DPBF w DMF podczas ekspozycji na promieniowanie o długości fali $\lambda_{\text{max}} = 685$ nm, we wstawce przedstawiono zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania; pomiary przeprowadzono dla długości fali $\lambda = 417$ nm.	59
Ryc. 46. Widmo absorpcji mieszaniny 14 i DPBF w DMSO podczas ekspozycji na promieniowanie o długości fali $\lambda_{\text{max}} = 688$ nm, we wstawce przedstawiono zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania; pomiary przeprowadzono dla długości fali $\lambda = 417$ nm.	59
Ryc. 47. Przebieg widm absorpcji ftalocyjaniny 14 w różnych rozpuszczalnikach.	60
Ryc. 48. Korelacja pomiędzy λ_{max} pasma Q ftalocyjaniny 14 i parametrem 1/F. Rozpuszczalniki: (1) 1-chloronaftalen, (2) chlorobenzen, (3) toluen, (4) DMSO, (5) dichlorometan, (6) DMF, (7) 1,4-dioksan, (8) THF, (9) trietyloamina, (10) octan etylu, (11) aceton, (12) acetonitryl.	61

Ryc. 49. Widmo $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HMBC NMR związku 21 w zakresie ^{13}C NMR: a) 26-46 ppm; b) 90-155 ppm; oraz zaobserwowane przesunięcia chemiczne dla jąder ^1H (^{13}C).....	64
Ryc. 50. Struktury krystalograficzne związków 20 i 21.....	65
Ryc. 51. Fragmenty widm ^1H NMR a) porfirazyny 22 b) maleonitrylu 21 w zakresie 6,0-8,3 ppm; symbole # wskazują na sygnały resztkowe pirydyny.....	66
Ryc. 52. Fragmenty widm ^1H NMR a) porfirazyny 22 b) maleonitrylu 21 w zakresie 1,55-2,45 ppm.....	67
Ryc. 53. Widmo absorpcji mieszaniny 22 i DPBF w DMF podczas ekspozycji na promieniowanie $\lambda_{\text{max}} = 729$ nm, we wstawce przedstawiono zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania; pomiary przy długości fali $\lambda = 417$ nm.....	68
Ryc. 54. Widma absorpcji, emisji i wzbudzenia związku 22 w DMF.....	68
Ryc. 55. Widma absorpcji, emisji i wzbudzenia związku 22 w THF.....	69
Ryc. 56. Zmiany widm absorpcji porfirazyny 22 w DMF po ekspozycji na promieniowanie w czasie od 0 do 600 s; warunki swobodnego dostępu tlenu.....	69
Ryc. 57. Wykres przedstawiający zależność kinetyczną $\ln(A/A_0) = f(t)$ dla porfirazyny 22; warunki swobodnego dostępu tlenu.....	70
Ryc. 58. Zmiany widm absorpcji porfirazyny 22 w DMF po ekspozycji na promieniowanie w czasie od 0 do 600 s; po odtlenowaniu.....	70
Ryc. 59. Wykres przedstawiający zależność kinetyczną $\ln(A/A_0) = f(t)$ dla porfirazyny 22; warunki ograniczonego dostępu do tlenu.....	71
Ryc. 60. a) cykliczne voltamogramy porfirazyny 22 przy różnych prędkościach skanowania; 1, 2 – procesy redukcyjne; 3, 4 – procesy oksydacyjne; b) różnicowe pulsowe voltamogramy (DPV) porfirazyny 22, parametry DPV: amplituda modulacji 20 mV, prędkość przemieszczania $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$; Fc – ferrocen.....	72
Ryc. 61. Zmiany widm UV-Vis porfirazyny 22 po przyłożeniu potencjału (a) $E_{\text{app}} = 0,14 \text{ V}$, $E_{\text{app}} = 0,66 \text{ V}$ (wstawka); (b) $E_{\text{app}} = -1,79 \text{ V}$, $E_{\text{app}} = -2,1 \text{ V}$ (wstawka).....	75
Ryc. 62. Rozkład wielkości liposomów zawierających porfirazynę 22 i wolnych; Chol – cholesterol; DOTAP – chlorek N-[1-(2,3-dioleoiloksy)propylo]-N,N,N-trimetyloamoniowy; PG – L- α -fosfatydylo-DL glicerol; POPC – 1-palmitoilo-2-oleoilo- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholina.....	76
Schemat 1. Reagenty i warunki: (i) NaH, DMF, temp. pokojowa.....	39
Schemat 2. Reagenty i warunki reakcji: (i) octan cynku, 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en (DBU), <i>n</i> -pentanol, temp. wrzenia, 23 godz.....	41
Schemat 3. Reagenty i warunki reakcji: (i) <i>n</i> -butanolan magnezu, <i>n</i> -butanol, temp. wrzenia, 23 godz. We wstawce przedstawiono możliwe, powstające ubocznie regioizomery.....	43
Schemat 4. Reagenty i warunki reakcji: (i) octan cynku, DBU, <i>n</i> -pentanol, temp. powyżej $106 \text{ }^\circ\text{C}$, 23 godz.....	44
Schemat 5. Reagenty i warunki reakcji: (i) K_2CO_3 , DMF; (ii) <i>n</i> -butanolan magnezu, <i>n</i> -butanol, temp. wrzenia, 17 godz.....	46
Schemat 6. Reagenty i warunki reakcji: (i) octan cynku, DBU, <i>n</i> -pentanol, temp. wrzenia, 16 godz.....	52
Schemat 7. Reagenty i warunki reakcji: (i) K_2CO_3 , DMF, temp. pokojowa, 20 godz.....	53
Schemat 8. Reagenty i warunki reakcji: (i) <i>n</i> -butanolan magnezu, <i>n</i> -butanol, temperatura wrzenia, 19 godz.....	54
Schemat 9. Reagenty i warunki reakcji: (i) wodorek sodu, THF, $-10 \text{ }^\circ\text{C}$; (ii) wodny roztwór wodorotlenku sodu, etanol.....	62
Schemat 10. Reagenty i warunki reakcji: (i) tlenek fosforu(V), metanol, temp. wrzenia, 24 godz.; (ii) wodorek sodu, siarczan(VI) dimetylu, THF, temp. od $-12 \text{ }^\circ\text{C}$ do temp. pokojowej.....	63
Schemat 11. Reagenty i warunki reakcji: (i) <i>n</i> -butanolan magnezu, <i>n</i> -butanol, temperatura wrzenia, 16 godz.....	65

Tabela 1. Wydajność kwantowa fluorescencji Φ_f ftalocyjaniny 14 i cynk(II) ftalocyjaniny jako związku referencyjnego, w różnych rozpuszczalnikach.....	55
Tabela 2. Wartości IC_{50} uzyskane dla ftalocyjaniny 14 w fazie jasnej i ciemnej.	61
Tabela 3. Parametry kinetyczne fotorozkładu porfirazyny 22.....	71
Tabela 4. Wyniki woltamperometryczne dla porfirazyny 22, zarejestrowane dla prędkości skanowania $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$	74
Tabela 5. Wartości współczynnika redukcji (\log_{10}) w stosunku do próby kontrolnej dla formułacji liposomalnych porfirazyny 22.	77
Tabela 6. Stosunki molowe poszczególnych składników w formułacjach liposomalnych.....	93

X PIŚMIENICTWO

- [1] Vogel E. Novel porphyrinoids. *Pure Appl Chem* 1990;62:557–64.
- [2] Trytek M, Makarska M, Polska K, Radzki S, Fiedurek J. Porfiryryny i ftalocyjaniny. Cz. I. Właściwości i niektóre zastosowania. *Biotechnologia* 2005;71:109–27.
- [3] Lever ABP. The Phthalocyanines. W: H.J. Emeléus, A.G. Sharpe, ed. *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.*, tom 7, Academic Press; 1965, p. 27–114.
- [4] Smith KM. 3.07 - Porphyrins, Corrins and Phthalocyanines. W: Katritzky AR, Rees CW, ed. *Compr. Heterocycl. Chem.*, Oxford: Pergamon; 1984, p. 377–442.
- [5] Kerber WD, Goldberg DP. High-valent transition metal corrolazines. *J Inorg Biochem* 2006;100:838–57.
- [6] Rodríguez-Morgade MS, Stuzhin PA. The chemistry of porphyrazines: an overview. *J Porphyr Phthalocyanines* 2004;8:1129–65.
- [7] Rothmund P. Formation of porphyrins from pyrrole nad aldehydes. *J Am Chem Soc* 1935;57:2010–1.
- [8] Linstead RP, Whalley M. 944. Conjugated macrocycles. Part XXII. Tetrazaporphin and its metallic derivatives. *J Chem Soc Resumed* 1952:4839.
- [9] Martínez-Díaz MV, Ince M, Torres T. Phthalocyanines: colorful macroheterocyclic sensitizers for dye-sensitized solar cells. *Monatshefte Chem* 2011;142:699–707.
- [10] Wöhrle D, Schnurpfeil G, Makarov SG, Kazarin A, Suvorova ON. Practical Applications of Phthalocyanines – from Dyes and Pigments to Materials for Optical, Electronic and Photo-electronic Devices. *Macroheterocycles* 2012;5:191–202.
- [11] Vibfast Pigments PVT. LTD., Manufacturers and Exporters of Dyestuffs & Pigments, www.vibfast.com, dostęp 06.03.2014.
- [12] Kryjewski M, Śmigielska A, Gośliński T. Makrocykle porfiryrynowe jako związki budulcowe do tworzenia nanoukładów. *Przem Chem* 2010;89:727–33.
- [13] Beletskaya I, Tyurin VS, Tsivadze AY, Guilard R, Stern C. Supramolecular Chemistry of Metalloporphyrins. *Chem Rev* 2009;109:1659–713.
- [14] De la Torre G, Vázquez P, Agulló-López F, Torres T. Role of Structural Factors in the Nonlinear Optical Properties of Phthalocyanines and Related Compounds. *Chem Rev* 2004;104:3723–50.
- [15] Podbielska H, Sieroń A, Stręk W. Diagnostyka i terapia fotodynamiczna. Wrocław: Urban & Partner; 2004.
- [16] Konopka K, Gośliński T. Photodynamic Therapy in Dentistry. *J Dent Res* 2007;86:694–707.
- [17] Wainwright M, Crossley KB. Photosensitising agents - circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. *Int Biodeterior Biodegrad* 2004;53:119–26.
- [18] Wanka L, Iqbal K, Schreiner PR. The Lipophilic Bullet Hits the Targets: Medicinal Chemistry of Adamantane Derivatives. *Chem Rev* 2013;113:3516–604.
- [19] Govorkova EA, Baranovich T, Seiler P, Armstrong J, Burnham A, Guan Y, i wsp. Antiviral resistance among highly pathogenic influenza A (H5N1) viruses isolated

- worldwide in 2002–2012 shows need for continued monitoring. *Antiviral Res* 2013;98:297–304.
- [20] Beigel J, Bray M. Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza. *Antiviral Res* 2008;78:91–102.
- [21] Lagoja IM, De Clercq E. Anti-influenza virus agents: Synthesis and mode of action. *Med Res Rev* 2008;28:1–38.
- [22] Balzarini J, Orzeszko-Krzesińska B, Maurin JK, Orzeszko A. Synthesis and anti-HIV studies of 2- and 3-adamantyl-substituted thiazolidin-4-ones. *Eur J Med Chem* 2009;44:303–11.
- [23] Tripathi AC, Gupta SJ, Fatima GN, Sonar PK, Verma A, Saraf SK. 4-Thiazolidinones: The advances continue.... *Eur J Med Chem* 2014;72:52–77.
- [24] Causey PW, Dubovyk I, Leznoff CC. Syntheses and characterization of phthalonitriles and phthalocyanines substituted with adamantane moieties. *Can J Chem* 2006;84:1380–7.
- [25] Collman JP, Boulatov R, Sunderland CJ, Fu L. Functional Analogues of Cytochrome *c* Oxidase, Myoglobin, and Hemoglobin. *Chem Rev* 2004;104:561–88.
- [26] Kessel D. Photodynamic therapy: from the beginning. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2004;1:3–7.
- [27] Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2004;1:279–93.
- [28] O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol* 2009;85:1053–74.
- [29] Yano S, Hirohara S, Obata M, Hagiya Y, Ogura S, Ikeda A, i wsp. Current states and future views in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol C* 2011;12:46–67.
- [30] Panzarini E, Inguscio V, Dini L. Immunogenic Cell Death: Can It Be Exploited in Photodynamic Therapy for Cancer? *BioMed Res Int* 2012;2013:Article ID 482160.
- [31] Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2010;7:61–75.
- [32] Liu J, Obando D, Liao V, Lifa T, Codd R. The many faces of the adamantyl group in drug design. *Eur J Med Chem* 2011;46:1949–63.
- [33] Shen XM, Jiang XJ, Huang CC, Zhang HH, Huang JD. Highly photostable silicon(IV) phthalocyanines containing adamantane moieties: synthesis, structure, and properties. *Tetrahedron* 2010;66:9041–8.
- [34] Tolbin AY, Sukhorukov AY, Ioffe SL, Lobach OA, Nosik DN, Tomilova LG. Synthesis of a phthalocyanine–1,4,6,10-tetraazaadamantane conjugate and its activity against the human immunodeficiency virus. *Mendeleev Commun* 2010;20:25–7.
- [35] Ochoa AL, Tempesti TC, Spesia MB, Milanesio ME, Durantini EN. Synthesis and photodynamic properties of adamantylethoxy Zn(II) phthalocyanine derivatives in different media and in human red blood cells. *Eur J Med Chem* 2012;50:280–7.

- [36] Kobayashi N, Ohya T, Sato M, Nakajima S. Synthesis and spectroscopic properties of symmetrically tetrasubstituted phthalocyanines with four alkyl or aryl chains or porphyrin, adamantane, crown, or quinone units attached. *Inorg Chem* 1993;32:1803–8.
- [37] Baugh SDP, Yang Z, Leung DK, Wilson DM, Breslow R. Cyclodextrin Dimers as Cleavable Carriers of Photodynamic Sensitizers. *J Am Chem Soc* 2001;123:12488–94.
- [38] García Vior MC, Dicelio LE, Awruch J. Synthesis and properties of phthalocyanine zinc(II) complexes replaced with oxygen and sulfur linked adamantane moieties. *Dyes Pigm* 2009;83:375–80.
- [39] García Vior MC, Monteagudo E, Dicelio LE, Awruch J. A comparative study of a novel lipophilic phthalocyanine incorporated into nanoemulsion formulations: Photophysics, size, solubility and thermodynamic stability. *Dyes Pigm* 2011;91:208–14.
- [40] López Zeballos NC, García Vior MC, Awruch J, Dicelio LE. An exhaustive study of a novel sulfur-linked adamantane tetrasubstituted zinc(II) phthalocyanine incorporated into liposomes. *J Photochem Photobiol A* 2012;235:7–13.
- [41] Voskuhl J, Kauscher U, Gruener M, Frisch H, Wibbeling B, Strassert CA, i wsp. A soft supramolecular carrier with enhanced singlet oxygen photosensitizing properties. *Soft Matter* 2013;9:2453–7.
- [42] Novakova V, Roh J, Gela P, Kuneš J, Zimcik P. Azaphthalocyanines with fused triazolo rings: formation of sterically stressed constitutional isomers. *Chem Commun* 2012;48:4326.
- [43] Uekama K. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2004;52:900–15.
- [44] Loftsson T, Duchene D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm* 2007;329:1–11.
- [45] Hauch Fenger T, Bjerre J, Bols M. Cyclodextrin Aldehydes are Oxidase Mimics. *ChemBioChem* 2009;10:2494–503.
- [46] Breslow R, Yang J, Yan J. Biomimetic hydroxylation of saturated carbons with artificial cytochrome P-450 enzymes - liberating chemistry from the tyranny of functional groups. *Tetrahedron* 2002;58:653–9.
- [47] Breslow R, Yan J, Belvedere S. Catalytic hydroxylation of steroids by cytochrome P-450 mimics. Hydroxylation at C-9 with novel catalysts and steroid substrates. *Tetrahedron Lett* 2002;43:363–5.
- [48] Fang Z, Breslow R. A thiolate ligand on a cytochrome P-450 mimic permits the use of simple environmentally benign oxidants for biomimetic steroid hydroxylation in water. *Bioorg Med Chem Lett* 2005;15:5463–6.
- [49] Yang J, Breslow R. Selective Hydroxylation of a Steroid at C-9 by an Artificial Cytochrome P-450. *Angew Chem Int Ed* 2000;39:2692–5.
- [50] Yang J, Gabriele B, Belvedere S, Huang Y, Breslow R. Catalytic Oxidations of Steroid Substrates by Artificial Cytochrome P-450 Enzymes. *J Org Chem* 2002;67:5057–67.

- [51] Kloer DP. The Structure of a Retinal-Forming Carotenoid Oxygenase. *Science* 2005;308:267–9.
- [52] French RR, Holzer P, Leuenberger M, Nold MC, Woggon WD. A supramolecular enzyme model catalyzing the central cleavage of carotenoids. *J Inorg Biochem* 2002;88:295–304.
- [53] Salvemini D, Muscoli C, Riley DP, Cuzzocrea S. Superoxide Dismutase Mimetics. *Pulm Pharmacol Ther* 2002;15:439–47.
- [54] Oliveri V, Puglisi A, Vecchio G. New conjugates of β -cyclodextrin with manganese(III) salophen and porphyrin complexes as antioxidant systems. *Dalton Trans* 2011;40:2913.
- [55] Yu S, Huang X, Miao L, Zhu J, Yin Y, Luo Q, i wsp. A supramolecular bifunctional artificial enzyme with superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities. *Bioorg Chem* 2010;38:159–64.
- [56] Yu S, Yin Y, Zhu J, Huang X, Luo Q, Xu J, i wsp. A modulatory bifunctional artificial enzyme with both SOD and GPx activities based on a smart star-shaped pseudo-block copolymer. *Soft Matter* 2010;6:5342.
- [57] Yu S, Zhang W, Zhu J, Yin Y, Jin H, Zhou L, i wsp. Construction of a Hyperbranched Supramolecular Polymer as a Bifunctional Antioxidative Enzyme Model. *Macromol Biosci* 2011;11:821–7.
- [58] Komatsu T, Hayakawa S, Tsuchida E, Nishide H. meso-Tetrakis[o-(N-methyl)pyridinium]porphyrin ensembles with axially coordinated cyclodextrin-penetrating phenethylimidazole: reversible dioxygen-binding in aqueous DMF solution. *Chem Commun* 2003:50–1.
- [59] Zhou H, Groves JT. Hemodextrin: a self-assembled cyclodextrin–porphyrin construct that binds dioxygen. *Biophys Chem* 2003;105:639–48.
- [60] Kano K, Kitagishi H, Kodera M, Hirota S. Dioxygen Binding to a Simple Myoglobin Model in Aqueous Solution. *Angew Chem Int Ed* 2005;44:435–8.
- [61] Kano K, Kitagishi H, Dagallier C, Kodera M, Matsuo T, Hayashi T, i wsp. Iron Porphyrin–Cyclodextrin Supramolecular Complex as a Functional Model of Myoglobin in Aqueous Solution. *Inorg Chem* 2006;45:4448–60.
- [62] Kano K, Kitagishi H, Tanaka S. Characterization of an inclusion complex of 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)-porphinato iron and an O-methylated β -cyclodextrin dimer having a pyridine linker and its related complexes in aqueous solution. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 2006;56:69–74.
- [63] Kano K, Kitagishi H, Mabuchi T, Kodera M, Hirota S. A Myoglobin Functional Model Composed of a Ferrous Porphyrin and a Cyclodextrin Dimer with an Imidazole Linker. *Chem Asian J* 2006;1:358–66.
- [64] Kano K, Itoh Y, Kitagishi H, Hayashi T, Hirota S. A supramolecular receptor of diatomic molecules (O₂, CO, NO) in aqueous solution. *J Am Chem Soc* 2008;130:8006–15.
- [65] Kitagishi H, Negi S, Kiriyama A, Honbo A, Sugiura Y, Kawaguchi AT, i wsp. A Diatomic Molecule Receptor That Removes CO in a Living Organism. *Angew Chem Int Ed* 2010;49:1312–5.

- [66] Watanabe K, Kitagishi H, Kano K. Supramolecular Ferric Porphyrins as Cyanide Receptors in Aqueous Solution. *ACS Med Chem Lett* 2011;2:943–7.
- [67] Ueda T, Kitagishi H, Kano K. PEGylation of an artificial O₂ and CO receptor: synthesis, characterisation and pharmacokinetic study. *Org Biomol Chem* 2012;10:4337.
- [68] Kano K, Chimoto S, Tamaki M, Itoh Y, Kitagishi H. Supramolecular dioxygen receptors composed of an anionic water-soluble porphyrinatoiron(II) and cyclodextrin dimers. *Dalton Trans* 2012;41:453.
- [69] Ermilov EA, Menting R, Lau JTF, Leng X, Röder B, Ng DKP. Switching the photoinduced processes in host–guest complexes of β -cyclodextrin-substituted silicon(iv) phthalocyanines and a tetrasulfonated porphyrin. *Phys Chem Chem Phys* 2011;13:17633.
- [70] Leng X, Choi CF, Lo PC, Ng DKP. Assembling a Mixed Phthalocyanine–Porphyrin Array in Aqueous Media through Host–Guest Interactions. *Org Lett* 2007;9:231–4.
- [71] Xu H, Ermilov EA, Röder B, Ng DKP. Formation and energy transfer property of a subphthalocyanine–porphyrin complex held by host–guest interactions. *Phys Chem Chem Phys* 2010;12:7366.
- [72] Menting R, Lau JTF, Xu H, Ng DKP, Röder B, Ermilov EA. Formation and photoinduced processes of a self-assembled subphthalocyanine–porphyrin–phthalocyanine supramolecular complex. *Chem Commun* 2012;48:4597.
- [73] Shi W-J, Ermilov E, Lo PC, Roeder B, Ng DK. Formation and photoinduced processes of the host-guest complexes of a β -cyclodextrin-conjugated aza-BODIPY and tetrasulfonated porphyrins. *Chem Commun* 2013;49:5277–9.
- [74] Fathalla M, Neuberger A, Li SC, Schmehl R, Diebold U, Jayawickramarajah J. Straightforward Self-Assembly of Porphyrin Nanowires in Water: Harnessing Adamantane/ β -Cyclodextrin Interactions. *J Am Chem Soc* 2010;132:9966–7.
- [75] Mazzaglia A, Micali N, Scolaro LM, Sciortino MT, Sortino S, Villari V. Design of photosensitizer/cyclodextrin nanoassemblies: spectroscopy, intracellular delivery and photodamage. *J Porphyr Phthalocyanines* 2010;14:661–77.
- [76] Tau P, Ogunsipe AO, Maree S, Maree MD, Nyokong T. Influence of cyclodextrins on the fluorescence, photostability and singlet oxygen quantum yields of zinc phthalocyanine and naphthalocyanine complexes. *J Porphyr Phthalocyanines* 2003;7:439–46.
- [77] Mosinger J, Kliment Jr V, Sejbál J, Kubát P, Lang K. Host-guest complexes of anionic porphyrin sensitizers with cyclodextrins. *J Porphyr Phthalocyanines* 2002;6:514–26.
- [78] Dentuto PL, Catucci L, Cosma P, Fini P, Agostiano A, Hackbarth S, i wsp. Cyclodextrin/chlorophyll a complexes as supramolecular photosensitizers. *Bioelectrochemistry* 2007;70:39–43.
- [79] Cosma P, Fini P, Rochira S, Catucci L, Castagnolo M, Agostiano A, i wsp. Phototoxicity and cytotoxicity of chlorophyll a/cyclodextrins complexes on Jurkat cells. *Bioelectrochemistry* 2008;74:58–61.
- [80] Kolarova H, Macecek J, Nevrelouva P, Huf M, Tomecka M, Bajgar R, i wsp. Photodynamic therapy with zinc-tetra(p-sulfophenyl)porphyrin bound to

- cyclodextrin induces single strand breaks of cellular DNA in G361 melanoma cells. *Toxicol In Vitro* 2005;19:971–4.
- [81] Mazzaglia A, Angelini N, Darcy R, Donohue R, Lombardo D, Micali N, i wsp. Novel Heterotopic Colloids of Anionic Porphyrins Entangled in Cationic Amphiphilic Cyclodextrins: Spectroscopic Investigation and Intracellular Delivery. *Chem Eur J* 2003;9:5762–9.
- [82] Sortino S, Mazzaglia A, Monsù Scolaro L, Marino Merlo F, Valveri V, Sciortino MT. Nanoparticles of cationic amphiphilic cyclodextrins entangling anionic porphyrins as carrier-sensitizer system in photodynamic cancer therapy. *Biomaterials* 2006;27:4256–65.
- [83] Ferro S, Jori G, Sortino S, Stancanelli R, Nikolov P, Tognon G, i wsp. Inclusion of 5-[4-(1-Dodecanoylpyridinium)]-10,15,20-triphenylporphine in Supramolecular Aggregates of Cationic Amphiphilic Cyclodextrins: Physicochemical Characterization of the Complexes and Strengthening of the Antimicrobial Photosensitizing Activity. *Biomacromolecules* 2009;10:2592–600.
- [84] Kandoth N, Vittorino E, Sciortino MT, Parisi T, Colao I, Mazzaglia A, i wsp. A Cyclodextrin-Based Nanoassembly with Bimodal Photodynamic Action. *Chem Eur J* 2012;18:1684–90.
- [85] Fraix A, Kandoth N, Manet I, Cardile V, Graziano AC, Gref R, i wsp. An engineered nanoplatfrom for bimodal anticancer phototherapy with dual-color fluorescence detection of sensitizers. *Chem Commun* 2013;49:4459.
- [86] Yu M, Chen Y, Zhang N, Liu Y. Construction and transmembrane dissociation behavior of supramolecular assembly of quinolinocyclodextrin with porphyrin. *Org Biomol Chem* 2010;8:4148.
- [87] Dong H, Li Y, Wen H, Xu M, Liu L, Li Z, i wsp. Highly Efficient Drug Delivery Nanosystem via L-Phenylalanine Triggering Based on Supramolecular Polymer Micelles. *Macromol Rapid Commun* 2011;32:540–5.
- [88] Silva JN, Silva AMG, Tomé JP, Ribeiro AO, Domingues MRM, Cavaleiro JAS, i wsp. Photophysical properties of a photocytotoxic fluorinated chlorin conjugated to four β -cyclodextrins. *Photochem Photobiol Sci* 2008;7:834.
- [89] Kralova J, Synytsya A, Pouckova P, Koc M, Dvorak M, Kral V. Novel Porphyrin Conjugates with a Potent Photodynamic Antitumor Effect: Differential Efficacy of Mono- and Bis- β -cyclodextrin Derivatives In Vitro and In Vivo. *Photochem Photobiol* 2006;82:432.
- [90] Králová J, Kejík Z, Bříza T, Poučková P, Král A, Martásek P, i wsp. Porphyrin-cyclodextrin conjugates as a nanosystem for versatile drug delivery and multimodal cancer therapy. *J Med Chem* 2010;53:128–38.
- [91] Kejík Z, Bříza T, Králová J, Poučková P, Král A, Martásek P, i wsp. Coordination conjugates of therapeutic proteins with drug carriers: A new approach for versatile advanced drug delivery. *Bioorg Med Chem Lett* 2011;21:5514–20.
- [92] Lau JTF, Lo PC, Fong WP, Ng DKP. Preparation and Photodynamic Activities of Silicon(IV) Phthalocyanines Substituted with Permethylated β -Cyclodextrins. *Chem Eur J* 2011;17:7569–77.

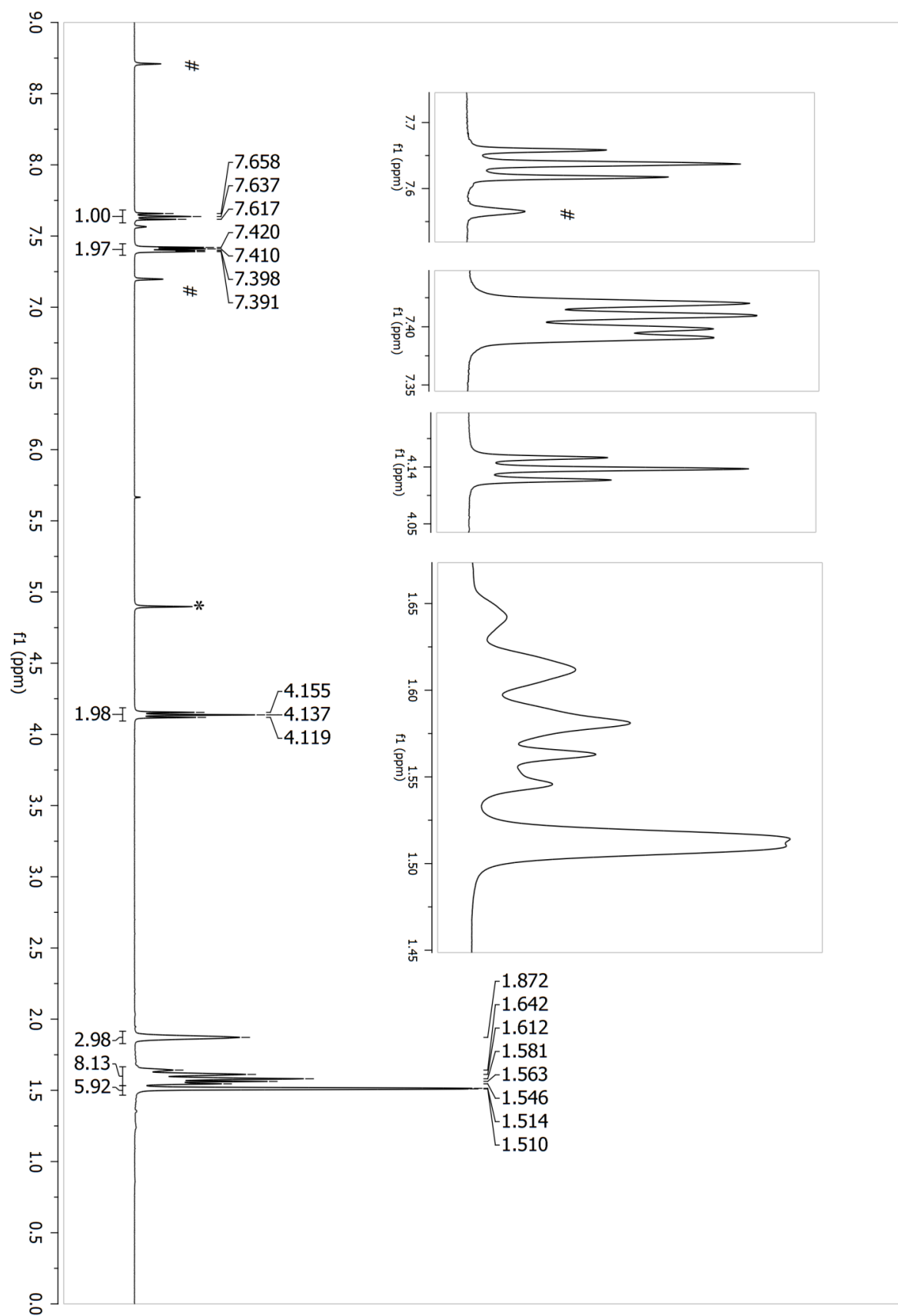
- [93] Lau JTF, Lo PC, Tsang YM, Fong WP, Ng DKP. Unsymmetrical β -cyclodextrin-conjugated silicon(iv) phthalocyanines as highly potent photosensitisers for photodynamic therapy. *Chem Commun* 2011;47:9657.
- [94] Mulder A, Juković A, van Leeuwen FWB, Kooijman H, Spek AL, Huskens J, i wsp. Photocontrolled release and uptake of a porphyrin guest by dithienylethene-tethered β -cyclodextrin host dimers. *Chem Eur J* 2004;10:1114–23.
- [95] Mulder A, Juković A, Huskens J, Reinhoudt DN. Bis(phenylthienyl)ethene-tethered β -cyclodextrin dimers as photoswitchable hosts. *Org Biomol Chem* 2004;2:1748.
- [96] Chen Z, Dong S, Zhong C, Zhang Z, Niu L, Li Z, i wsp. Photoswitching of the third-order nonlinear optical properties of azobenzene-containing phthalocyanines based on reversible host–guest interactions. *J Photochem Photobiol A* 2009;206:213–9.
- [97] Li ZQ, Zhang YM, Guo DS, Chen HZ, Liu Y. Supramolecular Assembly with Multiple Preorganised π -Electronic Cages. *Chem Eur J* 2013;19:96–100.
- [98] Li ZQ, Zhang YM, Chen HZ, Zhao J, Liu Y. Hierarchical organization of spherical assembly with reversibly photocontrollable cross-links. *J Org Chem* 2013;78:5110–4.
- [99] Ruebner A, Yang Z, Leung D, Breslow R. A cyclodextrin dimer with a photocleavable linker as a possible carrier for the photosensitizer in photodynamic tumor therapy. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:14692–3.
- [100] Ağgün N, Gonca E. Synthesis and characterization of novel polyfluorinated porphyrazines. *J Fluor Chem* 2012;140:54–8.
- [101] Çakır V, Demir F, Bıyıklıoğlu Z, Koca A, Kantekin H. Synthesis, characterization, electrochemical and spectroelectrochemical properties of metal-free and metallophthalocyanines bearing electropolymerizable dimethylamine groups. *Dyes Pigm* 2013;98:414–21.
- [102] Özçeşmeci M, Sorar İ, Hamuryudan E. Synthesis, optical and structural studies of tetrakis[4-(2',3',4',5',6'-pentafluorobenzyloxy)benzyloxy]-substituted metallophthalocyanines. *Synth Met* 2012;162:154–61.
- [103] Vacus J, Memetzidis G, Doppelt P, Simon J. The synthesis of unsymmetrically functionalized platinum and zinc phthalocyanine complexes. *J Chem Soc Chem Commun* 1994:697.
- [104] Schramm CJ, Hoffman BM. Octakis (alkylthio) tetraazaporphyrins. *Inorg Chem* 1980;19:383–5.
- [105] Forsyth TP, Williams DBG, Montalban AG, Stern CL, Barrett AGM, Hoffman BM. A Facile and Regioselective Synthesis of Trans-Heterofunctionalized Porphyrazine Derivatives. *J Org Chem* 1998;63:331–6.
- [106] Baumann TF, Nasir MS, Sibert JW, White AJP, Olmstead MM, Williams DJ, i wsp. solitaire-Porphyrazines: Synthetic, Structural, and Spectroscopic Investigation of Complexes of the Novel Binucleating Norphthalocyanine-2,3-dithiolato Ligand. *J Am Chem Soc* 1996;118:10479–86.
- [107] Ribeiro AO, Tomé JPC, Neves MGPMS, Tomé AC, Cavaleiro JAS, Iamamoto Y, i wsp. [1,2,3,4-Tetrakis(α/β -d-galactopyranos-6-yl)phthalocyaninato]zinc(II): a water-soluble phthalocyanine. *Tetrahedron Lett* 2006;47:9177–80.

- [108] Gośliński T, Osmałek T, Mielcarek J. Photochemical and spectral characterization of peripherally modified porphyrazines. *Polyhedron* 2009;28:3839–43.
- [109] Seotsanyana-Mokhosi I, Kuznetsova N, Nyokong T. Photochemical studies of tetra-2, 3-pyridinoporphyrazines. *J Photochem Photobiol A* 2001;140:215–22.
- [110] Spiller W, Kliesch H, Woehrle D, Hackbarth S, Roeder B, Schnurpfeil G. Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar solvents and micellar solutions. *J Porphyr Phthalocyanines* 1998;2:145–58.
- [111] Niu L, Zhong C, Chen Z, Zhang Z, Li Z, Zhang F, i wsp. Novel azobenzene-phthalocyanine dyads-design of photo-modulated J-aggregation. *Chin Sci Bull* 2009;54:1169–75.
- [112] Ogunsipe A, Maree D, Nyokong T. Solvent effects on the photochemical and fluorescence properties of zinc phthalocyanine derivatives. *J Mol Struct* 2003;650:131–40.
- [113] Bayliss NS. The Effect of the Electrostatic Polarization of the Solvent on Electronic Absorption Spectra in Solution. *J Chem Phys* 2004;18:292–6.
- [114] Lide DR. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 85th Edition. CRC Press; 2004.
- [115] Wöhrle D, Eskes M, Shigehara K, Yamada A. A Simple Synthesis of 4,5-Disubstituted 1,2-Dicyanobenzenes and 2,3,9,10,16,17,23,24-Octasubstituted Phthalocyanines. *Synthesis* 1993;1993:194–6.
- [116] Kimura M, Sugihara Y, Muto T, Hanabusa K, Shirai H, Kobayashi N. Dendritic Metallophthalocyanines-Synthesis, Electrochemical Properties, and Catalytic Activities. *Chem Eur J* 1999;5:3495–500.
- [117] Szczolko W, Sobotta L, Fita P, Koczorowski T, Mikus M, Gdaniec M, i wsp. Synthesis, characteristics and photochemical studies of novel porphyrazines possessing peripheral 2,5-dimethylpyrrol-1-yl and dimethylamino groups. *Tetrahedron Lett* 2012;53:2040–4.
- [118] Nowak M. Synteza i charakterystyka fizykochemiczna ftalocyjanin funkcjonalizowanych peryferyjnie grupami adamantyłowymi. Praca magisterska. Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 2012.
- [119] Cole DC, Manas ES, Stock JR, Condon JS, Jennings LD, Aulabaugh A, i wsp. Acylguanidines as small-molecule β -secretase inhibitors. *J Med Chem* 2006;49:6158–61.
- [120] Gośliński T, Tykarska E, Szczolko W, Osmałek T, Śmigielńska A, Walorczyk S, i wsp. Synthesis and characterization of periphery-functionalized porphyrazines containing mixed pyrrolyl and pyridylmethylamino groups. *J Porphyr Phthalocyanines* 2009;13:223–34.
- [121] Gośliński T, White AJP. Synthesis, characterization and spectroscopic properties of novel periphery – functionalized unsymmetrical porphyrazines containing mixed dithienylpyrrolyl and dimethylamino groups. *Polyhedron* 2009;28:2579–84.
- [122] Szczolko W. Synteza, charakterystyka i właściwości biologiczne nowych układów porfirynoidowych o rozbudowanych grupach peryferyjnych. Rozprawa doktorska. Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 2013.

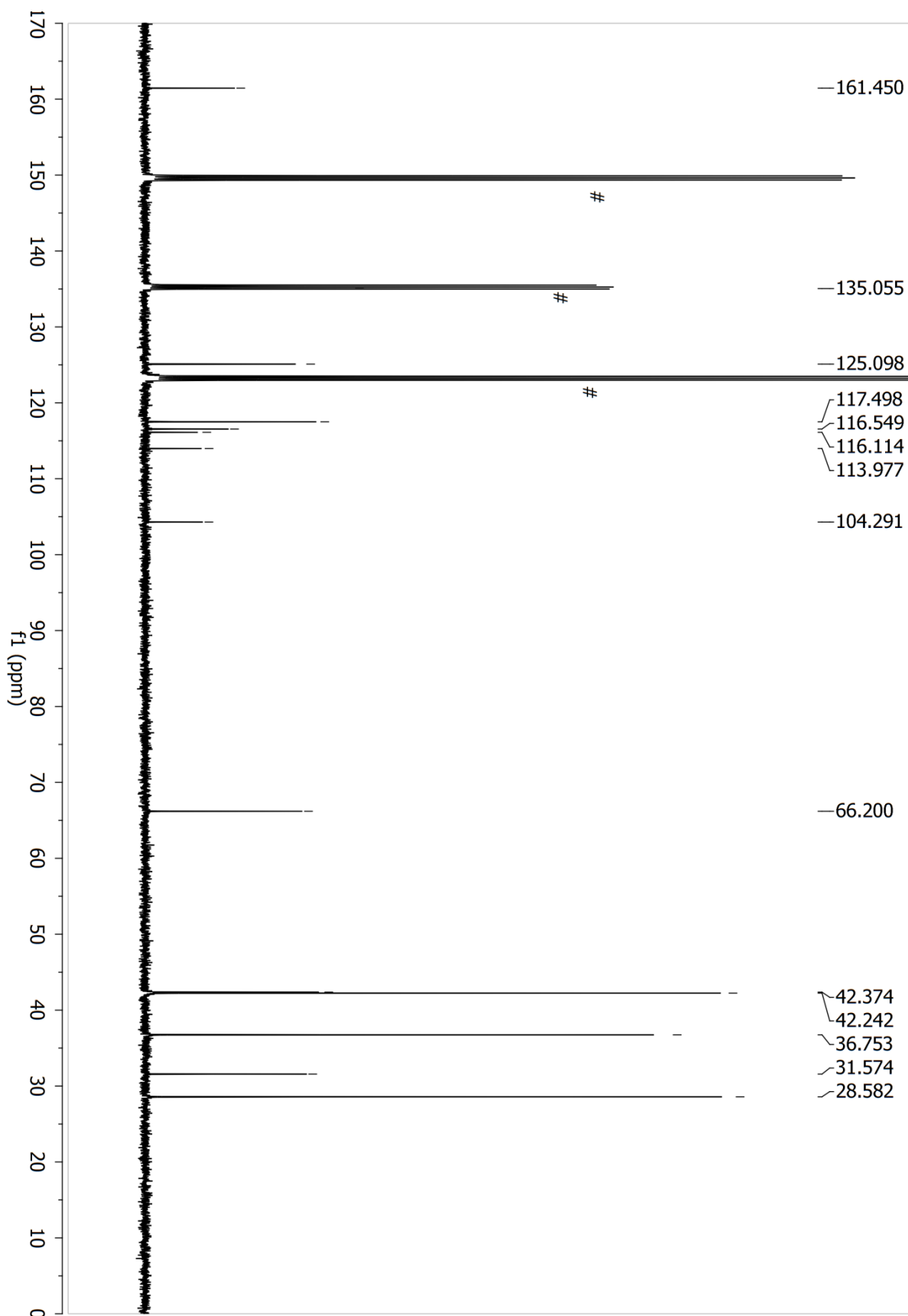
- [123] Begland RW, Hartter DR, Jones FN, Sam DJ, Sheppard WA, Webster OW, i wsp. Hydrogen cyanide chemistry. VIII. New chemistry of diaminomaleonitrile. Heterocyclic synthesis. *J Org Chem* 1974;39:2341–50.
- [124] Khaghaninejad S, Heravi MM. Chapter Three - Paal–Knorr Reaction in the Synthesis of Heterocyclic Compounds. W: Alan R. Katritzky, ed. *Adv. Heterocycl. Chem.*, tom 111, Academic Press; 2014, 95–146.
- [125] Beall LS, Mani NS, White AJP, Williams DJ, Barrett AGM, Hoffman BM. Porphyrazines and Norphthalocyanines Bearing Nitrogen Donor Pockets: Metal Sensor Properties. *J Org Chem* 1998;63:5806–17.
- [126] Gośliński T, Dutkiewicz Z, Kryjewski M, Tykarska E, Sobotta Ł, Szczołko W, i wsp. Experimental and computational study on the reactivity of 2,3-bis[(3-pyridylmethyl)amino]-2(Z)-butene-1,4-dinitrile, a key intermediate for the synthesis of tribenzoporphyrazine bearing peripheral methyl(3-pyridylmethyl)amino substituents. *Monatsh Chem* 2011;142:599–608.
- [127] Dwyer TJ, Jasien PG. Electronic effects in a prototype push-pull ethylene: a study of rotational barriers in C₄H₄N₄ isomers. *J Mol Struct THEOCHEM* 1996;363:139–50.
- [128] Tuncer S, Koca A, Gul A, Avciata U. 1,4-Dithiaheterocycle-fused porphyrazines: Synthesis, characterization, voltammetric and spectroelectrochemical properties. *Dyes Pigm* 2009;81:144–51.
- [129] Tuncer S, Koca A, Gül A, Avciata U. Synthesis, characterization, electrochemistry and spectroelectrochemistry of novel soluble porphyrazines bearing unsaturated functional groups. *Dyes Pigm* 2011;92:610–8.
- [130] Uslu Kobak RZ, Öztürk ES, Koca A, Gül A. The synthesis and cyclotetramerisation reactions of aryloxy-, arylalkyloxy-substituted pyrazine-2,3-dicarbonitriles and spectroelectrochemical properties of octakis(hexyloxy)-pyrazinoporphyrazine. *Dyes Pigm* 2010;86:115–22.
- [131] Nie H, Barrett AGM, Hoffman BM. Porphyrazinehexamines and Dinitroporphyrazines: Synthesis, Characterization, and Complementary Electrochemistry. *J Org Chem* 1999;64:6791–6.
- [132] Fuchter MJ, Beall LS, Baum SM, Montalban AG, Sakellariou EG, Mani NS, i wsp. Synthesis of porphyrazine-octaamine, hexamine and diamine derivatives. *Tetrahedron* 2005;61:6115–30.
- [133] Lange SJ, Nie H, Stern CL, Barrett AGM, Hoffman BM. Peripheral Palladium(II) and Platinum(II) Complexes of Bis(dimethylamino)porphyrazine. *Inorg Chem* 1998;37:6435–43.
- [134] Eichhorn DM, Yang S, Jarrell W, Baumann TF, Beall LS, White AJP, i wsp. [60]Fullerene and TCNQ donor-acceptor crystals of octakis(dimethylamino)porphyrazine. *J Chem Soc Chem Commun* 1995:1703.
- [135] Hou R, Li B, Zhong K, Li H, Jin L-Y, Yin B. Tetrakis(tetrathiafulvalene-tetrathiacrown ether)porphyrazine Triads: Synthesis, Photophysical, and Electrochemical Properties. *Eur J Org Chem* 2012;2012:1138–46.
- [136] Koca A, Gonca E, Gül A. Voltammetric and spectroelectrochemical characterization of porphyrazines: Electrochemical metal sensor. *J Electroanal Chem* 2008;612:231–40.

- [137] Dubinina T, Dyumaeva D, Trashin S, Sedova M, Karpo A, Krasovskii V, i wsp. Synthesis and Study of Physicochemical Properties of New Substituted Tetrathieno[2,3-b]porphyrazines. *Macroheterocycles* 2012;5:149–56.
- [138] Sakamoto K, Furuya N, Soga H, Yoshino S. Cyclic voltammetry of non-peripheral thioaryl substituted phthalocyanines. *Dyes Pigm* 2013;96:430–4.
- [139] Wierzchowski M, Sobotta L, Skupin-Mrugalska P, Kruk J, Jusiak W, Yee M, i wsp. Phthalocyanines functionalized with 2-methyl-5-nitro-1H-imidazolylethoxy and 1,4,7-trioxanonyl moieties and the effect of metronidazole substitution on photocytotoxicity. *J Inorg Biochem* 2013;127:62–72.
- [140] Skupin-Mrugalska P, Piskorz J, Gośliński T, Mielcarek J, Konopka K, Düzgüneş N. Current status of liposomal porphyrinoid photosensitizers. *Drug Discov Today* 2013;18:776–84.
- [141] Düzgüneş N. Preparation and Quantitation of Small Unilamellar Liposomes and Large Unilamellar Reverse-Phase Evaporation Liposomes. W: Nejat Duzgunes, ed. *Methods Enzymol.*, tom 367, Academic Press; 2003, p. 23–7.
- [142] Jarosław Piskorz, Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu; niepublikowane dane.

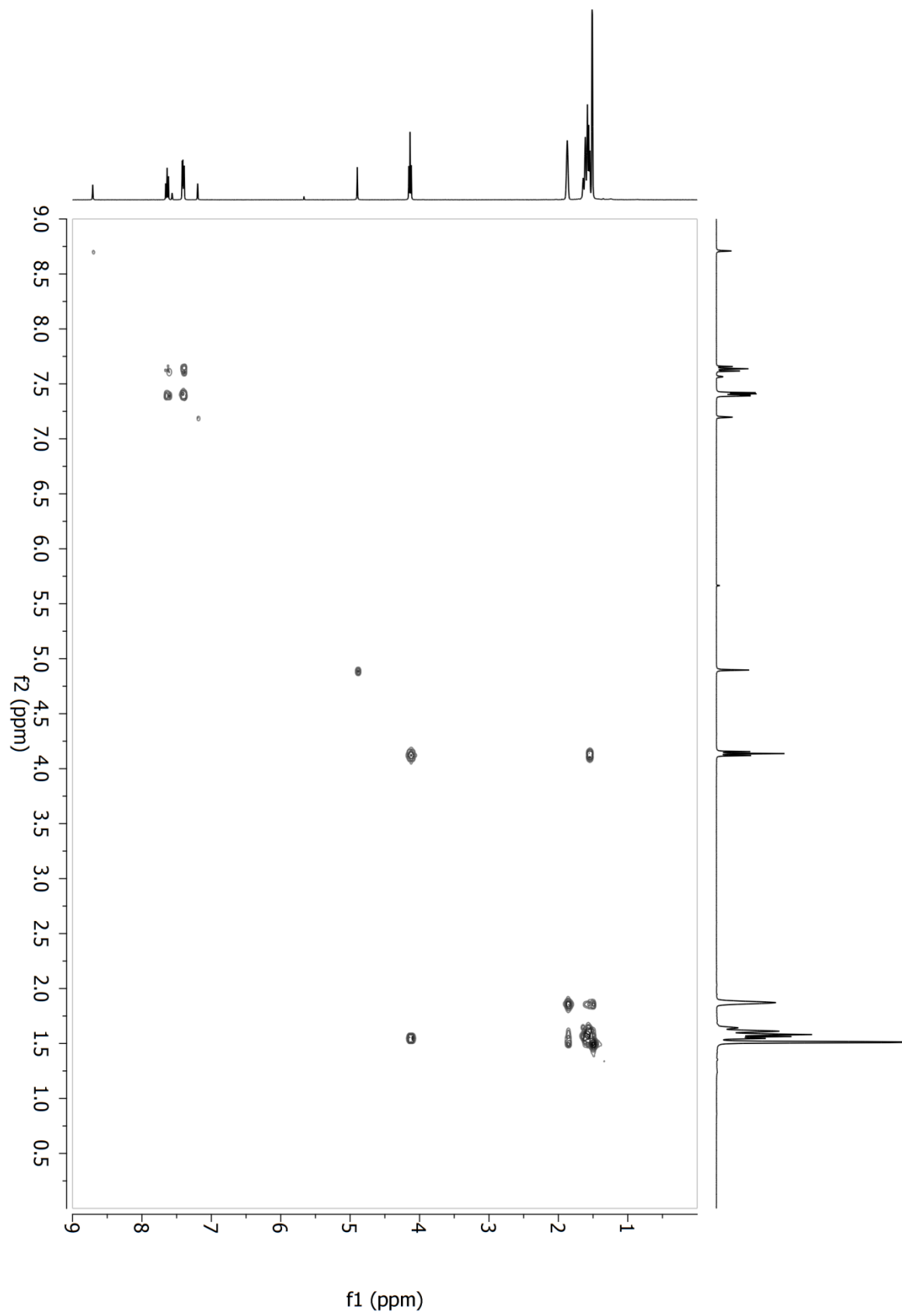
XI SUPPLEMENT



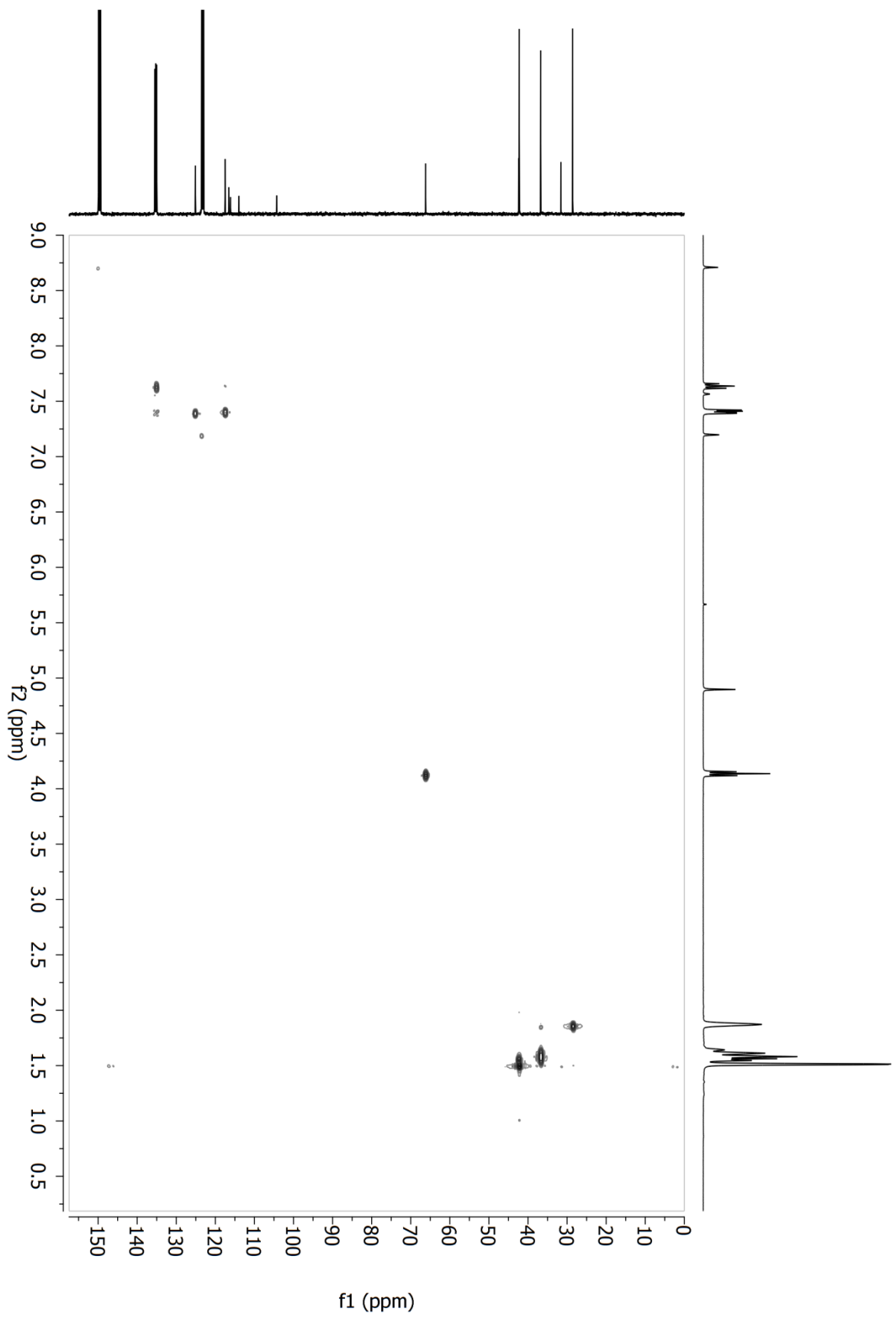
Widmo ^1H NMR **3** (pirydyna- d_5), symbole # i * wskazują na sygnały resztkowe odpowiednio, rozpuszczalnika i wody.

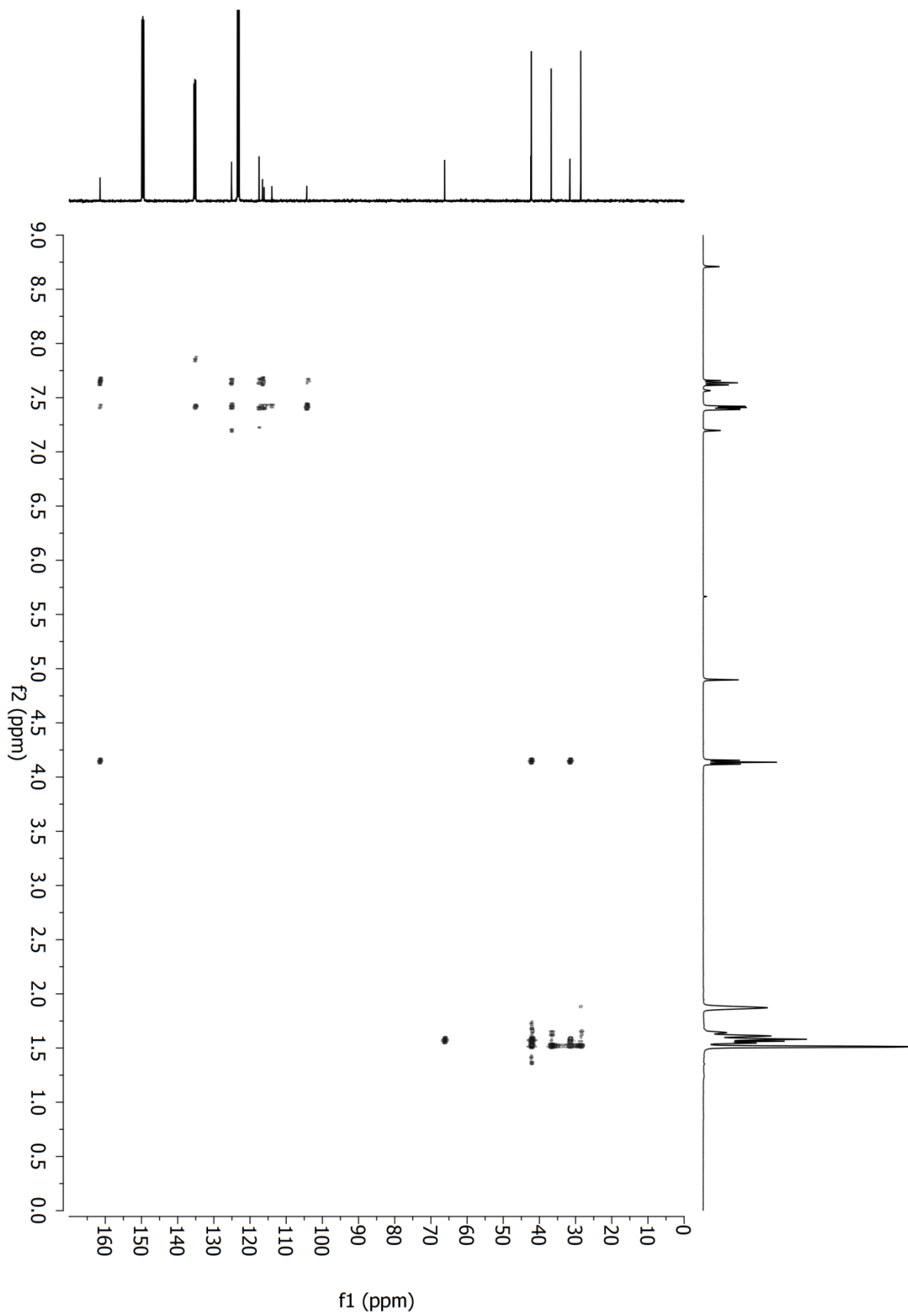


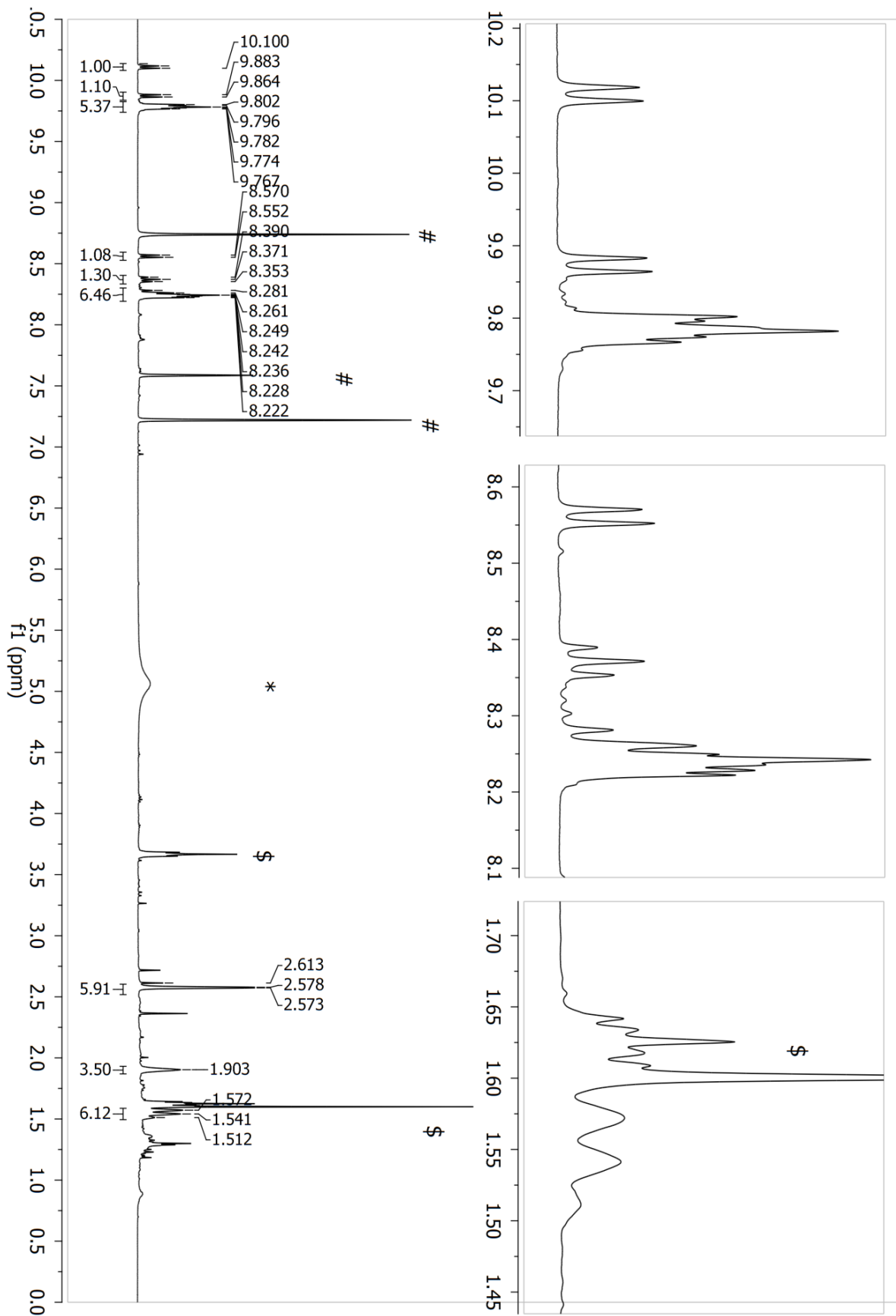
Widmo ^{13}C NMR 3 (pirydyna- d_5), symbol # wskazuje na sygnały rozpuszczalnika.



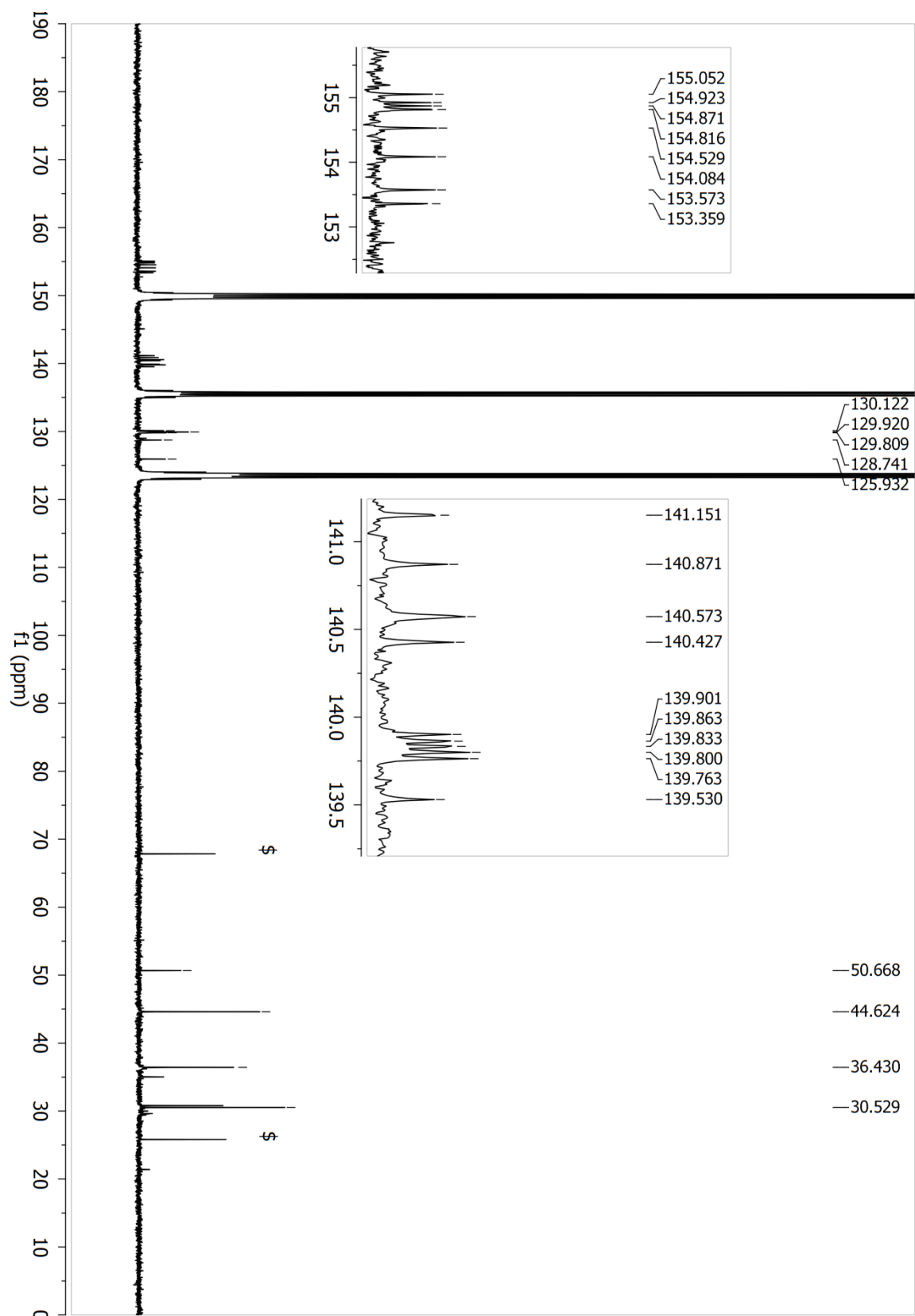
Widmo ^1H - ^1H COSY **3** (pirydyna- d_5).



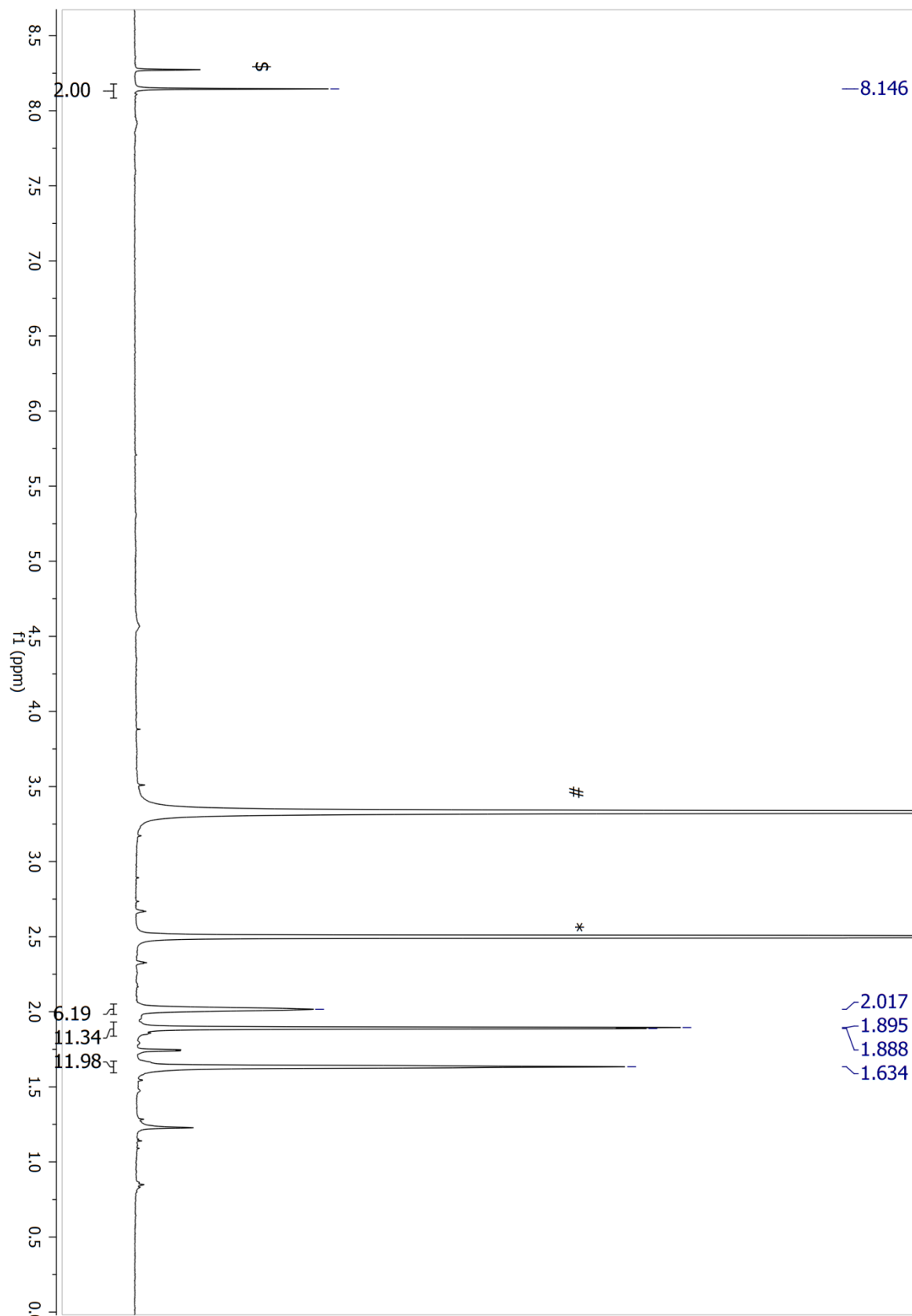




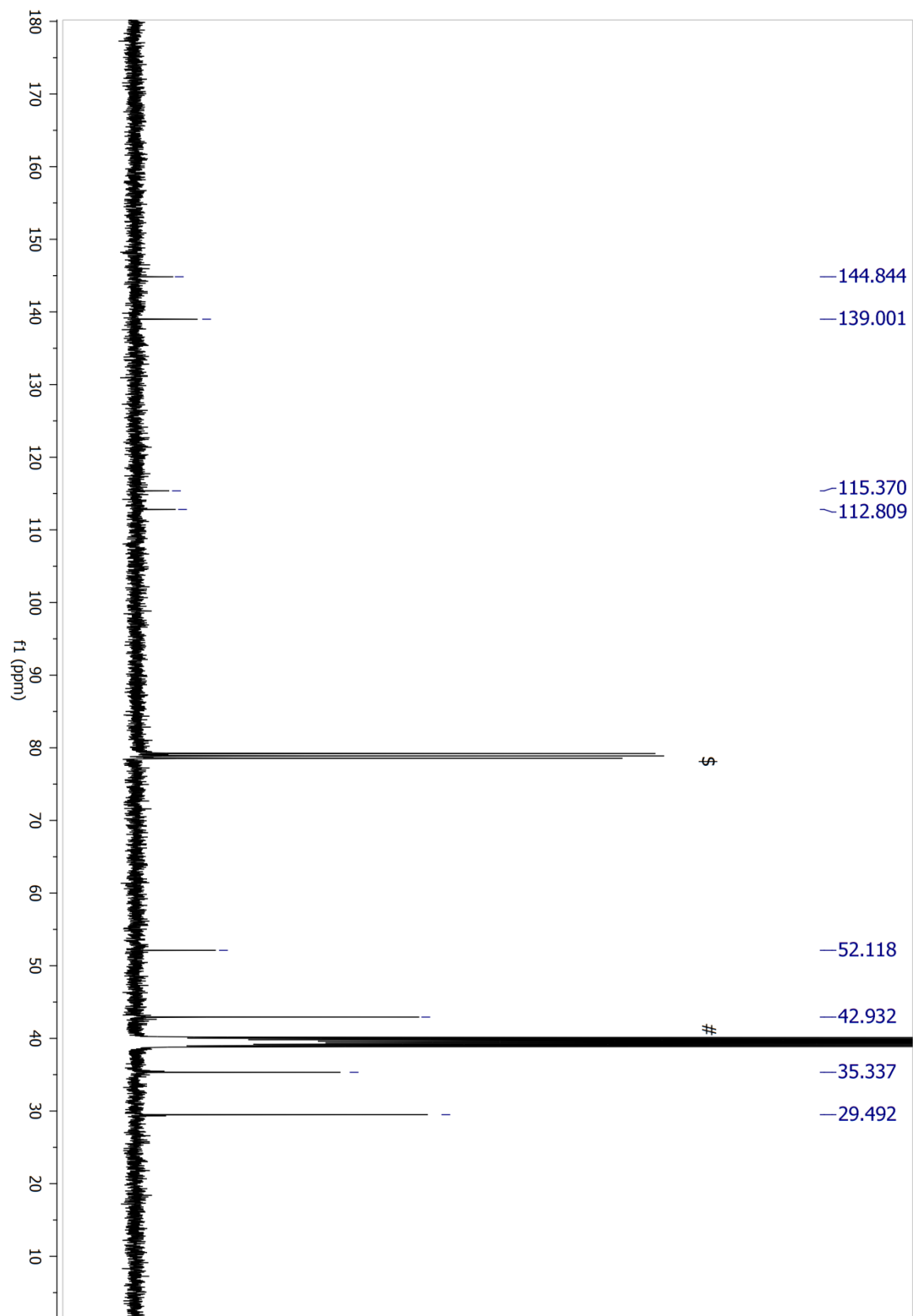
Widmo ^1H NMR **10** (pirydyna- d_5) symbole #, \$, * wskazują na sygnały resztkowe odpowiednio: pirydyny, THF i wody.



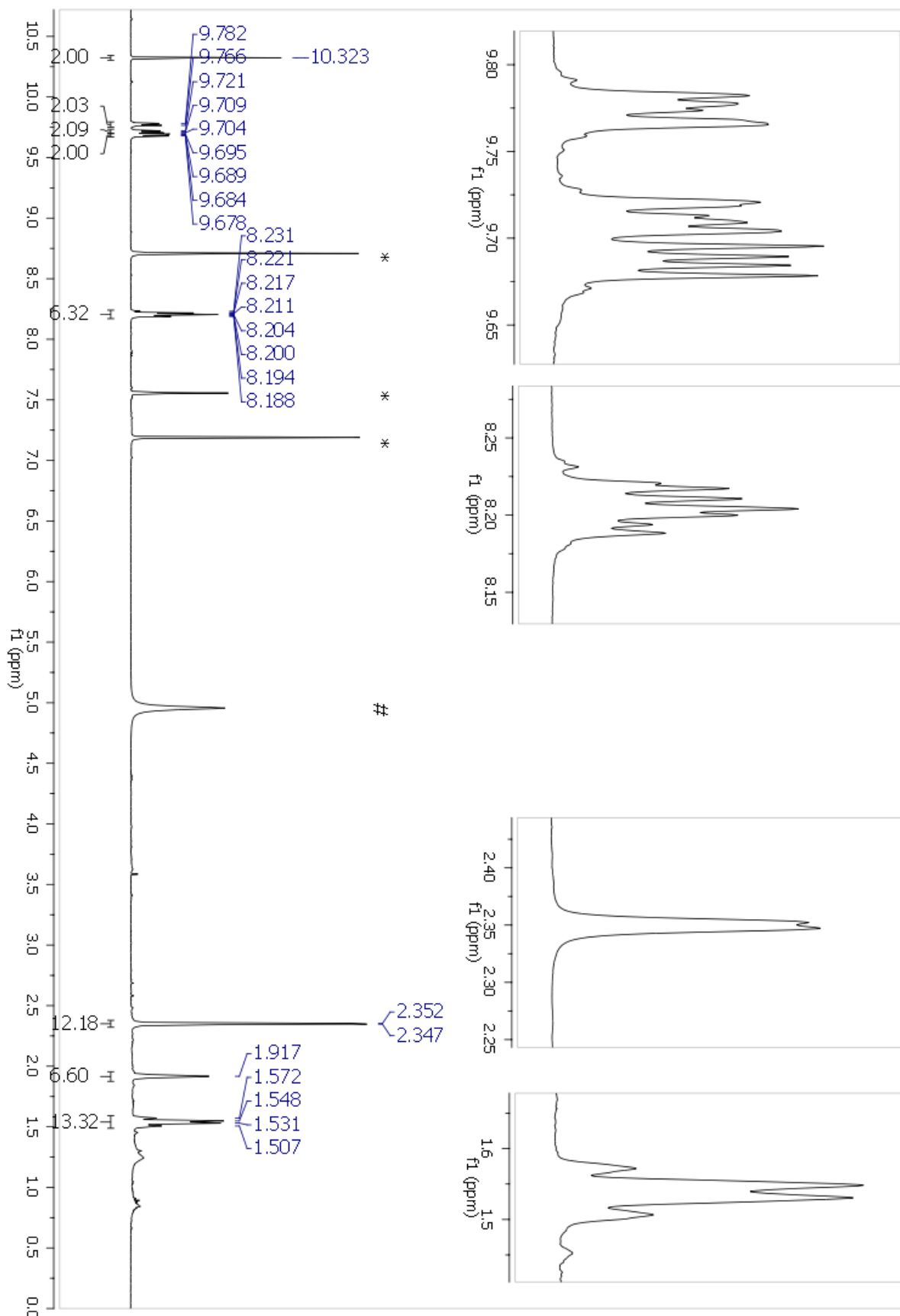
Widmo ^{13}C NMR **10** (pirydyna- d_5) symbole # i \$ wskazują na sygnały resztkowe odpowiednio: pirydyny i THF.



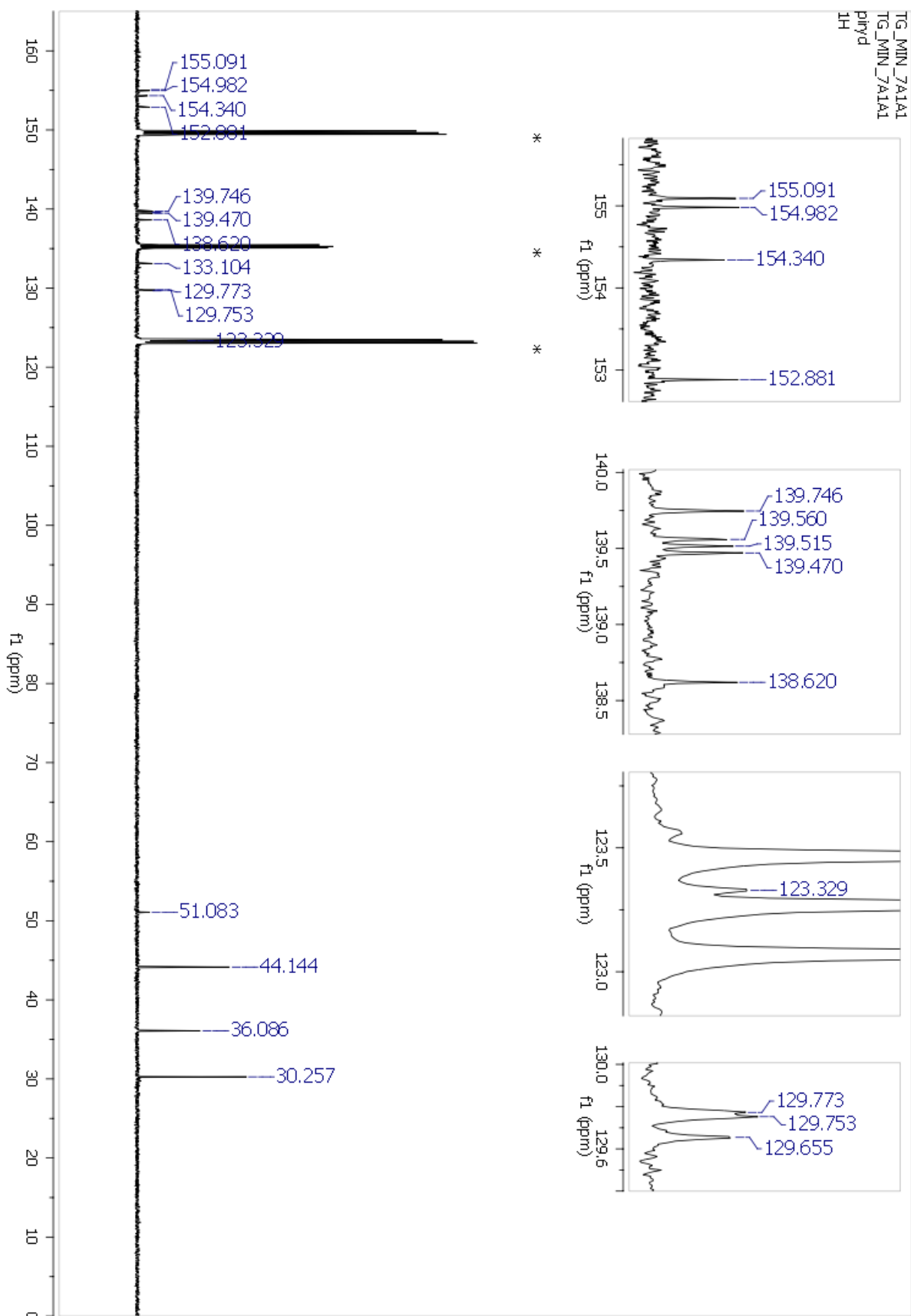
Widmo ^1H NMR **13** (DMSO-d_6); symbole \$, #, * wskazują na sygnały reszkowe odpowiednio: chloroformu, DMSO i wody.



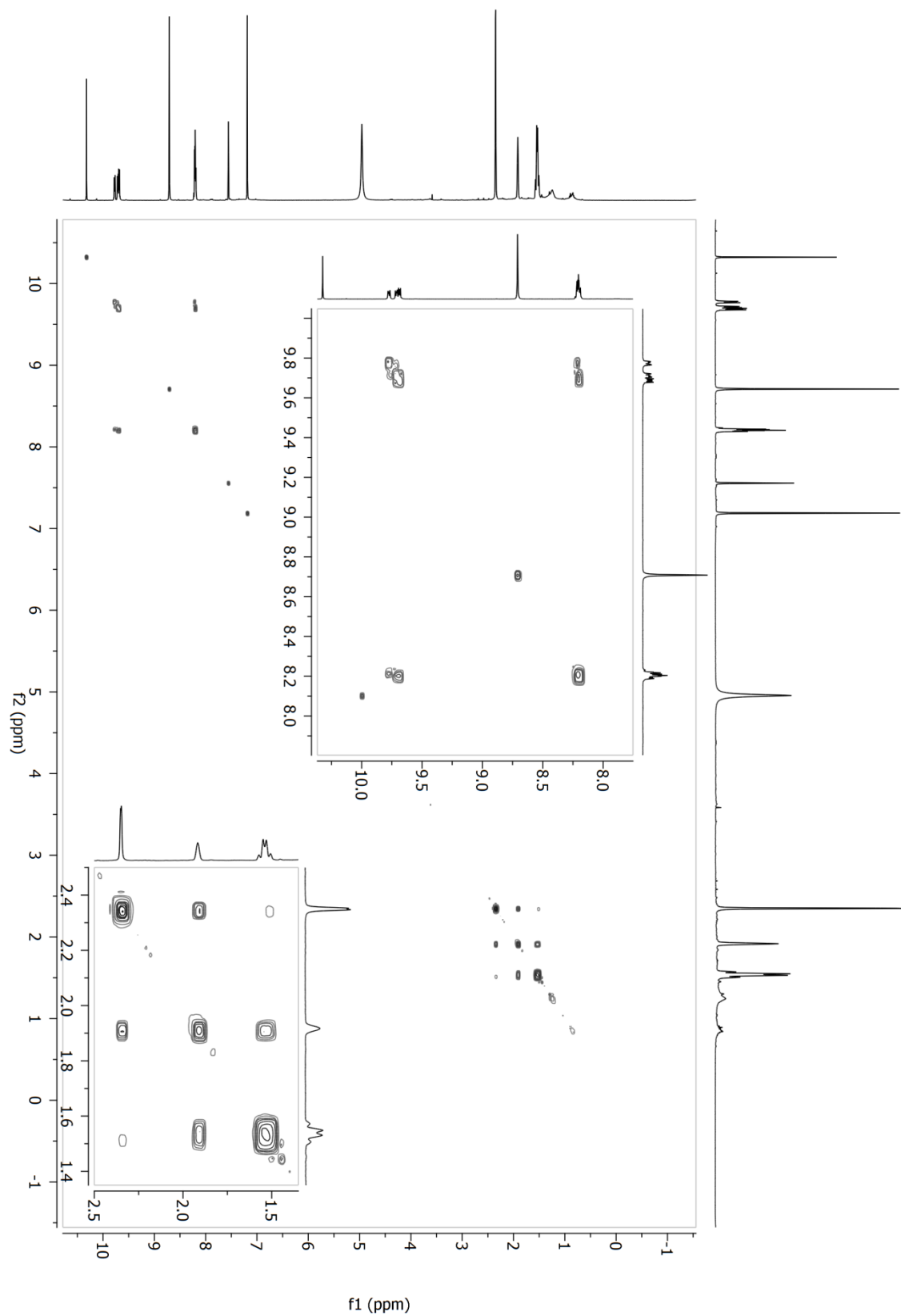
Widmo ^{13}C NMR **13** (DMSO- d_6); symbole \$, # wskazują na sygnały resztkowe odpowiednio: chloroformu i DMSO.



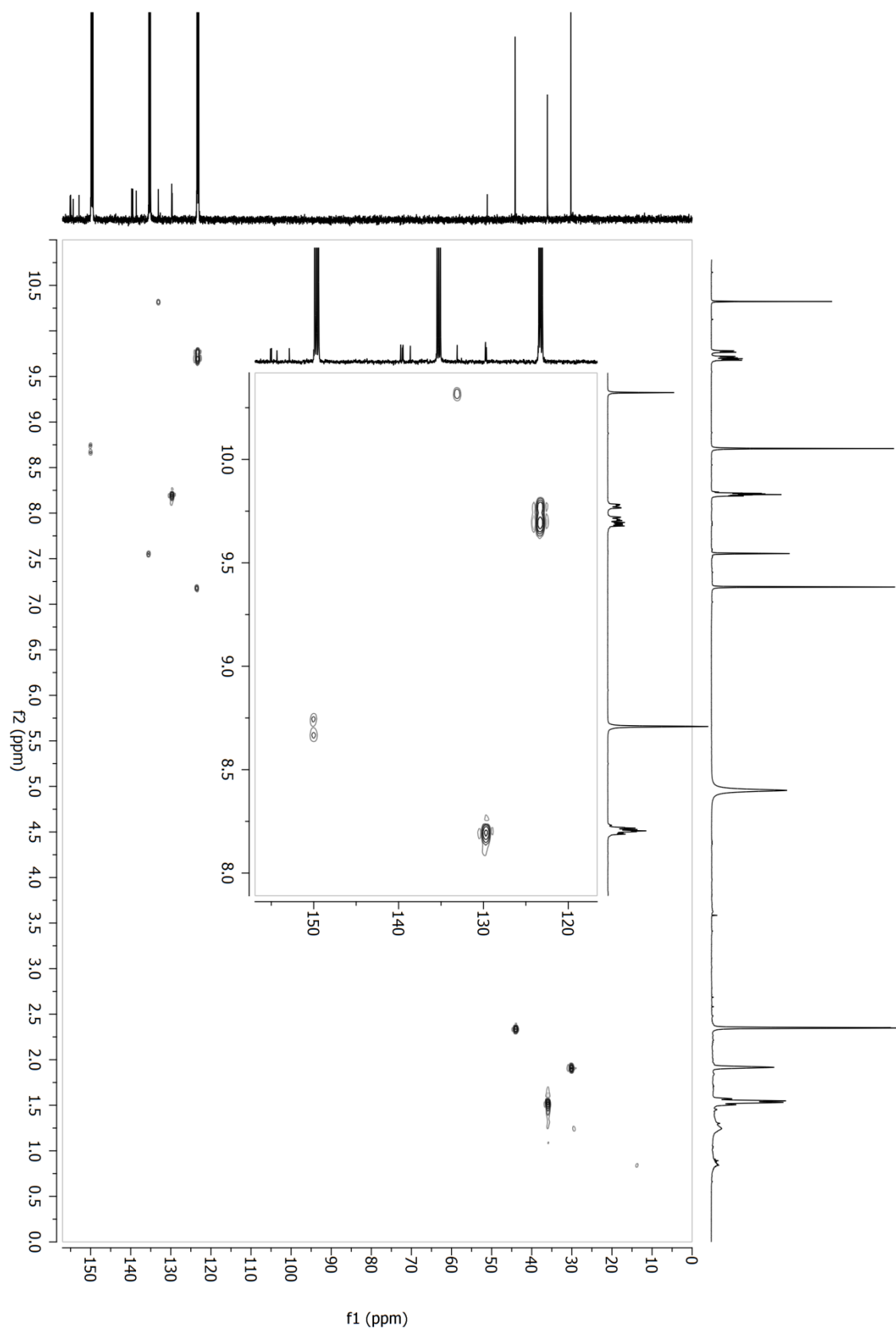
Widmo ^1H NMR **14** (pirydyna- d_5). Symbole *, # wskazują na sygnały reszkowe, odpowiednio, pirydyny i wody. Część sygnałów pokazano w powiększeniu.



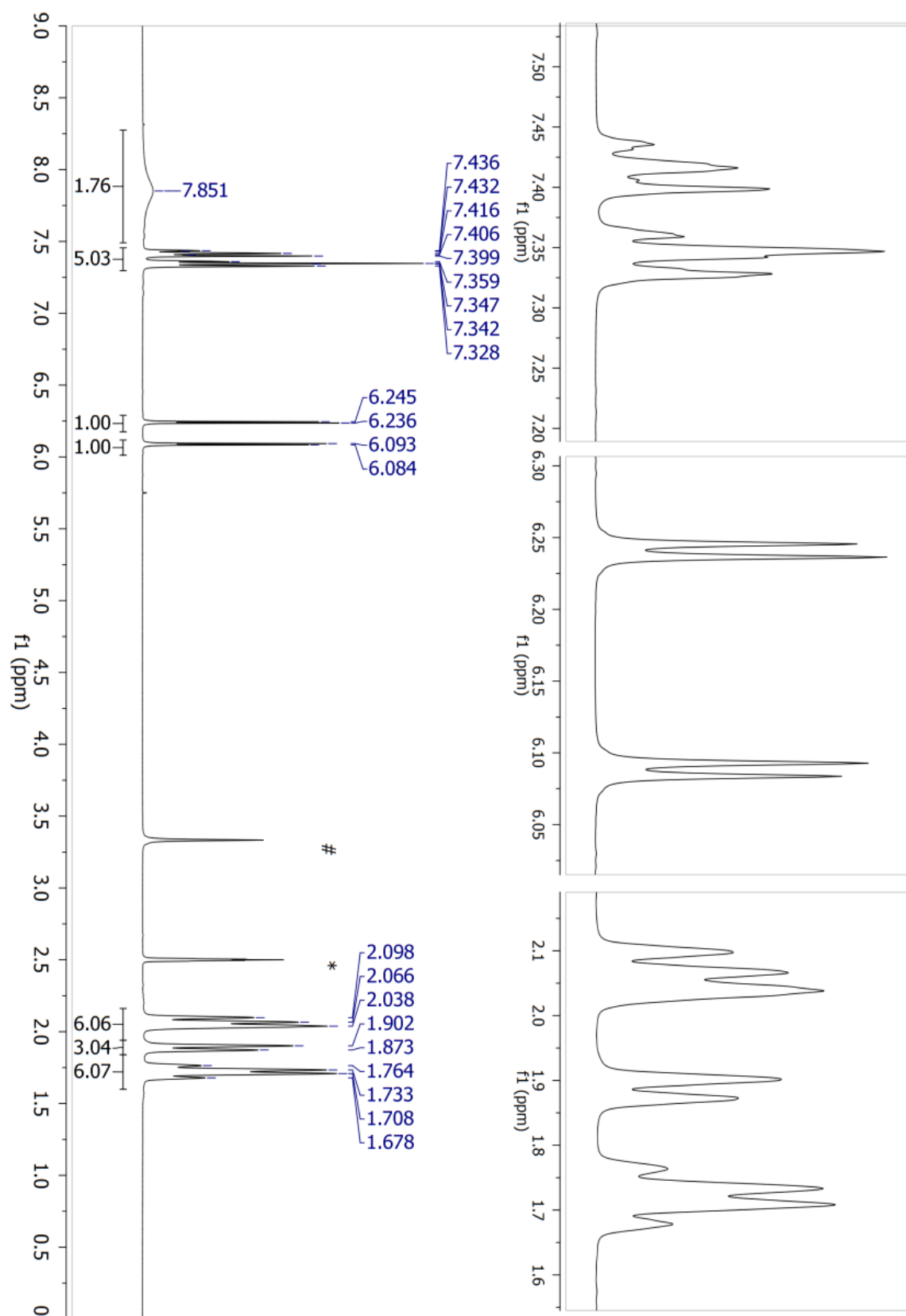
Widmo ^{13}C NMR **14** (pirydyna- d_5). Symbol * wskazuje na sygnał resztkowy pirydyny. Część sygnałów pokazano w powiększeniu.



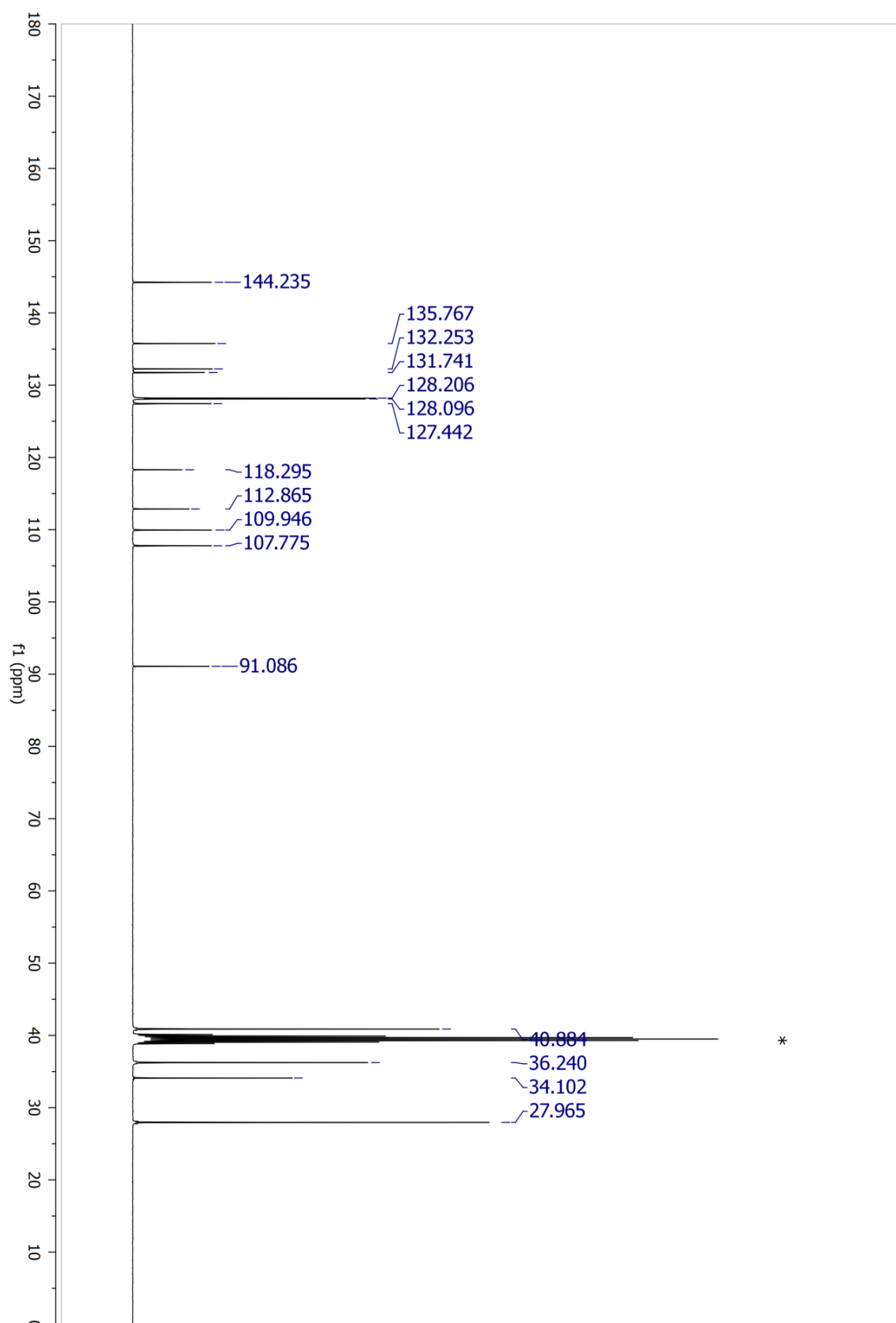
Widmo ^1H - ^1H COSY **14** (pirydyna- d_5). Część sygnałów pokazano w powiększeniu.



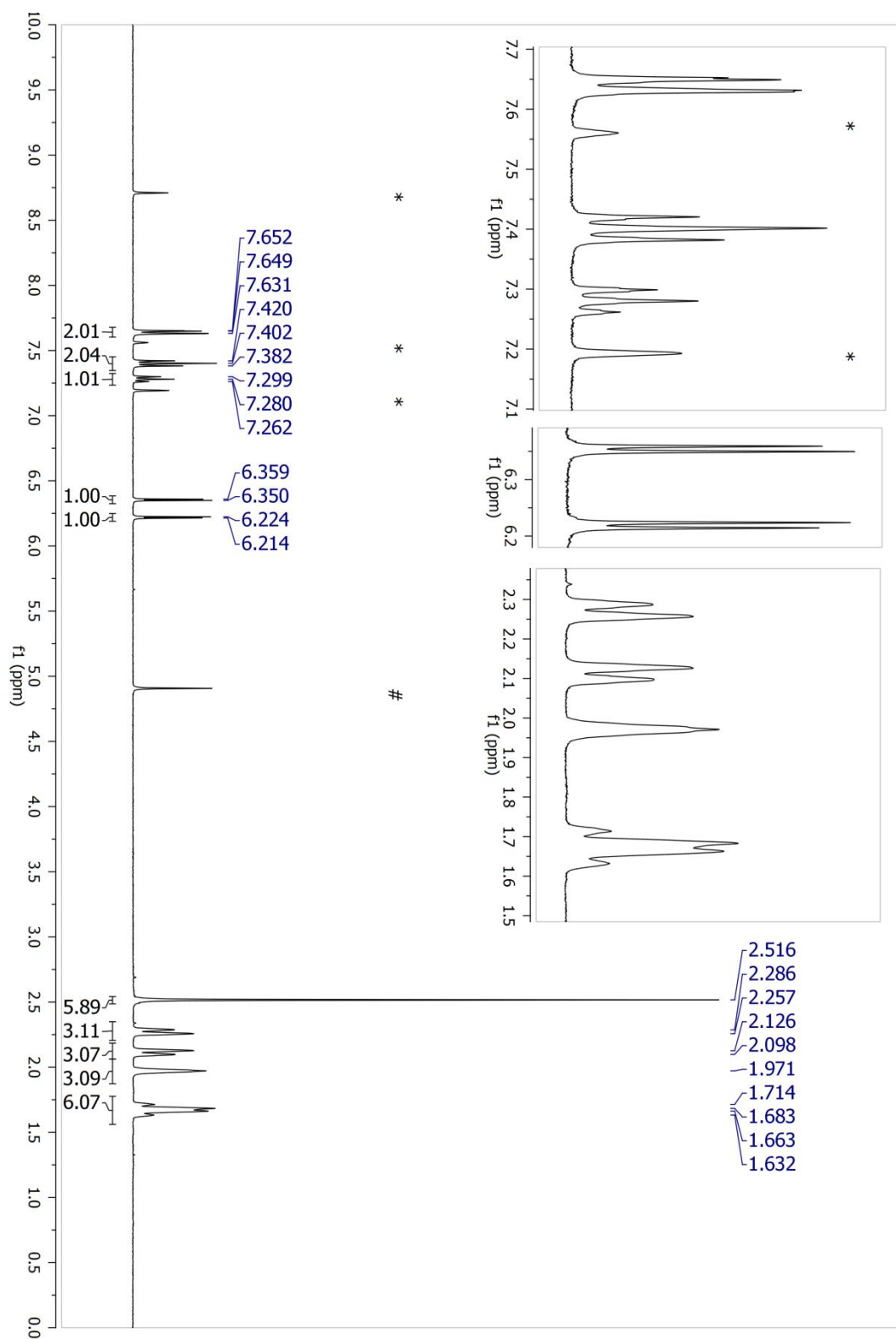
Widmo ^1H ^{13}C HSQC **14** (pirydyna- d_5). Część sygnałów pokazano w powiększeniu.



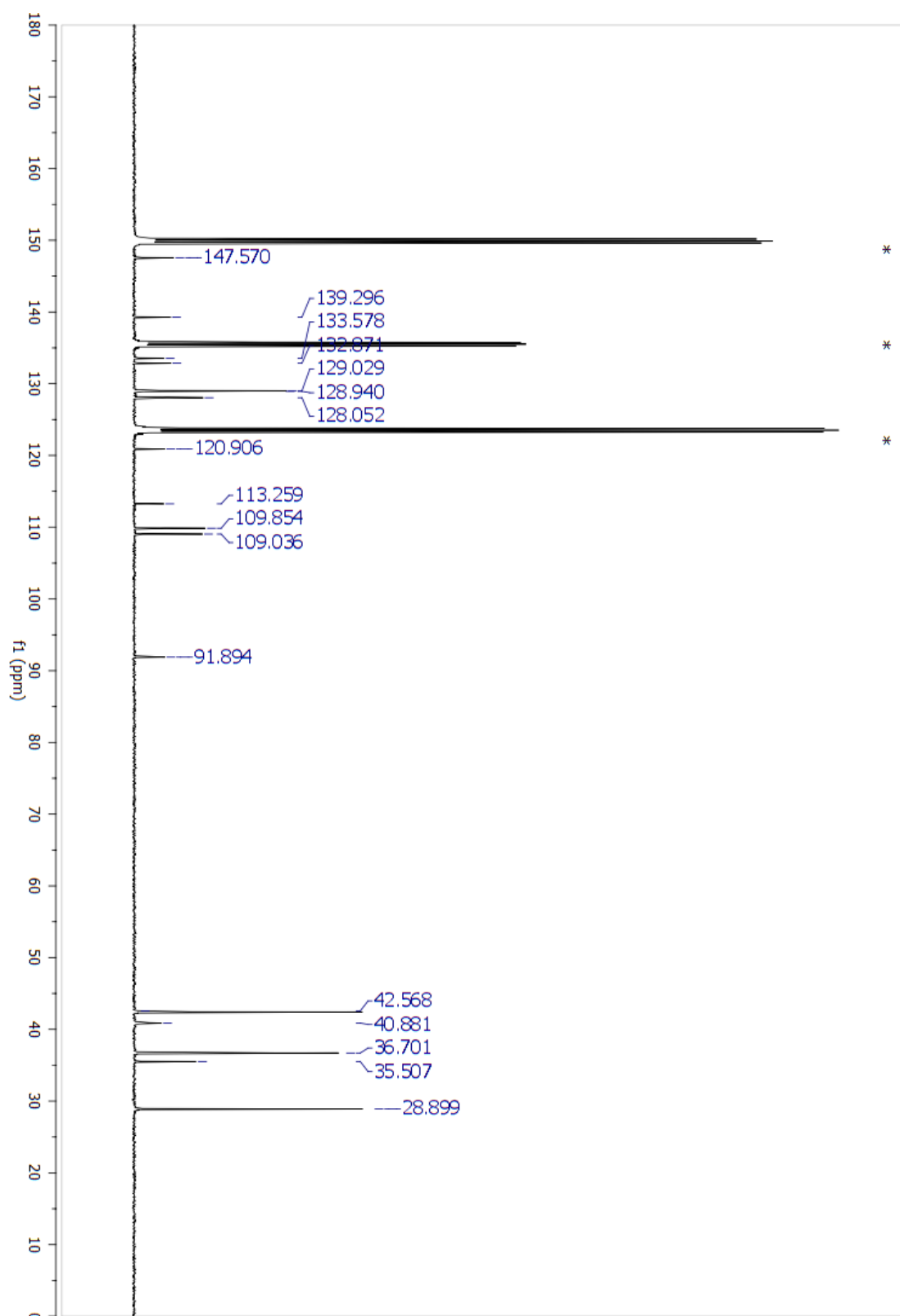
Widmo ^1H NMR **20** (DMSO-d_6). Symbole *, # wskazują sygnały reszkowe, odpowiednio DMSO i wody. Część pików pokazano w powiększeniu.



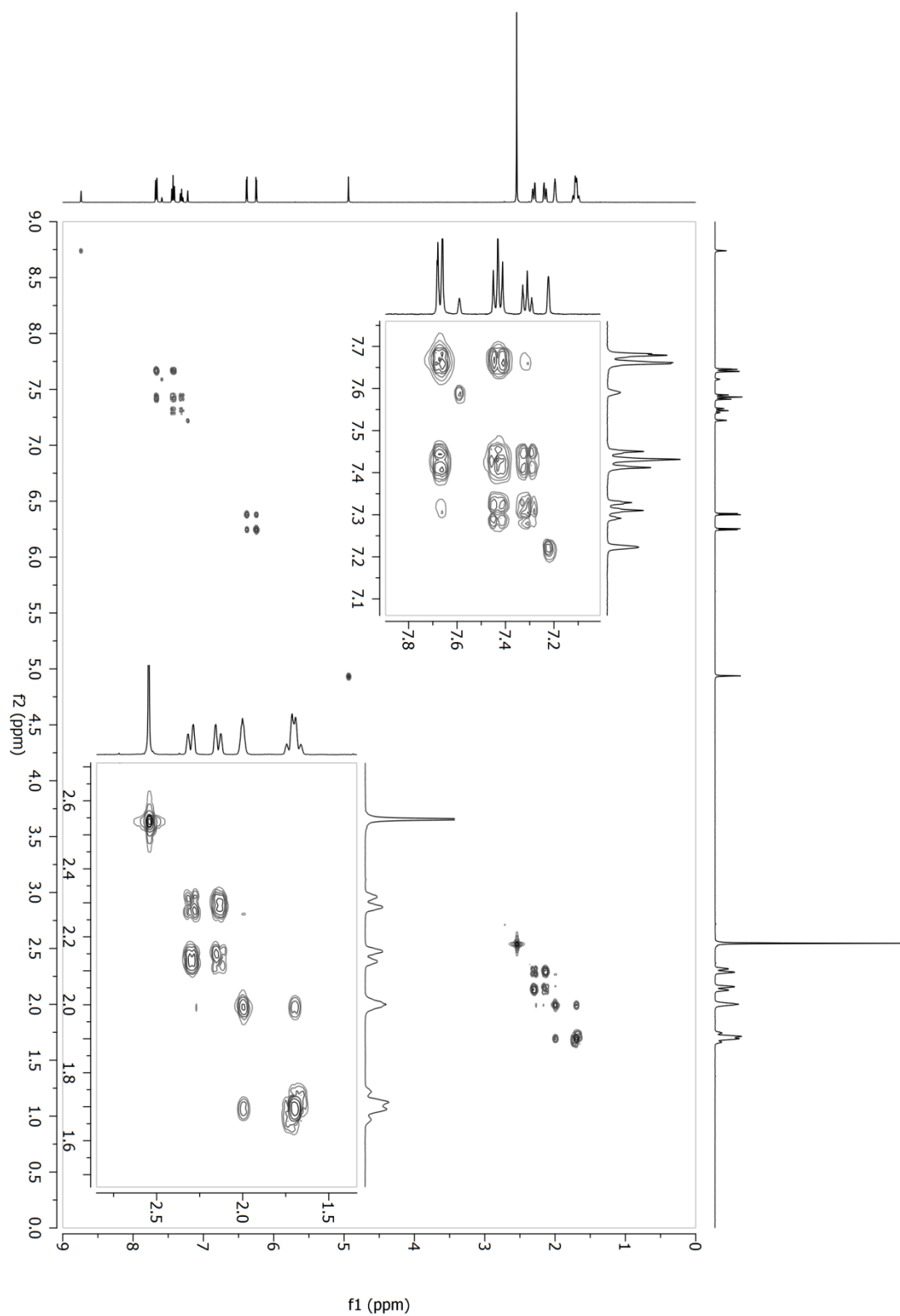
Widmo ^{13}C NMR 20. Symbol * wskazuje na sygnał reszkowy DMSO.



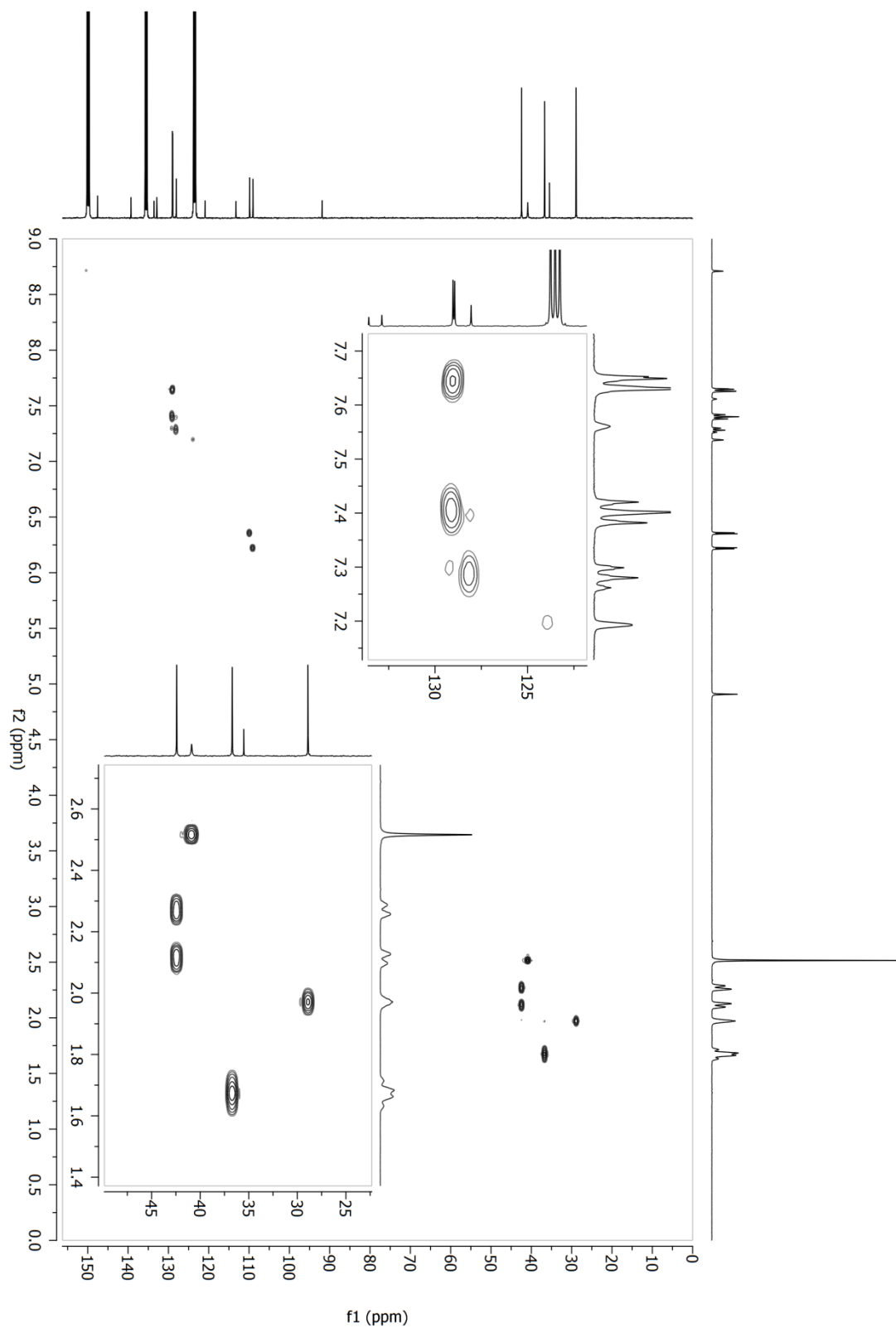
Widmo ^1H NMR **21** (pirydyna- d_5). Symbole *, # wskazują na sygnały resztkowe, odpowiednio pirydyny i wody. Część pików pokazano w zbliżeniach.



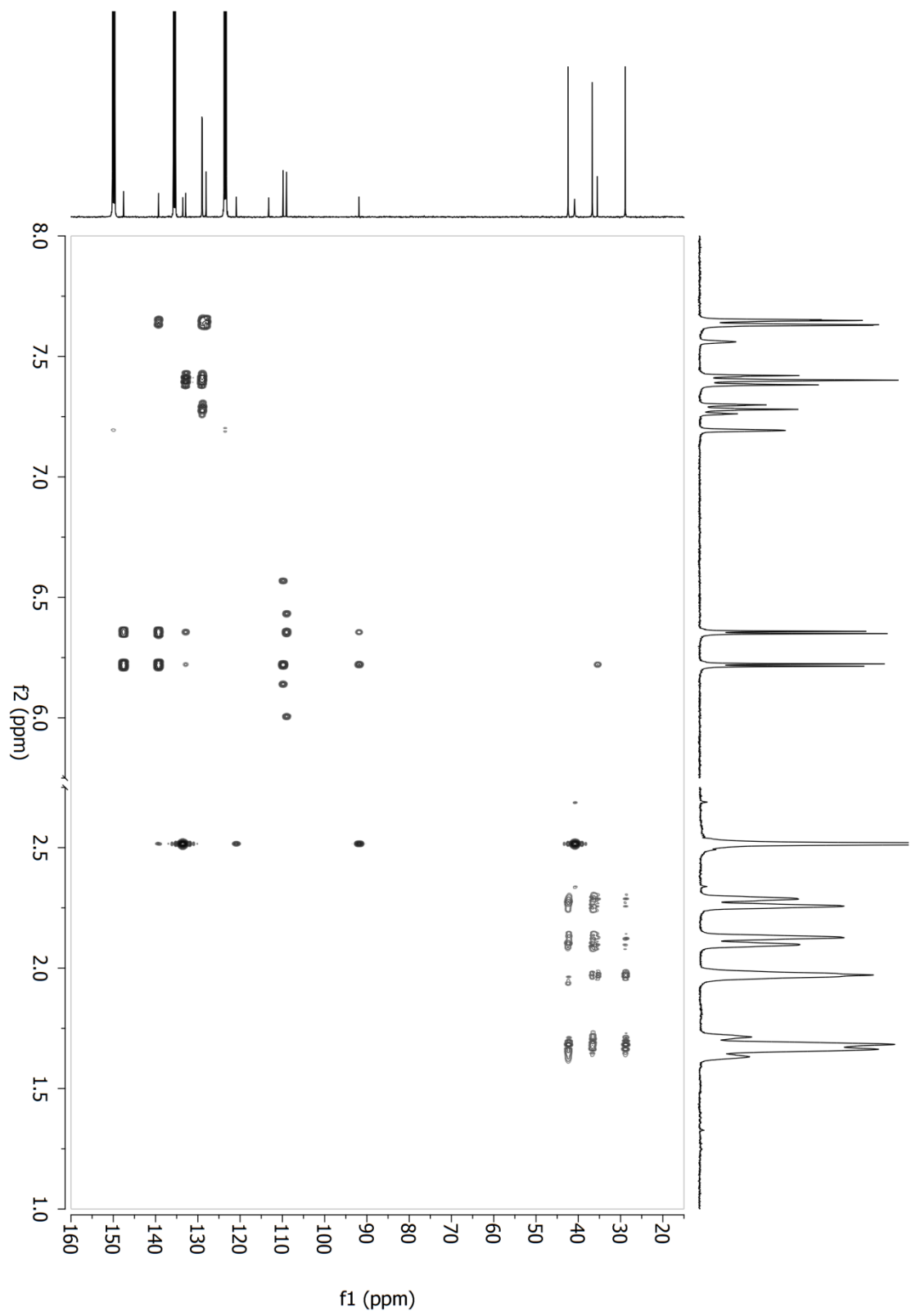
Widmo ^{13}C NMR **21** (pirydyna- d_5). Symbol * wskazuje na sygnał reszkowy pirydyny.



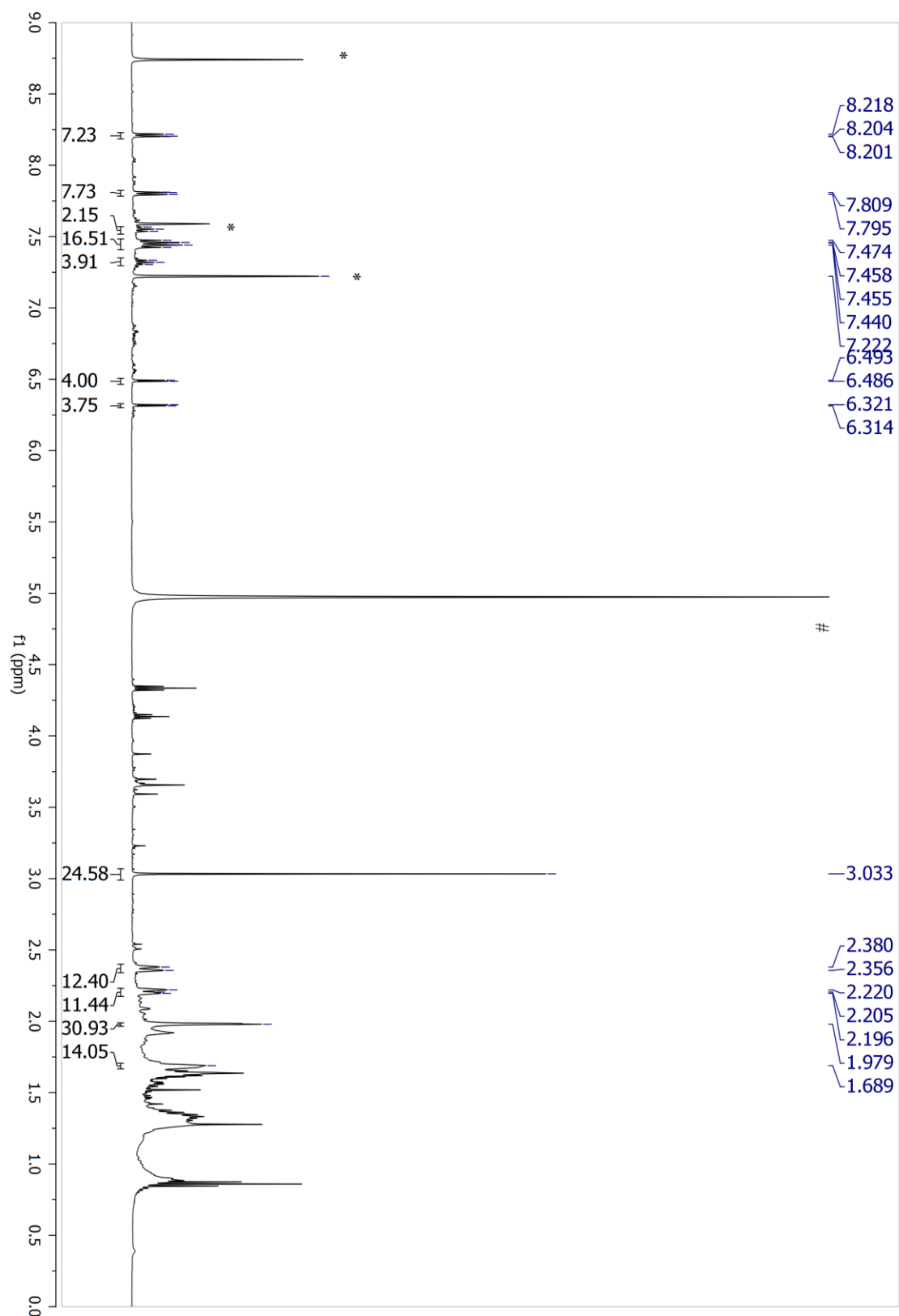
Widmo ¹H¹H COSY NMR **21** (pirydyna-d₅).



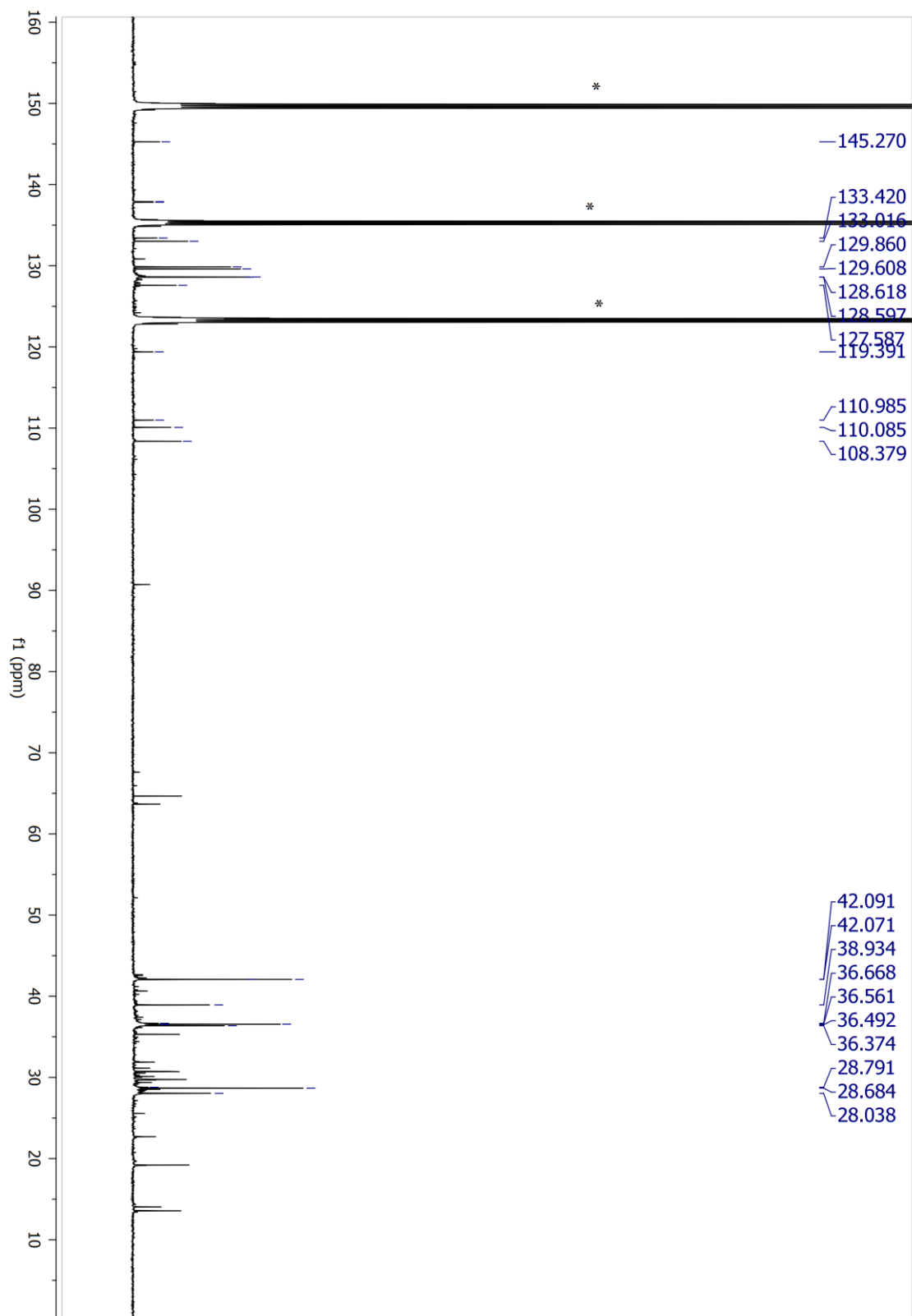
Widmo ^1H - ^{13}C HSQC NMR **21** (pirydyna- d_5).



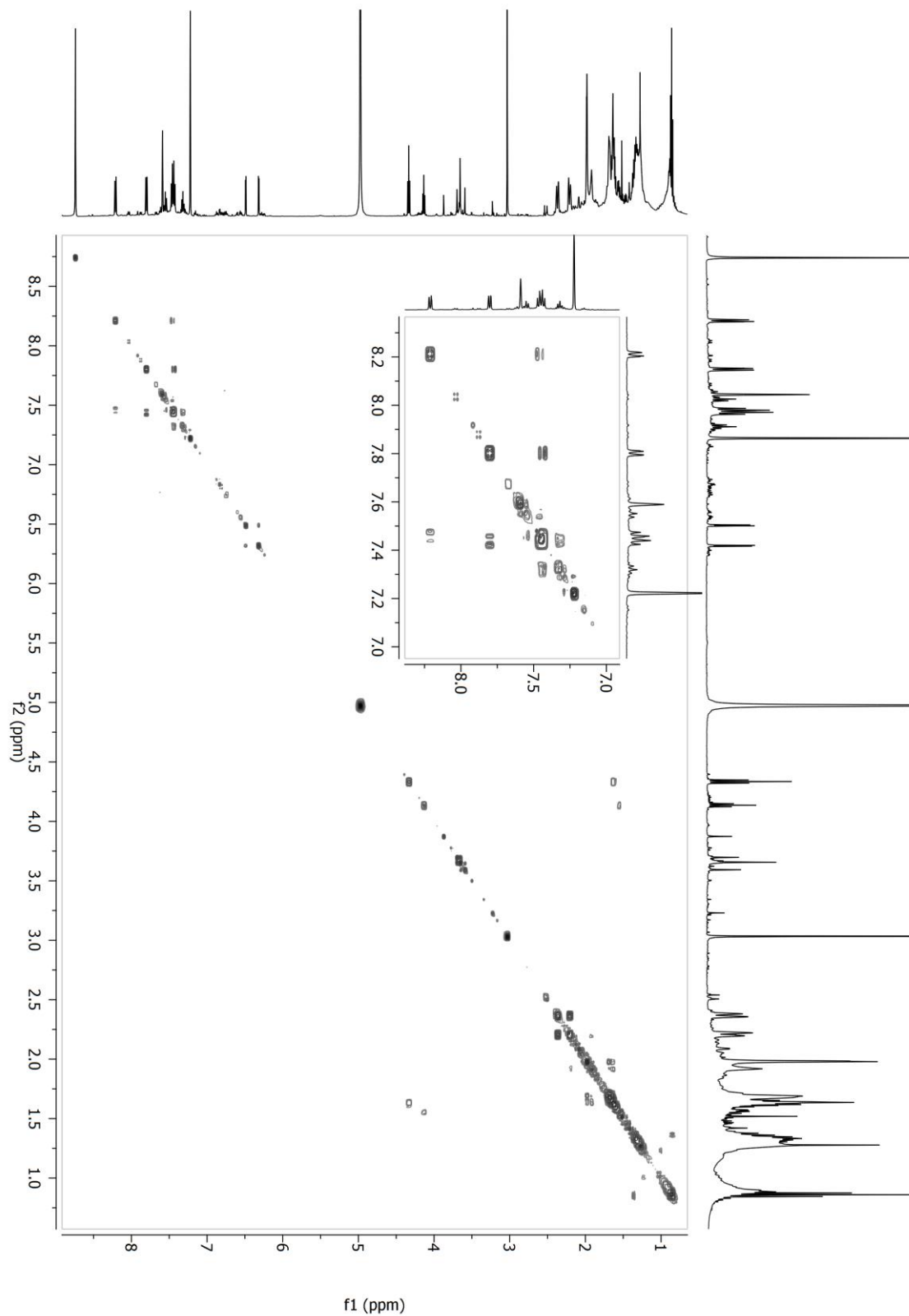
Widmo $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HMBC NMR **21** (pirydyna- d_5).



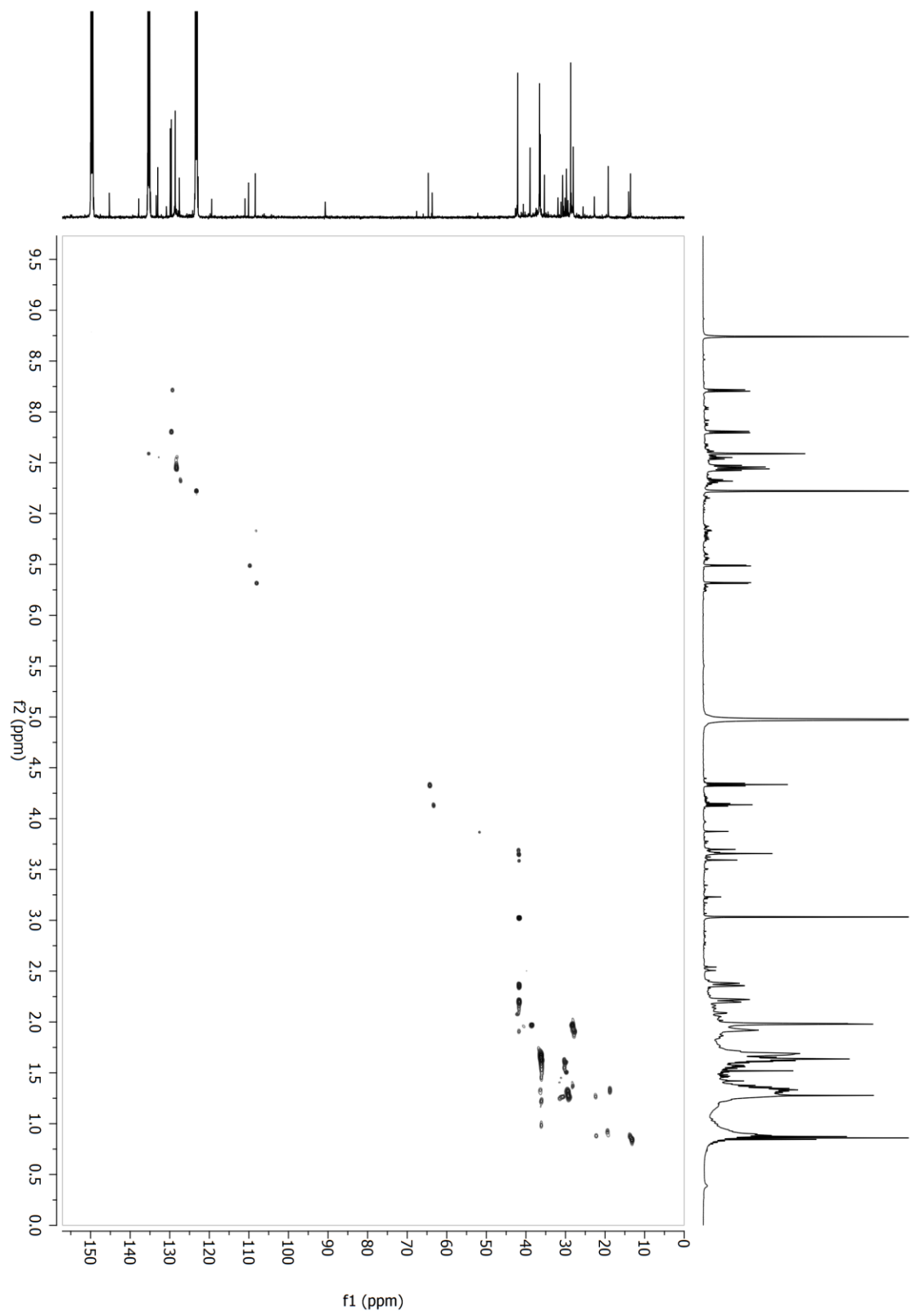
Widmo ^1H NMR **22** (pirydyna- d_5). Symbole *, # wskazują na sygnały resztkowe, odpowiednio pirydyny i wody.



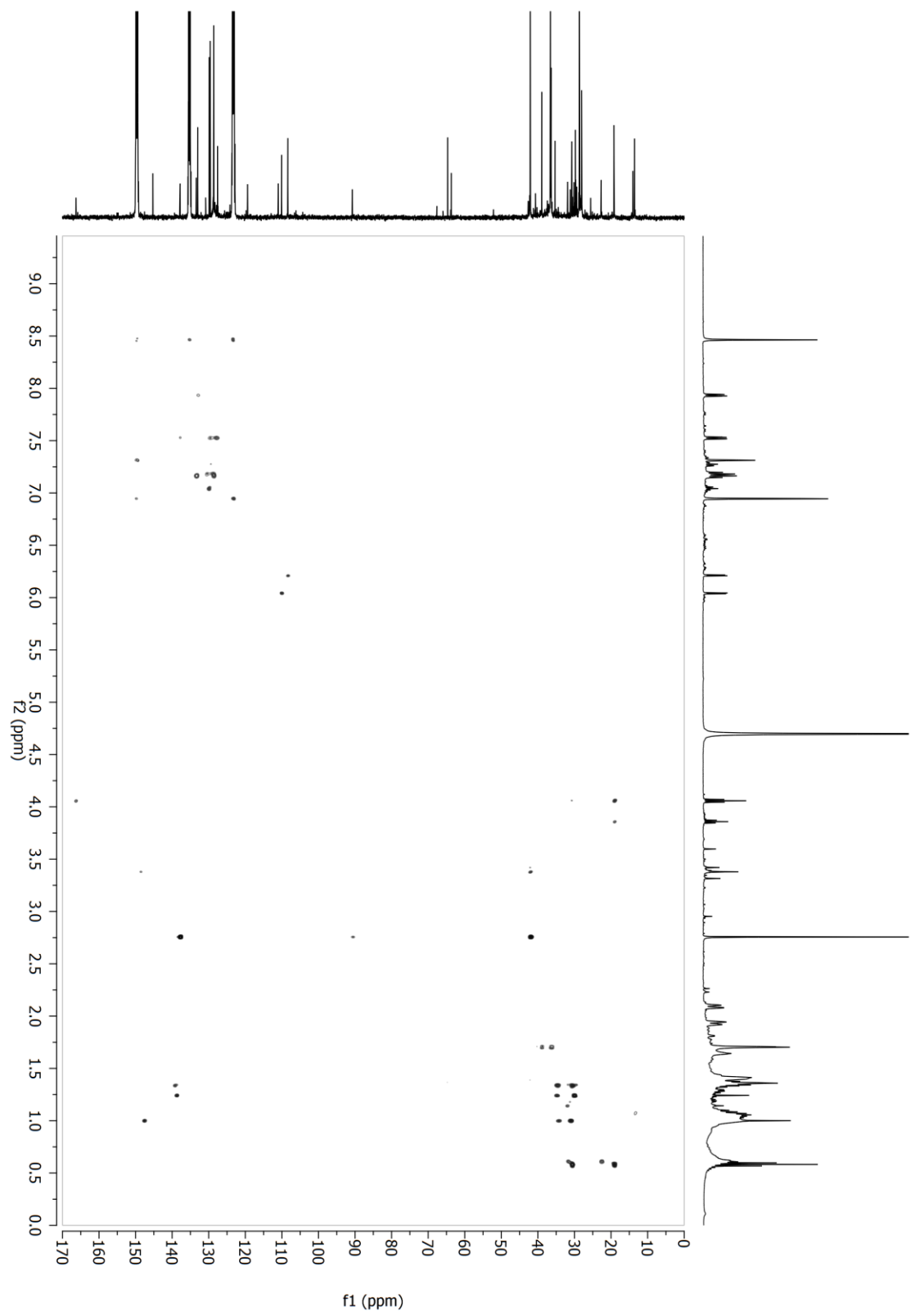
Widmo ^{13}C NMR **22** (pirydyna- d_5). Symbole * wskazują na sygnały reszkowe pirydyny.



Widmo ^1H COSY NMR **22** (pirydyna- d_5).



Widmo $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HSQC NMR **21** (pirydyna- d_5).



Widmo ^1H - ^{13}C HMBC NMR **21** (pirydyna- d_5).

OŚWIADCZENIE

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej rozprawy doktorskiej w Czytelni Naukowej Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego im. K.Marcinkowskiego w Poznaniu oraz w formie elektronicznej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej (www.wbc.poznan.pl).

Poznań, dnia 11.02.2014

.....
(podpis)

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy.....**doktorskiej**... p.t.:

"Synteza, badania strukturalne i fotochemiczne koniugatów porfirazyn i ftalocyjanin z adamantanem"

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną, nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem stopnia ...**naukowego: doktor nauk farmaceutycznych**..., a złożona przeze mnie dyskietka/płyta CD zawiera elektroniczny zapis przedstawionej przeze mnie pracy.

Jednocześnie oświadczam, że nieodpłatnie udzielam Uniwersytetowi Medycznemu im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu licencji do korzystania z wyżej wymienionej pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych w zakresie obrotu nośnikami, na których pracę utrwalono przez: wprowadzanie do obrotu, użyczenie lub najem egzemplarzy w postaci elektronicznej a nadto upoważniam Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu do przechowywania i archiwizowania pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania i udostępniania w formie elektronicznej oraz drukowanej.

.....
Michał Kryjewski

Poznań, 11.02.2014