

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej



Jarosław Piskorz

**Porfirazyny posiadające skondensowany pierścień
diazepinowy: synteza, właściwości fizykochemiczne
oraz aktywność fotodynamiczna względem komórek
nowotworowych**

Rozprawa doktorska

Promotorzy: prof. dr hab. Jadwiga Mielcarek

dr hab. Tomasz Gośliński

Poznań 2014

Słowa kluczowe:

Cytotoksyczność

Diazepina

Fotouczulacz

Porfirazyna

Terapia fotodynamiczna

Część pracy realizowano w ramach projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego pt. „Koniugaty porfirazynowo-nitroimidazolowe jako fotosensybilizatory dla terapii fotodynamicznej”, nr N N401 067 238 oraz projektu badawczego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, pt. „Ocena fotochemiczna metalotribenzoporfirazyn z peryferyjnym, skondensowanym pierścieniem heterocyklicznym” nr 502-14-03307415-50466

Część wyników przedstawionych w pracy została opublikowana lub przyjęta do druku:

1. Piskorz J., Goslinski T., Mielcarek J., *Azotowe analogi porfiryn w rozwoju przemysłu barwników syntetycznych*, Przem. Chem. - przyjęte do druku. IF=0,367; KBN/MNiI=15
2. Piskorz J., Konopka K., Düzgüneş N., Gdaniec Z., Mielcarek J., Goslinski T., *Diazepinoporphyrazines containing peripheral styryl substituents and their promising nanomolar photodynamic activity against oral cancer cells in liposomal formulations*, ChemMedChem 2014, 9, 1775-1782. IF=3,046; KBN/MNiI=30
3. Skupin-Mrugalska P., Piskorz J., Goslinski T., Mielcarek J., Konopka K., Düzgüneş N., *Current status of liposomal porphyrinoid photosensitizers*, Drug Discovery Today 2013, 18, 776-784. IF=5,964; KBN/MNiI=45
4. Piskorz J., Tykarska E., Gdaniec M., Gośliński T., Mielcarek J., *Synthesis, spectroscopic and photophysical properties of novel styryldiazepinoporphyrazine*, Inorg. Chem. Commun. 2012, 20, 13-17. IF=2,016; KBN/MNiI=25

Autor jest stypendystą:

1. Stypendium Naukowego Miasta Poznania w 2013 r. „za osiągnięcia naukowe związane z syntezą oraz badaniem właściwości nowych związków chemicznych z grupy porfirazyn o potencjalnym zastosowaniu w medycynie, szczególnie w terapii fotodynamicznej nowotworów”
2. Stypendium Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu ETIUDA na rok 2013/2014 w ramach finansowania stypendium doktorskiego na podstawie decyzji numer 2013/08/T/NZ7/00241
3. 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 w latach 2011/2012, 2012/2013 oraz 2013/2014

Praca została wykonana we współpracy z:

1. Katedrą i Zakładem Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
– synteza i charakterystyka struktury otrzymanych związków chemicznych
2. Instytutem Chemii Bioorganicznej, Polskiej Akademii Nauk
– analiza otrzymanych związków przy wykorzystaniu magnetycznego rezonansu jądrowego
3. Department of Biomedical Sciences, University of the Pacific, San Francisco, USA
– badania aktywności fotodynamicznej *in vitro* otrzymanych związków makrocyklicznych względem komórek nowotworowych jamy ustnej

*Pani Profesor **Jadwidze Mielcarek** składam serdeczne podziękowania za okazaną życzliwość, opiekę naukową, a także wszelkie konsultacje, porady oraz wsparcie udzielone w trakcie pisania pracy*

*Panu Doktorowi habilitowanemu **Tomaszowi Goślińskiemu** składam szczególne podziękowania za zaangażowanie, dużą cierpliwość, otwartość oraz nieocenioną pomoc podczas wykonywania niniejszej pracy*

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

*Panu Profesorowi **Nejatowi Düzgüneş** i Pani Profesor **Krystynie Konopce** dziękuję za możliwość odbycia stażu naukowego w Microbiology Department, University of the Pacific oraz przekazaną wiedzę i niezwykłą życzliwość okazaną w trakcie pobytu w San Francisco*

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

*Pani Doktor **Paulinie Skupin-Mrugalskiej** dziękuję za miłą i owocną współpracę podczas stażu naukowego w San Francisco*

Pracownikom Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Katedry Technologii Chemicznej Środków Leczniczych oraz Laboratorium Mikrobiologicznego Uniwersytetu w San Francisco dziękuję za życzliwość, miłą atmosferę oraz pomoc podczas wykonywania badań

Pracę dedykuję

Rodzicom

Rodzeństwu

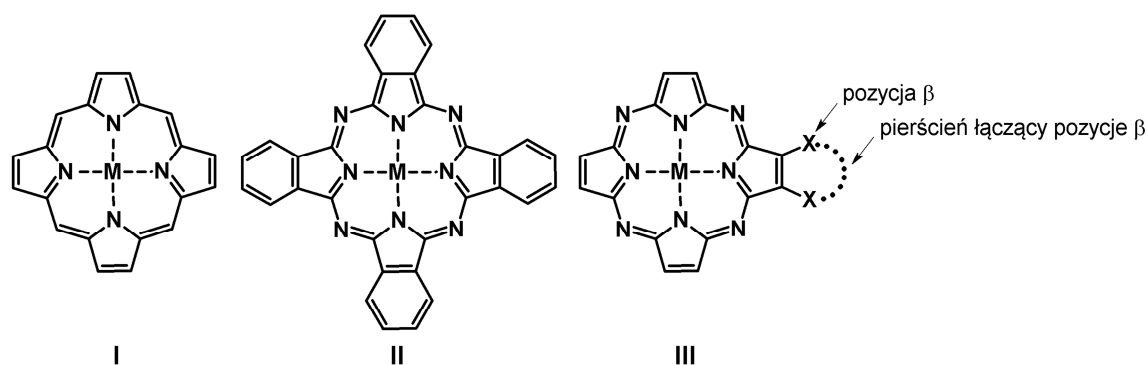
SPIS TREŚCI

I.	WSTĘP	1
II.	CEL PRACY.....	4
III.	CZEŚĆ TEORETYCZNA.....	5
III.	1. Historia otrzymania pierwszych azotowych pochodnych porfiryn	5
III.	2. Porfirazyny diazepinowe jako związki o obiecujących właściwościach fotouczulających.....	11
III.	3. Liposomy jako nośniki fotouczulaczy stosowanych w terapii fotodynamicznej	21
III.	3. 1. Liposomalne formułacje porfiryn	22
III.	3. 2. Liposomalne formułacje porfirazyn	27
III.	3. 3. Liposomalne formułacje ftalocyjanin	29
III.	3. 4. Liposomalne formułacje chloryn	31
IV.	WYNIKI I DYSKUSJA.....	32
IV.	1. Synteza porfirazyn z peryferyjnymi skondensowanymi ugrupowaniami styrylodiazepinowymi	32
IV.	1. 1. Synteza tribenzoporfirazyny ze skondensowanym ugrupowaniem styrylodiazepinowym	32
IV.	1. 2. Synteza porfirazyn posiadających skondensowane ugrupowania bisstyrylodiazepinowe.....	33
IV.	2. Ocena czystości	39
IV.	3. Charakterystyka struktury otrzymanych związków	45
IV.	3. 1. 5,7-bis[(2 <i>E</i>)-(3,4,5-trimetoksyfenylo)etenyl]-6 <i>H</i> -1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryl (11)	45
IV.	3. 2. magnez(II) tetrakis[5,7-bis{(2 <i>E</i>)-(3,4,5-trimetoksyfenylo)etenyl}-6 <i>H</i> -1,4-diazepino][2,3- <i>b</i> ;2',3'- <i>g</i> ;2'',3''- <i>l</i> ;2''',3'''- <i>q</i>]porfirazyna (18).....	48
IV.	3. 3. tetrakis[5,7-bis{(2 <i>E</i>)-(3,4,5-trimetoksyfenylo)etenyl}-6 <i>H</i> -1,4-diazepino][2,3- <i>b</i> ;2',3'- <i>g</i> ;2'',3''- <i>l</i> ;2''',3'''- <i>q</i>]porfirazyna (19).....	51
IV.	4. Ocena właściwości fizykochemicznych	55
IV.	4. 1. Właściwości absorpcyjne i emisyjne	55
IV.	4. 2. Właściwości agregacyjne	62
IV.	4. 3. Fotodegradacja	68
IV.	4. 3. Generowanie tlenu singletowego	75
IV.	5. Badania biologiczne aktywności fotodynamicznej porfirazyn w postaci wolnej oraz po enkapsulacji liposomalnej względem komórek nowotworowych.....	82
IV.	5. 1. Badanie toksyczności bez dostępu światła.....	82
IV.	5. 2. Badanie aktywności fotodynamicznej.....	83

IV. 5. 3. Badanie aktywności fotodynamicznej porfirazyn inkorporowanych w liposomy	85
IV. 5. 4. Określenie lokalizacji wewnątrzkomórkowej porfirazyn	92
IV. 5. 5. Obrazowanie żywotności komórek przy wykorzystaniu mikroskopii fluorescencyjnej	95
V. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	98
VI. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	100
VI. 1. Ogólne procedury	100
VI. 2. Stosowane rozpuszczalniki i reagenty	101
VI. 3. Synteza porfirazyn posiadających peryferyjne skondensowane ugrupowania styrylodiazepinowe	103
VI. 4. Metodyka badań właściwości fizykochemicznych	111
VI. 4. 1. Właściwości absorpcyjne i emisyjne	111
VI. 4. 2. Właściwości agregacyjne	111
VI. 4. 3. Fotodegradacja	112
VI. 4. 4. Generowanie tlenu singletowego	112
VI. 6. Metodyka badań biologicznych	112
VI. 6. 1. Hodowla komórek	112
VI. 6. 2. Badanie toksyczności bez dostępu światła	113
VI. 6. 3. Badanie aktywności fotodynamicznej	114
VI. 6. 4. Określenie żywotności komórek	114
VI. 6. 5. Przygotowanie liposomów	115
VI. 6. 6. Oznaczenie lokalizacji wewnątrzkomórkowej oraz żywotności komórek przy wykorzystaniu mikroskopu fluorescencyjnego	116
VII. STRESZCZENIE	117
VIII. ABSTRACT	119
IX. SPIS ZAMIESZCZONYCH SKRÓTÓW	121
X. SPIS RYCIN, SCHEMATÓW I TABEL	123
X. 1. Ryciny	123
X. 2. Schematy	127
X. 3. Tabele	127
XI. LITERATURA	129
XII. SUPLEMENT	137

I. WSTĘP

Porfirazyny (Pz) oraz ftalocyjaniny są azotowymi analogami naturalnie występujących porfiryn i wchodzą w skład dużej grupy związków makrocyklicznych, określanej mianem porfirynoidów. W cząsteczkach porfirazyn i ftalocyjanin pierścienie pirolowe połączone są atomami azotu, w miejscach mostków metinowych obecnych w strukturze porfiryn. Poprzez wbudowanie różnych kationów metali do centrum cząsteczki lub przez przyłączenie podstawników w części peryferyjnej, można otrzymać ogromną liczbę makrocykli porfirynoidowych. Podstawnikami peryferyjnymi są najczęściej różne ugrupowania w pozycjach β , zawierające atomy węgla, azotu, tlenu lub siarki, a także pierścienie łączące obie pozycje β (Ryc. 1) [1].

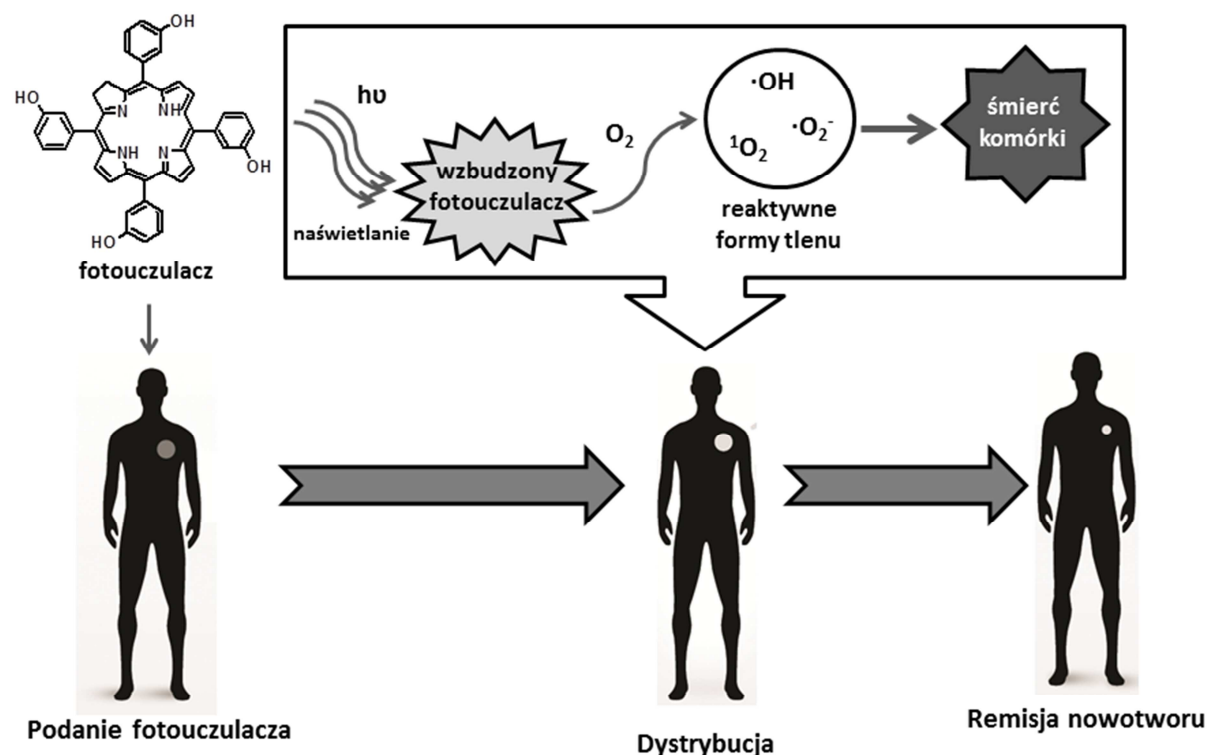


Ryc. 1. Struktury porfirynoidów: porfiryne (I), ftalocyjanina (II), porfirazyna (III) oraz możliwe modyfikacje peryferyjne porfirazyn, M = kation metalu, X = atomy: węgla, azotu, tlenu lub siarki.

Podobieństwo strukturalne porfirazyn do porfiryn, które pełnią ważne funkcje biologiczne w środowisku naturalnym oraz organizmie człowieka, niesie ze sobą szeroki wachlarz potencjalnych zastosowań. Porfirynoidy, w tym również porfirazyny, cieszą się rosnącym zainteresowaniem z uwagi na możliwość zastosowania w wielu dziedzinach medycyny, szczególnie w terapii fotodynamicznej (*ang. photodynamic therapy*, PDT), która jest nową, uzupełniającą, a niekiedy komplementarną do radioterapii i chemioterapii metodą leczenia chorób nowotworowych. Ponadto wzrasta wykorzystywanie PDT w leczeniu chorób nienowotworowych, w tym infekcji bakteryjnych, grzybiczych i wirusowych (terapia fotodynamiczna skierowana przeciw mikroorganizmom, *ang. photodynamic antimicrobial chemotherapy*, PACT), w stomatologii, a także różnych schorzeń dermatologicznych,

w tym rogowaczeń słonecznych, ostrego zapalnego trądziku, ropnego zapalenia gruczołów potowych oraz przerostu gruczołów łojowych [2-5].

PDT opiera się na kumulacji w tkance docelowej, odpowiedniej substancji leczniczej zwanej fotouczulaczem lub fotosensybilizatorem, a następnie napromieniowaniu światłem o długości fali dostosowanej do widma absorpcji zastosowanego fotouczulacza. W następstwie zachodzi aktywowana światłem reakcja fotodynamiczna pomiędzy fotouczulaczem i tlenem, prowadząca do powstania reaktywnych form tlenu, w tym tlenu singletowego, uważanego za główny czynnik cytotoksyczny, powodujący obumieranie tkanki docelowej (Ryc. 2) [6].



Ryc. 2. Przebieg terapii fotodynamicznej wraz ze schematem reakcji fotodynamicznej.

Reakcja fotodynamiczna może być zastosowana również w celach diagnostycznych [7]. Diagnostyka fotodynamiczna (*ang. photodynamic diagnosis, PDD*) wykorzystuje zdolność fotouczulaczy do kumulowania się w tkance nowotworowej, ze względu na efekt zwiększonej przepuszczalności naczyń i zatrzymywania cząsteczek (*ang. enhanced vascular permeability and retention, EPR*), wynikający z bogatego unaczynienia i słabszego drenażu limfatycznego nowotworów względem zdrowych tkanek [8]. Następnie pod wpływem naświetlania promieniowaniem o odpowiedniej długości fali, fotouczulacz skumulowany w komórkach nowotworowych emituje światło czerwone. Natomiast występujące

w zdrowych tkankach związki naturalne m. in. niektóre aminokwasy i koenzymy emitują światło zielone, co umożliwia uwidocznienie zmian nowotworowych. W terapii fotodynamicznej wykorzystuje się światło czerwone o długości fali powyżej 630 nm, natomiast w diagnostyce fotodynamicznej stosuje się najczęściej światło w zakresie długości fal 375–400 nm. Należy podkreślić, że fotouczulacze porfirynoidowe posiadają zazwyczaj dwa pasma absorpcji, występujące w wymienionych zakresach długości fal, dlatego mogą być wykorzystywane zarówno w celach diagnostycznych, jak również terapeutycznych. Ponadto, światło o różnej długości fali penetruje tkanki na zróżnicowaną głębokość, np. światło o długości fali 630 nm przenika na głębokość ok. 0,5 cm, podczas gdy światło o $\lambda=700$ nm na ok. 1,5 cm. Z tego względu badania skupiają się na poszukiwaniu fotouczulaczy absorbujących promieniowanie powyżej 700 nm, z uwagi na możliwość leczenia głębiej położonych tkanek oraz słabsze oddziaływanie ze składnikami krwi [9,10]. Aktualnie, pomimo istnienia wielu fotouczulaczy o potencjalnym wykorzystaniu w terapii fotodynamicznej, nadal najczęściej w praktyce klinicznej stosowany jest Photofrin, który jest mieszaniną wielu różnych porfiryn, wymaga stosowania dużych dawek, wykazuje słabą penetrację tkanek, a także wywołuje długo utrzymującą się nadwrażliwość na światło. Ze względu na powyższe ograniczenia w stosowaniu Photofrinu, synteza nowych fotouczulaczy wzbudza w dalszym ciągu rosnące zainteresowanie [2].

Lipofilność porfirynoidów powodująca słabą rozpuszczalność w wodzie oraz płynach biologicznych, a także wysoka tendencja do agregacji oraz niska biodostępność ograniczają ich zastosowanie w medycynie, w tym w terapii fotodynamicznej. Z tego powodu rosnącym zainteresowaniem cieszą się systemy dostarczania fotouczulaczy, w tym także porfirynoidów, do miejsca docelowego w organizmie. Dotychczas testowano wiele różnych systemów, między innymi liposomy, emulsje, micelle, polimery, lipoproteiny, nanocząstki metaliczne, krzemowe i ceramiczne, kropki kwantowe, fulereny oraz przeciwciała [11-14]. Spośród wymienionych, najczęściej stosowane są liposomy, ze względu na wysoką biokompatybilność oraz biodegradowalność. Ponadto modyfikacja powierzchni liposomów przy wykorzystaniu przeciwciał, peptydów, transferyny oraz folianów, jak również opracowanie liposomów uwalniających inkorporowane cząsteczki pod wpływem światła, umożliwia uzyskanie systemów selektywnie dostarczających fotouczulacze do tkanki docelowej [15-18].

II. CEL PRACY

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zaplanowano: (i) syntezę nowych porfirazyn, posiadających peryferyjne skondensowane pierścienie diazepinowe, (ii) określenie struktury uzyskanych związków przy wykorzystaniu metod instrumentalnych, (iii) ocenę właściwości fizykochemicznych oraz (iv) ustalenie aktywności fotodynamicznej *in vitro* względem komórek nowotworowych.

Realizację zaplanowanych badań podzielono na następujące etapy:

1. Synteza porfirazyn, w tym również tribenzoporfirazyn, posiadających peryferyjne, skondensowane pierścienie diazepinowe z jednym oraz dwoma podstawnikami styrylowymi.
2. Opracowanie metod izolacji porfirazyn i oceny ich czystości przy wykorzystaniu technik analitycznych, ze szczególnym uwzględnieniem metod chromatograficznych.
3. Charakterystyka struktury nowych związków metodami analizy instrumentalnej, w tym spektroskopii mas, magnetycznego rezonansu jądrowego oraz rentgenowskiej analizy strukturalnej monokryształów.
4. Ocena właściwości fizykochemicznych otrzymanych porfirazyn, obejmująca analizę właściwości absorpcyjnych i emisyjnych, tendencji do agregacji, trwałości fotochemicznej oraz wydajności kwantowej generowania tlenu singletowego.
5. Badania biologiczne zmierzające do oceny aktywności fotodynamicznej porfirazyn w postaci wolnej oraz po przeprowadzeniu enkapsulacji liposomalnej, względem dwóch linii komórek raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, pochodzących z języka oraz błony śluzowej policzka.

W części teoretycznej niniejszej pracy zaplanowano zebranie oraz opracowanie doniesień literaturowych obejmujących następujące zagadnienia:

1. Historia otrzymania pierwszych azotowych pochodnych porfiryn.
2. Porfirazyny diazepinowe jako związki o obiecujących właściwościach fotouczulających.
3. Liposomy jako nośniki dla fotouczulaczy stosowanych w terapii fotodynamicznej.

III. CZEŚĆ TEORETYCZNA

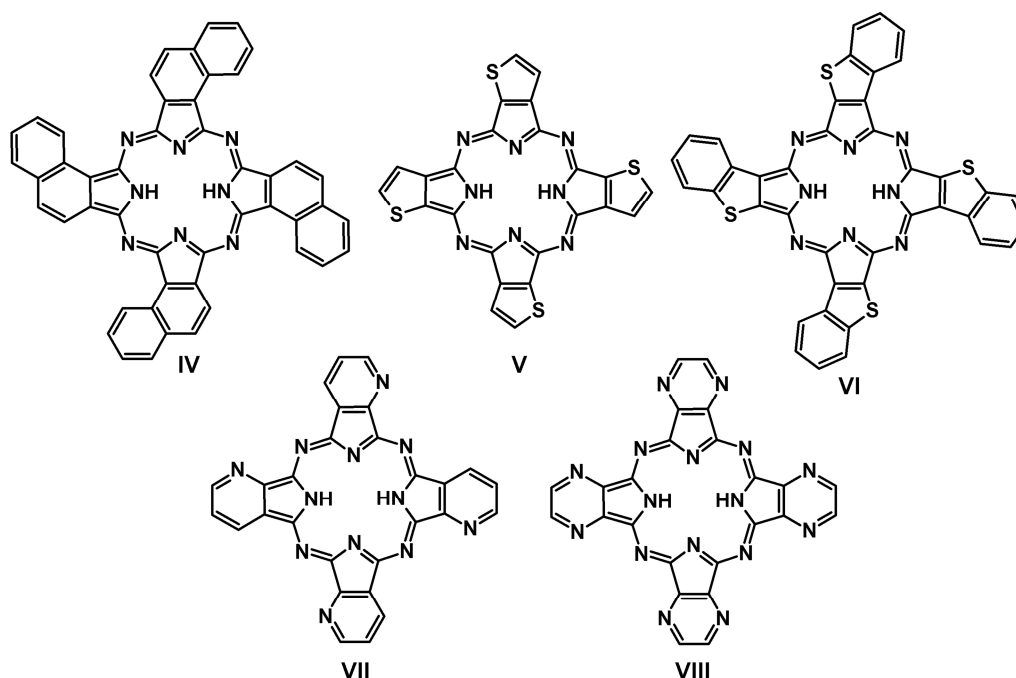
III. 1. Historia otrzymania pierwszych azotowych pochodnych porfiryn

Pierwszymi azotowymi pochodnymi porfiryn były ftalocyjaniny, jednak obecnie trudno jest jednoznacznie wskazać datę ich otrzymania, ponieważ autorzy prowadzonych wówczas syntez, w których powstawały ftalocyjaniny, nie potrafili poprawnie określić struktury uzyskiwanych związków. Pierwsze doniesienia pochodzą z roku 1927, w którym Diesbach i van der Weid opisali nowy, nierozpuszczalny, niebieski związek powstający w reakcji cyjanku miedzi(I) z *orto*-dibromobenzenem i pirydyną. Uzyskanym związkiem była ftalocyjanina miedzi(II), jednak autorzy mylnie zidentyfikowali produkt reakcji, jako związek kompleksowy dicyjanobenzenu z jonami miedzi(II) i pirydyną. Natomiast w 1928 roku Dandridge, Dreschr i Thomas opatentowali w Wielkiej Brytanii trudno rozpuszczalne, barwne kompleksy metali uzyskane w reakcji amoniaku z bezwodnikiem kwasu ftalowego lub ftalimidem. Jednak wymienieni autorzy nie udokumentowali struktury otrzymanych związków [19]. W tym samym roku w fabryce barwników w Grangemouth w Szkocji, podczas przemysłowej produkcji ftalimidu, zauważono ślady ciemnoniebieskiej, krystalicznej substancji, jednak również w tym przypadku nie powiodła się próba jej identyfikacji. Rok po tym odkryciu identyfikacją nowego barwnika zajął się Sir Reginald Patrick Linstead wraz z grupą współpracowników z Imperial College of Science and Technology w Londynie. Stwierdził, że otrzymany barwnik zawiera jony żelaza, charakteryzuje się znaczną trwałością, posiada formę krystaliczną oraz jest nierozpuszczalny w popularnych rozpuszczalnikach organicznych, wodzie oraz rozcieńczonych kwasach i zasadach [20]. W dalszych badaniach, które Linstead prowadził wraz z Byrne i Lowe wykazano, że można uzyskać barwniki zawierające w strukturze inne jony metali, w reakcjach *orto*-cyjano benzamid lub ftalonitrylu z odpowiednimi metalami, ich tlenkami lub solami. Otrzymane związki opisano jako piękne barwniki o niespotykanej trwałości i nazwano ftalocyjaninami. Ponadto zaobserwowano, że wykazują podobieństwo strukturalne do naturalnie występujących porfiryn, takich jak hem i chlorofil. Prowadzone w tym czasie dalsze prace badawcze dotyczyły opracowania efektywnych metod otrzymywania ftalocyjanin. Jako związki wyjściowe w reakcjach makrocyclizacji prowadzących do uzyskania ftalocyjanin, wybrano *orto*-cyjano benzamid oraz ftalonitryl. Po kilku doświadczeniach porównujących reaktywność obu związków, uwagę skupiono na wykorzystaniu *orto*-cyjano benzamid. Ftalonitryl uznany został za mniej reaktywny, co później okazało się decyzją błędną. Stwierdzono, że bezpośrednim

prekursorem ftalocyjanin jest izoindolowa pochodna *orto*-cyjanobenzamidu. Najlepsze rezultaty osiągnięto w reakcjach *orto*-cyjanobenzamidu z magnezem, żelazem, niklem, kobaltem i antymonem. Reakcje prowadzono w wysokiej temperaturze, zazwyczaj ok. 250 °C, w obecności niewielkiej ilości rozpuszczalnika, naftalenu lub chinoliny. Uzyskane ftalocyjaniny charakteryzowały się intensywną niebieską barwą, znaczną stabilnością oraz słabą rozpuszczalnością w popularnych rozpuszczalnikach organicznych. Ważnym osiągnięciem prowadzonych badań było opracowanie efektywnej metody syntezy ftalocyjaniny magnezu, umożliwiającej uzyskanie dużych ilości tego związku. W reakcjach *orto*-cyjanobenzamidu z magnezem oraz jego tlenkiem, otrzymywano jednorazowo kilkanaście gramów ftalocyjaniny. Zaobserwowano również, że ftalocyjanina magnezu pod wpływem stężonych kwasów, ulegała demetalacji do ftalocyjaniny pozbawionej jonu metalu, stanowiącej jednocześnie podstawową strukturę barwników ftalocyjaninowych [21]. Linstead i wsp. [22] podczas kolejnych reakcji syntezy ftalocyjanin zauważyli, że wiele metali i ich pochodnych reaguje z ftalonitrylem w środowisku pirydyny, prowadząc do powstania odpowiednich kompleksów ftalocyjanin z jonami metali m.in. ftalocyjaniny miedzi(II). Jak wspomniano wcześniej, podobne reakcje opisali już w 1927 roku Diesbach i Weid, jednak nie określono wówczas poprawnej struktury otrzymanego produktu. Przeprowadzone w kolejnych latach dalsze badania właściwości fizyko-chemicznych, wykazały nadzwyczajną stabilność ftalocyjaniny miedzi(II) w porównaniu ze znanymi wówczas kompleksami ftalocyjanin z innymi metalami. Z tego powodu barwnik ten uznano w tym okresie, za jeden z najbardziej niezwykłych związków organicznych [23].

Kolejne prace prowadzone przez zespół badawczy Linstead, miały na celu ustalenie struktury ftalocyjanin. Wykazano, że barwniki ftalocyjaninowe zbudowane są z czterech pierścieni pirolu połączonych atomami azotu i skondensowanych z pierścieniami benzenu. Strukturę ftalocyjanin potwierdziły również badania rentgenostrukturalne wykonane przez Robertsona [24]. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano także różnice pomiędzy budową porfiryń i ftalocyjanin. Zauważono, że w cząsteczkach porfiryń pierścienie pirolu nie są skondensowane z pierścieniami benzenu, a poszczególne jednostki pirolowe połączone są mostkami metinowymi, w przeciwieństwie do mostków azometinowych występujących we ftalocyjaninach (Ryc. 1). Niemniej jednak obie grupy związków posiadają wiele wspólnych właściwości, np. są stabilne w środowisku zasadowym, natomiast wykazują dużo mniejszą trwałość w obecności kwasów. Ponadto charakteryzują się intensywną barwą i tworzą kompleksy z jonami metali [25].

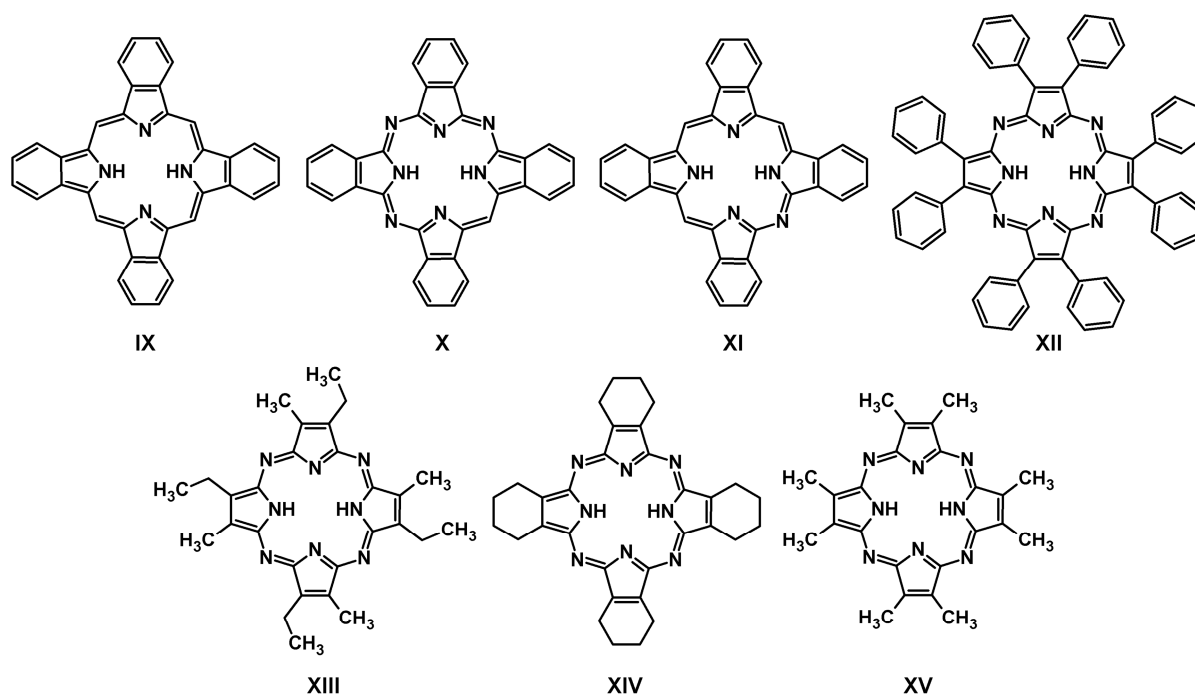
Dalsze prace badawcze prowadzone w Imperial College London zmierzały do oceny właściwości barwników ftalocyjaninowych oraz otrzymania nowych związków makrocyklicznych o podobnej strukturze. Wynikiem zaplanowanych badań było uzyskanie serii analogów porfirazyn, posiadających zamiast skondensowanych pierścieni benzenu, jak w przypadku ftalocyjanin, inne pierścienie aromatyczne, w tym naftalenu (**IV**), tiofenu (**V**), tionaftenu (**VI**), pirydyny (**VII**) oraz pirazyny (**VIII**) (Ryc. 3) [26,27].



Ryc. 3. Struktury pochodnych porfirazyn, posiadających zamiast skondensowanych pierścieni benzenu, inne pierścienie aromatyczne; naftalen (**IV**), tiofen (**V**), tionaften (**VI**), pirydynę (**VII**) oraz pirazynę (**VIII**).

W kolejnych latach dużą uwagę poświęcono otrzymaniu związków, wykazujących strukturę pośrednią pomiędzy ftalocyjaninami i porfirynami. Zaplanowano wówczas syntezę dwóch rodzajów związków makrocyklicznych zbudowanych z (i) czterech pierścieni pirolowych skondensowanych z pierścieniami benzenu i połączonych mostkami metinowymi (**IX**, Ryc. 4) oraz (ii) czterech pierścieni pirolowych połączonych atomami azotu (**III**, Ryc. 1). Hipotetyczne struktury tych związków nazwano odpowiednio tetrabenzoporfina (we współczesnej nomenklaturze częściej określanej jako tetrabenzoporfiryna [28]) oraz tetraazoporfina lub inaczej porfirazyna. W tym czasie dostrzeżono również możliwość dalszych modyfikacji cząsteczek poprzez (i) wbudowanie jonów różnych metali do centrum pierścienia makrocyklicznego oraz (ii) wprowadzenie podstawników w części peryferyjnej

makrocykli, czyli w pozycjach β pierścieni pirolu lub do skondensowanych pierścieni benzenu. Początkowo większymi sukcesami kończyły się próby uzyskania związków o strukturze tetrabenzoporfiny (**IX**). Barrett, Linstead i Tuey opisali syntezę związku zbudowanego z czterech pierścieni pirolowych połączonych atomami azotu, z których jeden zastąpiono grupą metinową. Otrzymany związek nazwano tetrabenzotriazaporfiną (**X**), a następnie otrzymano jego kompleksy z jonami miedzi, magnezu, cynku i żelaza [29]. Dalsze badania doprowadziły do syntezy pochodnych ftalocyjanin zawierających trzy oraz cztery mostki metinowe zamiast grup azometinowych, a także ich kompleksów z jonami metali. Związkami tymi były odpowiednio tetrabenzomonoazaporfina (**XI**) oraz tetrabenzoporfina (**IX**) (Ryc. 4) [30-32]. Prowadzone równoległe próby uzyskania związku o strukturze niepodstawionej porfirazyny, kończyły się w tym okresie mniejszym powodzeniem. Otrzymano jedynie porfirazyny, zawierające w części peryferyjnej dodatkowe podstawniki. W 1937 roku Cook i Linstead opisali syntezę porfirazyny zawierającej 8 podstawników fenylowych w pozycjach β pierścieni pirolowych (**XII**) [33]. Jednocześnie w tym samym roku Fisher i Endermann przedstawili metodę otrzymywania porfirazyny, posiadającej w pozycjach β pierścieni pirolowych, po cztery podstawniki metylowe oraz etylowe, którą nazwali tetraimidoetioporfiryną (**XIII**). Sukces Fishera i Endermanna został doceniony także przez Linstead, który w późniejszym okresie podkreślał zasługi tego zespołu w rozwoju badań dotyczących porfirazyn [34]. Znacznie lepsze efekty przyniosły próby syntezy porfirazyn, podjęte już po II wojnie światowej. W 1952 roku Linstead i Whalley [35], opisali metodę otrzymywania niepodstawionej porfirazyny w reakcji maleonitrylu z propanolanem magnezu w propanolu. Metoda ta umożliwiła syntezę kolejnych porfirazyn przy wykorzystaniu pochodnych maleonitrylu. W kolejnych latach zsyntetyzowano porfirazyny z peryferyjnymi podstawnikami alicyklicznymi (**XIV**) [36] oraz alifatycznymi (**XV**) (Ryc. 4) [37,38].



Ryc. 4. Struktury związków makrocyklicznych: tetrabenzoporfina (**IX**), tetrabenzotriazaporfina (**X**), tetrabenzomonoazaporfina (**XI**), oktafenyloporfirazyna (**XII**), tetraimidioetioporfiryna (**XIII**), tetracykloheksenoporfirazyna (**XIV**), oktametyloporfirazyna (**XV**).

Linstead i wsp. [35,36] poddali otrzymane barwniki porfirazynowe badaniom określającym właściwości spektralne, które porównano z wynikami uzyskanymi dla porfiryn i ftalocyjanin. Stwierdzono, że w zakresie światła widzialnego demetalowane porfiryny i azaporfiryny o nieskomplikowanej strukturze, posiadają pasmo absorpcji w zakresie 500-620 nm, określane jako pasmo Q. Natomiast obecność skondensowanych pierścieni benzenu w strukturze ftalocyjanin, a także innych skondensowanych pierścieni, warunkuje absorpcję światła o długości fali nawet do 700 nm. Zauważono, że intensywność absorpcji promieniowania wzrasta, jeżeli w cząsteczkach porfiryn mostki metinowe, zastępowane są grupami azometinowymi. Ponadto w widmie absorpcji porfiryn można zaobserwować pasmo krótkofalowe, z maksimum długości fali ok. 400 nm, określane jako pasmo Soreta. W przypadku azaporfiryn pasmo to posiada maksimum absorpcji przy ok. 340 nm. Wyjątkowo intensywna absorpcja promieniowania z zakresu UV-Vis, w połączeniu ze szczególną trwałością ftalocyjanin, umożliwiła ich wykorzystanie w przemyśle jako barwników. Modyfikacja struktury ftalocyjanin polegająca na wprowadzeniu

odpowiednich podstawników, wpłynęła na rozpuszczalność w wodzie i umożliwiła zastosowanie do barwienia tkanin oraz papieru [34].

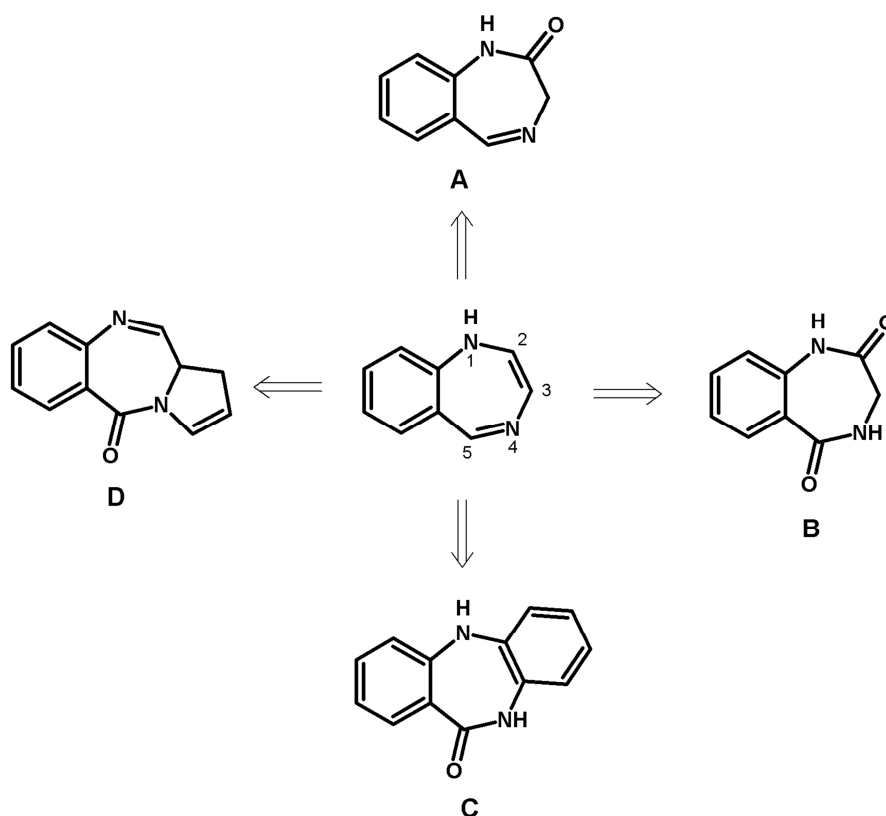
Ze względu na przedstawione powyżej właściwości, ftalocyjaniny już przed II wojną światową, były szeroko wykorzystywane w przemyśle. Największym zastosowaniem cieszyła się ftalocyjanina miedzi(II), wprowadzona do handlu w 1936 roku. Stwierdzono, że wykazuje znacznie silniejsze właściwości barwiące niż stosowane wówczas niebieskie barwniki takie jak błękit pruski i ultramaryna, dlatego zaczęła zastępować je w wielu dziedzinach przemysłu. Szczególne zastosowanie znalazła przy produkcji tuszy drukarskich, farb, lakierów, emalii, jako barwnik malarski dla artystów oraz do barwienia tkanin, papieru, linoleum, gum i tworzyw sztucznych. Modyfikacja części peryferyjnej cząsteczki ftalocyjaniny miedzi(II) poprzez wprowadzenie od 14 do 16 atomów chloru, doprowadziła do otrzymania zielonych barwników użytecznych do wytwarzania tuszy, farb, lakierów, emalii oraz do barwienia tekstyliów, papieru, linoleum, gumy, a także jako barwniki używane przez artystów. Również demetalowana ftalocyjanina była wykorzystywana jako barwnik, jednak w mniejszym zakresie niż dwa poprzednie, szczególnie przy produkcji opakowań do żywności, gdzie zastosowanie barwnika miedziowego nie było wskazane, a także tuszy do barwienia papieru, tapet oraz gum. Ponadto sulfonowane ftalocyjaniny stosowano przy barwieniu bawełny, włókien zwierzęcych oraz innych tkanin, a także przy produkcji tuszy i różnych barwnych powłok [19]. Należy podkreślić, że Barnett w artykule opublikowanym w 1949 roku stwierdził, że otrzymanie ftalocyjanin było jednym z najważniejszych odkryć w dziedzinie barwników w poprzednich 25 latach, ponieważ związki te wykazywały znacznie lepsze właściwości kryjące niż ówczesnie stosowane barwniki i farby [39].

Obecnie porfiryny i ich azotowe analogi tworzą dużą grupę związków makrocyklicznych, które znajdują zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu m.in. przy produkcji barwników, farb drukowych, półprzewodników, katalizatorów, sensorów chemicznych, ogniw słonecznych oraz materiałów optycznych [40-42]. Makrocykle porfirynoidowe mogą służyć także jako związki budulcowe w chemii materiałowej i nanotechnologii, stwarzając tym samym niemal nieograniczone możliwości dalszych zastosowań [43]. Porfirynoidy cieszą się również rosnącym zainteresowaniem z uwagi na możliwość zastosowania w medycynie, szczególnie w terapii fotodynamicznej i diagnostyce fotodynamicznej [2,6,7]. Porfirynoidy są również wykorzystywane jako modele związków naturalnych o udowodnionej aktywności biologicznej, takich jak hem, chlorofil, witamina B12 oraz cytochrom c [44,45].

III. 2. Porfirazyny diazepinowe jako związki o obiecujących właściwościach fotouczulających

Pierścień 1,4-diazepiny stanowi element struktury wielu związków chemicznych o różnej budowie i aktywności biologicznej. Również wiele substancji leczniczych zawiera w strukturze pierścień 1,4-diazepinowy, który zazwyczaj jest skondensowany z pierścieniem benzenu tworząc układ 1,4-benzodiazepinowy. Chociaż różnorodność struktury tych związków jest bardzo duża, większość można przypisać do jednej z czterech grup pochodnych – Ryc. 5:

- A. 1,4-benzodiazepin-2-onu,
- B. 1,4-benzodiazepino-2,5-dionu,
- C. dibenzodiazepinonu,
- D. pirolobenzodiazepin.

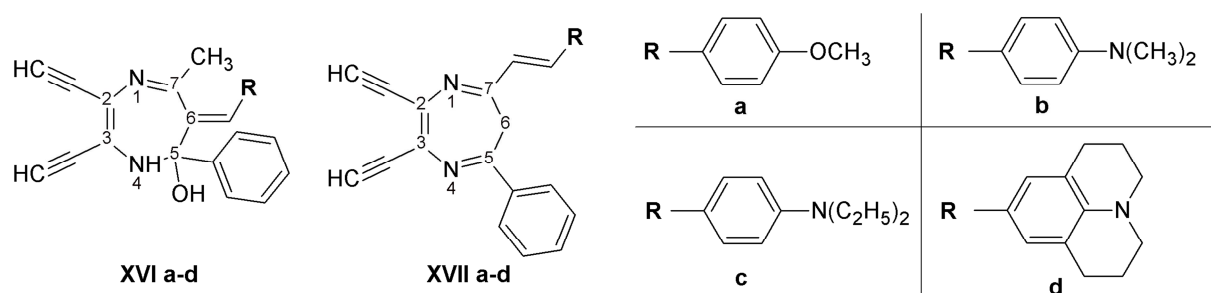


Ryc. 5. Struktury pochodnych 1,4-benzodiazepiny: 1,4-benzodiazepin-2-on (A), 1,4-benzodiazepino-2,5-dion (B), dibenzodiazepinon (C) oraz pirolobenzodiazepina (D).

Pochodne 1,4-benzodiazepin-2-onu stanowią najliczniejszą grupę, do której należy ok. 50 substancji leczniczych o działaniu przeciwlękowym i uspokajającym oraz stosowanych w leczeniu bezsenności, padaczki, a także łagodzeniu objawów odstawiennych w alkoholizmie. Najbardziej znanym przedstawicielem 1,4-benzodiazepin-2-onów jest diazepam [46-48]. W grupie pochodnych 1,4-benzodiazepino-2,5-dionów, znajdują się również związki wykazujące powinowactwo do receptora GABA_A [49]. Ponadto niektóre 1,4-benzodiazepino-2,5-diony hamują interakcje pomiędzy białkami MDM2 (*ang. murine double minute 2*) i p53. W komórkach nowotworowych często obserwuje się inaktywację białka p53, które jest czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym za zabezpieczenie komórek przed zmianami w genomie, poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego i indukcję apoptozy. Zaobserwowano, że zahamowanie aktywności białka p53 w komórkach nowotworowych, może być związane ze zwiększoną aktywnością białek regulatorowych, w tym MDM2, które jest głównym, negatywnym regulatorem białka p53. Z tego powodu hamowanie interakcji pomiędzy tymi białkami, uważa się za obiecującą strategię w leczeniu nowotworów [50-52]. Laudini i wsp. [53] zsyntetyzowali 1,4-benzodiazepino-2,5-diony będące inhibitorami deacetylaz histonów. Zmiany w budowie i ekspresji tych enzymów są związane z patogenezą nowotworów, dlatego inhibitory deacetylaz histonów są uważane za obiecującą klasę nowych chemioterapeutyków. Otrzymano również pochodne 1,4-benzodiazepino-2,5-dionów, które dzięki selektywnej aktywności względem limfocytów T, mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu niektórych chorób autoimmunologicznych np. toczenia rumieniowatego [54]. Ponadto, cyklopenina, naturalny alkaloid o strukturze 1,4-benzodiazepino-2,5-dionu, wyizolowana z pędzłaka *Penicillium cyclopium*, jest produktem pośrednim w biosyntezie wiridikatyny, inhibitora replikacji wirusa HIV [55,56]. Niektóre związki z kolejnej grupy, pochodnych dibenzodiazepinonów, posiadają działanie antagonistyczne do receptorów muskarynowych [57]. Ponadto naturalnie występujący dibenzodiazepinon TLN-4601, wyizolowany z bakterii rodzaju *Micromonospora* wykazał działanie antyproliferacyjne *in vitro*, względem wielu różnych linii komórek nowotworowych, w tym płuc, prostaty, piersi, nerek oraz okrężnicy, a także czerniaka i białaczki. Dodatkowo badania *in vivo* potwierdziły aktywność względem wszczepionym myszom nowotworom centralnego układu nerwowego [58,59]. Ostatnią grupę 1,4-benzodiazepin stanowią pirolobenzodiazepiny, które cieszą się rosnącym zainteresowaniem z uwagi na obiecującą aktywność przeciwnowotworową, wynikającą z alkilowania specyficznych sekwencji DNA. Biosynteza naturalnych pirolobenzodiazepin wytwarzanych przez bakterie z rodzaju *Micrococcus* i *Streptomyces*, a także metody uzyskiwania ich syntetycznych pochodnych

wraz z oceną aktywności biologicznej, zostały podsumowane w artykule przeglądowym przez B. Gerratana [46]. Otrzymano również pochodne benzodiazepin, w których pierścień benzenu jest zastępowany innym pierścieniem aromatycznym. Huang i wsp. [60] przeprowadzili syntezę serii pochodnych 1,4-tienodiazepino-2,5-dionu o obiecujących właściwościach biologicznych, wynikających z hamowania interakcji pomiędzy białkami p53 i MDM2, która może prowadzić do aktywacji szlaku p53 i tym samym zahamowania procesu nowotworowego. Uzyskano również 1,4-diazepino-2,4-diony i 1,4-diazepino-2,4,6-triony, posiadające skondensowane pierścienie pirymidyny [61]. Natomiast Eweas i wsp. [62] otrzymali 1,4-diazepiny, 1,4-benzodiazepiny oraz 1,4-pirydodiazepiny posiadające podstawniki 8-hydroksychinolinolosulfanylowe, które wykazały aktywność przeciw przywrom *Schistosoma mansoni*. Ponadto opracowano syntezę analogów zasad azotowych nukleotydów, zawierających układ 1,3-imidazodiazepin-4,8-dionu i potwierdzono ich działanie przeciwko wirusom zapalenia wątroby typu B i C (HBV, HCV). Niektóre z nich wykazały również obiecującą aktywność względem wirusa HIV [63-65].

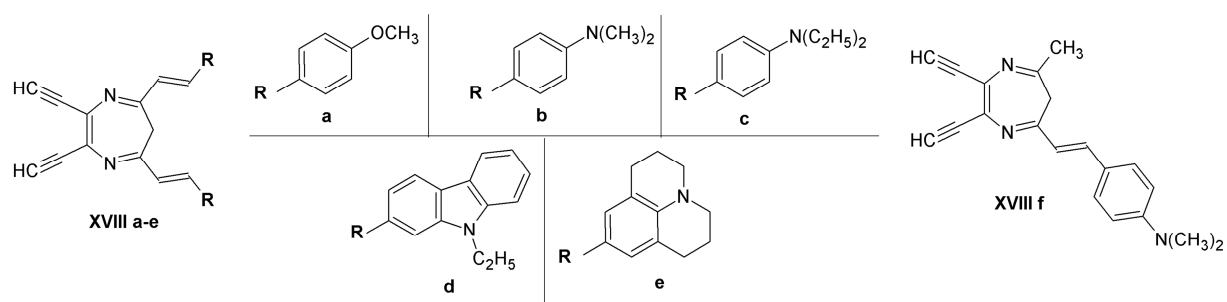
Horiguchi i wsp. [66] otrzymali serię nowych barwników fluorescencyjnych poprzez kondensację 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryli lub ich prekursorów z aldehydami aromatycznymi. Uzyskane barwniki charakteryzują się pofałdowaną strukturą przestrzenną pierścienia 1,4-diazepinowego oraz układem wielu sprzężonych wiązań nienasyconych, przez co wykazują specyficzne właściwości absorpcyjne i emisyjne. Zsyntetyzowane związki można podzielić na dwie grupy: pochodne zawierające nienasycony podstawnik w pozycji C6 pierścienia diazepinowego (**XVIa-d**) oraz związki zawierające nienasycony podstawnik etenylowy w pozycji C7 (**XVIIa-d**) (Ryc. 6).



Ryc. 6. Struktury pochodnych 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryli **XVIa-d**, **XVIIa-d**.

Określono właściwości spektralne otrzymanych barwników (**XVIa-d**, **XVIIa-d**). Zaobserwowano, że 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryle z nienasyconym podstawnikiem w pozycji C6 (**XVIa-d**), posiadają pasma absorpcji wykazujące maksima w zakresie długości fal 447-555 nm oraz emisji z maksimami w przedziale 512-613 nm. Zauważono również,

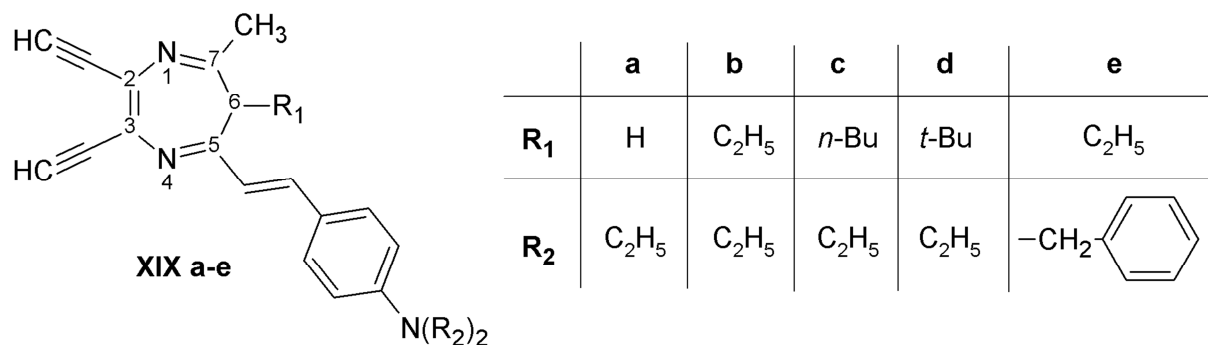
że maksima absorpcji i emisji tych związków zależą od rodzaju podstawnika w pozycji *para* pierścienia fenyłowego, wchodzącego w skład ugrupowania przy atomie węgla C6 diazepiny. Wraz ze wzrostem właściwości donorowych tego podstawnika, pasma absorpcji i emisji ulegają przesunięciu w kierunku fal dłuższych. Analogiczne właściwości spektralne stwierdzono w przypadku 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryli, zawierających podstawnik etenylowy w pozycji C7 pierścienia diazepiny (**XVIIa-d**), jednak przesunięcia Stokesa posiadały znacznie większe wartości. Na przykład 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryl z grupą metoksyową w pierścieniu fenyłowym (**XVIIa**), wykazywał maksimum absorpcji przy $\lambda=410$ nm, natomiast maksimum emisji przy $\lambda=511$ nm. Analog posiadający podstawnik julolidynowy (**XVIIId**), absorbował i emitował promieniowanie wykazujące λ_{\max} , odpowiednio 541 nm i 649 nm. Duża różnica wartości przesunięcia Stokesa sugeruje, że pochodne podstawione w pozycji C6 (**XVIIa-d**), tracą więcej energii w stanie wzbudzonym. Wyznaczono również wartości molowych współczynników absorpcji (ϵ) zsyntetyzowanych barwników. Zaobserwowano, że większe wartości ϵ posiadają związki zawierające nienasycony podstawnik w pozycji C6 pierścienia diazepiny (**XVIa-d**). Horiguchi i wsp. stwierdzili, że struktura tych związków jest bardziej płaska i sztywna niż barwników z nienasyconym podstawnikiem w pozycji C7 (**XVIIa-d**), które charakteryzują się niższymi wartościami ϵ [66]. W dalszych badaniach prowadzonych przez ten sam zespół, zsyntetyzowano 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryle, zawierające dwa podstawniki etenylowe w pozycjach C5 i C7 pierścienia diazepinowego (**XVIIIa-e**) (Ryc. 7). W celu określenia wpływu drugiego nienasyconego podstawnika na właściwości spektralne otrzymanych barwników, porównano widma UV-Vis dwóch 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryli, zawierających odpowiednio jedną (**XVIIIf**) oraz dwie (**XVIIIc**) grupy 4-dietyloaminostyrylowe (Ryc.7). Widmo UV-Vis związku **XVIIIc** zawierającego dwa podstawniki 4-dietyloaminostyrylowe, wykazało rozszczepienie pasma absorpcji Q na trzy sub-pasma, czego nie obserwowano w odniesieniu do pochodnej z jedną grupą styrylową (**XVIIIf**).



Ryc. 7. Struktury pochodnych 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryli **XVIIIa-f**.

Optymalizacja struktury obu 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryli (**XVIIIc**, **XVIIIf**) wraz z obliczeniami metodą modelowania molekularnego wykazała, że absorpcja promieniowania przez barwnik **XVIIIf**, zawierający jeden podstawnik styrylowy, jest związana z przejściem elektronowym pomiędzy orbitalami HOMO (*ang. Highest Occupied Molecular Orbital*) i LUMO (*ang. Lowest Unoccupied Molecular Orbital*). Natomiast rozszczenie pasma absorpcji w przypadku związku **XVIIIc**, wynika z występowania trzech przejść elektronowych (HOMO–LUMO, HOMO₁–LUMO i NHOMO (*ang. Next Highest Occupied Molecular Orbital*)–LUMO). Ponadto przeprowadzono badania rentgenograficzne 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitrylu **XVIIIc**, które wykazały pofałdowaną strukturę pierścienia diazepinowego. Zaobserwowano również, że dwa podstawniki 4-dyetyloaminostyrylowe nie znajdują się w jednej płaszczyźnie, a analiza oddziaływań międzycząsteczkowych potwierdziła wzajemne nakładanie się jedynie pierścieni fenyłowych sąsiadujących cząsteczek. Odległość pomiędzy warstwami cząsteczek wynikająca ze sposobu upakowania sugeruje, że nie ma wzajemnego, silnego oddziaływania π - π . Otrzymane wyniki dowiodły, że pofałdowana struktura pochodnych bisstyrylodiazepinowych, uniemożliwia silne oddziaływania π - π pomiędzy cząsteczkami, zapobiegając wygaszaniu fluorescencji w fazie stałej [67].

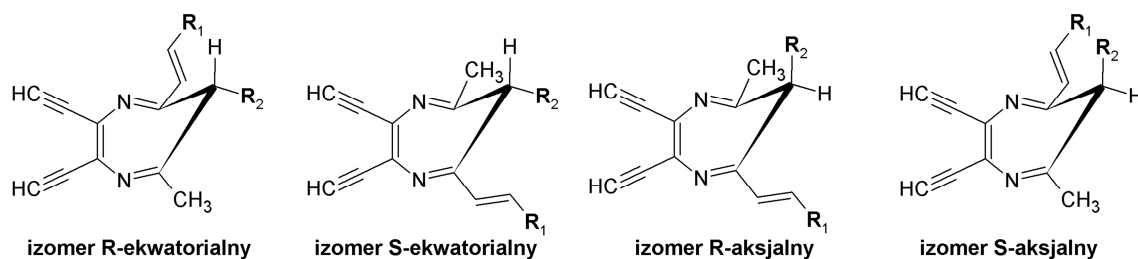
Podczas kolejnych prac dotyczących 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryli Horiguchi i wsp. [68], zsyntetyzowali serię związków zawierających podstawnik styrylowy w pozycji C5 pierścienia diazepiny oraz różne podstawniki w pozycji C6 (**XIXa-e**) (Ryc. 8).



Ryc. 8. Struktury pochodnych 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryli **XIXa-e**.

Otrzymane związki poddano badaniom spektralnym obejmującym ocenę właściwości absorpcyjnych i emisyjnych, które określono po rozpuszczeniu badanych barwników w chloroformie, a także w postaci cienkich warstw uzyskanych metodą osadzania z fazy gazowej (*ang. vapour-deposited thin films*). W przypadku roztworów chloroformowych

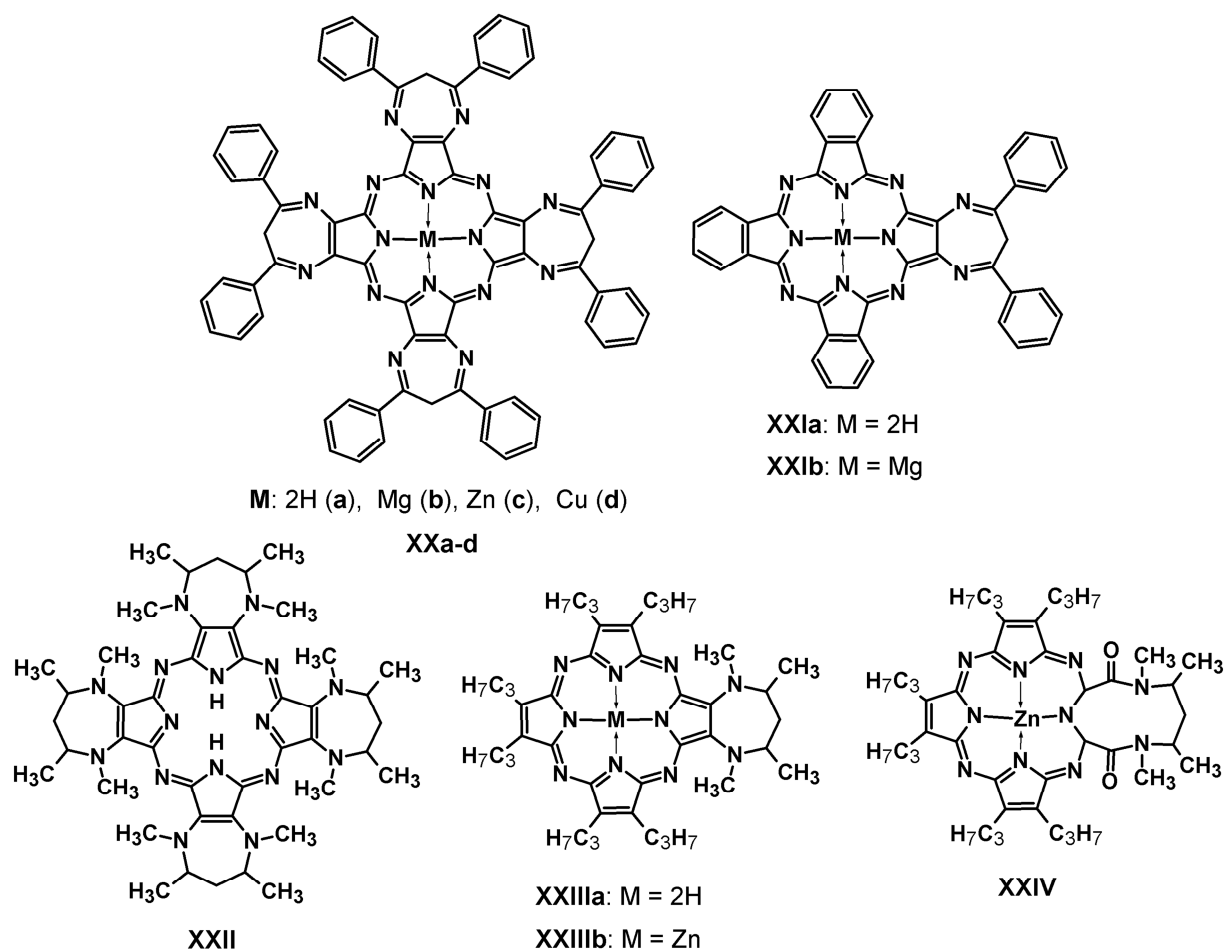
1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryli, nie zaobserwowano dużego wpływu podstawników w pozycji C6 diazepiny, na położenie pasm absorpcji i emisji. Związki **XIXa-c** i **XIXe** posiadały maksima absorpcji w zakresie długości fal 479-498 nm oraz maksima emisji w przedziale 586-608 nm. Jedynie barwnik z podstawnikiem *tert*-butylowym w pozycji C6 pierścienia diazepinowego (**XIXd**), wykazywał wyraźnie batochromowo przesunięte pasma absorpcji i emisji, z maksimami przy długości fali odpowiednio 514 nm i 632 nm. Zaobserwowano, że podstawniki w pozycji C6 pierścienia diazepiny, powodują obniżenie intensywności fluorescencji związków **XIXa-e** w roztworach chloroformowych. 1,4-Diazepino-2,3-dikarbonitryl **XIXa**, niezawierający podstawnika w pozycji C6, wykazywał zdecydowanie najsilniejszą fluorescencję, natomiast analog **XIXd** posiadający rozbudowany przestrzennie podstawnik *tert*-butylowy, najsłabszą. Natomiast maksima pasm absorpcji i emisji związków **XIXa-e**, analizowanych w postaci cienkich filmów, wynosiły odpowiednio 493-551 nm i 640-682 nm i były zdecydowanie przesunięte w kierunku fal dłuższych, w porównaniu z wartościami uzyskanymi dla roztworów. Również intensywność fluorescencji barwników w postaci cienkich warstw, znacząco różniła się od uzyskanej dla roztworów chloroformowych, a obecność podstawników w pozycji C6 diazepiny, wyraźnie zwiększała jej wartość. Zastosowany w formie cienkiej warstwy, niepodstawiony w pozycji C6 związek **XIXa**, posiadał najsłabszą fluorescencję, natomiast cienka warstwa barwnika **XIXc** z podstawnikiem *n*-butylowym w pozycji C6, najsilniejszą. Stwierdzono, że zaobserwowane zmiany w intensywności fluorescencji, są wynikiem oddziaływań międzycząsteczkowych w fazie stałej. Zależności te potwierdziła analiza rentgenostrukturalna, która wykazała, że cząsteczki **XIXa** tworzą ściśle przylegające pary, ułożone jedna nad drugą, umożliwiając nakładanie się chromoforów. Stwierdzono, że oddziaływania międzycząsteczkowe pomiędzy chromoforami powodują wygaszanie fluorescencji i są odpowiedzialne za najniższą intensywność emisji związku **XIXa**. W przypadku pozostałych 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryli obecność podstawników w pozycji C6 pierścienia diazepinowego, uniemożliwia podobne ułożenie, co zmniejsza oddziaływania międzycząsteczkowe i zapobiega wygaszaniu fluorescencji. Zaobserwowano również, że podstawniki w pozycji C6 mogą przyjmować pozycję aksjalną lub ekwatorialną, prowadząc do powstania izomerów, które można rozróżnić metodą NMR. Ponadto związki te ze względu na obecność asymetrycznego atomu węgla, występują w formie izomerów optycznych R i S, których właściwości absorpcyjne i emisyjne są jednakowe (Ryc. 9).



Ryc. 9. Możliwe izomery 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryli **XIXa-e**; R₁, R₂ jak na Ryc. 8.

Widma NMR potwierdziły, że związki **XIXa-c** i **XIXe** występują w roztworze jedynie w postaci izomerów ekwatorialnych. Ponadto analiza rentgenostrukturalna wykazała obecność ekwatorialnych izomerów R i S. Natomiast **XIXd**, ze względu na oddziaływanie steryczne grupy *tert*-butylowej z podstawnikami w pozycji C5 i C7, występuje w formie izomeru aksjalnego. Z obliczeń wykonanych metodą modelowania molekularnego wynika, że izomery aksjalne wykazują batochromowe przesunięcie pasm absorpcji o ok. 10-20 nm, w porównaniu do izomerów ekwatorialnych. Horiguchi i wsp. stwierdzili, że obliczenia te wyjaśniają zaobserwowane przesunięcia maksimum absorpcji 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitrylu **XIXd**, w kierunku fal dłuższych względem innych analogów, ponieważ jako jedyny posiada podstawnik w pozycji aksjalnej [68].

Ponad dziesięć lat temu zespół badawczy Ercolani i Stuzhina [69,70], przedstawili syntezę i właściwości nowej klasy porfirazyn, posiadających peryferyjnie skondensowane pierścienie 1,4-diazepinowe. Stwierdzono, że pierścień 1,4-diazepiny, zawierający 6 π -elektronów, sprzężonych z rdzeniem porfirazyny niepodstawionej w części centralnej lub zawierającej różne kationy metali, występuje w stabilnej formie *6H*-tautomerycznej. Natomiast kompleksy porfirazyn diazepinowych z jonami manganu i litu istnieją w formie tautomerów *1H*. Szczególne zainteresowanie badaczy wzbudziły oddziaływania pomiędzy płaskim rdzeniem porfirazyny oraz rozbudowanym przestrzennie pierścieniem diazepiny. Udział pierścieni diazepinowych w delokalizacji elektronów w rdzeniu makrocyklicznym, potwierdziła analiza profilu widm UV-Vis. Zaobserwowano również, że widma absorpcji kompleksów porfirazyny **XX** z jonami metali (**XXa-d**), wykonane w rozpuszczalnikach o różnych właściwościach kwasowo-zasadowych, wykazują szerokie pasmo Q rozszczerzone na dwa sub-pasma, w zakresie długości fal 630-640 nm oraz 660-680 nm (Ryc. 10) [69,71].

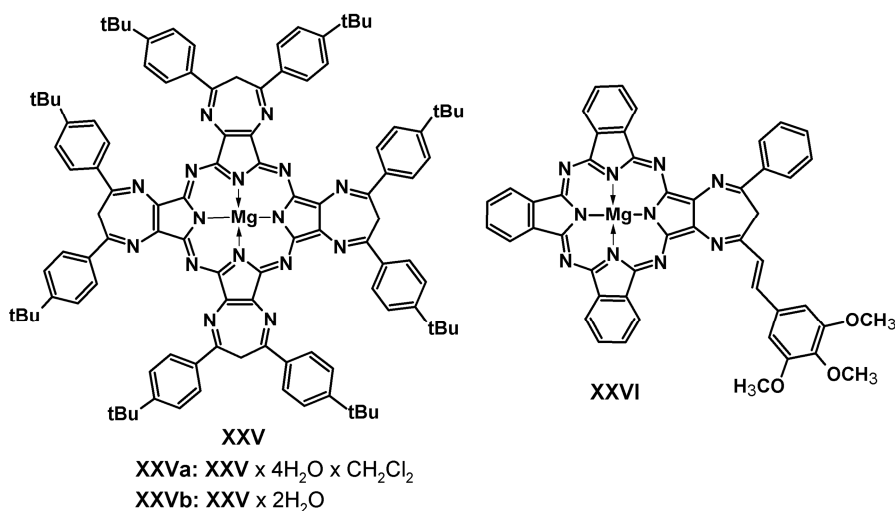


Ryc. 10. Struktury związków makrocyklicznych **XX – XXIV**.

Ponieważ większość obecnie stosowanych fotouczulaczy posiada pasmo absorpcji Q w zakresie 630-650 nm, kluczową właściwością uwzględnianą w badaniach dotyczących nowych związków użytecznych w terapii fotodynamicznej, jest absorpcja światła o długości fali powyżej 650 nm. Jest to uzasadnione zdolnością przenikania tkanek przez światło, jak wiadomo promieniowanie o większej długości fali przenika tkanki na większą głębokość, co umożliwia naświetlenie zmian nowotworowych znajdujących się w głębszych warstwach skóry i błon śluzowych. Donzello i wsp. [72] otrzymali tribenzoporfirazyne zawierające skondensowany pierścień 6*H*-1,4-diazepinowy (**XXIa**, **XXIb**), których widma UV-Vis charakteryzują się szerokim rozszczepionym pasmem Q, przesuniętym jeszcze bardziej w kierunku długofalowym niż w przypadku kompleksów jonów metali z symetryczną porfirazyną **XX** (Ryc. 10). Demetalowana tribenzoporfirazyne **XXIa** posiada trzy sub-pasma absorpcji w zakresie 620-630 nm, 670-680 nm i 705-715 nm, wynikające z rozszczepienia pasma Q, natomiast pochodna magnezowa **XXIb** dwa sub-pasma w obszarze 650-660 nm i 690-700 nm. Baum i wsp. [73] przedstawili syntezę oraz właściwości fotochemiczne

tetrahydrodiazepinoporfirazyny (**XXII**), niesymetrycznych porfirazyn (**XXIIIa**, **XXIIIb**) oraz *seco*-porfirazyny (**XXIV**) (Ryc. 10). Wykonano widma UV-Vis otrzymanych związków makrocyklicznych w dichlorometanie. Porfirazyna **XXII**, zawierająca skondensowane pierścienie tetrahydrodiazepinowe, wykazała szerokie pasmo Q z maksimum absorpcji przy 551 nm. W przypadku niesymetrycznej porfirazyny magnezowej **XXIIIb**, zaobserwowano szerokie rozszczerzone pasmo Q z dwoma maksimumami absorpcji przy 596 nm i 648 nm. Natomiast *seco*-porfirazyna **XXIV** posiadała w obszarze pasma Q dwa wyraźnie wykształcone sub-pasma z maksimumami odpowiednio przy 559 nm i 644 nm. Autorzy sugerują, że poszerzenie pasma Q zaobserwowane dla makrocykli **XXII** i **XXIIIb**, jest spowodowane oddziaływaniem wolnych par elektronowych atomów azotu pierścieni diazepinowych, z elektronami rdzenia makrocyklicznego. Ponadto zaobserwowano, że utlenienie pierścienia diazepinowego prowadzące do powstania *seco*-porfirazyny **XXIV**, powoduje zniesienie oddziaływania wolnych par elektronowych atomów azotu z elektronami rdzenia makrocyklicznego, co prowadzi do zmiany profilu pasma Q. Dodatkowo, *seco*-porfirazyna **XXIV** wykazuje najwyższą podawaną w piśmiennictwie dla tej grupy porfirazyn, wartość wydajności kwantowej generowania tlenu singletowego wynoszącą 0,74. Tarakanov i wsp. [74] opisali syntezę porfirazyny posiadającej skondensowane pierścienie diazepinowe z podstawnikami *tert*-butylofenyłowymi (**XXV**) (Ryc. 11). Autorzy udowodnili, że otrzymana porfirazyna istnieje w postaci kompleksów z cząsteczkami wody. Przy wykorzystaniu chromatografii kolumnowej wyizolowano dwa kompleksy porfirazyny **XXV**: jeden zawierający cztery cząsteczki wody (**XXVa**) oraz drugi, powstający w mniejszej ilości, z dwiema cząsteczkami wody (**XXVb**). W dalszych badaniach uwagę skupiono na kompleksie **XXVa**. Określono właściwości absorpcyjne porfirazyny **XXVa** w różnych rozpuszczalnikach tj. w DMF, DMSO, THF, dichlorometanie i pirydynie. Wykonano również widma ^1H NMR w deuterowanych odpowiednikach wymienionych rozpuszczalników. Widma UV-Vis porfirazyny **XXVa** wykazały silną zależność od rodzaju rozpuszczalnika. W DMF i DMSO zaobserwowano pojedyncze, intensywne pasmo absorpcji w obszarze długofalowym, natomiast w pozostałych rozpuszczalnikach pasmo Q było rozszczerzone na dwa sub-pasma. Autorzy przypisali zaobserwowane zmiany obecności dwóch form porfirazyny **XXVa**, monomerycznej i dimerycznej. Wykazano, że forma monomeryczna występuje w rozcieńczonych rozpuszczalnikach aprotycznych, takich jak DMF i DMSO, a w roztworach stężonych tych rozpuszczalników występują obie formy, monomeryczna i dimeryczna. Natomiast w dichlorometanie, benzenie, tetrahydrofuranie i pirydynie, porfirazyna **XXVa** istnieje w formie dimerycznej. Ponadto zaobserwowano, że dodatek wody

lub metanolu do rozcieńzonego roztworu DMSO, wywołuje dimeryzację rozpuszczonej porfirazyny. Stwierdzono, że proces dimeryzacji zachodzi w wyniku tworzenia wiązań wodorowych, pomiędzy atomami azotu pierścieni diazepinowych sąsiadujących cząsteczek porfirazyn, w których udział biorą cząsteczki wody i rozpuszczalnika. Obecność formy monomerycznej i dimerycznej porfirazyny **XXVa**, została potwierdzona w badaniach z wykorzystaniem magnetycznego rezonansu jądrowego. Natomiast dla kompleksu **XXVb**, o mniejszej zawartości wody, przeprowadzono jedynie wstępną ocenę właściwości spektralnych. Zaobserwowano, że **XXVb** istnieje najczęściej w formie monomerycznej, lecz w odpowiednich warunkach również może ulegać procesowi dimeryzacji [74].

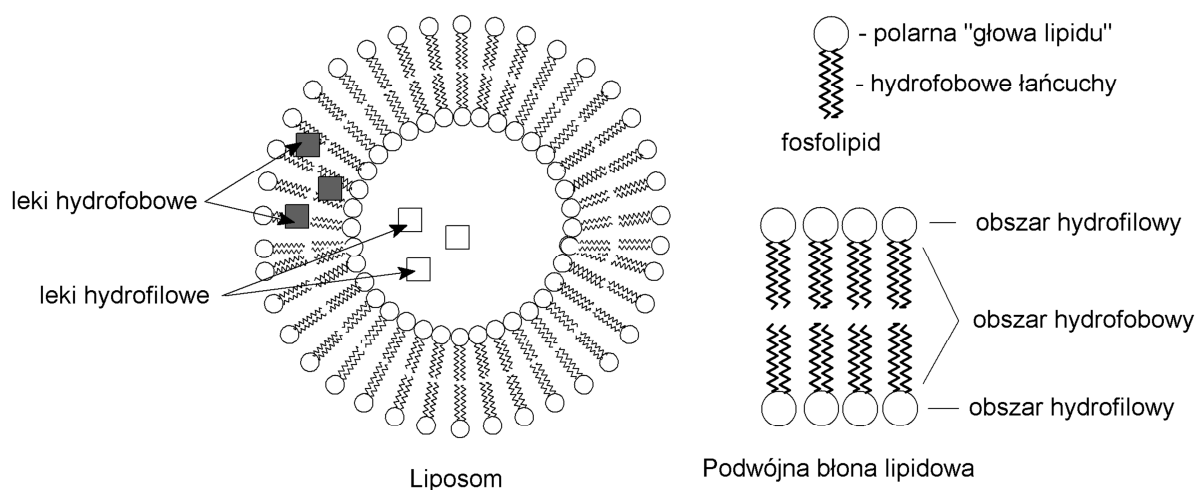


Ryc. 11. Struktury związków makrocyklicznych **XXV**, **XXVI**.

Badania w dziedzinie syntezy porfirazyn diazepinowych są również prowadzone w Katedrze i Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu przez Goślińskiego i wsp. [75]. Autorzy opracowali metodę otrzymywania nowej grupy porfirazyn diazepinowych, posiadających rozbudowane podstawniki w pozycjach C5 i C7 pierścienia diazepiny. Zsyntetyzowano tribenzoporfirazynę magnezową **XXVI** (Ryc. 11), posiadającą skondensowany pierścień diazepinowy sprzężony z grupą styrylową. Uzyskana pochodna wykazała interesujące właściwości spektroskopowe, w tym rozszczenie pasma Q na trzy sub-pasma z maksimum absorpcji w zakresie 645-660 nm, 670-680 nm oraz 690-700 nm, w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika. Określono również w jaki sposób właściwości rozpuszczalników, takie jak współczynnik załamania światła i moment dipolowy, wpływają na położenie poszczególnych składowych pasma Q.

III. 3. Liposomy jako nośniki fotouczulaczy stosowanych w terapii fotodynamicznej

Liposomy są to sztucznie otrzymane, sferyczne cząstki o wielkości ok. 20–1000 nm, składające się z podwójnej warstwy fosfolipidów otaczającej wodne środowisko rdzenia liposomu. Fosfolipidy będące podstawowym budulcem liposomów, składają się z dwóch obszarów: hydrofilowego nazywanego „głową liposomu”, oraz hydrofobowego, który stanowią długie łańcuchy węglowodorowe. Duża różnorodność fosfolipidów, zarówno pochodzenia naturalnego jak i syntetycznego, stosowanych do otrzymywania liposomów sprawia, że mogą się znacząco różnić wielkością, kształtem oraz właściwościami. Ze względu na unikalną budowę oraz właściwości, w tym możliwość wbudowywania zarówno związków hydrofilowych, jak i hydrofobowych oraz duże podobieństwo do organelli błonowych występujących w organizmach żywych, są one często stosowane jako nośniki substancji leczniczych. Związki o charakterze hydrofilowym po inkorporowaniu w liposomy są rozpuszczone w wodnym środowisku rdzenia, natomiast substancje hydrofobowe wbudowują się w hydrofobowy obszar błony lipidowej (Ryc. 12) [76].



Ryc. 12. Budowa liposomu.

Wprowadzenie do leczenia Visudyne, pierwszego preparatu zawierającego fotouczulacz w postaci liposomalnej, zwiększyło zainteresowanie inkorporacją innych fotosensybilizatorów w liposomy. Wykazano, że inkorporacja liposomalna znanych fotouczulaczy o wysokiej lipofilności takich jak temoporfiryne oraz ftalocyjanina cynkowa, doprowadziła do poprawy ich właściwości fizykochemicznych, w tym obniżenia tendencji do agregacji i zwiększenia rozpuszczalności w wodzie. Ponadto przyczynia się do lepszego wchłaniania przez komórki oraz poprawia selektywność kumulacji w tkance nowotworowej, co prowadzi do zwiększenia skuteczności fotouczulaczy oraz zmniejszenia uszkodzenia

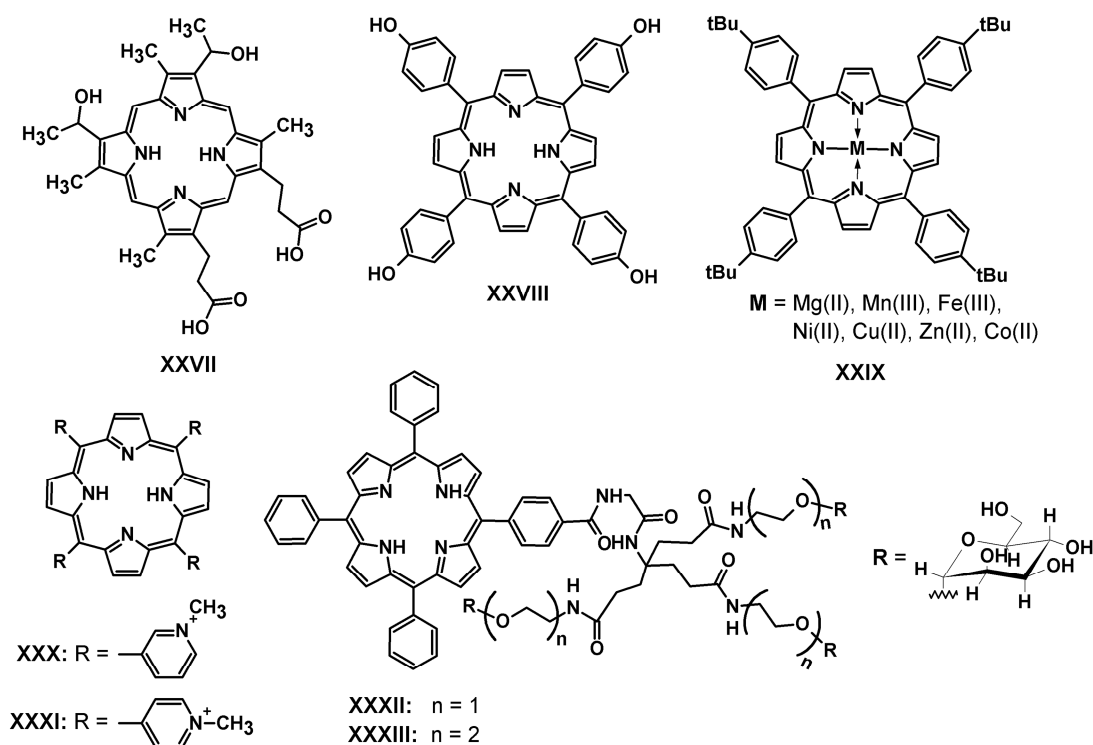
otaczających tkanek. Liposomy wykorzystuje się również jako nośniki dla fotouczulaczy o charakterze hydrofilowym, szczególnie kwasu 5-aminolewulinowego (*ang. 5-aminolevulinic acid, ALA*). ALA jest prometabolitem, ulegającym w organizmie przekształceniu do Protoporfiryny IX, będącej właściwym fotouczulaczem. Zaobserwowano, że wbudowanie w liposomy hydrofilowego kwasu 5-aminolewulinowego, zwiększa jego przenikalność przez skórę, poprawia selektywność kumulacji w tkance docelowej oraz wzmacnia aktywność fotodynamiczną. Ponadto umożliwia obniżenie wymaganej dawki terapeutycznej, a także znacząco zmniejsza częstotliwość występowania efektów niepożądanych [15,77]. Wykorzystanie liposomów jako nośników przyczyniło się również do opracowania wielu nowych porfirynoidów o potencjalnym zastosowaniu w terapii fotodynamicznej, których użyteczność w formie wolnej, nieinkorporowanej w liposomy byłaby bardzo ograniczona.

Obecnie prowadzone prace dotyczą formułacji liposomalnych dla nowych związków makrocyklicznych, wykazujących obiecujące właściwości fotouczulające, w tym porfiryn, porfirazyn, ftalocyjanin oraz chloryn.

III. 3. 1. Liposomalne formułacje porfiryn

Zdecydowanie najwięcej przeprowadzonych dotychczas badań, w dziedzinie formułacji liposomalnych dla związków makrocyklicznych, dotyczy porfiryn. Grupa badawcza z Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem Nowakowskiej, określiła zależność pomiędzy strukturą oraz właściwościami fizycznymi liposomów, a ich zdolnością do wiązania porfiryn. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem hematoporfiryny (**XXVII**) i 5,10,15,20-tetrakis(4-hydroksyfenylo)porfiryny (**XXVIII**). Przygotowano liposomy na bazie fosfatydylocholiny, zawierające wbudowane związki **XXVII** i **XXVIII**, natomiast różniące się zastosowanymi lipidami takimi jak: cholesterol, kwas oleinowy, oleinian metylu oraz lipidy pegylowane, (Ryc. 13). Zaobserwowano, że dodatek cholesterolu obniża zdolność wiązania błony lipidowej z porfirynami **XXVII** i **XXVIII**, podczas gdy zastosowanie oleinianu metylu lub lipidów pegylowanych, powodował wzrost stałych wiązania obu porfiryn z liposomami. Ponadto stwierdzono, że objętość podwójnej warstwy lipidowej ma większy wpływ na zdolność wiązania porfiryn niż jej hydrofobowość. Wyniki wskazują, że odpowiednia konstrukcja błony lipidowej, jest niezbędna do skutecznego wiązania oraz kumulacji badanych substancji w liposomach [78]. Man i wsp. [79] przygotowali liposomy zbudowane z lecytyny jaja kurzego

oraz dipalmitoilofosfatydylocholiny (DPPC), zawierające inkorporowane porfiryny. Wykorzystano 5,10,15,20-tetrakis(4-*tert*-butylofenylo)porfiryne (**XXIX**) oraz jej kompleksy z jonami Mg(II), Mn(III), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II). Następnie przy zastosowaniu spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego zbadano różnice w strukturze poszczególnych liposomów. Wykazano, że regularnie zorganizowana struktura podwójnej błony lipidowej, może zostać zaburzona przez cząsteczki zdolne do jej penetracji, a ułożenie składników błony jest wynikiem właściwości stereochemicznych, takich jak zawada przestrzenna, struktura molekularna oraz oddziaływania elektrostatyczne. Niektóre porfiryny po wbudowaniu w błonę lipidową, wykazują skłonność do przemieszczania się i samoczynnej organizacji w większe struktury. Zjawisko to ma duże znaczenie, ponieważ zakłócenie dobrze zorganizowanej struktury lipidowej błon komórkowych, może w znaczący sposób wpłynąć na funkcje całej komórki. Kontrolowane zmiany przepuszczalności błon komórkowych mogą mieć duże znaczenie w medycynie, szczególnie w leczeniu nowotworów, ze względu na skłonność wielu porfiryn do selektywnej kumulacji w komórkach nowotworowych. Engelmann i wsp. [80] zbadali wpływ struktury kationowych porfiryn na zdolność wiązania z liposomami oraz mitochondriami. W tym celu wykorzystano kationowe porfiryny posiadające w pozycjach *mezo* podstawniki 3-N-metylopirydyniowe (**XXX**) lub 4-N-metylopirydyniowe (**XXXI**), a także porfiryny amfifilowe, zawierające oba podstawniki oraz grupy fenyłowe (Ryc. 13). Wyznaczono stałe wiązania porfiryn z liposomami zbudowanymi z 1,2-distearoilo-sn-glicero-3-fosfocholiny (DSPC) i kardiolipiny, a także mitochondriami izolowanymi z wątroby szczurów. Otrzymane wyniki wykazały, że stałe wiązania porfiryn z liposomami oraz mitochondriami, są odwrotnie proporcjonalne do polarności badanych makrocykli, wyrażonej przez współczynnik podziału logP. Jednak zależność ta nie jest spełniona dla porfiryn amfifilowych, które wiążą się z liposomami i mitochondriami w większym stopniu niż wynika to z obliczeń na podstawie wartości logP, co wskazuje na obecność dodatkowych, bardziej specyficznych oddziaływań [80]. Przeprowadzono również ocenę interakcji liposomów zbudowanych z dimirytoilofosfatydylocholiny (DMPC), z dwiema glikodendrymerycznymi fenyloporfirydami (**XXXII**, **XXXIII**) (Ryc. 13). Zaobserwowano, że porfiryda **XXXIII**, posiadająca dłuższy łańcuch łączący część cukrową z pierścieniem makrocyklicznym, wykazuje większe powinowactwo do fosfolipidów błony liposomów i wnika w jej strukturę, a część cukrowa wystaje na zewnątrz oddziałując z otaczającym środowiskiem wodnym [81].

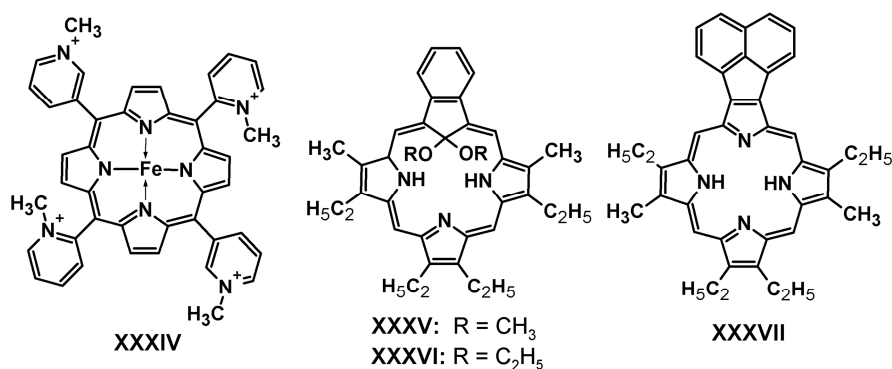


Ryc. 13. Struktury związków makrocyklicznych XXVII–XXXIII.

Wspomniani wcześniej zespół autorów Nowakowska i wsp., przeprowadził również badania oceniające możliwość zwiększenia rozpuszczalności 5,10,15,20-tetrakis-(4-hydroksyfenylo)porfiryny (XXVIII) w wodzie (Ryc. 13). W tym celu porównano rozpuszczalność XXVIII, po inkorporacji w sterycznie stabilizowane liposomy oraz po modyfikacji peryferyjnej polimerami polietylenoglikolu (PEG). Analiza widm absorpcji i emisji porfiryny XXVIII w stanie wolnym oraz w postaci liposomalnej i pegylowanej, umożliwiła przedstawienie wniosków, że inkorporacja liposomalna przeciwdziała agregacji porfiryny, natomiast modyfikacja polimerami PEG₂₀₀₀ jedynie redukuje ten proces. Ponadto sprawdzono aktywność fotodynamiczną otrzymanych połączeń względem dwóch linii komórek nowotworowych, raka okrężnicy HTC 116 oraz raka gruczołu krokowego DU 145 i porównano z aktywnością wolnej porfiryny rozpuszczonej w DMSO. Zaobserwowano, że obydwa przygotowane systemy dostarczania porfiryny XXVIII, umożliwiły jej wychwytywanie przez komórki nowotworowe oraz obniżyły cytotoksyczność bez dostępu światła. Ponadto liposomalna postać fotouczulacza wykazała większą aktywność fotodynamiczną od formy pegylowanej, jednak najwyższą aktywność uzyskano dla wolnej postaci porfiryny [82]. W kolejnych badaniach zmodyfikowano strukturę XXVIII, poprzez przyłączenie polimerów PEG o różnej masie cząsteczkowej. Następnie inkorporowano otrzymane połączenia w sterycznie stabilizowane liposomy i oceniono ich właściwości

fotofizyczne oraz cytotoksyczność, względem komórek nowotworowych HTC 116 i DU 145. Porfiryne zmodyfikowane polimerami PEG₂₀₀₀ wykazała najwyższy wychwyty przez komórki nowotworowe oraz najwyższą cytotoksyczność, jednak inkorporacja otrzymanego połączenia **XXVIII**-PEG₂₀₀₀ w liposomy, spowodowała obniżenie zarówno kumulacji **XXVIII** w komórkach, jak i cytotoksyczności. Jednocześnie liposomalna postać **XXVIII**-PEG₂₀₀₀, charakteryzowała się najwyższym stopniem indukcji apoptozy spośród ocenianych postaci fotouczulaczy. Ponadto zaobserwowano, że modyfikacja **XXVIII** poprzez przyłączenie polimerów PEG₂₀₀₀ oraz inkorporację liposomalną, wpływa na rozmieszczenie porfiryne wewnątrz komórek. Badanie lokalizacji wewnątrzkomórkowej przeprowadzono wykorzystując komórki raka okrężnicy HTC-116, po wybarwieniu poszczególnych organeli komórkowych odpowiednimi markerami fluorescencyjnymi. Obserwacja fluorescencji przy wykorzystaniu mikroskopu konfokalnego wykazała, że wolna postać **XXVIII** ulega kumulacji w całej komórce, a w szczególności w mitochondriach, retikulum endoplazmatycznym, aparacie Golgiego, lizosomach oraz błonie komórkowej. Połączenie **XXVIII**-PEG₂₀₀₀ również kumuluje się w strukturach błoniastych komórki takich jak mitochondria, retikulum endoplazmatyczne, aparat Golgiego i lizosomy, podczas gdy związek w postaci liposomalnej ulega wybiórczej kumulacji w lizosomach [83]. Hiraka i wsp. [84] opracowali liposomy wrażliwe na środowisko kwasowe, zawierające porfiryne żelazową (**XXXIV**), naśladującą dysmutazę ponadtlenkową (*ang. superoxide dismutase*, SOD). SOD jest enzymem katalizującym reakcję dysproporcjonowania (dysmutacji), anionorodnika ponadtlenkowego (O₂⁻) do nadtlenu wodoru oraz tlenu. Komórki nowotworowe ze względu na wysoki poziom przemian metabolicznych oraz często obserwowaną niską aktywność SOD, mają dużą zawartość O₂⁻. Wyniki badań sugerują, że naśladowanie dysmutazy ponadtlenkowej przez porfiryne żelazową, powoduje przemianę nagromadzonego w komórkach nowotworowych O₂⁻, do nadtlenu wodoru oraz powstającego w wyniku jego rozkładu rodnika hydroksylowego (·OH), który powoduje uszkodzenie DNA oraz śmierć komórki [84,85]. Dowiedziono także, że liposomy składające się z 1,2-dimirystoil-3-sn-glicero-3-fosfatydylocholiny, bromku dimetyloditetradecylammoniumowego, oleinianu sodu oraz Tweenu 80, uwalniały porfiryne pod wpływem kwasowego środowiska endosomów. Proces ten zachodził po wchłonięciu liposomów przez komórkę na drodze endocytozy, dzięki czemu porfiryne dostawały się do wnętrza komórki. Uzyskane wyniki są bardzo obiecujące i wskazują, że porfiryne posiadające aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, inkorporowane w liposomy wrażliwe na środowisko kwasowe, są potencjalnymi kandydatami do zastosowania w terapii fotodynamicznej [84].

Taylor i wsp. [86] opracowali liposomalną postać karbaporfiryn, pochodnych porfiryn zawierających podstawiony ketalami pierścień indolu w miejscu pierścienia pirolu (**XXXV**, **XXXVI**) (Ryc. 14) i ocenili ich skuteczność przeciwko różnym gatunkom pierwotniaków *Leishmania*. Wykazano, że inkorporacja w liposomy zwiększyła aktywność fotodynamiczną badanych porfiryn, względem *L. amazonensis* oraz *L. panamensis*, jednak nie wpłynęła w znaczący sposób na *L. infantum*. Ponadto badania przeprowadzone z wykorzystaniem ludzkiej monocytarnej linii komórkowej U937 wykazały, że inkorporacja liposomalna obniża toksyczność badanych związków względem komórek ssaków. Gardner i wsp. [87] przygotowali formułacje liposomalne trzech pochodnych porfiryn, posiadających pierścienie acenaftylenowe skondensowane z pierścieniami pirolu rdzenia makrocyklicznego, tzw. acenaftylenoporfiryn. Związki te wykazują korzystne właściwości spektralne, wysoką zdolność generowania tlenu singletowego i posiadają obiecujące właściwości przeciwko pierwotniakom wywołującym leishmaniozy. Jednak ze względu na wysoką hydrofobowość wymagają zastosowania odpowiednich nośników, zwiększających ich rozpuszczalność w środowisku wodnym. Spośród badanych związków porfiryra zawierająca jeden pierścień acenaftylenowy (**XXXVII**), wykazała najwyższą zdolność wiązania z liposomami zbudowanymi z DMPC oraz składającymi się z DMPC, cholesterolu oraz distearoilofosfatydyloglicerolu (DSPG) (Ryc. 14).

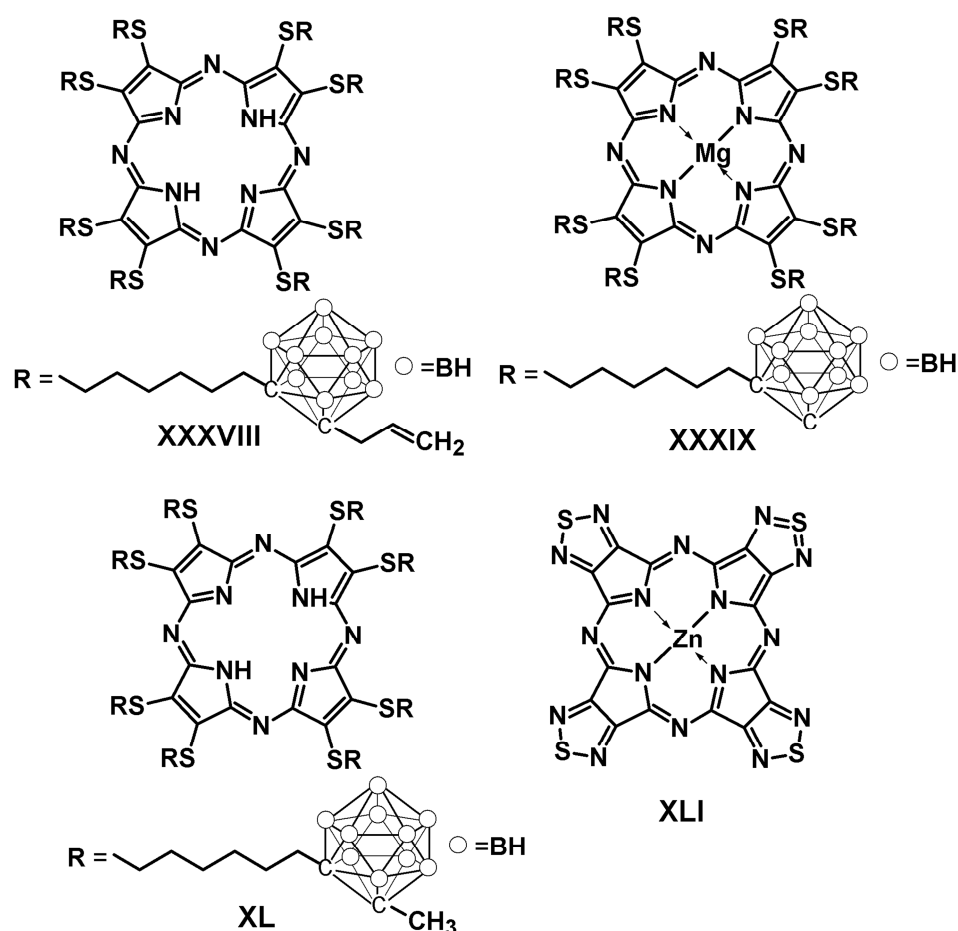


Ryc. 14. Struktury związków makrocyklicznych **XXXIV–XXXVII**.

Badania z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej potwierdziły, że otrzymane liposomy skutecznie transportują wbudowane porfiryny do promastigot *L. tarantolae*. Ponadto badania *in vitro* wykazały fotocytotoksyczność opracowanych liposomalnych postaci porfiryn, przeciwko pierwotniakom *L. panamensis*. Zaobserwowano większą aktywność uzyskanych liposomów po naświetleniu, niż bez dostępu światła. Dodatkowo okazały się one skuteczniejsze niż antymonian megluminy, lek stosowany przeciwko leishmaniozie [87].

III. 3. 2. Liposomalne formułacje porfirazyn

Dotychczas w literaturze znajduje się tylko kilka doniesień dotyczących liposomalnych formułacji porfirazyn. Są to badania prowadzone przez włoską grupę Ricciardi'ego, która opracowała syntezę porfirazyn zawierających podstawniki polikarboranylowe, z przeznaczeniem zastosowania w PDT oraz w terapii boronowo neutronowej (*ang. Boron Neutron Capture Therapy*, BNCT) [88]. BNCT jest innowacyjną formą radioterapii, polegającą na zastosowaniu związków zawierających izotopy boru ^{10}B , które nie wykazują naturalnej promieniotwórczości, ale pod wpływem wiązki neutronów ulegają rozpadowi promieniotwórczemu. Powstałe w wyniku tego procesu jony litu oraz cząstki *alfa* wykazują wysoki liniowy transfer energii, a ich oddziaływanie jest ograniczone do obszaru odpowiadającego pojedynczej komórce. Z tego względu terapia BNCT umożliwia selektywne niszczenie komórek nowotworowych, które wchłonęły atomy ^{10}B [89]. W pierwszym etapie prac zespół Ricciardi'ego otrzymał demetalowaną porfirazynę zawierającą podstawniki polikarboranylowe (**XXXVIII**), którą wbudowano w liposomy składające się z 1,2-dioleoilu-sn-glicero-fosfocholiny (DOPC) oraz 1,2-dioleoilu-sn-glicero-fosfoetanolaminy (DOPE) (Ryc. 15). Właściwości uzyskanych liposomów oceniono przy wykorzystaniu metod spektrofotometrycznych, dynamicznego rozpraszania światła (DLS) oraz małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego (SAXS). Wyniki badań eksperymentalnych, jak również rezultaty obliczeń wykorzystujących teorię funkcjonałów gęstości (DFT), potwierdziły oddziaływanie pomiędzy otrzymanym związkiem makrocyklicznym oraz lipidowymi składnikami liposomów. Badania wykazały obiecujące właściwości liposomów jako nośników porfirazyn [90]. W kolejnym etapie prac przeprowadzono enkapsulację liposomalną demetalowanej porfirazyny **XXXVIII** w liposomy o różnym ładunku tj. kationowe, anionowe oraz liposomy dipolarne (*ang. zwitterionic liposomes*), obdarzone zarówno ładunkiem dodatnim, jak i ujemnym. Najwyższą zawartość porfirazyny zaobserwowano w przypadku liposomów dipolarnych zbudowanych z DOPC i DOPE [91]. Następnie zsyntetyzowano magnezową porfirazynę z podstawnikami polikarboranylowymi (**XXXIX**), którą poddano inkorporacji w trzy rodzaje liposomów składających się z chlorku N-[1-(2,3-dioleoiloksy)propylo]-N,N,N-trimetyloamoniowego i dioleoilu-sn-glicero-3-fosfoetanolaminy (DOTAP/DOPE), 1,2-dioleoilu-sn-glicero-3-fosforanu i dioleoilu-sn-glicero-3-fosfoetanolaminy (DOPA/DOPE) oraz 1,2-dioleoilu-sn-glicero-3-fosfocholiny i dioleoilu-sn-glicero-3-fosfoetanolaminy (DOPC/DOPE), posiadające różny ładunek [92].



Ryc. 15. Struktury związków makrocyklicznych XXXVIII–XLI.

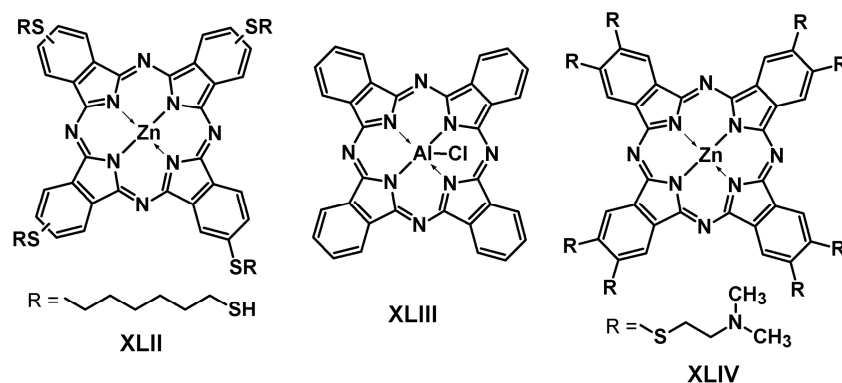
W kolejnych badaniach sprawdzono skuteczność liposomów jako nośników związków boronowych dla potrzeb BNCT, wykorzystując dwa związki karboranylowe, o-closo-karboranylo β-laktozyd (*closo* – kompletny deltahedron) i 1-metylo-o-closo-karboranylo-2-heksyloporfirazynę (XL) oraz liposomy o różnym ładunku powierzchniowym. Badania przeprowadzono na komórkach szczurzej linii nowotworu okrężnicy DHD/K12/TRb oraz komórkach czerniaka mysiego B16-F10, wykorzystywanych do badań kumulacji w komórkach nowotworowych standardowych leków stosowanych w BNCT, w tym borofenyloalaniny. Pomiar przy użyciu spektrometrii *alfa* wykazały, że zastosowanie kationowych liposomów (DOTAP/DOPC/DOPE) zawierających związki karboranylowe, zwiększa ponad 30-krotnie stężenie boru w komórkach, w porównaniu do kompleksu borofenyloalaniny, standardowo używanego w BNCT. Ponadto nie zauważono, żadnych znaczących efektów ubocznych zastosowanych formułacji liposomalnych [93]. Innym przykładem liposomalnych formułacji porfirazyn są badania dotyczące tiadiazoloporfirazyn, przeprowadzone przez Donzello i wsp. [94]. Otrzymano serię kompleksów

tetrakis(tiadiazolo)porfirazyny z różnymi jonami metali, w tym Mg(II), Zn(II), Al(III), Ga(III), Cd(II), Cu(II), a także pochodną demetalowaną. Następnie określono właściwości spektralne otrzymanych porfirazyn oraz wydajność kwantową generowania tlenu singletowego. Ze względu na wysoką wartość wydajności kwantowej fluorescencji oraz generowania tlenu singletowego, tiadiazoloporfirazynę cynkową **XLI**, w dalszych badaniach poddano inkorporacji w liposomy zbudowane z fosfatydylocholiny (Ryc. 15). Pomiary absorpcji oraz emisji otrzymanych liposomów wykazały wysoką, ponad 40-procentową, wydajność inkorporowania badanego makrocyklu w formie monomerycznej, co ma istotne znaczenie dla zachowania jego właściwości.

III. 3.3. Liposomalne formulacje ftalocyjanin

Liposomy wykorzystuje się również jako nośniki dla ftalocyjanin wykazujących obiecujące właściwości fotouczulające, przede wszystkim w celu zwiększenia rozpuszczalności w środowisku wodnym, co znacznie lepiej rokuje zastosowanie w terapii fotodynamicznej. Nombona i wsp. [95] porównali skuteczność nanocząstek złota oraz liposomów na bazie lecytyny żółtek jaj, jako systemów dostarczania ftalocyjaniny **XLII**, względem ludzkiego złośliwego nowotworu piersi MCF-7 (Ryc. 16). Wykazano, że oba zastosowane systemy dostarczania ftalocyjaniny **XLII** spowodowały poprawę jej aktywności fotodynamicznej, jednak formuacja liposomalna wykazała wyższą fotocytotoksyczność. Longo i wsp. [96] określili aktywność fotodynamiczną ftalocyjaniny chloroglinowej (**XLIII**), inkorporowanej w liposomy zbudowane z DMPC, względem mysiego nowotworu języka. Badanie przeprowadzono na 16 myszach z wywołanym nowotworem, podzielonych na 4 grupy, w tym trzy kontrolne: (i) z nowotworem nieleczonym, (ii) poddaną jedynie naświetlaniu nowotworu oraz (iii) której wstrzyknięto w okolice guza liposomalną postać **XLIII**, nie stosując naświetlania. Natomiast czwarta tzw. grupa badawcza, została poddana terapii fotodynamicznej po uprzednim podaniu liposomów zawierających ftalocyjaninę **XLIII** oraz ekspozycji na promieniowanie o długości fali 670 nm. W tej grupie zaobserwowano 90% nekrozy nowotworów, wynikającej zarówno z bezpośredniej cytotoksyczności, jak i uszkodzenia naczyń krwionośnych. Natomiast w grupie kontrolnej, której podano liposomy z **XLIII**, stwierdzono jedynie 15% nekrozy. W dalszych badaniach Longo i wsp. [97] zastosowali dodatkowo naładowane liposomy zawierające ftalocyjaninę chloroglinową **XLIII**, w celu eradykacji bakterii próchnicy. Liposomalna formuacja ftalocyjaniny **XLIII** wykazała *in vitro* 82% redukcji żywotności

bakterii wywołujących próchnicę. Natomiast nie zaobserwowano aktywności względem linii komórkowych ludzkich komórek miazgi zębowej oraz mysich fibroblastów, co sugeruje brak szkodliwości względem komórek jamy ustnej. Ponadto badania kliniczne aktywności fotodynamicznej liposomalnej formy **XLIII**, wykazały jej aktywność przeciwbakteryjną oraz brak efektów niepożądanych w trakcie leczenia oraz po przeprowadzonej terapii fotodynamicznej.

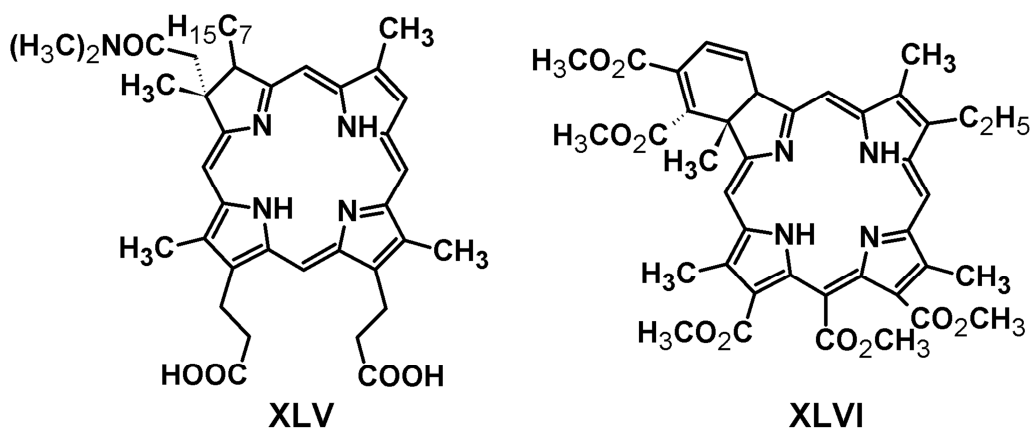


Ryc. 16. Struktury związków makrocyklicznych **XLII–XLIV**.

Vittar i wsp. [98] przygotowali dwa rodzaje liposomów jako systemy dostarczania 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis[(N,N-dimetylamino)etylosulfanylo]ftalocyjaniny cynku(II) (**XLIV**) (Ryc. 16). Pierwsze liposomy składały się z dipalmitoilofosfatydyloetanolaminy i cholesterolu, natomiast drugie były zbudowane z DMPC i cholesterolu. Przeprowadzono badania stopnia wchłaniania ftalocyjaniny **XLIV** inkorporowanej w liposomy, przez ludzkie komórki nowotworu piersi MCF-7c3. Zaobserwowano lepsze wchłanianie w przypadku liposomów zawierających DMPC, dlatego zostały wybrane do dalszych badań dotyczących oceny aktywności fotodynamicznej *in vitro* względem komórek nowotworowych MCF-7c3. Uzyskano ok. 70% śmiertelności komórek przy stężeniu ftalocyjaniny 0,5 μM oraz ok. 100% dla stężenia 1,0 μM . Badanie lokalizacji wewnątrzkomórkowej DMPC-liposomów zawierających **XLIV**, wykazało również częściową kumulację ftalocyjaniny w lizosomach, których uszkodzenie po PDT może wywoływać apoptozę. Ponadto badania *in vivo* z wykorzystaniem gruczolakoraka LM2, wszczepionego podskórnie myszom Balb/c wykazały, że terapia jest dobrze tolerowana i nie powoduje znaczących efektów ubocznych.

III. 3. 4. Liposomalne formułacje chloryn

W piśmiennictwie z okresu ostatnich pięciu lat, znaleziono jedynie dwa doniesienia dotyczące formułacji liposomalnych chloryn. Szurko i wsp. [99] przeprowadzili badania aktywności fotodynamicznej nowej chloryny (**XLV**), po wbudowaniu w liposomy składające się z fosfatydylocholiny i cholesterolu, względem komórek raka płuc Lewisa (LLC) (Ryc. 17). Wykazano, że inkorporacja w liposomy zredukowała żywotność komórek nowotworowych po terapii z 70,6% do 20,3%.



Ryc. 17. Struktury związków makrocyklicznych **XLV**–**XLVI**.

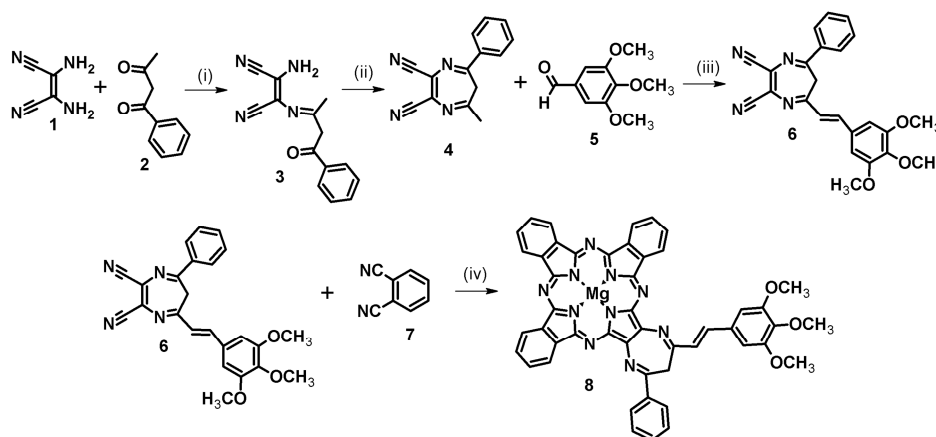
Natomiast Zhang i wsp. [100] przygotowali liposomy składające się z fosfatydyloglicerolu, DMPC oraz chloryny BCPD-18MA (**XLVI**) (Ryc. 17). Badania wchłaniania otrzymanej liposomalnej postaci chloryny wykazały, że posiada zdolność kumulacji w komórkach ludzkiego gruczolakoraka sutka MDA-MB-231, już w ciągu 4 godzin. Ponadto zastosowanie liposomów jako systemu dostarczania chloryny **XLVI**, spowodowało wzrost aktywności fotodynamicznej, jednocześnie obniżając toksyczność w ciemności.

IV. WYNIKI I DYSKUSJA

IV. 1. Synteza porfirazyn z peryferyjnymi skondensowanymi ugrupowaniami styrylodiazepinowymi

IV. 1. 1. Synteza tribenzoporfirazyny ze skondensowanym ugrupowaniem styrylodiazepinowym

W pierwszym etapie pracy przeprowadzono syntezę tribenzoporfirazyny magnezowej (**8**), posiadającej skondensowany pierścień diazepinowy z jednym podstawnikiem styrylowym, zgodnie z opracowaną wcześniej procedurą (Schemat 1) [75]. W tym celu diaminomaleonitryl (**1**) został poddany dwuetapowej reakcji kondensacji z 1-fenylbutano-1,3-dionem (**2**), prowadzącej do otrzymania 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitrylu, podstawionego w pozycjach C5 i C7 pierścienia diazepiny, odpowiednio grupami fenylową i metylową (**4**). Otrzymany związek poddano reakcji z 3,4,5-trimetoksybenzaldehydem (**5**), w której uzyskano pochodną 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitrylu z podstawnikiem (2*E*)-(3,4,5-trimetoksyfenylo)etylowym (**6**), dostosowując procedurę Horiguchi i wsp. [66]. Następnie przeprowadzono reakcję mieszanej makrocyklizacji typu Linstead diazepiny **6** z 1,2-dicyjanobenzenem (**7**), otrzymując tribenzoporfirazynę ze skondensowanym pierścieniem styrylodiazepinowym **8** oraz ftalocyjaninę magnezową, jako uboczny produkt reakcji [35,75].

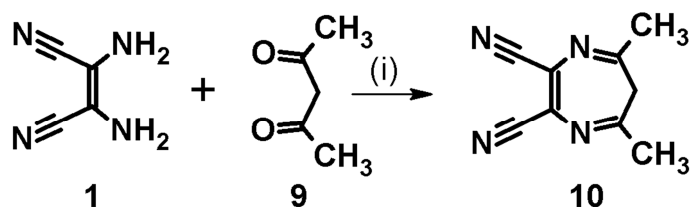


Schemat 1. Reagenty i warunki reakcji: (i) $(\text{COOH})_2$, benzen, temp. wrzenia, 3,5 godz. (ii) P_2O_5 , etanol, temp. wrzenia, 4 godz. (iii) piperodyna, benzen, temp. wrzenia, 24 godz. (iv) *n*-butanolan magnezu, *n*-butanol, temp. wrzenia, 17 godz.

Tribenzoporfirazyne **8** wyizolowano i oczyszczono chromatograficznie. W pierwszej kolejności przeprowadzono chromatografię kolumnową w normalnym układzie faz, używając jako fazy ruchomej mieszaniny dichlorometanu i metanolu, w stosunku objętościowym 50:1. Przemycanie kontynuowano do momentu usunięcia pozostałości nieprzereagowanego, żółtopomarańczowego substratu. Następnie wykorzystano fazę ruchomą o wzrastającej polarności, poprzez zwiększanie zawartości metanolu, stosując proporcje 35:1, a następnie 20:1. W celu oddzielenia pozostałości ftalocyjaniny magnezowej od tribenzoporfirazy **8**, zastosowano chromatografię w odwróconym układzie faz, wykorzystując mieszaninę metanolu i tetrahydrofuranu w stosunku objętościowym 20:1.

IV. 1. 2. Synteza porfirazyn posiadających skondensowane ugrupowania bisstyrylodiazepinowe

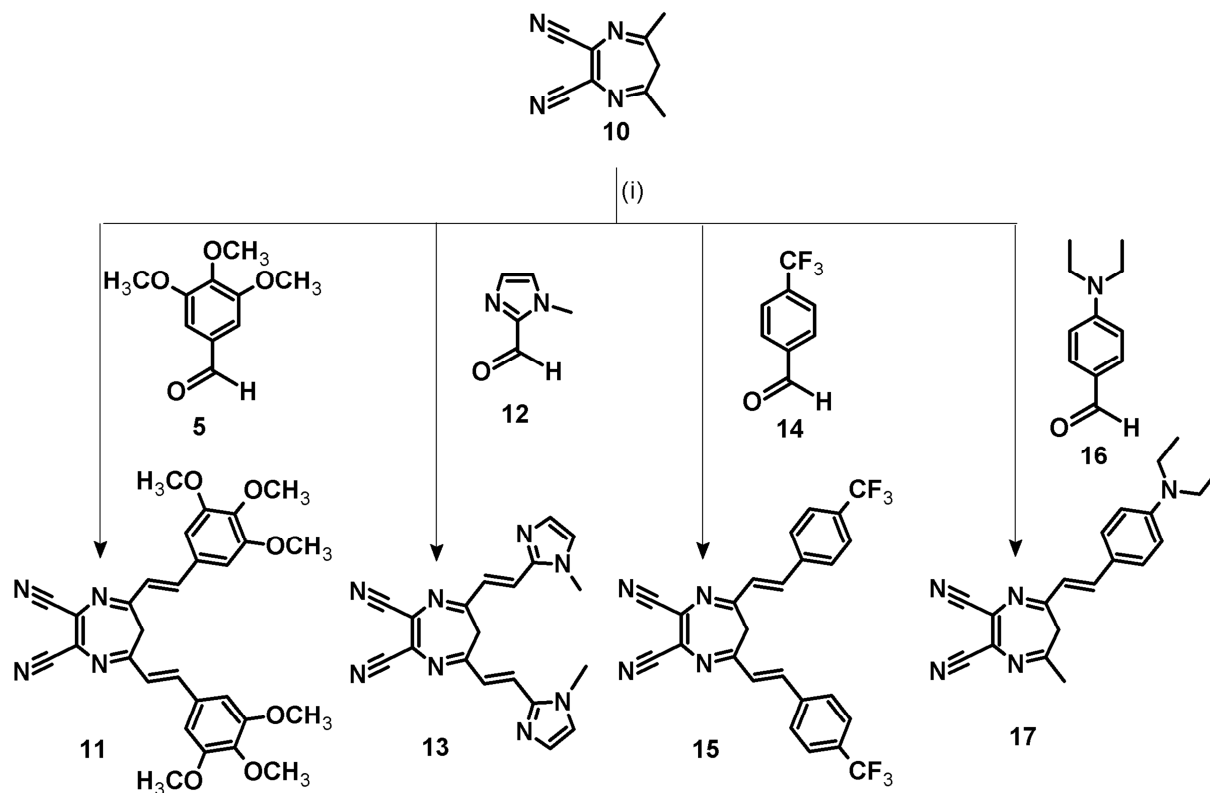
W kolejnym etapie pracy zaplanowano syntezę porfirazyn, posiadających skondensowane pierścienie diazepinowe z dwoma podstawnikami styryłowymi. W tym celu przeprowadzono syntezę 5,7-dimetylo-6*H*-1,4-diazepino-2,3-dikarbonitrylu (**10**) w reakcji diaminomaleonitrylu (**1**) z pentano-2,4-dionem (**9**) w benzenie, przy udziale kwasu szczawiowego, zgodnie z metodą literaturową (Schemat 2) [101].



Schemat 2. Reagenty i warunki reakcji: (i) (COOH)₂, benzen, temp. wrzenia, 5 godz.

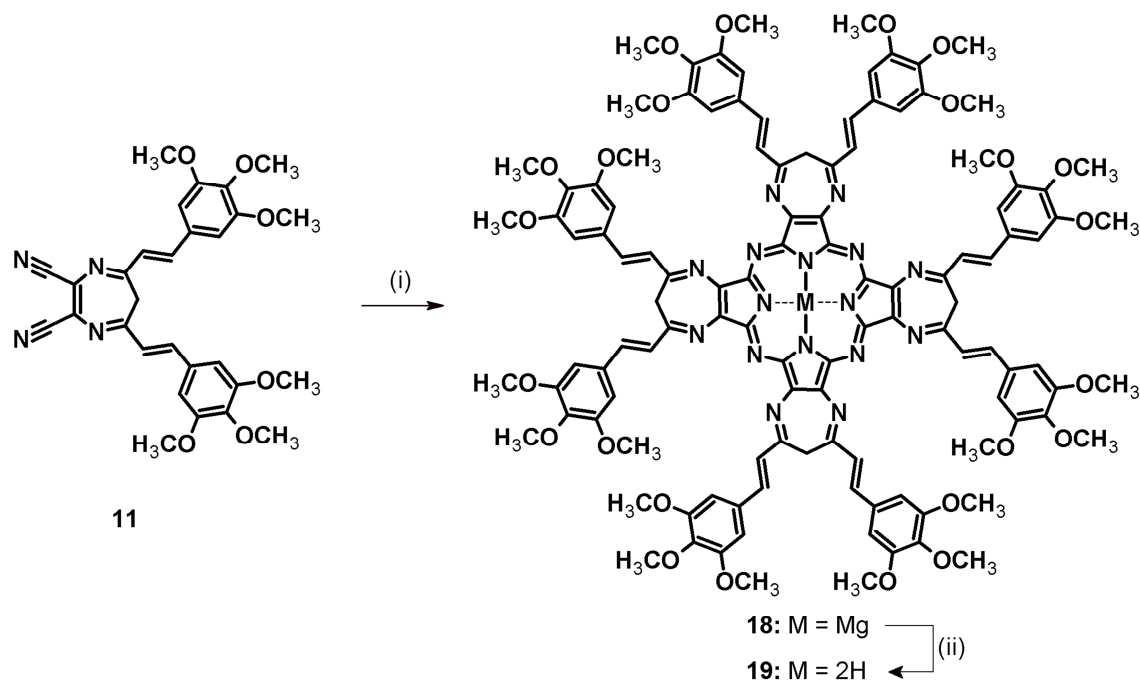
Otrzymany 5,7-dimetylo-6*H*-1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryl **10**, poddano reakcjom kondensacji z aldehydami aromatycznymi, prowadzącym do uzyskania nowych pochodnych 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryli, posiadających w pozycjach C5 i C7 pierścienia diazepiny dwa podstawniki styrylowe – Schemat 3. Reakcje przeprowadzono dostosowując warunki opracowane przez Horiguchi i wsp. [66,102]. Substraty reakcji kondensacji, 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryl **10** oraz 3,4,5-trimetoksybenzaldehyd (**5**) ogrzewano przez 7 godzin w benzenie w temperaturze wrzenia, w obecności katalitycznej ilości piperodyny. Otrzymany 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryl podstawiony w pozycjach C5 i C7 grupami (2*E*)-(3,4,5-trimetoksyfenylo)etylowymi (**11**), wyizolowano z mieszaniny poreakcyjnej

przy wykorzystaniu chromatografii kolumnowej z wydajnością 42%. Następnie otrzymany produkt wykryształizowano używając mieszaniny dichlorometanu i *n*-heksanu. W analogicznej reakcji 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitrylu **10** z 1-metyloimidazolo-2-karbaldehydem (**12**), prowadzonej w tych samych warunkach przez 6 godzin, otrzymano z wydajnością 78% 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryl podstawiony w pozycjach C5 i C7 grupami (2*E*)-(1-metylo-1*H*-imidazol-2-ilo)etenylowymi (**13**). Przeprowadzono również reakcję kondensacji związku **10** z 4-trifluorometylobenzaldehydem (**14**), mieszając substraty oraz katalityczną ilość piperydyny, w temperaturze wrzenia benzenu przez 15 godzin. Uzyskano 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryl posiadający dwie grupy (2*E*)-(4-trifluorometylofenylo)etenylowe (**15**) z 7% wydajnością. W tych samych warunkach przeprowadzono reakcję 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitrylu **10** z 4-dietyloaminobenzaldehydem (**16**), otrzymując z wydajnością 98% uprzednio zsyntetyzowany przez Horiguchi i wsp., produkt zawierający jedną grupę (2*E*)-(4-dietyloaminofenylo)etenylową (**17**) [66]. We wspomnianych wyżej warunkach reakcja nie prowadziła do produktu kondensacji 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitrylu **10** z dwoma cząsteczkami 4-dietyloaminobenzaldehydu (**16**), oczekiwanego ze względu na możliwość dalszego zastosowania w reakcji makrocyklizacji prowadzącej do uzyskania porfirazyny.



Schemat 3. Reagenty i warunki reakcji: (i) (COOH)₂, benzen, temp. wrzenia, 6–15 godz.

W kolejnym etapie pracy przeprowadzono reakcje makrocyklizacji otrzymanych 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryli **11**, **13** i **15**. Związek **11** poddano reakcji makrocyklizacji stosując warunki Linstead'a z wykorzystaniem *n*-butanolanu magnezu w *n*-butanolu [35]. W pierwszej kolejności przygotowano *n*-butolan magnezu ogrzewając przez 6 godzin opłki magnezu we wrzącym *n*-butanolu, w obecności katalitycznej ilości jodu. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano związek **11** i reakcję kontynuowano kolejne 20 godzin, ochłodzono i przesączono przez ziemię okrzemkową w celu usunięcia nieprzereagowanego magnezu. Po odparowaniu rozpuszczalnika suchą pozostałość oczyszczono chromatograficznie w normalnym układzie faz, używając jako fazy ruchomej mieszaniny dichlorometan–metanol (50:1 do 10:1) oraz w odwróconym układzie faz stosując mieszaninę metanol–tetrahydrofuran (20:1). Otrzymano porfirazynę magnezową posiadającą skondensowane pierścienie bisstyrylodiazepinowe (**18**) z 9% wydajnością, w postaci ciemnozielonego osadu (Schemat 4). W celu uzyskania porfirazyny pozbawionej jonu magnezu w centrum makrocyklicznym, porfirazynę **18** poddano reakcji demetalacji w środowisku kwasu trifluorooctowego, zgodnie z procedurami literaturowymi [103,104]. Po zakończeniu reakcji mieszaninę reakcyjną wylano do wody z lodem, zobojętniono nasyconym roztworem wodorowęglanu(IV) sodu, a następnie fazę organiczną wyekstrahowano dichlorometanem. Po odparowaniu rozpuszczalnika, suchą pozostałość oczyszczono chromatograficznie w normalnym układzie faz, stosując jako fazę ruchomą mieszaninę dichlorometan–metanol (50:1 do 20:1) oraz w układzie odwróconym przy użyciu mieszaniny metanol–tetrahydrofuran (25:1), uzyskując z wydajnością 14% demetalowaną porfirazynę **19** w postaci zielonoczarne osadu.

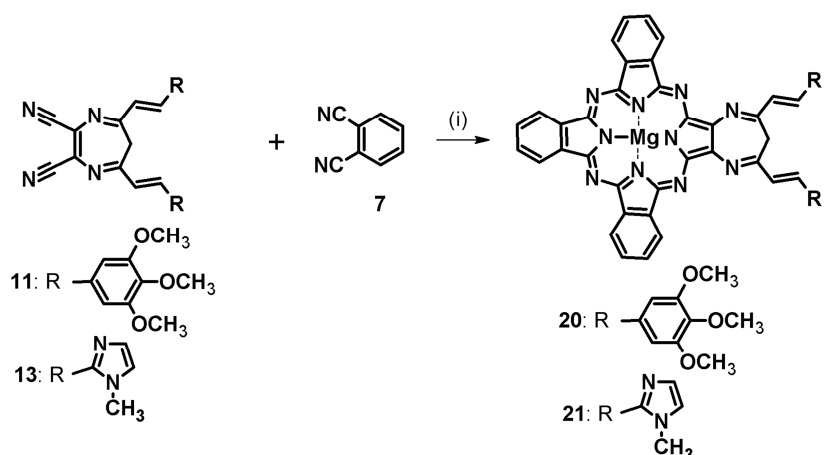


Schemat 4. Reagenty i warunki reakcji: (i) $(n\text{-BuO})_2\text{Mg}$, n -butanol, temp. wrzenia, 20 godz., (ii) CF_3COOH , temp. pok. 30 min.

Następnie przeprowadzono reakcje makrocyklizacji 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryli **13** i **15**, stosując warunki analogiczne jak w przypadku makrocyklizacji związku **11**. Jednak nie otrzymano oczekiwanych analogów magnezowej porfirazyny **18**. Podjęto również próby alternatywnych reakcji makrocyklizacji przy wykorzystaniu:

- (i) octanu cynku w pentanolu w obecności 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-enu (DBU) – synteza porfirazyn cynku(II) [105],
- (ii) dimetyloaminoetanolu – synteza porfirazyn demetalowanych [106].

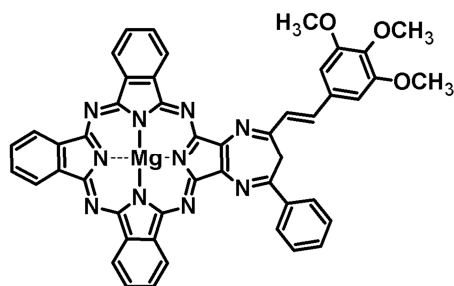
Powyższe próby reakcji makrocyklizacji nie doprowadziły do uzyskania kolejnych porfirazyn, zawierających cztery skondensowane pierścienie diazepinowe. Z tego względu zaplanowano syntezę tribenzoporfirazyn, zawierających jeden skondensowany pierścień diazepinowy. W tym celu przeprowadzono reakcje mieszanej makrocyklizacji 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryli **11** i **13** z 1,2-dicyjanobenzenem (**7**) (*orto*-ftalonitryl) (Schemat 5).



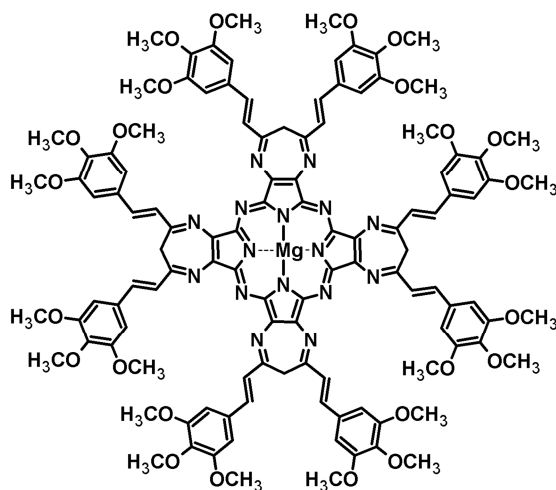
Schemat. 5. Reagenty i warunki reakcji: (i) $(n\text{-BuO})_2\text{Mg}$, *n*-butanol, temp. wrzenia, 24 godz. (**20**) lub 13 godz. (**21**).

Reakcję makrocyklizacji 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitrylu **11** z 1,2-dicyjanobenzenem (**7**), przeprowadzono w *n*-butanolu, przy udziale *n*-butanolanu magnezu, w temperaturze wrzenia w ciągu 24 godzin. W celu zwiększenia wydajności syntezy oczekiwanej tribenzoporfirazy, w reakcji zastosowano 10-krotny nadmiar 1,2-dicyjanobenzenu (**7**). Jak wiadomo reakcja mieszanej makrocyklizacji dwóch maleonitryli lub ftalonitryli prowadzi do mieszaniny produktów makrocyklicznych. W celu uniknięcia powstawania mieszaniny sześciu różnych izomerów Hoffman i wsp. [103,107] opracowali procedury selektywnego uzyskiwania oczekiwanego izomeru. Zastosowanie 10-krotnego nadmiaru 1,2-dicyjanobenzenu w reakcji mieszanej makrocyklizacji uznano za najlepszą procedurę syntezy tribenzoporfirazy, ponieważ głównym produktem ubocznym jest jedynie powstająca w przeważającej ilości ftalocyjanina. Uzyskaną tribenzoporfirazę zawierającą pierścień bisstyrylodiazepinowy **20**, poprzez powtarzaną kilkakrotnie chromatografię kolumnową w normalnym oraz odwróconym układzie faz, oddzielono od ftalocyjaniny magnezowej powstającej jako produkt uboczny. Następnie przeprowadzono analogiczną reakcję mieszanej makrocyklizacji 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitrylu **13** z 1,2-dicyjanobenzenem (**7**), otrzymując tribenzoporfirazę **21**. Pz **20** i **21** scharakteryzowano metodą spektrometrii mas (MS MALDI), która potwierdziła uzyskanie związków o oczekiwanej masie cząsteczkowej. Niska trwałość obu związków, uniemożliwiła przeprowadzenie pełnej charakterystyki ich struktury, w tym przy wykorzystaniu technik spektroskopii NMR. Z tego względu w dalszych badaniach uwzględniono tribenzoporfirazę **8** oraz porfirazyny **18** i **19**, których nazwy systematyczne oraz wzory podano poniżej:

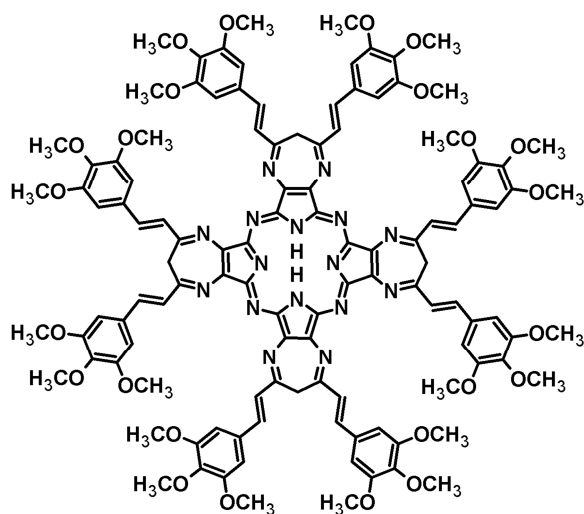
magnez(II) {5-fenyl-7-[(2*E*)-(3,4,5-trimetoksyfenyl)etenyl]-6*H*-1,4-diazepino}[2,3-*q*]tribenzo[*b,g,l*]porfirazyna (8) – określana w pracy jako tribenzoporfirazyna magnezowa 8



magnez(II) tetrakis[5,7-bis{(2*E*)-(3,4,5-trimetoksyfenyl)etenyl}-6*H*-1,4-diazepino][2,3-*b*;2',3'-*g*;2'',3''-*l*;2''',3'''-*q*]porfirazyna (18) - określana w pracy jako porfirazyna magnezowa 18



tetrakis[5,7-bis{(2*E*)-(3,4,5-trimetoksyfenyl)etenyl}-6*H*-1,4-diazepino][2,3-*b*;2',3'-*g*;2'',3''-*l*;2''',3'''-*q*]porfirazyna (19) - określana w pracy jako porfirazyna demetalowana 19



IV. 2. Ocena czystości

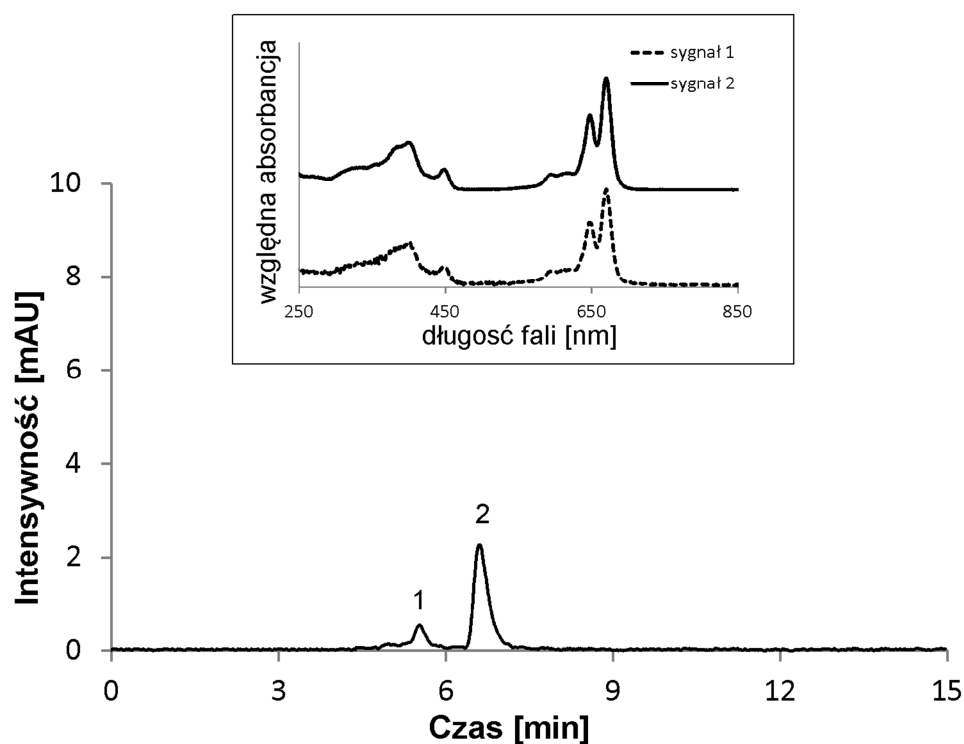
Ważnym parametrem determinującym wykorzystanie związków w PDT, jest ich czystość chemiczna, tj. odpowiednio wysoka zawartość w próbce. Najczęściej stosowaną metodą oceny jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), powszechnie wykorzystywana w przemyśle farmaceutycznym. W przypadku preparatu Tookad, znajdującego się w badaniach klinicznych aktywności fotodynamicznej względem raka prostaty, zawartość fotouczulacza, którym jest padoporfin, określono na poziomie >95% [2, 108]. Natomiast w odniesieniu do innego z fotouczulaczy – verteporfinu, stosowanego w leczeniu w postaci preparatu Visudyne, monografia Farmakopei Amerykańskiej (USP) podaje, że wymagana czystość powinna być zawarta w przedziale 94-102% [109]. Jednak wykorzystanie metody HPLC do określania czystości fotouczulaczy porfirynoidowych przysparza wiele trudności, ponieważ większość porfirynoidów słabo rozpuszcza się w rozpuszczalnikach, powszechnie stosowanych jako fazy ruchome, a także wykazuje duże powinowactwo do faz stacjonarnych. Z tego względu jak podaje Kashiyama i wsp., może dochodzić do wytrącania fotouczulaczy po nastrzyknięciu na kolumnę chromatograficzną, co niekorzystnie wpływa na warunki rozdzielania oraz powtarzalność wyników [110,111].

Czystość porfirazyn **8**, **18** i **19** określono metodą HPLC, przy wykorzystaniu chromatografu Agilent 1200, wyposażonego w detektor spektralny z matrycą diodową (UV-DAD). Analizę chromatograficzną przeprowadzono w odwróconym układzie faz, stosując kolumnę Eclipse XDB-C18 (Agilent), wypełnioną złożem o średniej wielkości ziarna 5 µm, przy zachowaniu zarówno izokratycznych, jak i gradientowych warunków elucji. Skład fazy ruchomej wykorzystywanej w analizie poszczególnych porfirazyn podano w Tabelach 1, 3 i 5, natomiast uzyskane chromatogramy przedstawiono na Ryc. 18-23. Na chromatogramach Pz **8** i **18** (Ryc. 18-21) można zaobserwować po dwa sygnały generowane przez związki, które posiadają analogiczne widma UV-Vis. Obecność dwóch sygnałów na chromatogramach przypisano występowaniu formy monomerycznej i zagregowanej porfirazyn **8** i **18**, ponieważ przy wykorzystaniu spektroskopii NMR wykluczono obecność innych związków makrocyklicznych, a także izomerycznych porfirazyn. Analogiczne obserwacje i zależności zostały zauważone także w odniesieniu do innych porfirazyn, zawierających skondensowane pierścienie diazepinowe. Na przykład Stuzhin i Ercolani zaobserwowali, że porfirazyny diazepinowe tworzą różne kompleksy z cząsteczkami wody oraz rozpuszczalnika. Powstałe kompleksy ulegają procesowi

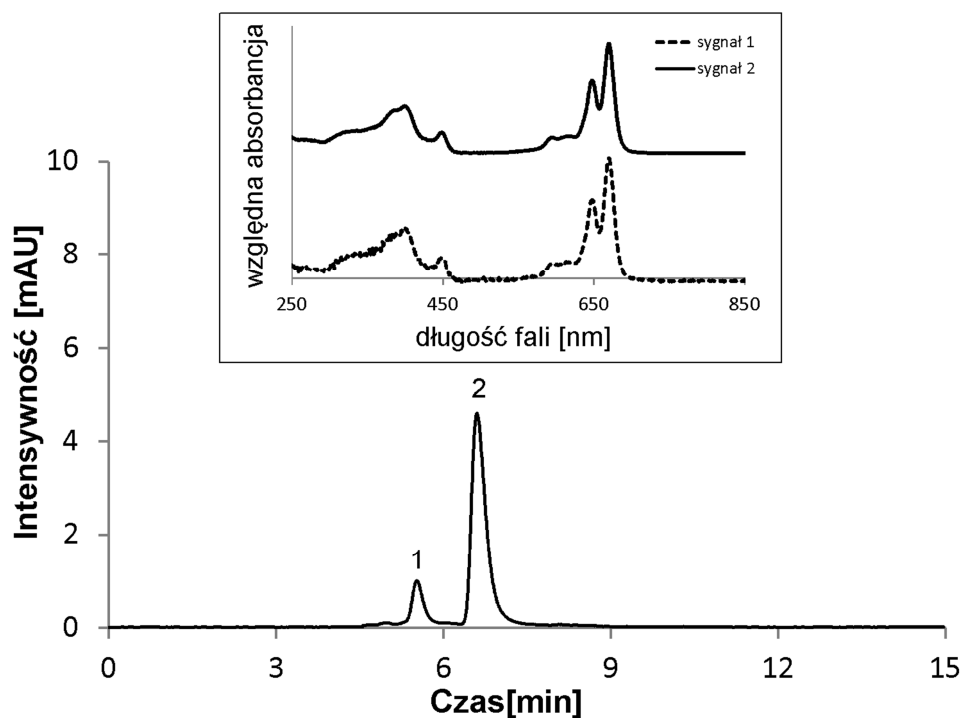
dimeryzacji w wyniku tworzenia wiązań wodorowych, pomiędzy atomami azotu pierścieni diazepinowych sąsiadujących cząsteczek porfirazyn [74,112]. Z tego względu oceniając zawartość porfirazyn **8** i **18** na podstawie chromatogramów badanych próbek, wynik podawano jako sumę procentowego udziału powierzchni pików, odpowiadających formie monomerycznej i zagregowanej. Otrzymane wyniki analizy HPLC przedstawione w Tabelach 2, 4 i 6 wykazały, że zawartość Pz **8**, **18** i **19** w badanych próbkach wynosiła $\geq 95\%$.

Tabela 1. Skład fazy ruchomej w analizie HPLC Pz **8**

Czas [min]	Rozpuszczalnik [% v/v]	
	metanol	acetonitryl
0	50	50
15	50	50



Ryc. 18. Chromatogram oraz widma UV-Vis Pz **8**, detekcja przy $\lambda=360$ nm.



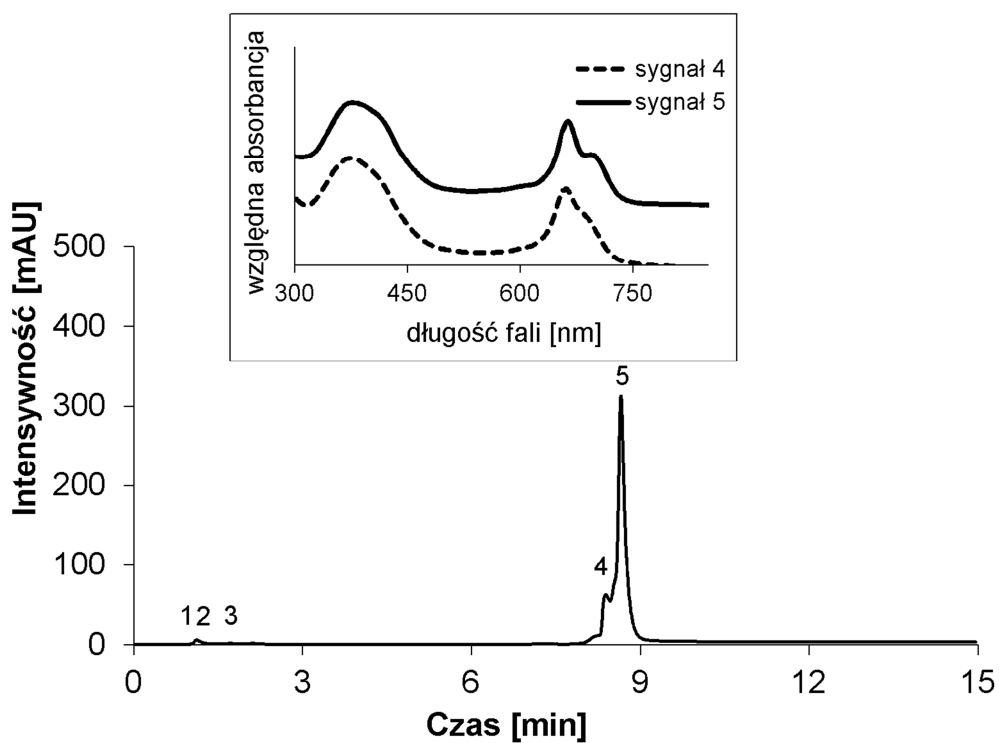
Ryc. 19. Chromatogram oraz widma UV-Vis Pz 8, detekcja przy $\lambda=655$ nm.

Tabela 2. Wyniki analizy HPLC Pz 8

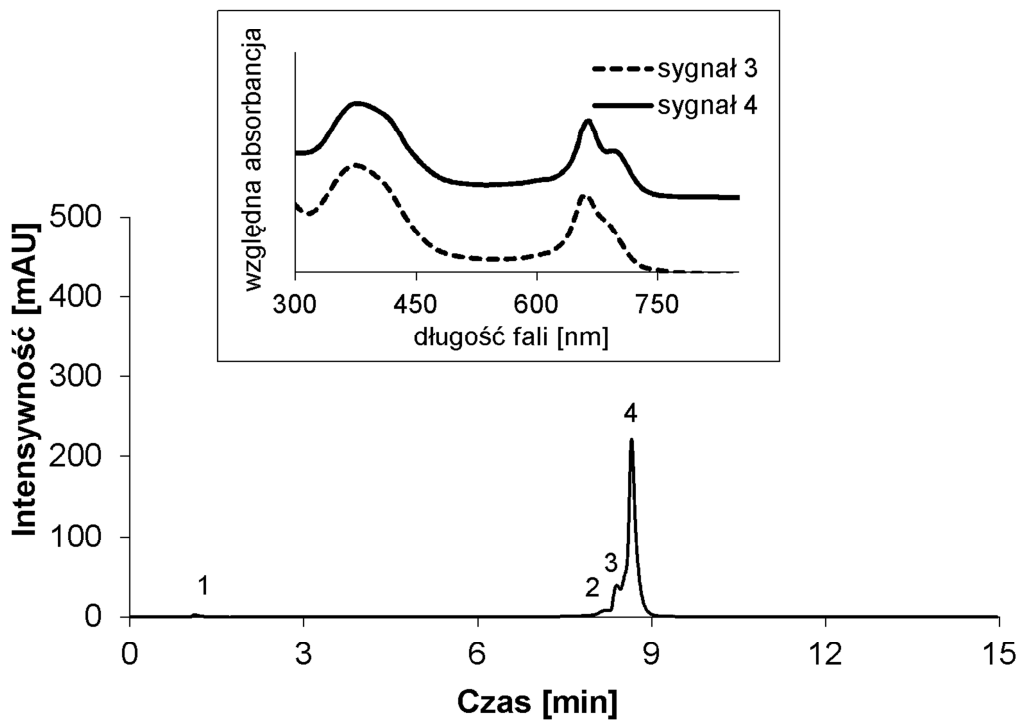
Detekcja przy $\lambda=360$ nm			Detekcja przy $\lambda=655$ nm		
sygnał	czas retencji [min]	zawartość [%]	sygnał	czas retencji [min]	zawartość [%]
1	1,5	32,2	1	1,5	5,9
2	6,6	67,8	2	6,6	94,1

Tabela 3. Skład fazy ruchomej w analizie HPLC Pz 18

Czas [min]	Rozpuszczalnik [% v/v]	
	metanol	woda
0	95	5
3	100	0
15	100	0



Ryc. 20. Chromatogram oraz widma UV-Vis Pz 18, detekcja przy $\lambda=370$ nm.



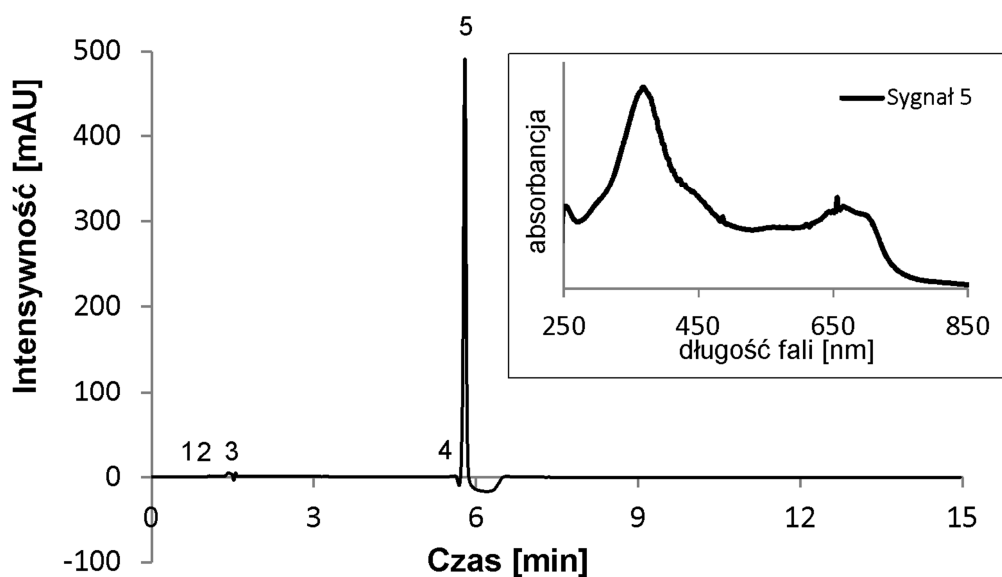
Ryc. 21. Chromatogram oraz widma UV-Vis Pz 18, detekcja przy $\lambda=660$ nm.

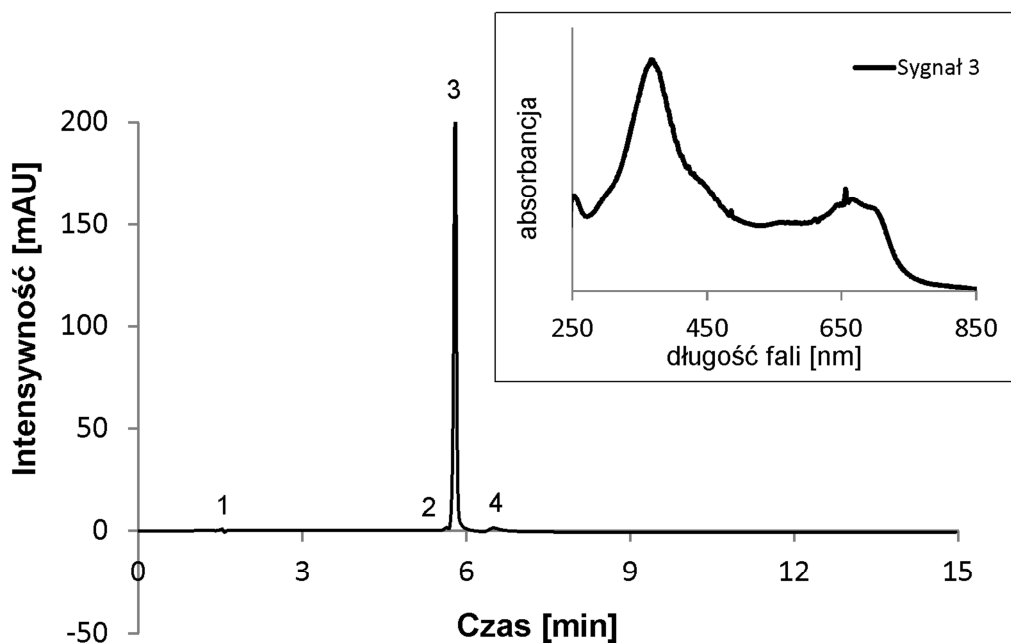
Tabela 4. Wyniki analizy HPLC Pz 18

Detekcja przy $\lambda=370$ nm			Detekcja przy $\lambda=660$ nm		
sygnał	czas retencji [min]	zawartość [%]	sygnał	czas retencji [min]	zawartość [%]
1	1,1	1,5	1	1,1	0,7
2	1,7	0,5	2	8,2	3,3
3	2,1	0,3	3	8,4	11,5
4	8,4	15,7	4	8,7	84,5
5	8,7	82,0			96,0

Tabela 5. Skład fazy ruchomej w analizie HPLC Pz 19

Czas [min]	Rozpuszczalnik [% v/v]		
	metanol	acetonitryl	tetrahydrofuran
0	50	50	0
3	50	50	0
4	0	0	100
15	0	0	100

**Ryc. 22.** Chromatogram oraz widma UV-Vis Pz 19, detekcja przy $\lambda=360$ nm.



Ryc. 23. Chromatogram oraz widma UV-Vis Pz 19, detekcja przy $\lambda=660$ nm.

Tabela 6. Wyniki analizy HPLC Pz 19

Detekcja przy $\lambda=360$ nm			Detekcja przy $\lambda= 660$ nm		
sygnał	czas retencji [min]	zawartość [%]	sygnał	czas retencji [min]	zawartość [%]
1	1,1	0,7	1	1,5	0,9
2	1,4	1,9	2	5,6	1,0
3	1,6	0,6	3	5,8	95,0
4	5,6	1,5	4	6,5	3,1
5	5,8	95,3	---		

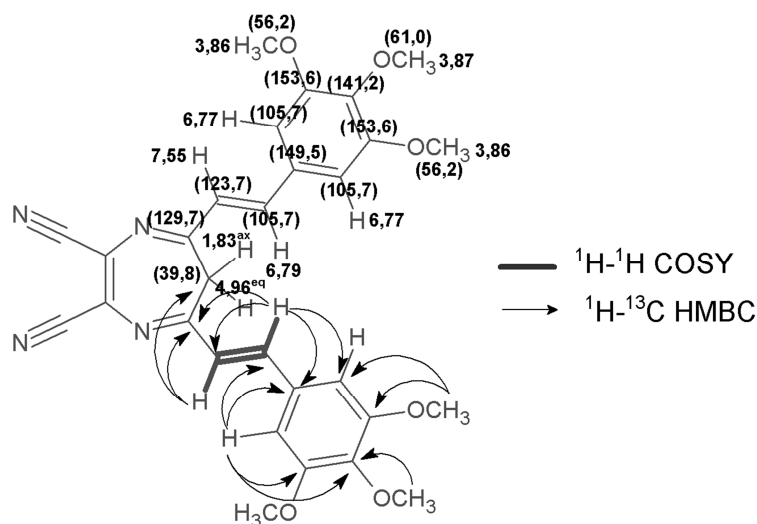
IV. 3. Charakterystyka struktury otrzymanych związków

Otrzymane porfirazyny **18** i **19** oraz ich prekursor 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryl **11**, zostały poddane chemicznej analizie strukturalnej przy wykorzystaniu różnych metod instrumentalnych, w tym magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), spektrometrii mas, spektrofotometrii UV-Vis, analizy elementarnej, rentgenowskiej analizy strukturalnej monokryształów, a także chromatografii cienkowarstwowej. Analiza wyników podanych w Rozdz. VI. 3., ze szczególnym uwzględnieniem widm NMR (widma ^1H i ^{13}C NMR załączono w formie suplementu), umożliwiła określenie dokładnej struktury związków **11**, **18** i **19**.

IV. 3. 1. 5,7-bis[(2E)-(3,4,5-trimetoksyfenylo)etenyl]-6H-1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryl (**11**)

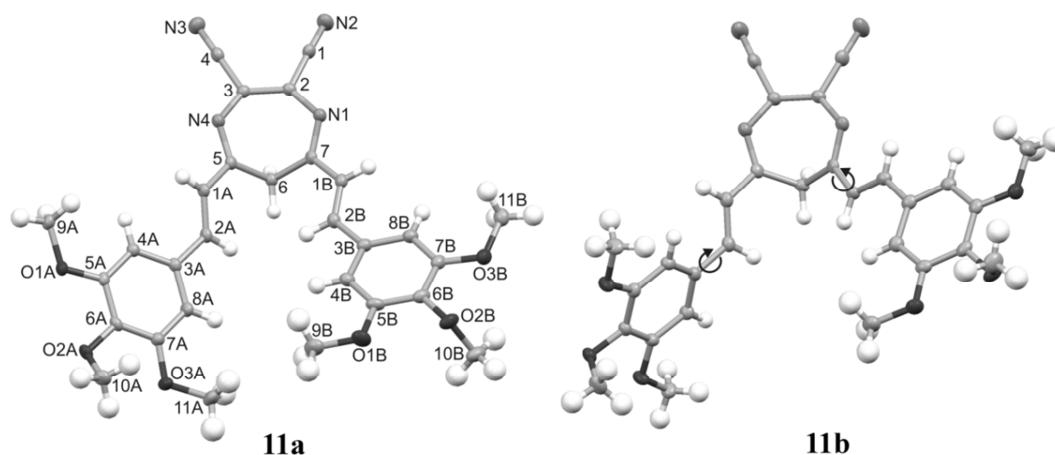
1,4-Diazepino-2,3-dikarbonitryl **11** scharakteryzowano wykorzystując spektrometrię mas z jonizacją przez elektrorozpylanie (MS ES), różne techniki NMR, analizę elementarną, analizę rentgenostrukturalną oraz spektrofotometrię UV-Vis. Wyznaczono również współczynnik opóźnienia (R_f) metodą chromatografii cienkowarstwowej, a także temperaturę topnienia. Jak przedstawiono na Ryc. 24, szczególnie wiele cennych danych potwierdzających strukturę **11** dostarczyła analiza widm NMR, w tym dwuwymiarowych ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMBC i ^1H - ^{13}C HSQC, które umożliwiły przypisanie sygnałów widm ^1H i ^{13}C NMR, poszczególnym atomom. W widmie ^1H NMR zaobserwowano charakterystyczne sygnały atomów wodoru grup etenylowych, w postaci dwóch dubletów przy 7,55 ppm oraz 6,79 ppm, o stałej sprzężenia $^3J=16$ Hz. Na podstawie wartości stałej sprzężenia atomów wodoru obecnych przy wiązaniu podwójnym (3J), można wnioskować o występowaniu związku w postaci odpowiedniego izomeru geometrycznego cis-trans. Jak wynika bowiem z danych literaturowych wartość 3J dla cis-alkenów wynosi 10-12 Hz, natomiast w przypadku trans-alkenów 14-18 Hz [113]. Z powyższych informacji oraz analizy widm NMR, można stwierdzić, że uzyskana wartość 3J równa 16 Hz, stanowi potwierdzenie występowania 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitrylu **11** w postaci izomeru trans. Na widmie ^1H NMR zaobserwowano również częściowe nakładanie się sygnału położonego przy 6,77 ppm, odpowiadającego czterem atomom wodoru grup fenylowych, z sygnałem pochodzącym od atomów wodoru grupy etenylowej, o przesunięciu chemicznym równym 6,79 ppm. Ponadto zauważono dwa intensywne, pojedyncze sygnały przy 3,87 ppm oraz 3,86 ppm, pochodzące od atomów wodoru grup metoksyloowych, odpowiednio w położeniu *para*

oraz *meta* pierścienia fenylowego. Zaobserwowano również dwa mało intensywne, słabo wykształcone sygnały od geminalnych atomów wodoru grupy CH₂ w pozycji C6 pierścienia diazepinowego, przy 4,96 ppm oraz 1,83 ppm. Analogiczne zróżnicowanie geminalnych atomów wodoru w widmach ¹H NMR, zauważyli również Ercolani i Horiguchi, w przypadku analizy innych 5,7-dipodstawionych 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryli. Wymienieni autorzy wykazali, że sygnały od dwóch atomów wodoru w pozycji C6 pierścienia diazepiny, stanowią potwierdzenie tautomerii *6H* tego pierścienia. Ponadto stwierdzili, że położenie i multipletowość wspomnianych sygnałów silnie zależą od temperatury, w której wykonano widmo. Zgodnie z danymi uzyskanymi przez wspomnianych badaczy, na widmach wykreślonych w temperaturze pokojowej jeden z sygnałów występuje w przedziale 1,5-2,5 ppm, natomiast drugi 4,0-6,0 ppm. Pierwszy z tych sygnałów, przy wyższych wartościach pola magnetycznego, przypisano atomowi wodoru w pozycji aksjalnej, natomiast drugi, przy niższym polu magnetycznym, atomowi w pozycji ekwatorialnej pierścienia diazepinowego [67,69,102]. W kolejnym etapie prac przeprowadzono analizę widma ¹H-¹H COSY 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitrylu **11**, która ujawniła sprzężenie pomiędzy nierównocennymi atomami wodoru grupy etenylowej. Natomiast w widmie ¹H-¹³C HMBC zaobserwowano sprzężenie atomów wodoru grupy etenylowej przy 7,55 ppm, z atomami węgla w pozycji C5 i C6 pierścienia diazepinowego. Natomiast drugi atom wodoru grupy etenylowej, o przesunięciu chemicznym 6,77 ppm, sprzęga się z atomami węgla pierścienia fenylowego. Zaobserwowano również sprzężenie pomiędzy atomami wodoru grup metoksylowych oraz atomami węgla pierścienia fenylowego. Ponadto atomy wodoru pierścieni fenylowych sprzęgają się z atomami węgla tych pierścieni oraz atomami węgla grupy etenylowej.



Ryc. 24. Analiza widm NMR **11** z przypisaniem przesunięć chemicznych [ppm] dla ^1H NMR (^{13}C NMR) oraz sprzężeń obserwowanych w widmach ^1H - ^1H COSY i ^1H - ^{13}C HMBC.

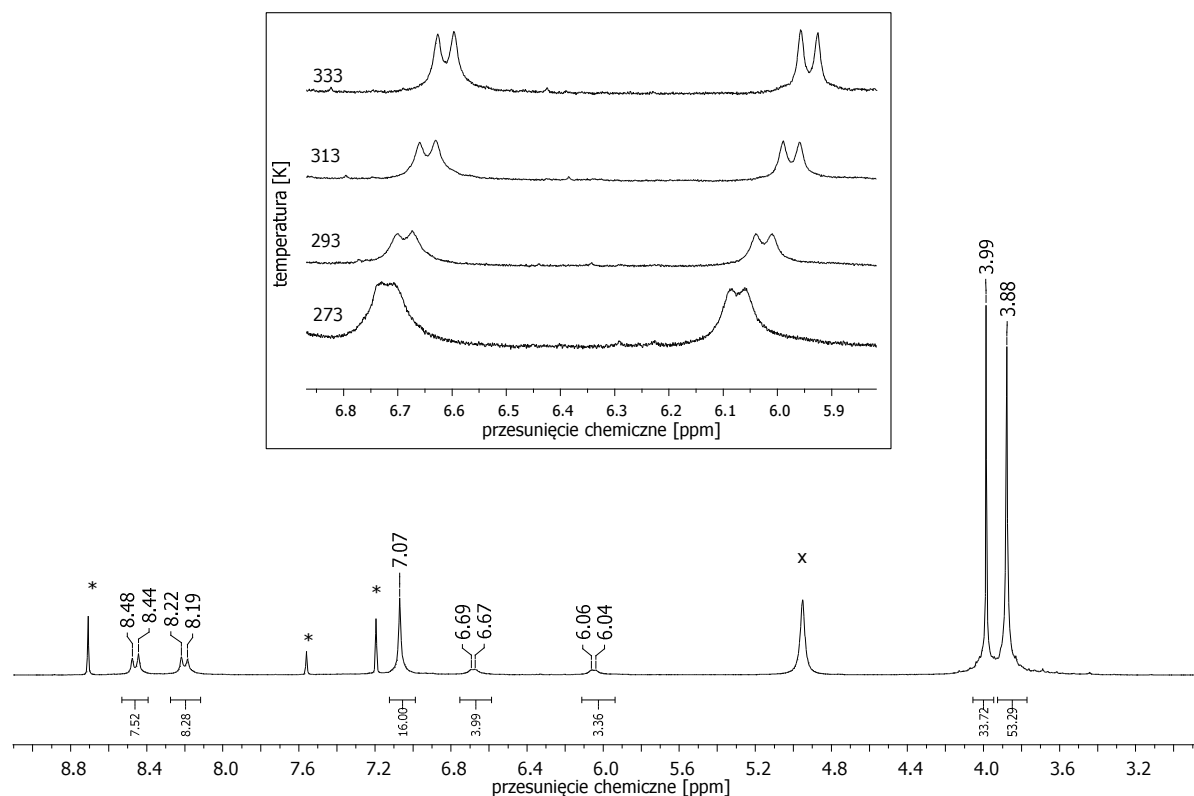
Cenną metodą umożliwiającą dokładne określenie struktury substancji chemicznych jest analiza rentgenostrukturalna, wymaga jednak uzyskania badanego związku w formie monokryształu. W przypadku 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitrylu **11**, wykorzystując metodę powolnego odparowania mieszaniny rozpuszczalników otrzymano dwie różne formy monokrystaliczne. Z układu rozpuszczalników dichlorometan–propanol uzyskano **11a**, w postaci ciemnopomarańczowych kryształów o temperaturze topnienia 236–237 °C (z rozkładem), natomiast z roztworu octan etylu–*n*-heksan **11b**, w postaci żółtych kryształów o temperaturze topnienia 232–233 °C (z rozkładem). Analiza krystalograficzna wykazała, że otrzymane kryształy są dwiema formami polimorficznymi związku **11**, a różnice struktury wynikają ze zmian konformacyjnych dotyczących pojedynczych wiązań w podstawnikach styrylowych. Na Ryc. 25 przedstawiono struktury krystalograficzne obu form polimorficznych, wraz z oznaczeniem atomów. Ponadto zaznaczono wiązania łączące grupy styrylowe z pierścieniem diazepinowym, wokół których zaobserwowano zmiany konformacyjne. W formie polimorficznej **11a**, obie grupy styrylowe wykazują podobną orientację względem pierścienia diazepinowego, z kątami torsyjnymi C2A-C1A-C5-N4 oraz C2B-C1B-C7-N1 równymi odpowiednio 166,6(2)° oraz 167,8(2)°. Natomiast w formie **11b** kąty torsyjne są zróżnicowane i wynoszą 163,0(1)° i -6,2(2)°, potwierdzając zmianę orientacji obu podstawników styrylowych. Kąty dwusienne pomiędzy dwoma płaszczyznami pierścieni benzenu, wynikają głównie ze zmian wartości kątów torsyjnych drugiego wiązania pojedynczego w podstawniku styrylowym i wynoszą 39,7° i 88,9°, odpowiednio dla **11a** i **11b**.



Ryc. 25. Struktury krystalograficzne dwóch form polimorficznych 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitrylu **11** wraz z oznaczeniami atomów. Strzałki wskazują wiązania, wokół których zaobserwowano zmiany konformacji obu form polimorficznych.

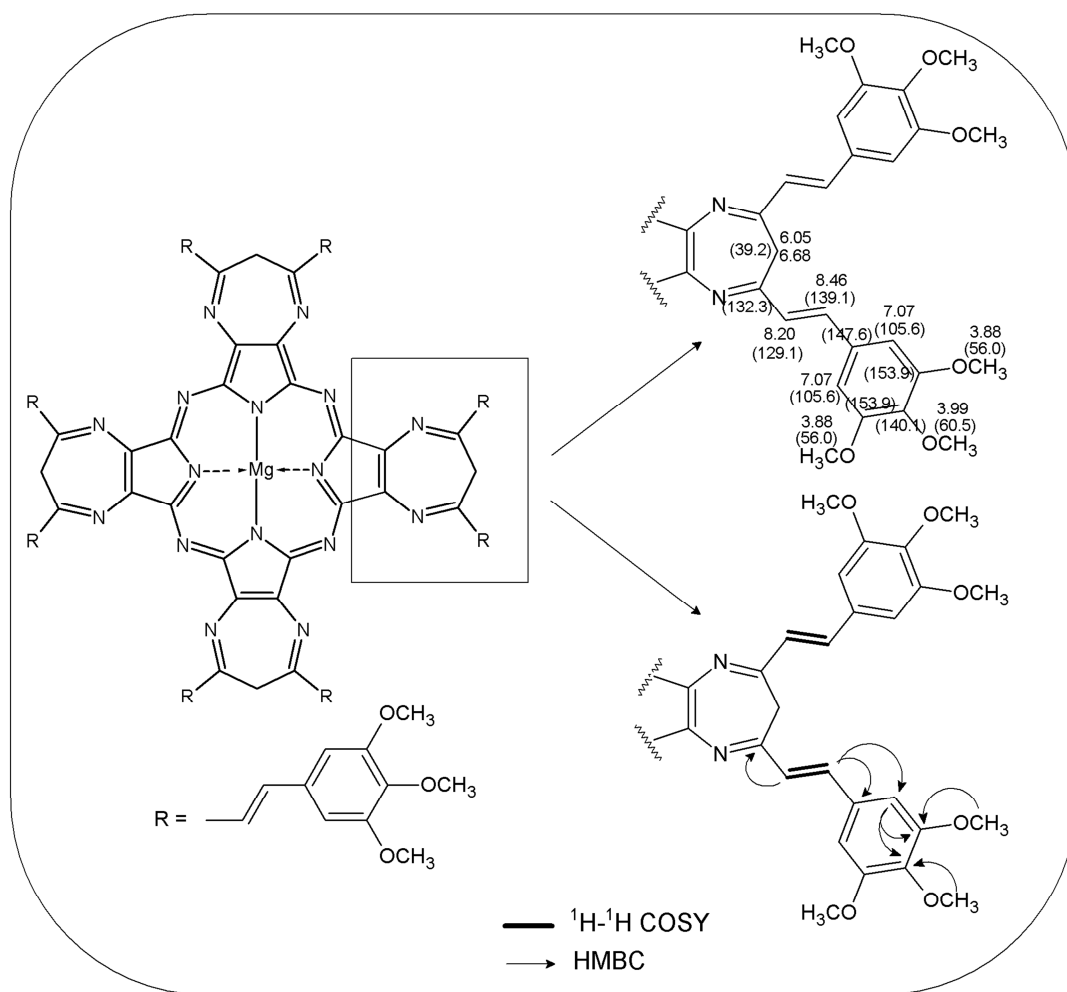
IV. 3. 2. magnez(II) tetrakis[5,7-bis{(2*E*)-(3,4,5-trimetoksyfenylo)etenilo}-6*H*-1,4-diazepino][2,3-*b*;2',3'-*g*;2'',3''-*l*;2''',3'''-*q*]porfirazyna (**18**)

Charakterystykę struktury porfirazyny magnezowej **18**, przeprowadzono wykorzystując spektrometrię mas z jonizacją przez desorpcję promieniowaniem laserowym z użyciem matrycy (MS MALDI), a także różne techniki NMR, spektrofotometrię UV-Vis oraz chromatografię cienkowarstwową. W widmie ^1H NMR, przedstawionym na Ryc. 26, zaobserwowano dwa charakterystyczne podwójne sygnały (dublety) przy 8,46 ppm i 8,20 ppm, o stałej sprzężenia 16 Hz, należące do atomów wodoru 8 grup etenylowych, z podstawnikami w położeniu *trans*. Zauważono również pojedynczy sygnał przy 7,07 ppm, od 16 atomów wodoru grup fenyłowych. Ponadto dwa szerokie, słabo wykształcone dublety przy 6,68 ppm i 6,05 ppm, pochodzące od 8 atomów wodoru grup CH_2 w pozycji C6 pierścieni diazepinowych, sugerują formę tautomeryczną 6*H* diazepiny. Dwa kolejne, pojedyncze sygnały przy 3,99 ppm i 3,88 ppm pochodzą od 72 atomów wodoru grup metoksyłowych.



Ryc. 26. Widmo ^1H NMR porfirazyny (**18**) w pirydynie- d_5 , wykonane w temp $25\text{ }^\circ\text{C}$ (298K). W ramce przedstawiono widma ^1H NMR wykreślone w różnych temperaturach dla zakresu 5,9-6,8 ppm. Symbole * i x wskazują reszkowe sygnały pirydyny i wody.

Wiele cennych informacji umożliwiających określenie struktury porfirazyny **18** uzyskano analizując widma dwuwymiarowe ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC oraz ^1H - ^{13}C HMBC. Strukturę porfirazyny **18** oraz przyporządkowanie wartości przesunięć chemicznych poszczególnym atomom węgla i wodoru, zaobserwowanych na widmach ^1H i ^{13}C NMR przedstawiono na Ryc. 27. Na widmie ^1H - ^1H COSY zauważono sprzężenie pomiędzy atomami wodoru grup etenylowych. Natomiast w widmie ^1H - ^{13}C HMBC zaobserwowano sprzężenie atomów wodoru grupy etenylowej, którym odpowiada sygnał przy 8,20 ppm, z atomami węgla w pozycji C5 pierścienia diazepinowego. Stwierdzono również, że drugi sygnał pochodzący od atomów wodoru grupy etenylowej o przesunięciu chemicznym 8,46 ppm, wykazuje sprzężenie z atomami węgla pierścienia fenyłowego. Ponadto zaobserwowano sprzężenie pomiędzy atomami wodoru grup metoksyłowych oraz atomami węgla pierścienia fenyłowego, a także sprzężenie atomów wodoru pierścieni fenyłowych z atomami węgla tych pierścieni. Natomiast analiza widma HSQC wykazała, które atomy wodoru związane są z poszczególnymi atomami węgla (Ryc. 27).



Ryc. 27. Analiza widm ^1H NMR i ^{13}C NMR porfirazyny **18** z przypisaniem przesunięć chemicznych [ppm] oraz sprzężeń obserwowanych w widmach ^1H - ^1H COSY i ^1H - ^{13}C HMBC.

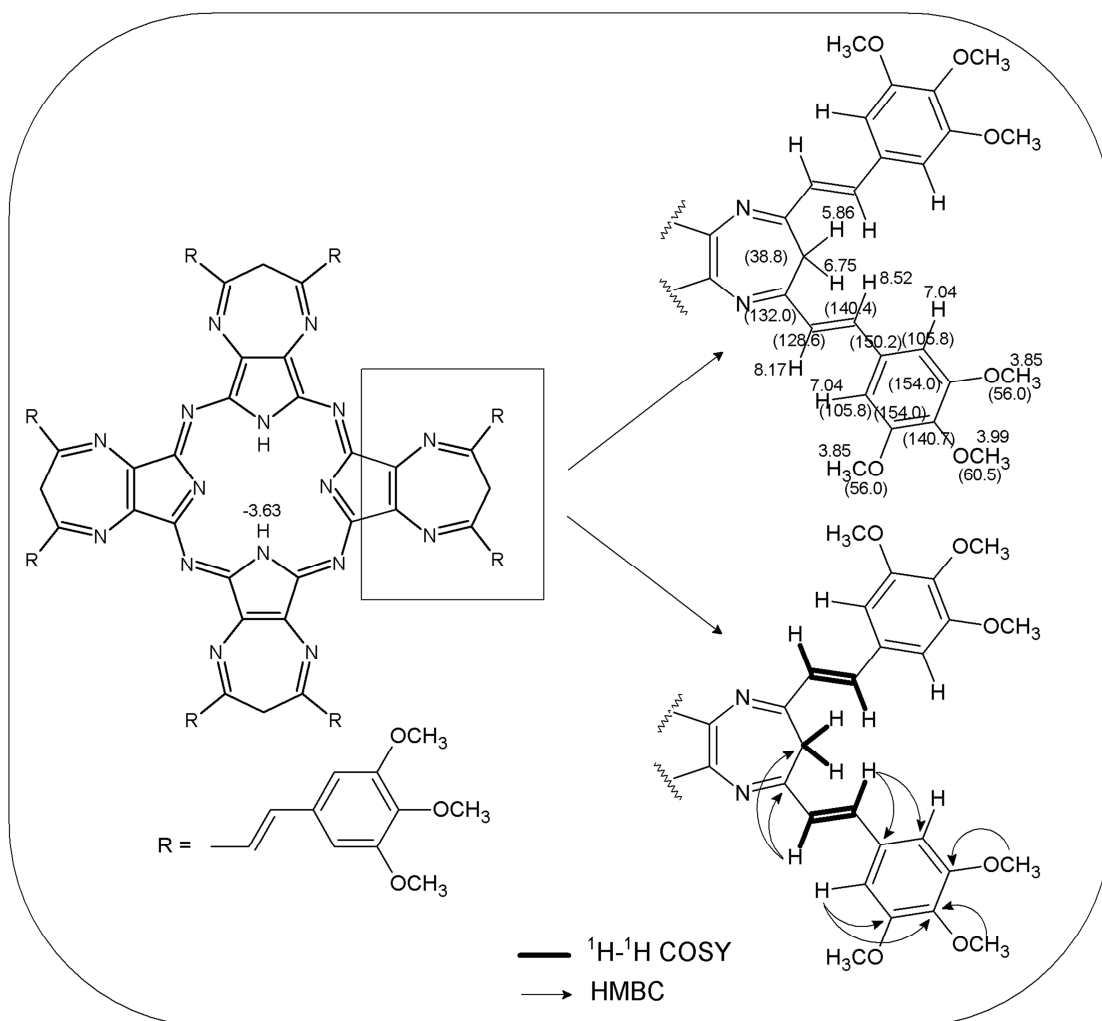
Badania struktury porfirazyny **18** z wykorzystaniem spektroskopii NMR, zostały rozszerzone poprzez analizę widm ^1H NMR wykonanych w różnych temperaturach z zakresu 273–333 K (0–60 °C). Największe zmiany multipletowości oraz wartości przesunięć chemicznych zaobserwowano dla sygnałów pochodzących od atomów wodoru grup CH_2 , w pozycji C6 pierścieni diazepinowych. Sygnały związane z obecnością tych atomów występowały w przedziałach 6,61–6,72 ppm oraz 5,59–6,07 ppm, w zależności od temperatury rejestracji widma. Na Ryc. 26 przedstawiono widmo ^1H NMR porfirazyny **18** wykonane w temperaturze 298 K, a także fragmenty widm wykonanych w temperaturach 273 K, 293 K, 313 K, 333 K, obejmujących zakres 5,8-6,9 ppm. Na widmie wykonanym w temperaturze 273 K zaobserwowano dwa płaskie, szerokie sygnały przy 6,72 ppm i 6,07 ppm, które uległy przesunięciu i przekształceniu w dublety wraz ze wzrostem temperatury rejestracji widma. Natomiast na widmie wykonanym w temperaturze 333 K wspomniane sygnały były położone

przy 6,61 ppm i 5,94 ppm. Ponadto otrzymane wartości przesunięć chemicznych wymienionych sygnałów, pochodzących od geminalnych atomów wodoru grup CH₂, w pozycji C6 pierścieni diazepinowych, porównano z wartościami otrzymanymi dla 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitrylu **11** (Rozdz. IV. 3. 1). Zaobserwowano, że sygnały pochodzące od geminalnych atomów wodoru grupy CH₂ w pozycji C6 pierścienia diazepiny związku **11**, występowały przy 1,83 ppm i 4,96 ppm. Należy podkreślić, że zagadnienie położenia sygnałów ¹H NMR pochodzących od atomów wodoru grupy CH₂, w pozycji C6 pierścienia diazepiny, analizowali Donzello i wsp. [69] na przykładzie tetrakis-2,3-(5,7-difenylo-6*H*-1,4-diazepino)porfirazyny oraz jej prekursora 5,7-difenylo-1,4-diazepino-2,3-dikarbonitrylu. Autorzy zaobserwowali na widmie ¹H NMR porfirazyny, sygnały o zbliżonych wartościach 5,18 ppm i 6,08 ppm, pochodzące od atomów wodoru grupy CH₂ w pozycji C6 pierścienia diazepiny. Natomiast w przypadku widma 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitrylu, będącego prekursorem porfirazyny, sygnały te były znacznie oddalone i występowały odpowiednio przy wartościach przesunięć chemicznych wynoszących 1,98 ppm i 5,74 ppm. Ponadto stwierdzono, że opisane zależności świadczą o „wyplaszczeniu” pierścieni diazepinowych w wyniku reakcji makrocyklizacji 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitrylu, prowadzącej do syntezy porfirazyny. Zaobserwowane zjawisko wyjaśniono efektem odekranowania atomów wodoru, spowodowanym oddziaływaniem układu sprzężonych elektronów π pierścienia makrocyklicznego.

IV. 3. 3. tetrakis[5,7-bis{(2*E*)-(3,4,5-trimetoksyfenylo)etenylo}-6*H*-1,4-diazepino]
[2,3-*b*;2',3'-*g*;2'',3''-*l*;2''',3'''-*q*]porfirazyna (**19**)

Kolejny etap badań dotyczył określenia struktury demetalowanej porfirazyny **19**. W tym celu wykorzystano spektrometrię mas z jonizacją przez desorpcję promieniowaniem laserowym z użyciem matrycy (MS MALDI), a także różne techniki NMR, spektrofotometrię UV-Vis oraz chromatografię cienkowarstwową. Na Ryc. 28 przedstawiono strukturę porfirazyny **19**, wraz z zaznaczonymi wartościami przesunięć chemicznych, dla poszczególnych atomów wodoru i węgla oraz sprzężeniami obserwowanymi na widmach ¹H-¹H COSY i ¹H-¹³C HMBC. Widmo ¹H NMR **19** wykazało duże podobieństwo do widma porfirazyny magnezowej **18**. Zaobserwowano dwa dublety przy 8,52 ppm i 8,17 ppm o stałej sprzężenia 16 Hz, pochodzące od atomów wodoru grup etenylowych posiadających podstawniki w położeniu *trans*, analogicznie jak w przypadku **Pz 18** (Rozdz. IV. 3. 2). Zauważono również pojedynczy sygnał przy 7,04 ppm od geminalnych atomów wodoru grup

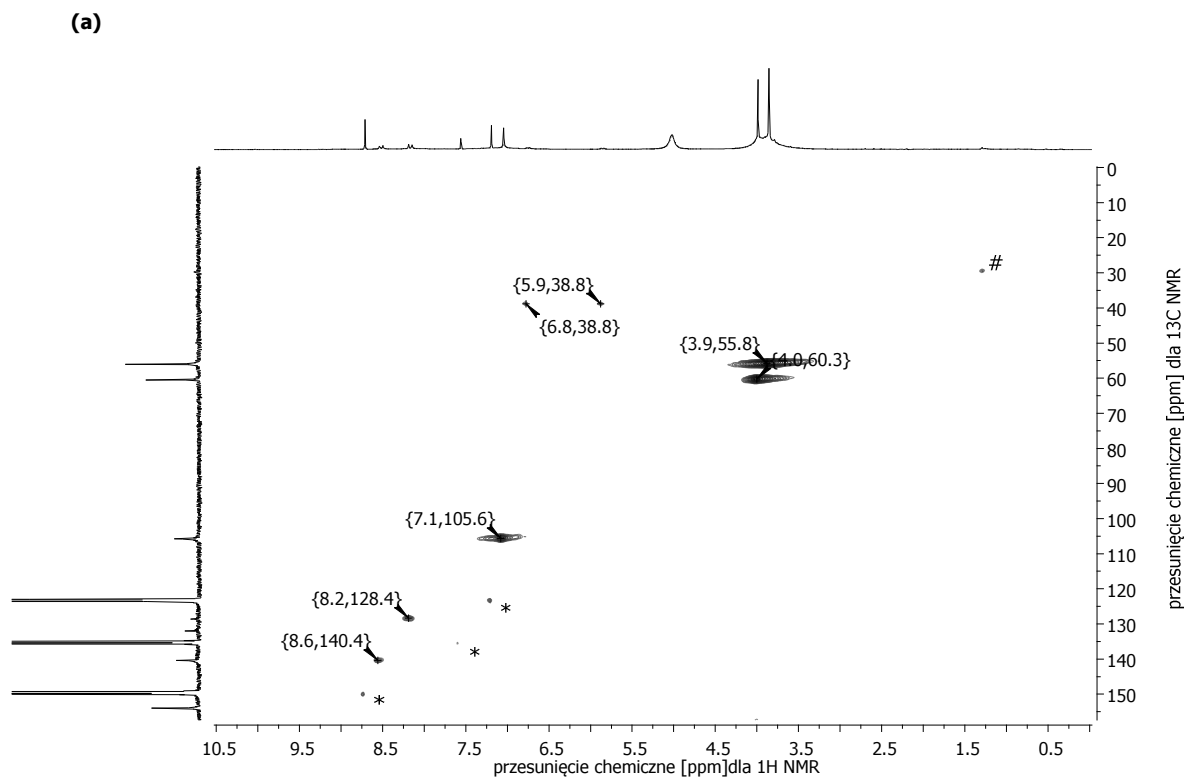
fenylowych oraz dwa dublety przy 6,75 ppm i 5,86 ppm o stałej sprzężenia 12 Hz, od atomów wodoru grup CH₂, w pozycji C6 pierścieni diazepinowych. Kolejne dwa pojedyncze sygnały przy 3,99 ppm i 3,85 ppm należą do atomów wodoru grup metoksyowych w pierścieniach fenylowych. Natomiast pojedynczy, silnie ekranowany sygnał przy -3,63 ppm jest charakterystyczny dla porfirazyn demetalowanych, zawierających dwa atomy wodoru typu pirolowego w centrum makrocyklicznym.

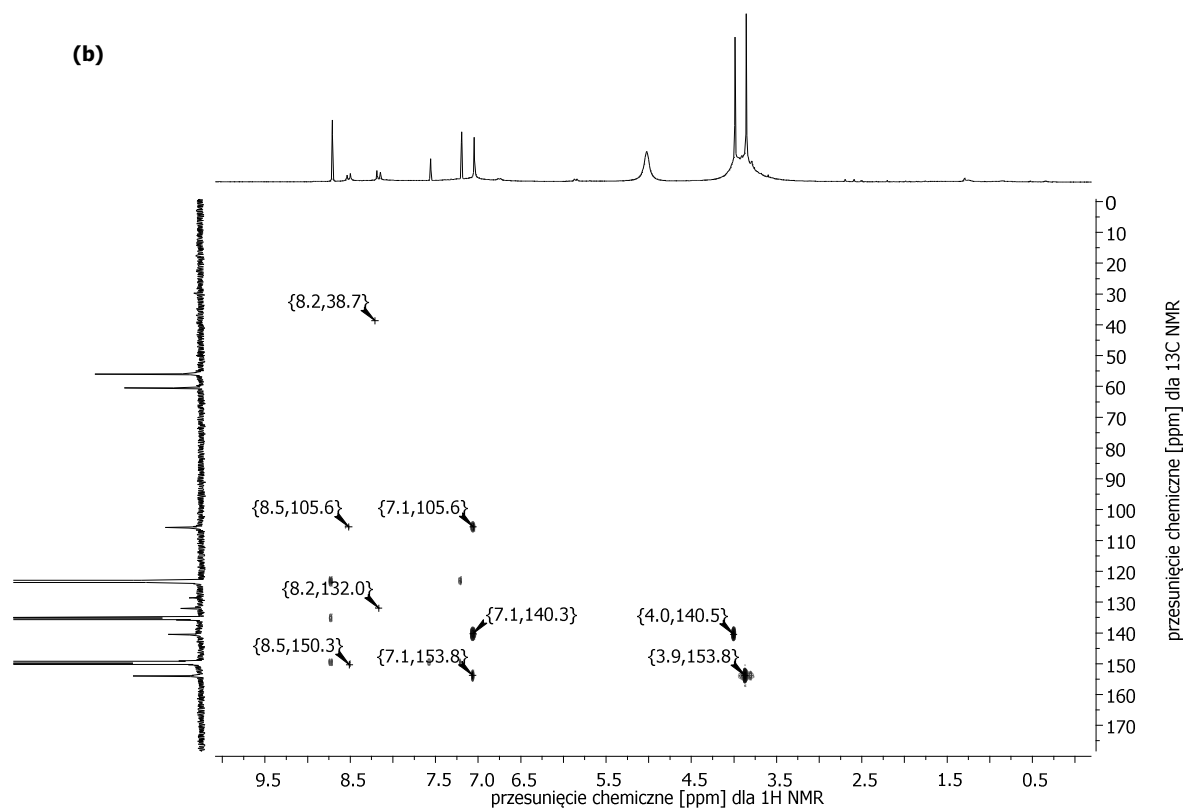


Ryc. 28. Analiza widm ¹H NMR oraz ¹³C NMR porfirazyny **19** z przypisaniem przesunięć chemicznych [ppm] oraz sprzężeń obserwowanych na widmach ¹H-¹H COSY i ¹H-¹³C HMBC.

Na widmie ¹H-¹H COSY zaobserwowano sprzężenie pomiędzy atomami wodoru grup etenylowych oraz geminalnymi atomami wodoru grup CH₂, w pozycji C6 pierścieni diazepinowych. Natomiast analiza widma ¹H-¹³C HMBC przedstawionego na Ryc. 29a, wykazała sprzężenie atomów wodoru grup etenylowych o wartości przesunięcia chemicznego

8,17 ppm, z atomami węgla w pozycjach C5 i C6 pierścienia diazepinowego. Zauważono również sprzężenie atomów wodoru grup etylenowych o przesunięciu chemicznym 8,52, ppm z atomami węgla pierścieni fenylowych. Ponadto zaobserwowano sprzężenia atomów wodoru grup metoksyłowych z atomami węgla pierścienia fenylowego oraz atomów wodoru pierścieni fenylowych z atomami węgla tych pierścieni. Należy podkreślić, że na widmach dwuwymiarowych ^1H - ^{13}C HMBC i ^1H - ^{13}C HSQC, przedstawionych na Ryc. 29, zauważono sprzężenia atomów węgla w pozycji C6 pierścienia diazepiny, dla których nie zaobserwowano sygnału na widmie ^{13}C NMR. Fakt ten potwierdza dużą użyteczność heterojądrowych widm korelacyjnych ^1H - ^{13}C NMR, w określaniu struktury związków makrocyklicznych.





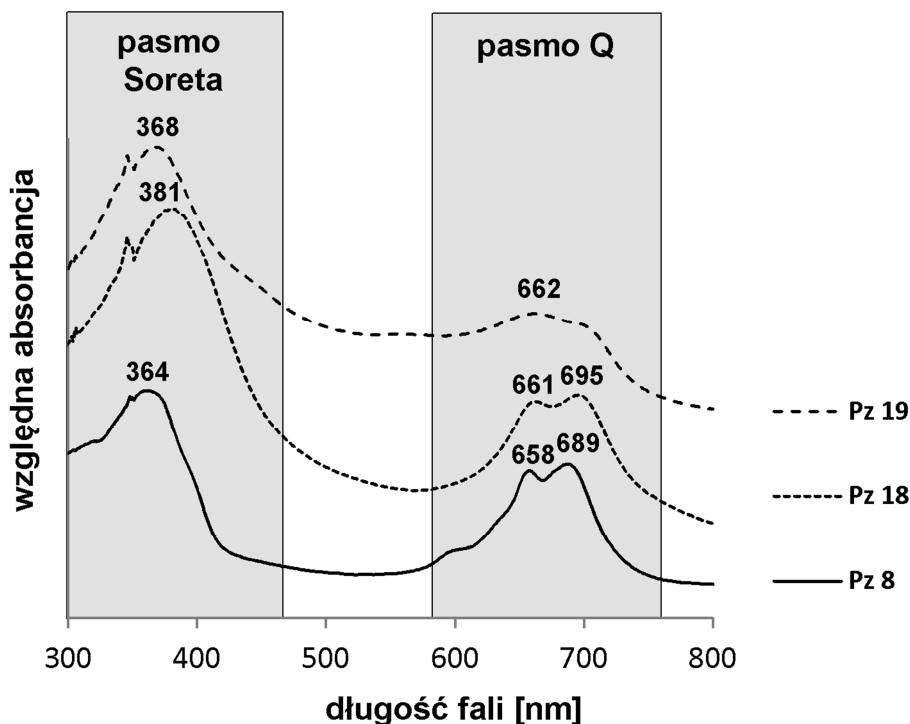
Ryc. 29. Widma ^1H - ^{13}C HMBC (a) i ^1H - ^{13}C HSQC (b) Pz **19** w pirydynie- d_5 . Symbole * i # wskazują resztkowe sygnały pirydyny i *n*-heksanu.

IV. 4. Ocena właściwości fizykochemicznych

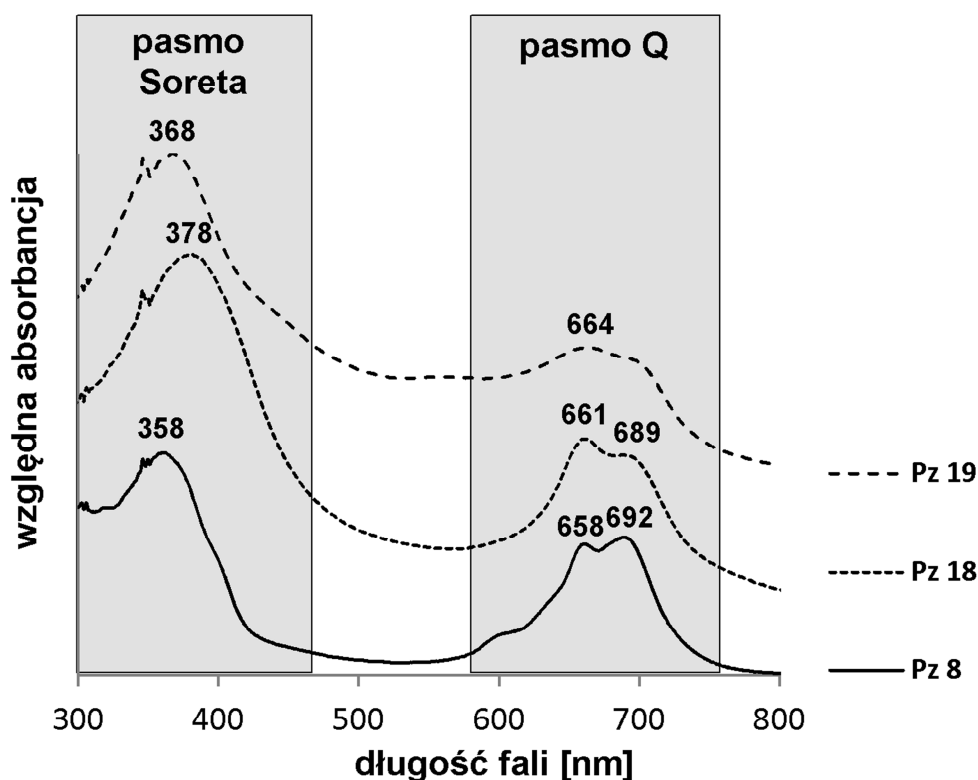
IV. 4.1. Właściwości absorpcyjne i emisyjne

Ważnym etapem analizy nowych fotouczulaczy jest charakterystyka spektralna, ponieważ zakres absorbowanego promieniowania, ma znaczący wpływ na efekt terapeutyczny. Jak wiadomo właściwości fotochemiczne barwników, wynikają z różnych stanów wzbudzenia cząsteczek. Natomiast rodzaj wzbudzenia, zależy głównie od długości fali absorbowanego promieniowania. Ponadto długość fali światła jest powiązana ze zdolnością przenikania tkanek. Wykazano, że światło o długości fali 630 nm penetruje tkanki na głębokość ok. 0,5 cm, natomiast o $\lambda=700$ nm na ok. 1,5 cm. Z tego względu poszukuje się fotouczulaczy, posiadających zdolność absorbowania promieniowania długofalowego [9,114]. Niezbędnych informacji w tym zakresie, dostarcza przede wszystkim ocena przebiegu elektronowych widm absorpcji. Szczególnie istotne jest uzyskanie absorpcji powyżej 650 nm, co generuje właściwe położenie pasma Q w widmie UV-Vis.

W odniesieniu do badanych porfirazyn **8**, **18** i **19**, właściwości absorpcyjne oceniono analizując przebieg widm UV-Vis, wykonanych w roztworach DMF (Ryc. 30) oraz DMSO (Ryc. 31).



Ryc. 30. Widma UV-Vis porfirazyn **8**, **18** i **19** w DMF.



Ryc. 31. Widma UV-Vis porfirazyn **8**, **18** i **19** w DMSO.

Porównanie widm na Ryc. 30 i 31 umożliwia identyfikację dwóch charakterystycznych pasm absorpcji, tj. Soreta oraz pasma Q, których obecność w widmie elektronowym jest wymagana w odniesieniu do wszystkich sensybilizatorów porfirynoidowych. W przypadku widma tribenzoporfirazyny magnezowej **8**, stwierdzono obecność pasma Soreta z maksimum przy długości fali 364 nm oraz 358 nm, odpowiednio dla roztworów w DMF i DMSO. Natomiast drugie szerokie pasmo Q, występujące w zakresie fal dłuższych, w roztworach DMF jest podzielone na dwa sub-pasma, z maksimami absorpcji $\lambda=658$ nm i $\lambda=689$ nm; dla roztworów w DMSO wartości te wynosiły 658 nm i 692 nm. W odniesieniu do porfirazyny magnezowej **18** pasma absorpcji są przesunięte w kierunku fal dłuższych, a maksima absorpcji obserwowano przy 381 nm, 661 nm i 695 nm w DMF. Dla roztworów w DMSO uzyskano wartości odpowiednio 378 nm, 661 nm i 689 nm. Natomiast demetalowana porfirazyna **19** w roztworach obu rozpuszczalników, posiada pasmo Soreta z maksimum przy 368 nm oraz szerokie płaskie pasmo Q z λ_{\max} przy 662 nm i 664 nm, odpowiednio w DMF i DMSO. Rozszczepienie pasma absorpcji Q jest najczęściej wynikiem tworzenia agregatów lub zaburzenia symetrii cząsteczki, np. w procesie demetalacji. Jednak Donzello i wsp. [69,71] wykazali, że w przypadku porfirazyn diazepinowych, rozszczepienie pasma Q może mieć inną przyczynę. Autorzy przeprowadzili ocenę właściwości absorpcyjnych porfirazyny

zawierającej skondensowane pierścienie 5,7-difenylo-6*H*-1,4-diazepinowe oraz jej kompleksów z jonami Mg(II), Zn(II), Cu(II). Zasugerowano, że pasmo w zakresie długości fali 630-640 nm jest wynikiem wzbudzenia elektronów w obrębie orbitali $\pi \rightarrow \pi^*$ i może być uznane za „normalne” pasmo Q. Natomiast dodatkowe pasmo w zakresie 660-680 nm, powstaje w wyniku przejść elektronowych w obrębie orbitali $n \rightarrow \pi^*$. Ze względu na konformację łódkową pierścieni w formie tautomerycznej 6*H*, wolna para elektronowa atomów azotu pierścieni diazepinowych, jest położona w orientacji umożliwiającej częściowe sprzężenie z π -chromoforem rdzenia makrocyklicznego. Ponadto orbital tej pary elektronowej tworząc kąt z płaszczyzną rdzenia porfirazyny, ma wyższą energię niż orbital HOMO, w wyniku czego pasmo absorpcji wynikające z przejścia $n \rightarrow \pi^*$ występuje w obszarze długofalowym.

Intensywność absorpcji światła określono wyznaczając molowe współczynniki absorpcji (ϵ). Jak wynika z Tabeli 7, najwyższe wartości ϵ wykazuje magnezowa porfirazyna **18**, natomiast najmniejszą intensywność absorpcji zaobserwowano dla porfirazyny demetalowanej **19**. Zmniejszenie intensywności absorpcji w wyniku demetalacji cząsteczki, zostało zauważone również w przypadku innych makrocykli porfirynoidowych. Bayir i wsp. [115] badając właściwości spektralne ftalocyjaniny podstawionej grupami hydroksytylosulfanylowymi, zaobserwowali znacznie mniejszą intensywność absorpcji ftalocyjaniny demetalowanej niż kompleksów z jonami Ni(II), Co(II) i Zn(II). Także Sobotta i wsp. [116] wykazali, że porfirazyna demetalowana zawierająca podstawniki 2,5-dimetylopirolilowe i dimetyloaminowe, posiada mniejsze wartości ϵ w porównaniu do pochodnej magnezowej. Ponadto, Donzello i wsp. [69] zaobserwowali słabszą intensywność absorpcji demetalowanej porfirazyny zawierającej skondensowane pierścienie 5,7-difenylo-1,4-diazepinowe, niż kompleksu z jonami Mg(II). W kolejnych badaniach Donzello i wsp. [72] otrzymali tribenzoporfirazynę demetalowaną oraz kompleks z jonami Mg(II), zawierające jeden skondensowany pierścień 5,7-difenylo-1,4-diazepinowy. Porównanie wartości ϵ tribenzoporfirazyn ze współczynnikami molowymi porfirazyn zawierających cztery pierścienie diazepinowe wskazuje, że wprowadzenie kolejnych pierścieni diazepinowych do cząsteczek makrocykli prowadzi do zmiany intensywności absorpcji. Również w przypadku analizowanych porfirazyn **8** i **18** stwierdzono analogiczną zależność, ponieważ tribenzoporfirazyna magnezowa **8** posiadająca jeden pierścień diazepinowy wykazała mniejszą intensywność absorpcji. Otrzymane wyniki oraz dane literaturowe pozwalają wnioskować, że liczba skondensowanych pierścieni diazepinowych wpływa na zmianę intensywności absorpcji pasma Q oraz $n \rightarrow \pi^*$. Zaobserwowano,

że ze zwiększeniem liczby skondensowanych pierścieni diazepinowych z rdzeniem porfirazynowym, zwiększa się intensywność pasma $n \rightarrow \pi^*$, co wynika z elektronodonorowego wpływu pierścieni diazepinowych.

Najkorzystniejsze właściwości absorpcyjne z punktu wymagań stawianych fotouczulaczom wykorzystywanym w PDT, posiada tribenzoporfirazyna magnezowa **18** oraz porfirazyna magnezowa **8**, wykazujące intensywną absorpcję światła o długości fali z zakresu 600-750 nm. Podsumowując wyniki dotyczące właściwości absorpcyjnych porfirazyn **8**, **18** i **19** należy podkreślić, że intensywność absorpcji w maksimum pasma Q wszystkich badanych związków (Tabela 7), jest znacznie większa niż powszechnie stosowanego fotouczulacza – Photofrinu ($\log \epsilon = 3,48$ w roztworze PBS). Ponadto intensywność absorpcji najbardziej obiecującej Pz **18**, jest porównywalna z fotouczulaczami stosowanymi w praktyce szpitalnej i badaniach klinicznych, charakteryzujących się dużymi wartościami współczynników absorpcji, tj. Motexafin lutetium ($\log \epsilon = 3,48$ w roztworze CH_3OH) i NPe6 ($\log \epsilon = 4,60$ w roztworze PBS) [117,118].

Tabela 7. Parametry charakteryzujące właściwości absorpcyjne porfirazyn **8**, **18** i **19**

Rozpuszczalnik	Maksima pasm absorpcji λ_{\max} [nm] ($\log \epsilon$)		
	Pz 8	Pz 18	Pz 19
DMF	689(4,58); 658(4,55) 364(4,72)	695(4,77); 661(4,71) 381(5,08)	662(4,14) 368(4,58)
DMSO	692(4,55); 658(4,52) 358(4,69)	689(4,77), 661(4,80) 378(5,15)	664(4,14) 368(4,56)

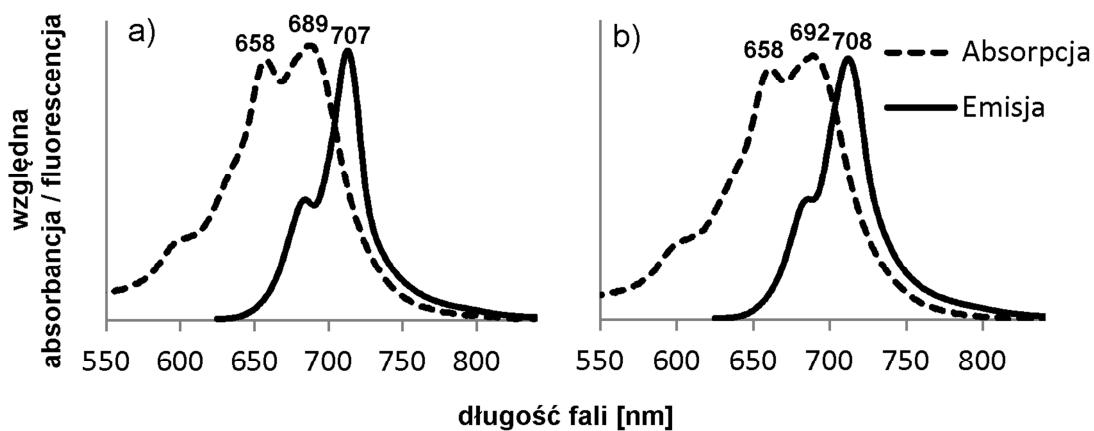
Kolejny etap pracy obejmował analizę właściwości emisyjnych porfirazyn **8**, **18** i **19**, która umożliwiła ocenę przydatności danego związku, jako fotouczulacza w diagnostyce fotodynamicznej. Jest to metoda polegająca na emisji czerwonej fluorescencji przez fotouczulacz, selektywnie skumulowany w tkance nowotworowej. Natomiast związki naturalnie występujące w zdrowych tkankach, emitują zieloną fluorescencję, co ułatwia określenie obszaru objętego zmianami nowotworowymi [10].

Właściwości emisyjne porfirazyn **8**, **18** i **19** oceniano w roztworach DMF i DMSO (Ryc. 32-34). Wyznaczono również wydajności kwantowe fluorescencji (Φ_F), stosując metodę porównawczą z ftalocyjaniną cynkową (ZnPc) jako odnośnikiem, której Φ_F w DMSO wynosi 0,20, a w DMF 0,17. Do obliczeń wykorzystano wzór:

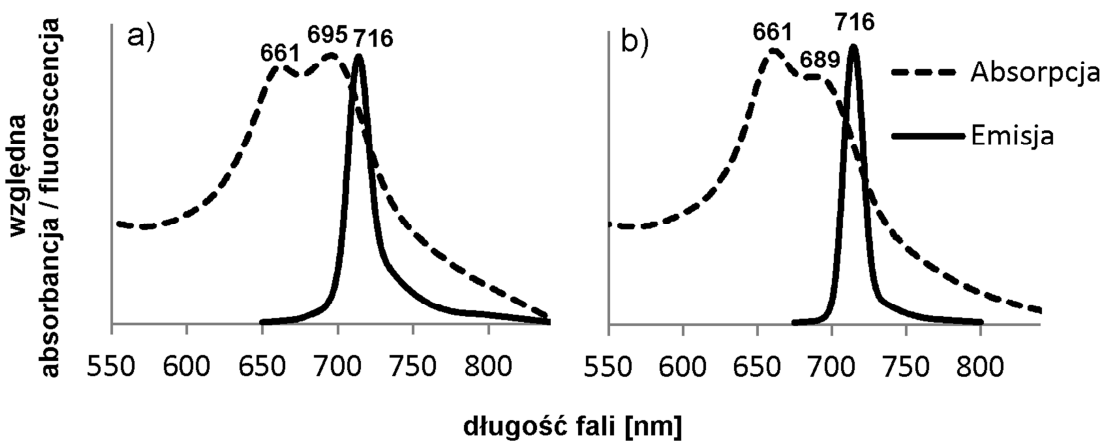
$$\Phi_F = \Phi_{F \text{ ZnPc}} \times (F_{\text{badanego związku}} / F_{\text{ZnPc}}) \times (A_{\text{ZnPc}} / A_{\text{badanego związku}})$$

gdzie:

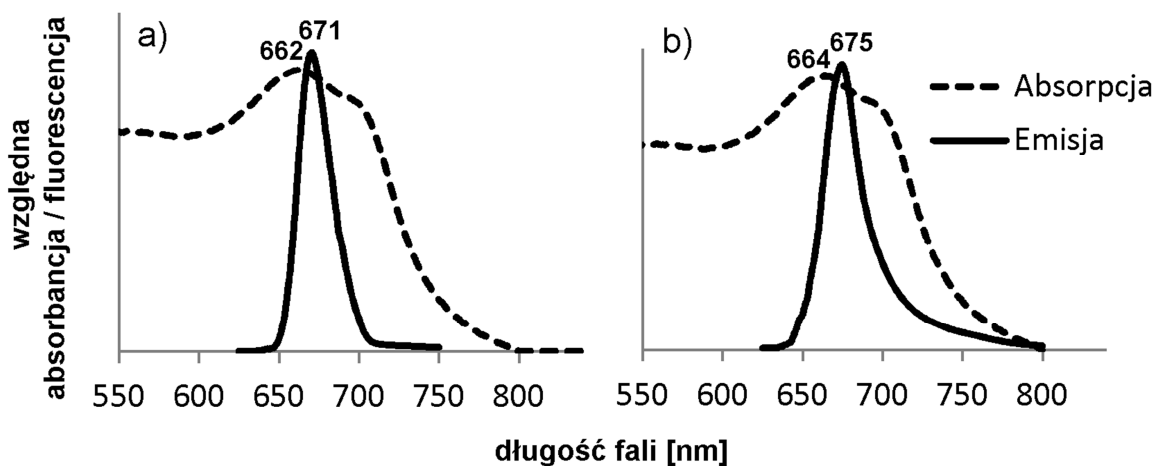
F odpowiada polu powierzchni pod sygnałem emisji, natomiast A wartości absorpcji przy długości fali odpowiadającej wzbudzeniu (360 nm) [119].



Ryc. 32. Widma absorpcji i emisji w zakresie pasma Q Pz 8 w: a) DMF, b) DMSO.



Ryc. 33. Widma absorpcji i emisji w zakresie pasma Q Pz 18 w a) DMF, b) DMSO.



Ryc. 34. Widma absorpcji i emisji w zakresie pasma Q Pz 19 w a) DMF, b) DMSO.

Tabela 8. Wydajność kwantowa fluorescencji porfirazyn **8**, **18** i **19**

Rozpuszczalnik	Wydajność kwantowa fluorescencji (Φ_F)			
	Pz 8	Pz 18	Pz 19	ZnPc [*]
DMF	$2,6 \cdot 10^{-2}$	$4,1 \cdot 10^{-3}$	$3,1 \cdot 10^{-5}$	0,17 ^{**}
DMSO	$4,5 \cdot 10^{-2}$	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$5,5 \cdot 10^{-5}$	0,20 ^{**}

* związek odniesienia; ** wartości referencyjne [120]

Zgodnie z uzyskanymi i przedstawionymi w Tabeli 8 wartościami Φ_F , zdecydowanie najintensywniejszą fluorescencję wykazała tribenzoporfirazyna **8**, zarówno w DMF jak i DMSO, z maksimum odpowiednio przy długości fali 707 nm i 708 nm. Dla porfirazyny magnezowej **18** zaobserwowano mniej intensywną fluorescencję, a maksimum pasma emisji występowało przy 716 nm dla obu rozpuszczalników. Natomiast najslabszą emisję wykazała demetalowana porfirazyna **19**, z maksimum przy 671 nm oraz 675 nm, odpowiednio w DMF i DMSO. Spośród znalezionych w piśmiennictwie doniesień dotyczących zależności intensywności fluorescencji od budowy porfiryroidów, jedynie praca Knyukshto i wsp. [121] dotyczyła porfirazyn diazepinowych. Wymienieni badacze przeprowadzili ocenę właściwości emisyjnych porfirazyny magnezowej, posiadającej cztery skondensowane pierścienie 5,7-difenylo-1,4-diazepinowe oraz tribenzoporfirazyny magnezowej zawierającej jeden pierścień. Wymienieni autorzy jako związek referencyjny przyjęli ftalocyjaninę magnezową i zaobserwowali, że tribenzoporfirazyna magnezowa wykazuje intensywną fluorescencję, lecz mniejszą niż w przypadku wzorca. Na tej podstawie stwierdzono, że zastąpienie pierścienia benzenu pierścieniem 5,7-difenylo-1,4-diazepiny, powoduje osłabienie właściwości emisyjnych. Ponadto stwierdzono, że porfirazyna magnezowa zawierająca cztery pierścienie diazepinowe nie wykazuje fluorescencji, a jej wygaszanie wynikające z obecności skondensowanych pierścieni 1,4-diazepinowych, może być skutkiem dodatkowych procesów bezpromienistej dezaktywacji wzbudzonego stanu singletowego. Wspomniane procesy powodujące powrót cząsteczki ze stanu wzbudzonego do stanu podstawowego, bez emisji fluorescencji, mogą być uwarunkowane wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem ładunku oraz oddziaływaniami solwatacyjnymi [121]. Wnioski z badań opisanych przez Knyukshto i wsp., wykorzystano przy określeniu zależności pomiędzy liczbą pierścieni styrylodiazepinowych, a właściwościami emisyjnymi makrocykli **8**, **18** i **19**. Porównując wydajność kwantową fluorescencji porfirazyn **8** i **18**, z wartością $\Phi_F=0,76$ podaną w piśmiennictwie dla ftalocyjaniny magnezowej, można zauważyć, że wprowadzenie

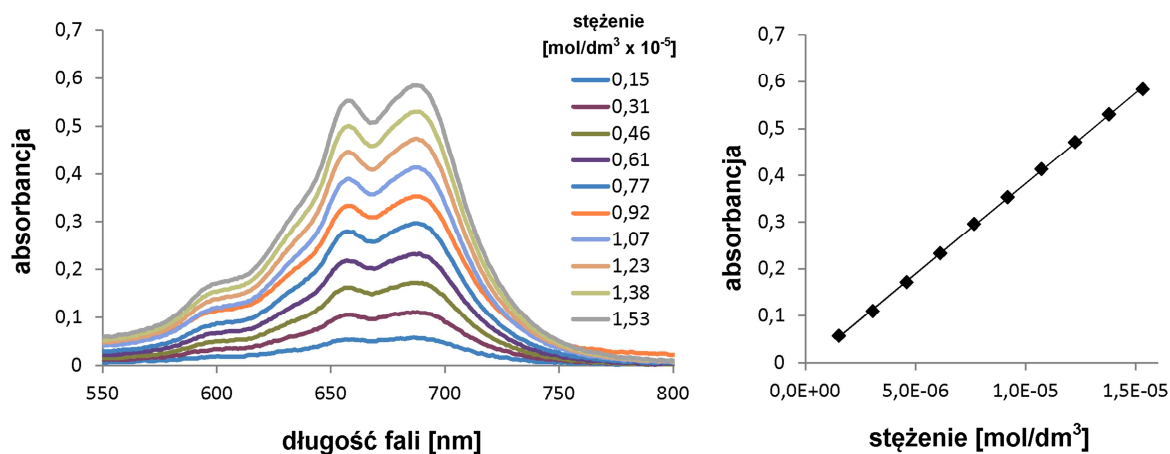
skondensowanych pierścieni styrylodiazepinowych powoduje znaczne osłabienie właściwości emisyjnych. Tribenzoporfirazyne magnezowa **8** posiadająca jeden podstawnik styrylodiazepinowy, w porównaniu z ftalocyjaniną magnezową wykazała znacznie słabszą fluorescencję. A jeszcze słabsze właściwości emisyjne obserwowano w przypadku porfirazyne magnezowej **18**, zawierającej cztery pierścienie styrylodiazepinowe. Na właściwości emisyjne porfirynoidów duży wpływ ma również obecność oraz rodzaj jonu centralnego w pierścieniu makrocyklicznym. Powyższą zależność zaobserwowano także w odniesieniu do analizowanych związków, ponieważ porfirazyne magnezowa **18** posiadała znacznie wyższe wartości Φ_F niż pochodna demetalowana **19**. Podobne wnioski wynikają z badań przeprowadzonych przez Sobottę i wsp., dotyczących porfirazyn z podstawnikami 2,5-dimetylopirolilowymi i dimetyloaminowymi, w których również potwierdzono znacznie większą intensywność fluorescencji porfirazyne magnezowej niż pochodnej demetalowanej [116].

IV. 4. 2. Właściwości agregacyjne

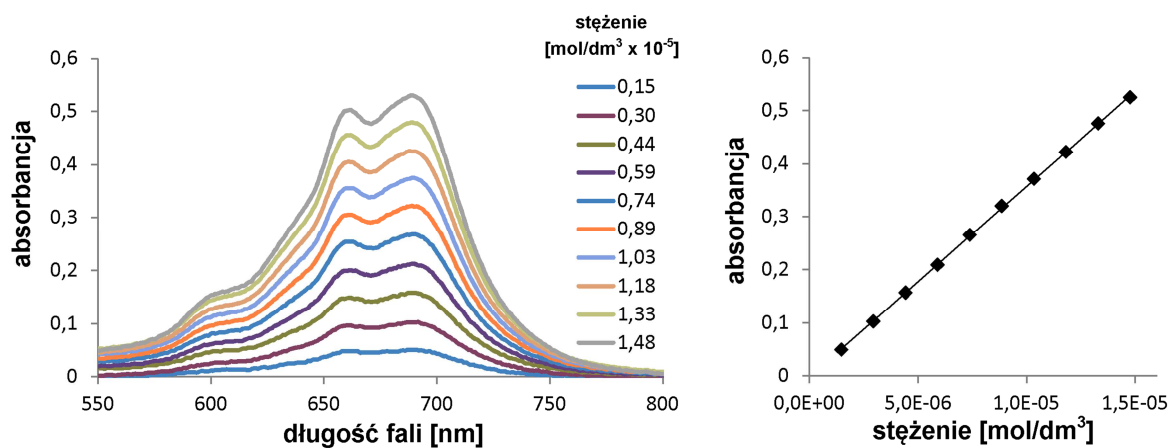
Porfirynoidy ze względu na wysoką lipofilowość i płaską strukturę rdzenia makrocyklicznego, posiadają możliwość wzajemnego oddziaływania cząsteczek, co przekłada się na dużą tendencję do tworzenia agregatów. Zjawisko to jest niekorzystne ponieważ obniża rozpuszczalność związków, powoduje problemy podczas syntezy i wyodrębniania związków z mieszanin poreakcyjnych, a także późniejszej identyfikacji. Ponadto zgodnie z licznymi doniesieniami literaturowymi, tworzenie agregatów ogranicza możliwość zastosowania w terapii fotodynamicznej. Wykazano, że powoduje skrócenie czasu życia stanu trypletowego oraz obniża wydajność generowania tlenu singletowego, a przez to osłabia aktywność fotodynamiczną. Wpływa także na zmniejszenie rozpuszczalności w środowisku wodnym, w tym w płynach ustrojowych, co utrudnia dystrybucję w organizmie i przenikanie przez błony biologiczne [122-126]. Jedną z metod wykorzystywanych do oceny właściwości agregacyjnych, jest metoda spektrofotometryczna polegająca na analizie zmian przebiegu widm UV-Vis, w zależności od stężenia badanego związku. Jeżeli zależność absorbancji od stężenia fotouczulacza ma charakter liniowy i spełnia prawo absorpcji, można wnioskować o braku tendencji do agregacji. Natomiast powstawanie, zanikanie lub przemieszczanie pasm absorpcji oraz brak liniowej zależności absorbancji od stężenia, wskazuje na tworzenie agregatów [123,127,128]

W celu określenia właściwości agregacyjnych, przygotowano roztwory o różnych stężeniach porfirazyn **8**, **18** i **19**, stosując jako rozpuszczalniki DMF oraz DMSO i wykreślono widma UV-Vis, przedstawione na Ryc. 35-40. Nie zaobserwowano zmian w profilu widm ze wzrostem stężenia badanych związków. Następnie wyznaczono zależność absorbancji (A), mierzonej w λ_{\max} pasma Q, od stężenia porfirazyn (c). Zaobserwowano liniową korelację zależności $A=f(c)$. W celu potwierdzenia, czy w analizowanym zakresie stężeń porfirazyny spełniały prawo Lamberta-Beera, przeprowadzono analizę statystyczną. Parametry statystyczne zależności absorbancji od stężenia roztworów Pz **8**, **18** i 19 w DMF, podano w Tabeli 9, natomiast dla roztworów w DMSO w Tabeli 10. Większa bezwzględna wartość parametru t obliczonego dla odciętej (b), od wartości tabelarycznej parametru t , potwierdza istotność parametru b , co świadczy, że prawo Lamberta-Beera nie jest zachowane. Jak wynika z Tabel 9 i 10 prawo absorpcji jest spełnione dla Pz **8** w DMF i DMSO. Można zatem wnioskować, że tylko tribenzoporfirazyna magnezowa **8** nie ulega agregacji w ocenianym zakresie stężeń, w przeciwieństwie do porfirazyn **18** i **19**. W piśmiennictwie istnieje wiele

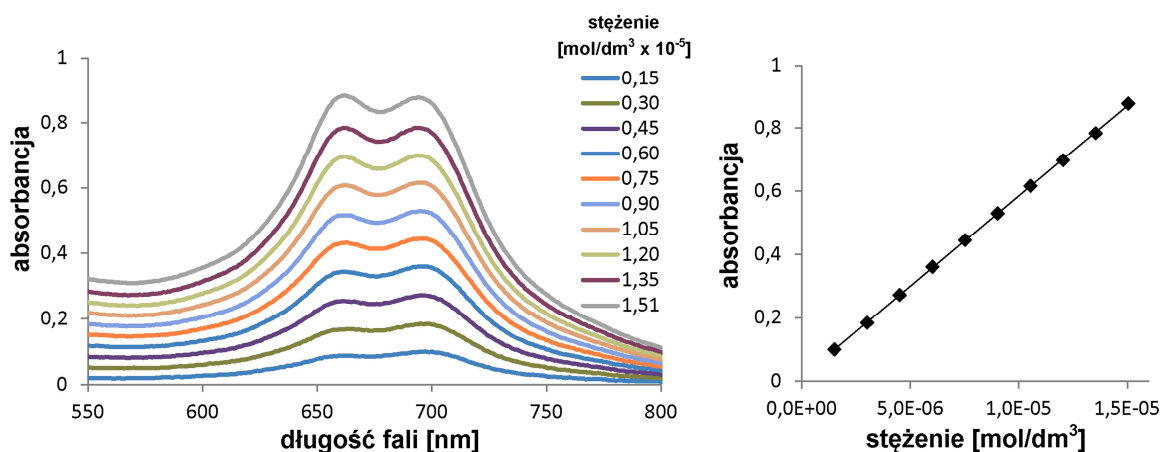
doniesień dotyczących agregacji porfirynoidów. Silne właściwości agregacyjne zaobserwowano również w przypadku innych porfirazyn, zawierających cztery skondensowane pierścienie diazepinowe. Tarakanov i wsp. stwierdzili, że w wyniku agregacji powstają najczęściej dimery, poprzez tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy atomami azotu pierścieni diazepinowych, sąsiadujących cząsteczek porfirazyn [74,112].



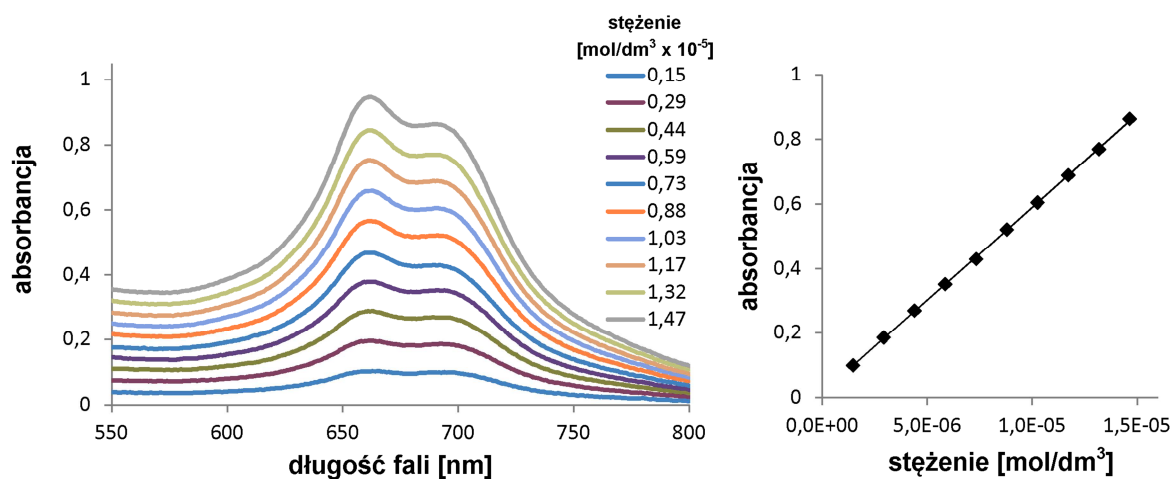
Ryc. 35. Widma absorpcji w zakresie pasma Q roztworów Pz **8** w DMF ($c=1,53 \cdot 10^{-6}$ – $1,53 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³) oraz zależność stężenia i absorbancji odpowiadającej maksimum absorpcji pasma Q ($\lambda=689$ nm).



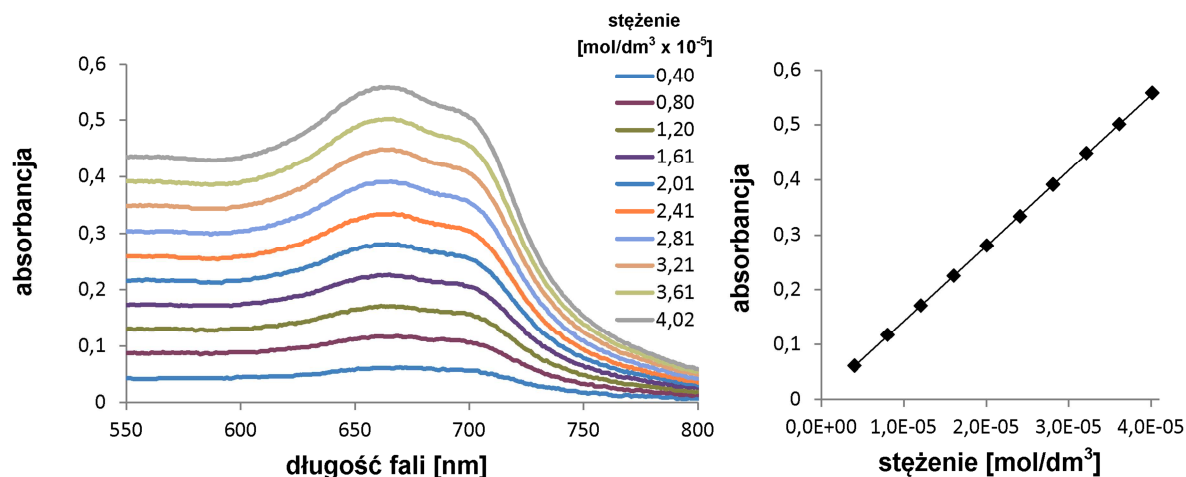
Ryc. 36. Widma absorpcji w zakresie pasma Q roztworów Pz **8** w DMSO ($c=1,48 \cdot 10^{-6}$ – $1,48 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³) oraz zależność stężenia i absorbancji odpowiadającej maksimum absorpcji pasma Q ($\lambda=692$ nm).



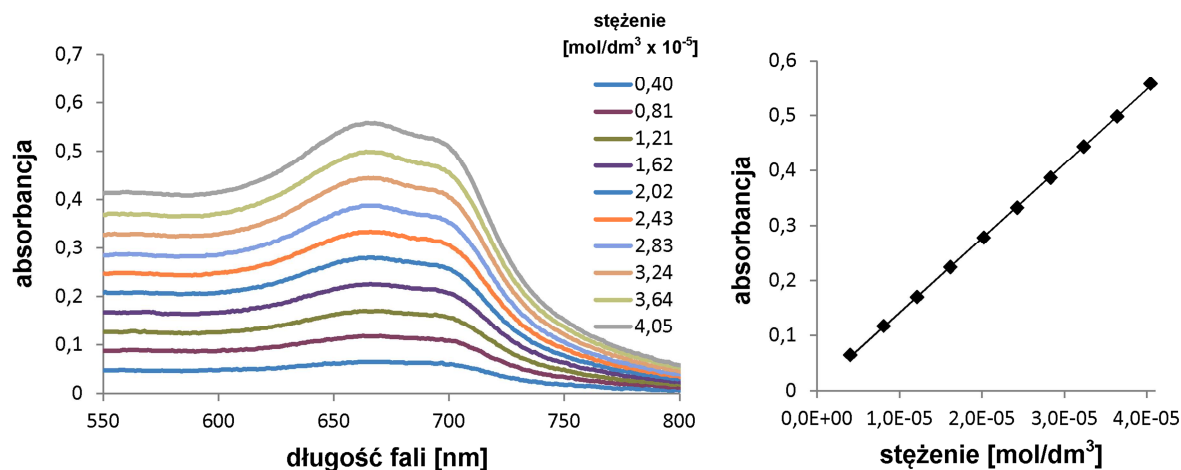
Ryc. 37. Widma absorpcji w zakresie pasma Q roztworów Pz **18** w DMF ($c=1,51 \cdot 10^{-6}$ – $1,51 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³) oraz zależność stężenia i absorbancji odpowiadającej maksimum absorpcji pasma Q ($\lambda=695$ nm).



Ryc. 38. Widma absorpcji w zakresie pasma Q roztworów Pz **18** w DMSO ($c=1,47 \cdot 10^{-6}$ – $1,47 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³) oraz zależność stężenia i absorbancji odpowiadającej maksimum absorpcji pasma Q ($\lambda=689$ nm).



Ryc. 39. Widma absorpcji w zakresie pasma Q roztworów Pz **19** w DMF ($c=4,02 \cdot 10^{-6}$ – $4,02 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³) oraz zależność stężenia i absorbancji odpowiadającej maksimum absorpcji pasma Q ($\lambda=662$ nm).



Ryc. 40. Widma absorpcji w zakresie pasma Q roztworów Pz **19** w DMSO ($c=4,05 \cdot 10^{-6}$ – $4,05 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³) oraz zależność stężenia i absorbancji odpowiadającej maksimum absorpcji pasma Q ($\lambda=664$ nm).

Tabela 9. Parametry statystyczne zależności absorpcji od stężenia Pz **8**, **18** i **19** w DMF

Porfirazyna	8	18	19
Stężenie [mol/dm ³]	1,53·10 ⁻⁶ –1,53·10 ⁻⁵	1,51·10 ⁻⁶ –1,51·10 ⁻⁵	4,02·10 ⁻⁶ –4,02·10 ⁻⁵
Długość fali [nm]	689	695	662
n	10	10	10
a	38705	57071	13712
S _a	219,40	190,78	36,668
Δa	505,94	439,93	84,556
b	-0,00465	0,0137	0,00550
S _b	0,00208	0,00178	0,00091
Δb	0,00480	0,00410	0,00211
t _a	176,4	299,16	373,96
t _b *	-2,229	-7,682	6,020
t _{α, f} *	2,306	2,306	2,306
r ²	0,9997	0,9999	0,9999

n – liczba pomiarów, a – wartość współczynnika kierunkowego prostej, S_a - błąd standardowy współczynnika kierunkowego prostej, Δa – przedział ufności współczynnika kierunkowego prostej, b – wartość y dla x=0 w równaniu prostej y=ax+b, S_b - błąd standardowy współczynnika b, Δb - przedział ufności współczynnika b, t_b – parametr t obliczony empirycznie dla współczynnika b, t_{α, f} – wartość tabelaryczna parametru t dla poziomu ufności 0,95, r² – współczynnik determinacji;

*większa bezwzględna wartość parametru t_b od t_{α, f} oznacza, że parametr b jest istotny, co wskazuje na występowanie agregacji, ponieważ prawo absorpcji Lamberta-Beara nie jest zachowane

Tabela 10. Parametry statystyczne zależności absorbancji od stężenia Pz **8**, **18** i **19** w DMSO

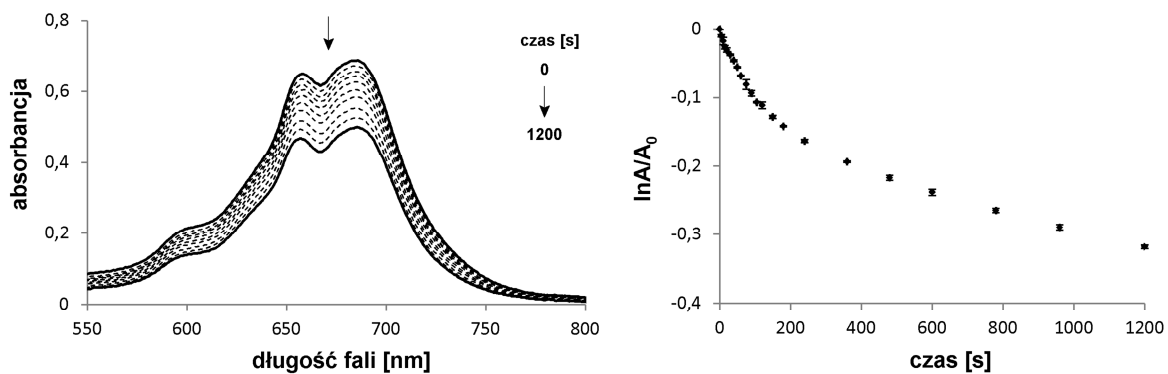
Porfirazyna	8	18	19
Stężenie [mol/dm ³]	$1,48 \cdot 10^{-6}$ – $1,48 \cdot 10^{-5}$	$1,47 \cdot 10^{-6}$ – $1,47 \cdot 10^{-5}$	$4,05 \cdot 10^{-6}$ – $4,05 \cdot 10^{-5}$
Długość fali [nm]	692	689	664
n	10	10	10
a	35921	57591	13508
S _a	173,86	246,40	65,565
Δa	400,9	568,20	151,19
b	-0,00229	0,0137	0,00669
S _b	0,00159	0,00224	0,00165
Δb	0,00367	0,00516	0,00380
t _a	206,6	233,73	206,02
t _b *	-1,439	6,130	4,063
t _{α, f} *	2,306	2,306	2,306
r ²	0,9998	0,9998	0,9998

n – liczba pomiarów, a – wartość współczynnika kierunkowego prostej, S_a - błąd standardowy współczynnika kierunkowego prostej, Δa – przedział ufności współczynnika kierunkowego prostej, b - wartość y dla x=0 w równaniu prostej y=ax+b, S_b – błąd standardowy współczynnika b, Δb – przedział ufności współczynnika b, t_b – parametr t obliczony empirycznie dla współczynnika b, t_{α, f} – wartość tabelaryczna parametru t dla poziomu ufności 0,95, r² – współczynnik determinacji,
 *większa bezwzględna wartość parametru t_b od t_{α, f} oznacza, że parametr b jest istotny, co wskazuje na występowanie agregacji, ponieważ prawo absorpcji Lamberta-Beara nie jest zachowane

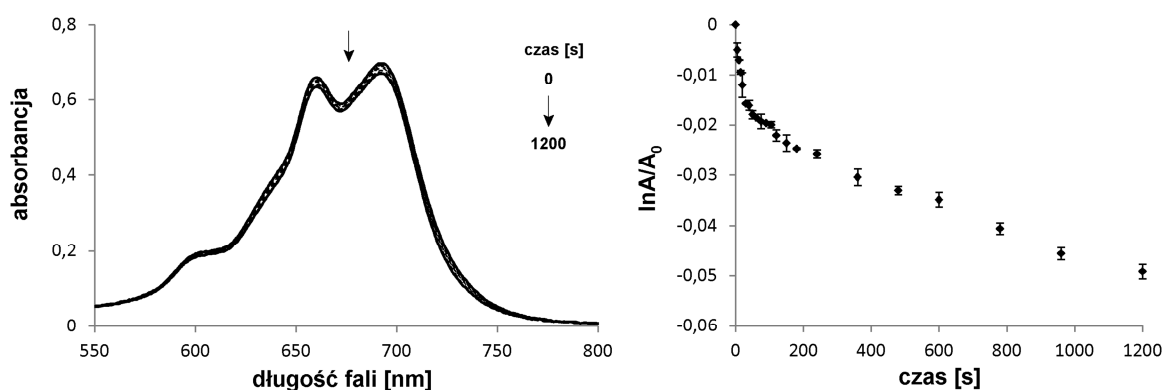
IV. 4.3. Fotodegradacja

Ocena trwałości fotochemicznej stanowi istotny etap analizy nowych związków, o potencjalnym zastosowaniu jako fotouczulaczy. Zakłada się, że właściwość ta zależy w znacznym stopniu od stabilności wiązań w pierścieniu makrocyklicznym, jak również od zastosowanego rozpuszczalnika. Większość fotouczulaczy wykorzystywanych w terapii fotodynamicznej, ulega rozkładowi pod wpływem światła, co wpływa na zmniejszenie intensywności absorpcji i fluorescencji. Proces ten, jest zwykle określany jako fotodegradacja lub fotowycielanie i zachodzi najczęściej w wyniku reakcji fotouczulacza z tlenem singletowym, innymi reaktywnymi formami tlenu lub wolnymi rodnikami. Zdolność rozkładu fotochemicznego substancji wykorzystywanych w PDT, może stanowić zarówno wadę, jak i zaletę. Zbyt szybki rozkład fotouczulacza podczas naświetlania, spowoduje niecałkowite zniszczenie tkanki docelowej. Z drugiej strony w wyniku rozkładu fotochemicznego obniża się stężenie sensybilizatora w zdrowych tkankach, w szczególności w skórze, a przez to maleje możliwość nieodwracalnych uszkodzeń zdrowych tkanek. Zjawisko fotodegradacji jest również uwzględniane przy ustalaniu odpowiedniej dawki fotouczulacza, ponieważ jego stężenie w tkankach ulega zmniejszeniu w wyniku naświetlania [129,130]. Ponadto zaobserwowano, że ekspozycja niektórych fotouczulaczy na światło, np. pochodnych hematoporfiryny, powoduje powstawanie produktów fotodegradacji, wykazujących zdolność absorpcji światła czerwonego. Z tego powodu przy ustalaniu intensywności oraz czasu naświetlania podczas PDT, należy uwzględnić dawkę promieniowania pochłanianego przez powstające produkty fotorozkładu [131].

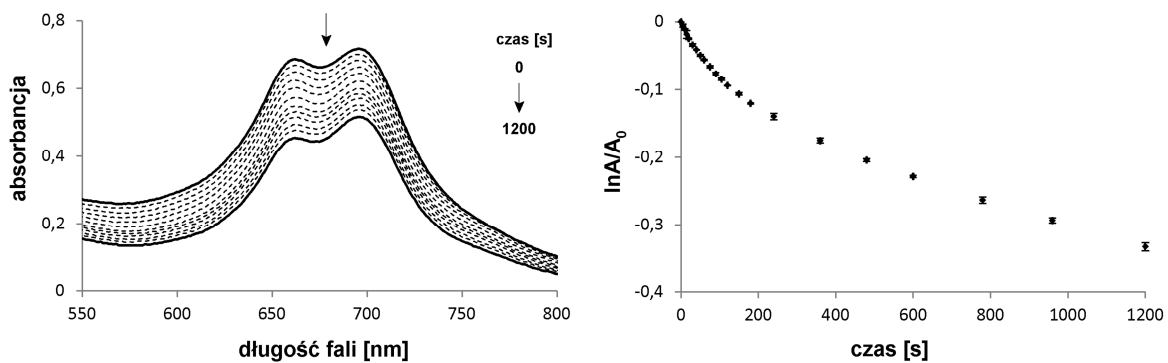
Jedną z metod oceny fotodegradacji jest spektrofotometria UV-Vis, a analiza jakościowa zachodzących procesów fotochemicznych, polega na obserwacji zmian w przebiegu widm elektronowych [129,130,132]. Metoda UV-Vis została zastosowana także do oceny trwałości fotochemicznej porfirazyn **8**, **18** i **19**, a także ftalocyjaniny cynkowej (ZnPc), która stanowiła substancję odniesienia (Ryc. 41-48).



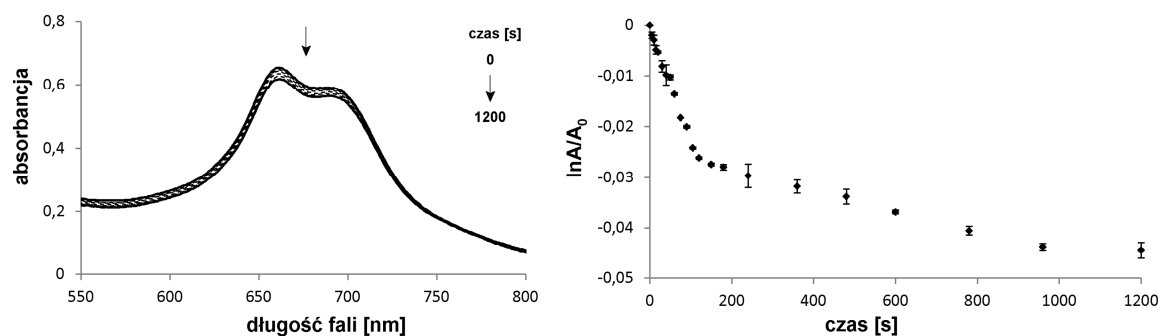
Ryc. 41. Zmiany w widmie UV-Vis w zakresie pasma Q podczas naświetlania roztworu Pz 8 w DMF oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A/A_0=f(t)$.



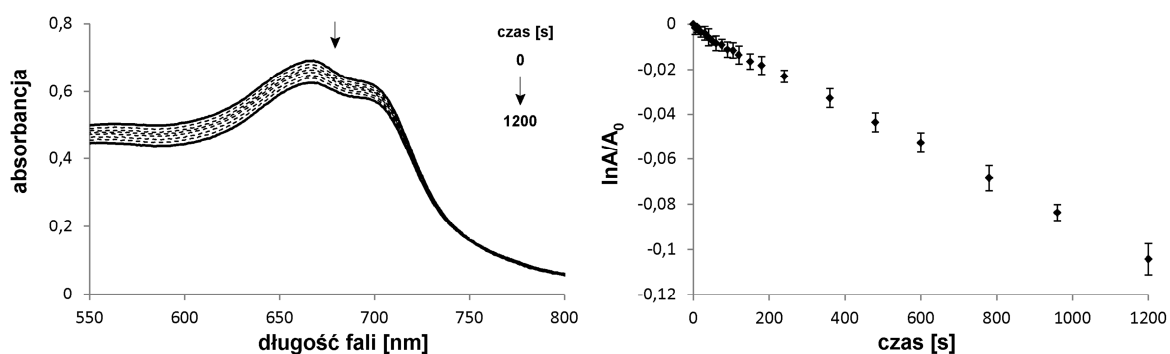
Ryc. 42. Zmiany w widmie UV-Vis w zakresie pasma Q podczas naświetlania roztworu Pz 8 w DMSO oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A/A_0=f(t)$.



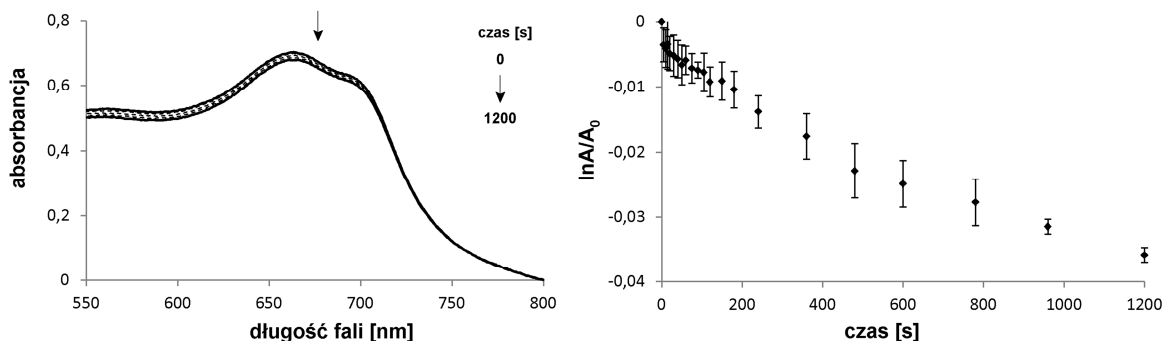
Ryc. 43. Zmiany w widmie UV-Vis w zakresie pasma Q podczas naświetlania roztworu Pz 18 w DMF oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A/A_0=f(t)$.



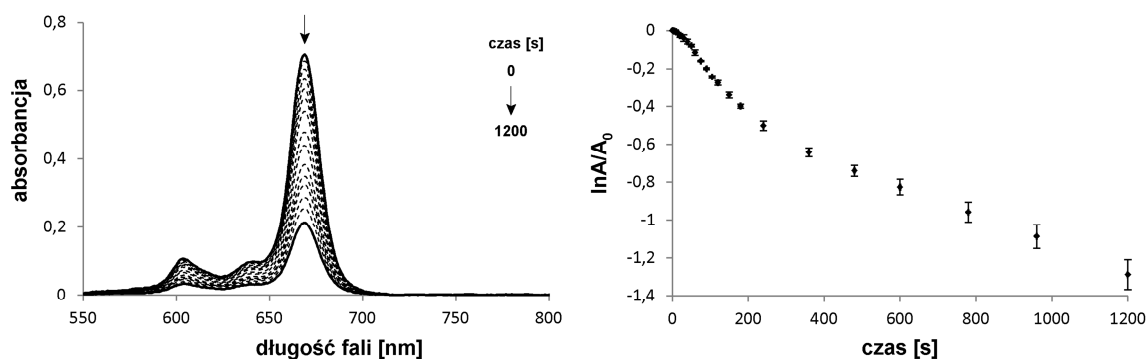
Ryc. 44. Zmiany w widmie UV-Vis w zakresie pasma Q podczas naświetlania roztworu Pz 18 w DMSO oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A/A_0=f(t)$.



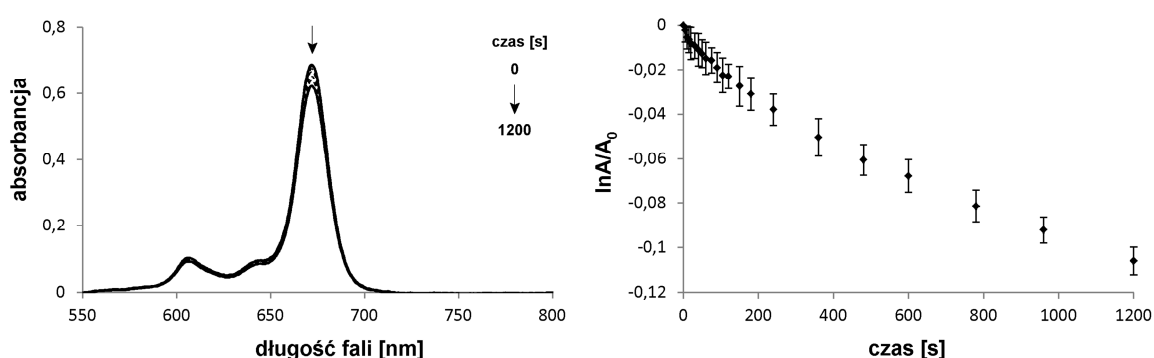
Ryc. 45. Zmiany w widmie UV-Vis w zakresie pasma Q podczas naświetlania roztworu Pz 19 w DMF oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A/A_0=f(t)$.



Ryc. 46. Zmiany w widmie UV-Vis w zakresie pasma Q podczas naświetlania roztworu Pz 19 w DMSO oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A/A_0=f(t)$.



Ryc. 47. Zmiany w widmie UV-Vis w zakresie pasma Q podczas naświetlania roztworu ZnPc w DMF oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A/A_0=f(t)$.



Ryc. 48. Zmiany w widmie UV-Vis w zakresie pasma Q roztworu ZnPc w DMSO podczas naświetlania oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A/A_0=f(t)$.

W czasie ekspozycji na światło, w widmach wszystkich analizowanych porfirazyn **8**, **18** i **19**, niezależnie od zastosowanego rozpuszczalnika, obserwowano zmniejszenie intensywności pasm absorpcji, a jednocześnie nie zauważono wykształcania nowych. Zgodnie z danymi literaturowymi, zmniejszenie absorpcji fotouczulaczy pod wpływem światła, któremu nie towarzyszy powstawanie nowych pasm, jest skutkiem rozpadu cząsteczek na mniejsze fragmenty, nieabsorbujące promieniowania z zakresu światła widzialnego [133]. Istotnych informacji dostarczyła również ocena ilościowa procesu fotodegradacji, polegająca na wyznaczeniu zależności pomiędzy wartością absorbancji (A), odpowiadającej maksimum absorpcji pasma Q, od czasu ekspozycji na promieniowanie (t). Zaobserwowano, że dla wszystkich badanych związków, zarówno w DMF jak i DMSO, proces fotodegradacji zachodził zgodnie z równaniem reakcji kinetycznej pierwszego rzędu. Zmiany w widmach UV-Vis w zakresie pasma Q podczas naświetlania roztworów Pz **8**, **18** i **19**, a także wykresy przedstawiające zależność $\ln A/A_0=f(t)$, zamieszczono na Ryc. 41-48. Analiza zależności $\ln A/A_0=f(t)$ wykazała, że w przypadku roztworów w DMF proces fotorozkładu porfirazyn **8**

i **18**, zawierających jon magnezu w centrum makrocyklicznym (Ryc. 41, 43), zachodził w dwóch etapach, natomiast dla demetalowanej porfirazyny **19** był procesem jednoetapowym (Ryc. 45). Analogiczne zależności zaobserwowali Sobotta i wsp. [116], którzy badali serię porfirazyn posiadających podstawniki 2,5-dimetylopirolilowe i dimetyloaminowe. Wymienieni autorzy stwierdzili, że w roztworach DMF proces fotodegradacji porfirazyn zawierających jony metali zachodzi dwuetapowo, podczas gdy porfirazyny demetalowanej jest procesem jednoetapowym. Natomiast fotodegradacja roztworów w DMSO, w odniesieniu do wszystkich porfirazyn zachodziła w dwóch etapach (Ryc. 42, 44, 46).

Ocena trwałości fotochemicznej porfirazyn **8**, **18** i **19** obejmowała również wyznaczenie parametrów kinetycznych, które obliczono na podstawie zależności $\ln A/A_0=f(t)$ i zamieszczono w Tabeli 11 dla roztworów w DMF oraz Tabeli 12 dla DMSO. Uzyskane wartości stałych szybkości reakcji (k) oraz czasu półtrwania ($t_{0,5}$) wskazują, że proces fotodegradacji zachodzi znacznie szybciej w roztworach DMF niż w DMSO. Ponadto pierwszy etap rozkładu wszystkich badanych porfirazyn, w przypadku obu rozpuszczalników był znacznie szybszy, niż etap drugi. Wyjątek stanowiła fotodegradacja Pz **19** w roztworze DMF, zachodząca jednoetapowo. Porównanie przedstawionych w Tabeli 11 parametrów kinetycznych dotyczących pierwszego etapu, wskazuje na szybszy przebieg w przypadku porfirazyny **8** niż Pz **18**. Podczas gdy drugi etap rozkładu Pz **8**, przebiegał już wolniej niż analogiczny etap dla Pz **18**. Jednak zdecydowanie najwolniej fotorozkładowi ulegała porfirazyna **19**, pozbawiona jonu centralnego. Natomiast jak wynika z Tabeli 12, szybkość rozkładu fotochemicznego porfirazyn w roztworach DMSO, maleje w przypadku obu etapów zgodnie z zależnością: Pz **8** > Pz **18** > Pz **19**. Ilościową ocenę procesu fotodegradacji określono również jako procent rozkładu porfirazyn **8**, **18** i **19** oraz ftalocyjaniny cynkowej (ZnPc), po 20 minutach naświetlania roztworów w DMF i DMSO. Z porównania danych zamieszczonych w Tabeli 11 wynika, że w roztworach DMF w jednakowym czasie rozkłada się ok. 30% porfirazyn **8** i **18**, a tylko ok. 10% Pz **19**. Również w DMSO Pz **19** okazała się najbardziej stabilna. W tym przypadku po 20 minutach naświetlania rozkładowi uległo 4,7% Pz **8**, 4,3% Pz **18** i 3,5% Pz **19** (Tabela 12). Oceniono również procent rozkładu ZnPc, będącej związkiem porównawczym i obliczono, że po 20 minutach ekspozycji na światło, uległo rozkładowi odpowiednio 72,4% w roztworze DMF oraz 10,1% w DMSO. Uzyskane wyniki potwierdzają większą trwałość fotochemiczną wszystkich analizowanych porfirazyn **8**, **18** i **19** niż ZnPc. W piśmiennictwie można znaleźć doniesienia wskazujące większą trwałość porfirynoidów demetalowanych w porównaniu do inkorporowanych jonami metali. Między innymi Sobotta i wsp. analizując porfirazyny zawierające podstawniki 2,5-dimetylopirolilowe

i dimetyloaminowe, podkreślali znacznie większą szybkość fotorozkładu porfirazyny magnezowej w porównaniu z formą demetalowaną. Wymienieni autorzy stwierdzili, że szybkość fotodegradacji porfirazyny magnezowej, jest ok. 40-krotnie większa niż pochodnej demetalowanej [116].

Tabela 11. Parametry kinetyczne zależności $\ln A/A_0=f(t)$ dla Pz 8, 18, 19 w DMF

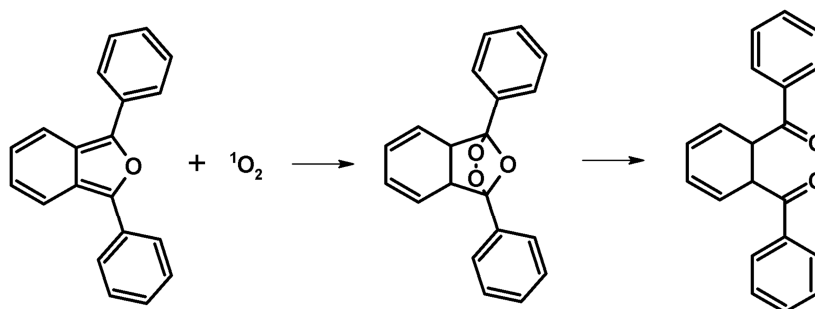
Związek	Pz 8	Pz 18	Pz 19	ZnPc
Etap I				
$10^3(k \pm \Delta k)$	9,4±0,6	7,9±0,3	0,085± 0,001	10,0± 0,3
$10^2(b \pm \Delta b)$	-1,0±3,2	-2,4±1,7	-0,22± 0,05	30,8±3,3
$t_{0,5}$ [s]	73,4	87,5	8140	69,4
$10^4 S_a$	2,73	1,27	0,0063	1,33
$10^2 S_b$	1,45	0,775	0,027	1,41
r	0,996	0,999	0,999	0,999
n	12	13	22	9
t_a	-34,6	-62,4	-134,0	-75,4
t_b	-0,72	-3,1	-8,3	21,8
$t_{\alpha, f}$	2,228	2,201	2,086	2,365
Etap II				
$10^4(k \pm \Delta k)$	1,5±0,2	1,8±0,1	Nie zaobserwowano etapu II	7,6±0,3
$10^2(b \pm \Delta b)$	-14,6± 1,4	-12,2± 1,3		-37,0± 2,4
$t_{0,5}$ [s]	4700	3900		914
$10^6 S_a$	6,60	4,65		10,9
$10^3 S_b$	5,17	3,93		8,53
r	0,996	0,999		0,999
n	6	5		6
t_a	-22,4	-38,2		-69,7
t_b	-28,2	-30,9		-43,4
$t_{\alpha, f}$	2,776	3,182		2,776
% rozkładu związku	27,3±0,3	28,3±0,4	9,4±0,4	72,4±3,2
<p>k – stała szybkości, równa ujemnej wartości współczynnika kierunkowego prostej, Δk - przedział ufności stałej szybkości, b - wartość y dla x=0 w równaniu prostej $y=ax+b$, Δb - przedział ufności współczynnika b, $t_{0,5}$ – okres półtrwania, S_a - błąd standardowy współczynnika kierunkowego prostej, S_b - błąd standardowy współczynnika b, r - współczynnik regresji, n - liczba pomiarów, t_b - parametr t obliczony empirycznie dla współczynnika b, $t_{\alpha, f}$ – wartość tabelaryczna parametru t dla poziomu ufności 0,95</p>				

Tabela 12. Parametry kinetyczne zależności $\ln A/A_0=f(t)$ dla Pz 8, 18, 19 w DMSO

Związek	Pz 8	Pz 18	Pz 19	ZnPc
Etap I				
$10^3(k \pm \Delta k)$	44,6±6,1	11,5±0,9	3,6±0,5	5,7±0,4
$10^2(b \pm \Delta b)$	6,9±10,1	1,9±2,4	-26,7±6,6	-13,7± 3,9
$t_{0,5}$ [s]	15,5	60,3	195,0	122,0
$10^4 S_a$	22,1	3,72	2,28	2,03
$10^2 S_b$	3,66	1,00	3,08	1,81
r	0,995	0,997	0,972	0,993
n	6	8	16	13
t_a	-20,2	-30,9	-15,6	-7,6
t_b	1,89	1,89	-8,7	-28,0
$t_{\alpha, f}$	2,776	2,447	2,145	2,201
Etap II				
$10^5(k \pm \Delta k)$	2,5±0,2	2,1±0,1	0,18±0,03	6,6± 0,6
$10^2(b \pm \Delta b)$	-2,0±1,2	-2,4± 0,1	-1,4±0,2	-2,8±0,4
$t_{0,5}$ [s]	30400	33500	37400	10500
$10^6 S_a$	0,86	0,42	0,58	2,02
$10^3 S_b$	0,53	0,22	0,53	1,58
r	0,995	0,999	0,999	0,998
n	10	9	4	6
t_a	-29,6	-48,8	-31,9	-32,7
t_b	-37,8	-111,0	-25,6	-17,8
$t_{\alpha, f}$	2,306	2,365	4,303	2,776
% rozkładu związku	4,7±0,1	4,3±0,2	3,5±0,1	10,1±0,5
<p>k – stała szybkości równa ujemnej wartości współczynnika kierunkowego prostej, Δk - przedział ufności stałej szybkości, b - wartość y dla x=0 w równaniu prostej $y=ax+b$, Δb - przedział ufności współczynnika b, $t_{0,5}$ – okres półtrwania, S_a - błąd standardowy współczynnika kierunkowego prostej, S_b - błąd standardowy współczynnika b, r - współczynnik regresji, n - liczba pomiarów, t_b - parametr t obliczony empirycznie dla współczynnika b, $t_{\alpha, f}$ – wartość tabelaryczna parametru t dla poziomu ufności 0,95</p>				

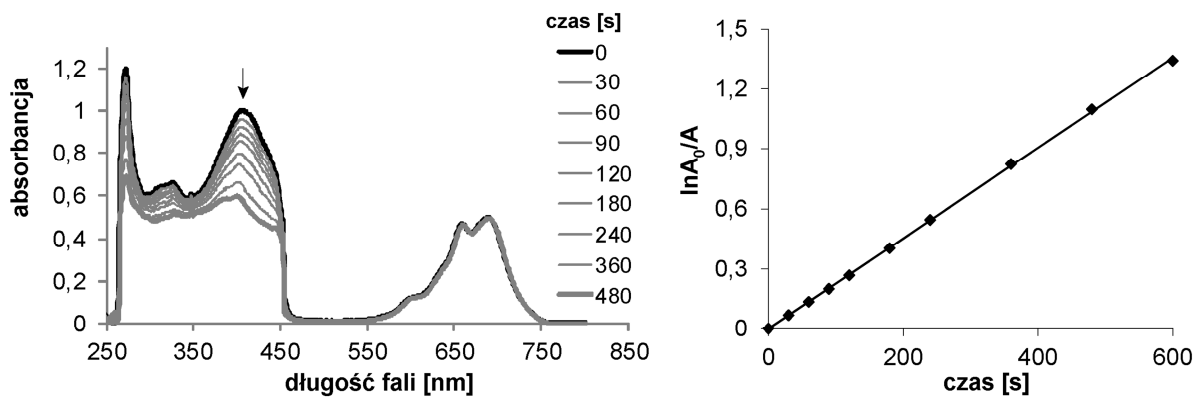
IV. 4.3. Generowanie tlenu singletowego

Tlen singletowy jest uważany za główny czynnik powodujący obumieranie tkanki docelowej po przeprowadzeniu terapii fotodynamicznej [6]. Z tego względu wyznaczenie wydajności kwantowej generowania tlenu singletowego (Φ_{Δ}), stanowi istotny etap przy ocenie potencjalnych właściwości fotouczulających. Obecnie istnieje wiele sposobów oceny generowania tlenu singletowego, a jedną z metod stosowanych do wyznaczania wydajności kwantowej Φ_{Δ} , jest porównawcza metoda spektrofotometryczna. Metoda ta polega na analizie zmian w widmie UV-Vis barwnych związków, które pod wpływem tlenu singletowego ulegają rozkładowi, powodując stopniowy zanik pasm absorpcji. Związek o takich właściwościach jest określany mianem chemicznego wygaszacza tlenu singletowego, a do najczęściej stosowanych należy 1,3-difenyloizobenzofuran (DPBF), dimetyloantracen oraz luminol. W celu wyznaczenia wydajności kwantowej Φ_{Δ} porfirazyn **8**, **18** i **19** wykorzystano DPBF, który jako wygaszcz tlenu singletowego ulega utlenieniu i rozkładowi, zgodnie z liniowym równaniem reakcji kinetycznej pierwszego rzędu (Ryc. 49) [134]. Odnośnikiem była ftalocyjanina cynkowa (ZnPc), której wartości Φ_{Δ} zgodnie z danymi z piśmiennictwa wynoszą 0,67 w DMSO oraz 0,56 w DMF [135]. Proces generowania tlenu singletowego monitorowano w DMSO oraz DMF, doświadczenie prowadzono w atmosferze powietrza.

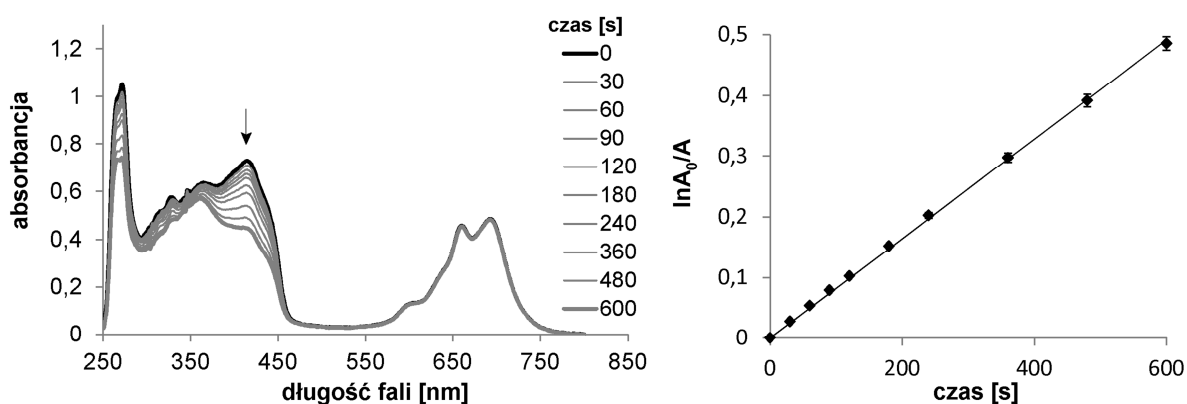


Ryc. 49. Reakcja rozkładu 1,3-difenyloizobenzofuranu pod wpływem tlenu singletowego.

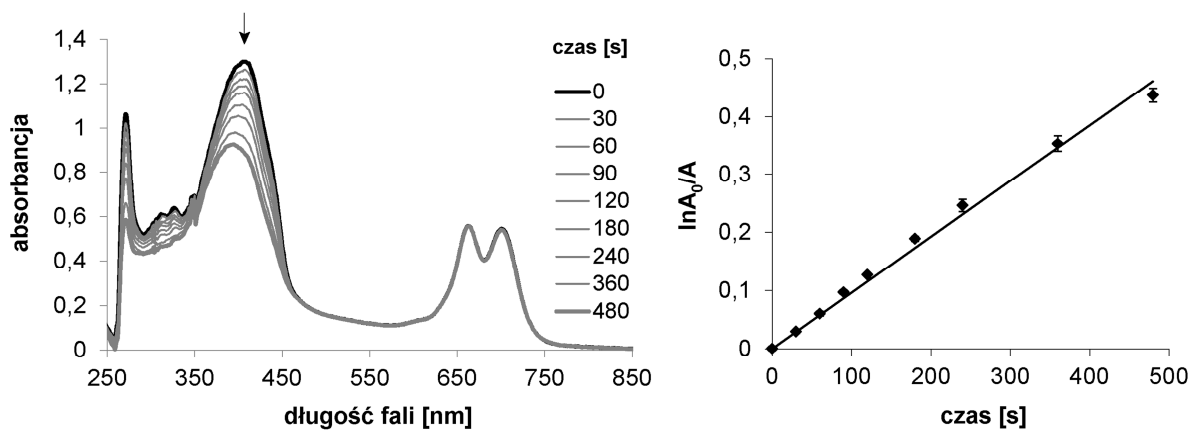
Szybkość rozkładu DPBF podczas naświetlania, określono poprzez śledzenie zmian absorbancji (A) przy 417 nm. Pomiary przeprowadzono przy użyciu wiązki światła monochromatycznego o długości fali, odpowiadającej maksimum absorpcji danego fotouczulacza [136-138]. Zmiany przebiegu widm UV-Vis w wyniku naświetlania porfirazyn **8**, **18** i **19** oraz wykresy przedstawiające zależność $\ln(A_0/A)=f(t)$ zamieszczono na Ryc. 50-57.



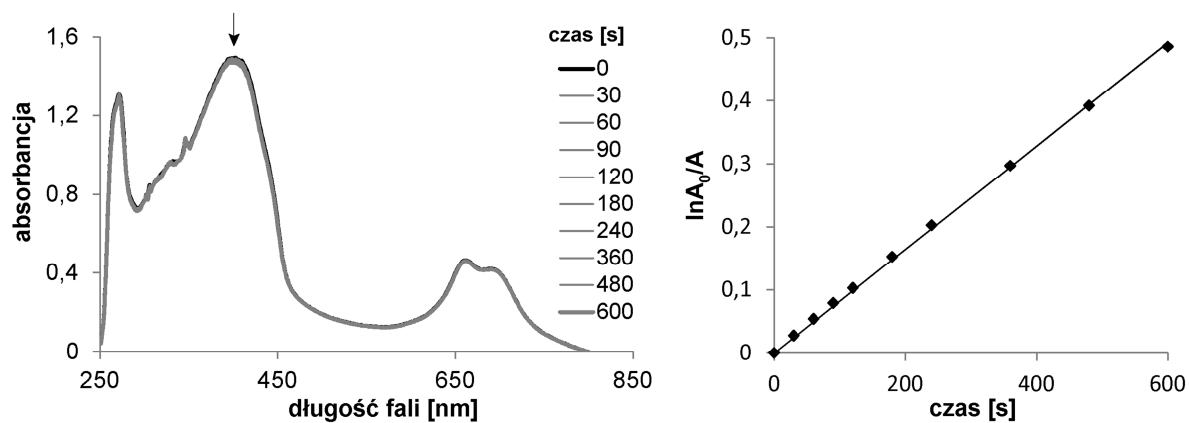
Ryc. 50. Zmiany w widmie UV-Vis podczas naświetlania roztworu zawierającego Pz 8 i DPBF w DMF oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A_0/A=f(t)$.



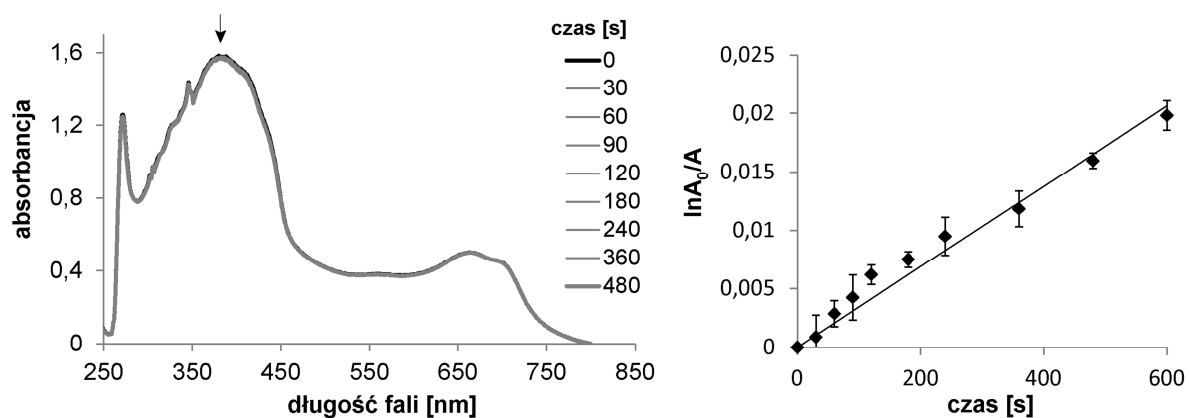
Ryc. 51. Zmiany w widmie UV-Vis podczas naświetlania roztworu zawierającego Pz 8 i DPBF w DMSO oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A_0/A=f(t)$.



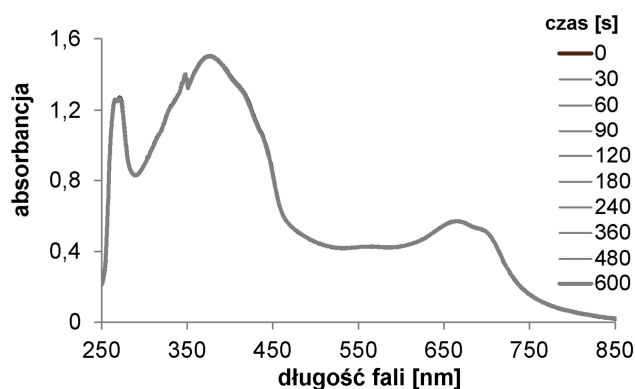
Ryc. 52. Zmiany w widmie UV-Vis podczas naświetlania roztworu zawierającego Pz 18 i DPBF w DMF oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A_0/A=f(t)$.



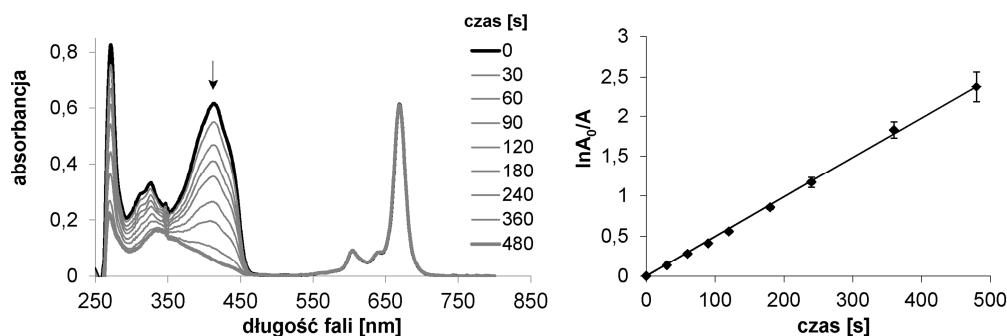
Ryc. 53. Zmiany w widmie UV-Vis podczas naświetlania roztworu zawierającego Pz 18 i DPBF w DMSO oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A_0/A=f(t)$.



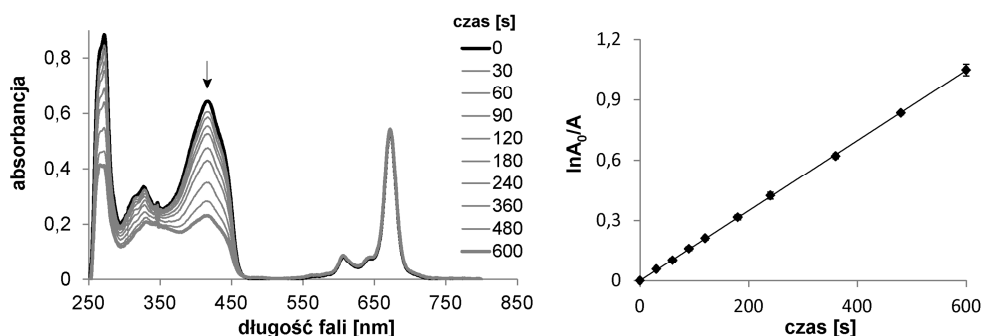
Ryc. 54. Zmiany w widmie UV-Vis podczas naświetlania roztworu zawierającego Pz 19 i DPBF w DMF oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A_0/A=f(t)$.



Ryc. 55. Zmiany w widmie UV-Vis podczas naświetlania roztworu zawierającego Pz 19 i DPBF w DMSO.



Ryc. 56. Zmiany w widmie UV-Vis DMF podczas naświetlania roztworu zawierającego ZnPc i DPBF w oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A_0/A=f(t)$.



Ryc. 57. Zmiany w widmie UV-Vis podczas naświetlania roztworu zawierającego ZnPc i DPBF w DMSO oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A_0/A=f(t)$.

Parametry kinetyczne zależności $\ln A/A_0=f(t)$, opisującej szybkość rozkładu DPBF, wykorzystane przy obliczaniu wartości Φ_{Δ} porfirazyn **8**, **18** i **19** w roztworach DMF podano w Tabeli 13, natomiast w DMSO w Tabeli 14. Zgodnie z uzyskanymi wynikami, tribenzoporfirazyna magnezowa **8** posiada największą zdolność generowania tlenu singletowego, o czym świadczą wartości Φ_{Δ} , wynoszące odpowiednio 0,28 w DMF oraz 0,31 w DMSO. Porfirazyna **18** charakteryzowała się znacznie mniejszą wydajnością generowania tlenu singletowego, w odniesieniu do obu rozpuszczalników. Zdecydowanie najslabiej generowała tlen singletowy porfirazyna demetalowana **19**, a w roztworach DMSO zmiany stężenia DPBF podczas naświetlania były tak niewielkie, że uniemożliwiły ocenę ilościową, w tym wyznaczenie Φ_{Δ} . Porównując otrzymane wyniki z danymi literaturowymi stwierdzono, że znacznie mniejsza zdolność generowania tlenu singletowego porfirazyny demetalowanej **19** niż pochodnej magnezowej **18**, zgadza się z wynikami otrzymanymi dla porfirazyn posiadających podstawniki 2,5-dimetylopirolilowe i dimetyloaminowe [116]. Zaobserwowane zależności są także zgodne z doniesieniami Sekullariou i wsp. [139], którzy w badaniach

dotyczących *seco*-porfirazyn, uzyskali znacznie większe wartości Φ_{Δ} dla związku zawierającego jony cynku(II), niż dla formy demetalowanej.

W piśmiennictwie wskazuje się na decydujący wpływ tlenu singletowego na fotodegradację wielu fotouczulaczy, m.in. szczegółowo analizowali ten problem Hadjur i wsp. w odniesieniu do meso-tetra(hydroksyfenylo)chloryny (mTHPC) [129,140]. Z tego względu analizowano zdolność generowania tlenu singletowego (Φ_{Δ}) przez Pz **8**, **18** i **19**, w powiązaniu z ocenioną wcześniej trwałością fotochemiczną (Rozdz. IV. 3. 3). Nie zaobserwowano proporcjonalnej zależności pomiędzy zdolnością generowania tlenu singletowego, a szybkością fotodegradacji porfirazyn **8**, **18** i **19**. Tribenzoporfirazyna magnezowa **8**, pomimo, że posiadała trzykrotnie większą wartość Φ_{Δ} niż porfirazyna magnezowa **18**, w roztworach w DMF ulegała fotodegradacji z podobną szybkością. Także w DMSO Pz **8** ponad 20-krotnie skuteczniej generuje tlen singletowy niż Pz **18**, jednak procent rozkładu obu porfirazyn po 20 minutach naświetlania, był zbliżony i wynosił odpowiednio 4,7% i 4,3%. Ponadto pomimo, że wartość Φ_{Δ} Pz **8** w DMSO była większa niż w DMF, to jednak rozkład fotochemiczny zachodził znacznie wolniej. Podsumowanie uzyskanych wyników pozwala wnioskować, że tlen singletowy nie ma decydującego wpływu na trwałość fotochemiczną porfirazyn Pz **8**, **18** i **19**. Można zakładać, że zgodnie z sugestią Georgakoudi i wsp., Yang i wsp., Das i wsp., szybkość rozkładu może być uwarunkowana obecnością wolnych rodników lub działaniem innych reaktywnych form tlenu [130,132,141].

Tabela 13. Wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego przez Pz 8, 18 i 19 w DMF oraz parametry kinetyczne zależności $\ln A/A_0=f(t)$ opisującej szybkość rozkładu DPBF

Związek	Pz 8	Pz 18	Pz 19	ZnPc*
$\Phi_{\Delta} \pm \Delta\Phi_{\Delta}$	0,281±0,006	0,109±0,006	0,0039±0,0003	0,56**
$10^4(k \pm \Delta k)$	22,9±0,2	8,9±0,6	0,32±0,05	45,8±1,5
$10^3(b \pm \Delta b)$	-3,7±3,8	13,3±13,0	1,0±0,1	6,2±0,4
$10^6 S_a$	7,0	23,9	2,0	65,3
$10^3 S_b$	1,6	5,5	0,46	15,0
r	1,000	0,997	0,987	0,999
n	9	9	9	9
t_a	327,8	37,3	15,9	70,1
t_b	-2,32	2,42	2,088	0,41
$t_{\alpha, f}$	2,365	2,365	2,365	2,365

Φ_{Δ} – wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego, $\Delta\Phi_{\Delta}$ – błąd pomiaru Φ_{Δ} , k – stała szybkości równa ujemnej wartości współczynnika kierunkowego prostej, Δk - przedział ufności stałej szybkości, b - wartość y dla x=0 w równaniu prostej y=ax+b, Δb - przedział ufności współczynnika b, S_a - błąd standardowy współczynnika kierunkowego prostej, S_b - błąd standardowy współczynnika b, r - współczynnik regresji, n - liczba pomiarów, t_a - parametr t obliczony empirycznie dla współczynnika a, t_b - parametr t obliczony empirycznie dla współczynnika b, $t_{\alpha, f}$ – wartość tabelaryczna parametru t dla poziomu ufności 0,95
* związek odniesienia; ** wartość referencyjna [135]

Tabela 14. Wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego przez Pz 8, 18 w DMSO oraz parametry kinetyczne zależności $\ln A/A_0=f(t)$ opisującej szybkość rozkładu DPBF

Związek	Pz 8	Pz 18	ZnPc*
$\Phi_{\Delta} \pm \Delta\Phi_{\Delta}$	0,311±0,003	0,013±0,001	0,67**
$10^4(k \pm \Delta k)$	8,1±0,1	0,33±0,05	17,4±0,2
$10^3(b \pm \Delta b)$	5,0±3,1	2,3±1,5	2,0±4,6
$10^6 S_a$	4,6	2,2	7,0
$10^3 S_b$	1,3	0,63	2,0
r	1,000	0,983	1,000
n	10	10	10
t_a	175,2	15,2	249,6
t_b	3,73	3,60	0,97
$t_{\alpha, f}$	2,306	2,306	2,306

Φ_{Δ} – wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego, $\Delta\Phi_{\Delta}$ – błąd pomiaru Φ_{Δ} , k – stała szybkości równa ujemnej wartości współczynnika kierunkowego prostej, Δk - przedział ufności stałej szybkości, b - wartość y dla x=0 w równaniu prostej y=ax+b, Δb - przedział ufności współczynnika b, S_a - błąd standardowy współczynnika kierunkowego prostej, S_b - błąd standardowy współczynnika b, r - współczynnik regresji, n - liczba pomiarów, t_a - parametr t obliczony empirycznie dla współczynnika a, t_b - parametr t obliczony empirycznie dla współczynnika b, $t_{\alpha, f}$ – wartość tabelaryczna parametru t dla poziomu ufności 0,95
* związek odniesienia; ** wartość referencyjna [135]

IV. 5. Badania biologiczne aktywności fotodynamicznej porfirazyn w postaci wolnej oraz po enkapsulacji liposomalnej względem komórek nowotworowych

IV. 5. 1. Badanie toksyczności bez dostępu światła

Aktywność fotodynamiczną porfirazyn **8**, **18** i **19** określono *in vitro*, wykorzystując dwie linie komórek raka płaskonabłonkowego jamy ustnej (*ang. oral squamous cell carcinoma*, OSCC),

- HSC-3 pochodzące z języka oraz
- H413 z błony śluzowej policzka.

W pierwszym etapie badań określono toksyczność porfirazyn **8**, **18**, **19** bez dostępu światła. Jeden dzień przed doświadczeniem, osadzono komórki HSC-3 lub H413 na płytkach do hodowli komórkowych i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37 °C, w wilgotnej atmosferze zawierającej 5% CO₂. Następnie do komórek dodano pożywkę z badanym fotouczulaczem w trzech różnych stężeniach, w zakresie 0,1-10 µmol/dm³ i komórki inkubowano w tych samych warunkach przez kolejne 24 godziny. Nie stosowano większych stężeń, ze względu na zaobserwowaną intensywną agregację Pz **18** i **19** przy stężeniach przekraczających 10 µmol/dm³. Stężenia poszczególnych związków zastosowane podczas badań przedstawiono w Tabeli 15. W celu rozpuszczenia porfirazyn w wodnym środowisku pożywki, podczas sporządzania roztworów dodawano DMSO w takiej objętości, żeby stężenie nie przekraczało 0,5%. Aby wykluczyć wpływ DMSO na żywotność komórek, jako próby kontrole, niezawierające fotouczulaczy, stosowano komórki inkubowane jedynie w pożywce oraz w pożywce z dodatkiem 0,5% DMSO. Żywotność komórek określono spektrofotometrycznie przy wykorzystaniu testu Alamar Blue. Badanie przeprowadzono w dwóch powtórzeniach dla każdego stężenia oraz prób kontrolnych. Otrzymane wyniki przedstawione w Tabeli 15, wykazały brak toksyczności porfirazyny **18** względem komórek HSC-3 i H413 w badanym zakresie stężeń 0,1–10 µmol/dm³. Porfirazyna **19** również nie była toksyczna względem komórek HSC-3, lecz spowodowała redukcję żywotności komórek H413 o ok. 13% i 20%, odpowiednio przy stężeniu 1,0 µmol/dm³ i 10 µmol/dm³. Tribenzoporfirazyna magnezowa **8**, analogicznie jak Pz **19**, wykazała toksyczność jedynie względem komórek H413, redukcja ich żywotności przy zastosowaniu stężeń 5 µmol/dm³ i 10 µmol/dm³ wyniosła ponad 35%. Zaobserwowana większa wrażliwość komórek H413 niż HSC-3 jest zgodna z wcześniej otrzymanymi wynikami przez Wierzchowskiego i wsp. [142], którzy przeprowadzili badania aktywności fotodynamicznej serii ftalocyjanin

zawierających podstawniki nitroimidazolowe, względem tych samych komórek nowotworowych, HSC-3 i H413. Zauważono, że badane ftalocyjaniny wykazują większą toksyczność bez dostępu światła względem komórek H413 niż HSC-3.

Tabela 15. Żywotność komórek HSC-3 i H413 inkubowanych z Pz **8**, **18** i **19** bez dostępu światła

Porfirazyna	Żywotność komórek* [%]			
	Stężenie [$\mu\text{mol}/\text{dm}^3$]	Komórki HSC-3	Stężenie [$\mu\text{mol}/\text{dm}^3$]	Komórki H413
8	0,1	113,2 \pm 8,1	1,0	93,3 \pm 6,3
	1,0	128,7 \pm 8,5	5,0	64,9 \pm 8,4
	10,0	111,0 \pm 8,3	10,0	63,2 \pm 3,2
18	0,1	109,7 \pm 4,4	1,0	99,8 \pm 4,6
	1,0	115,4 \pm 7,7	5,0	98,9 \pm 3,2
	10,0	107,3 \pm 1,1	10,0	116,2 \pm 9,7
19	0,1	120,4 \pm 3,4	0,1	103,3 \pm 7,1
	1,0	113,3 \pm 1,2	1,0	86,6 \pm 2,6
	10,0	96,5 \pm 1,0	10,0	80,5 \pm 2,6

*wyniki podano jako wartości średnie z dwóch równoległych prób \pm odchylenie standardowe

IV. 5.2. Badanie aktywności fotodynamicznej

W kolejnym etapie badań przeprowadzono ocenę aktywności fotodynamicznej porfirazyn **8**, **18** i **19**. W tym celu komórki HSC-3 i H413 inkubowano przez 24 godziny w pożywce zawierającej roztwór Pz **8** o stężeniach 0,05 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, 0,25 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, 1,0 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Natomiast Pz **18** i **19** były stosowane w stężeniach 0,1 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, 1,0 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ i 10 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Następnie tak przygotowane komórki zostały poddane 20-minutowej ekspozycji na światło o długości fali 690 nm, przy użyciu diod LED (9,8 V, Roithner Lasertechnik). Intensywność promieniowania padającego na powierzchnię płytki wynosiła 3,0 mW/cm^2 , natomiast łączna dawka światła była równa 3,6 J/cm^2 . Wszystkie doświadczenia przeprowadzono przygotowując dwie oddzielne płytki do hodowli komórkowych. Każda zawierała komórki nowotworowe inkubowane z roztworami porfirazyn o określonym stężeniu oraz dwie próby kontrolne. Jedna z prób kontrolnych zawierała samą pożywkę, a druga pożywkę z dodatkiem 0,5% DMSO. Dla każdego roztworu porfirazyn oraz prób kontrolnych równocześnie prowadzono trzy analizy. Jedna płytka w każdym doświadczeniu nie była

poddawana naświetlaniu i służyła jako próba kontrolna toksyczności bez dostępu światła. Żywotność komórek określono spektrofotometrycznie przy wykorzystaniu testu Alamar Blue, a uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 16 dla komórek H413 oraz Tabeli 17 dla HSC-3.

Tabela 16. Żywotność komórek H413 po przeprowadzeniu procedury fotodynamicznej z udziałem Pz **8**, **18** i **19**

Porfirazyna	Stężenie [$\mu\text{mol}/\text{dm}^3$]	Żywotność komórek* H413 [%]	
		Fotocytotoksyczność	Kontrola (w ciemności)
8	0,05	90,9±6,3	120,2±6,1
	0,25	58,8±4,1	91,6±3,5
	1,00	9,8±4,0	96,6±0,5
18	0,1	88,7±3,5	117,3±1,3
	1,0	90,8±4,5	97,0±8,3
	10,0	76,2±3,0	99,8±7,5
19	0,1	95,1±4,1	96,9±3,8
	1,0	88,5±3,9	86,5±3,9
	10,0	86,1±0,4	84,7±1,6

*wyniki podano jako wartości średnie z trzech równoległych prób ± odchylenie standardowe wartości dla związków aktywnych zostały wyłuszczone.

Tabela 17. Żywotność komórek HSC-3 po przeprowadzeniu procedury fotodynamicznej z udziałem Pz **8**, **18** i **19**

Porfirazyna	Stężenie [$\mu\text{mol}/\text{dm}^3$]	Żywotność komórek* [%]	
		Fotocytotoksyczność	Kontrola (w ciemności)
8	0,05	91,2±6,9	91,2±8,2
	0,25	18,0±1,3	87,5±2,7
	1,00	5,4±0,5	101,2±3,2
18	0,1	103,1±3,1	105,0±6,9
	1,0	105,3±5,3	105,5±4,6
	10,0	113,9±1,6	97,2±5,2
19	0,1	103,4±4,9	103,4±7,5
	1,0	91,8±1,8	95,0±3,1
	10,0	13,0±1,0	84,7±1,6

*wyniki podano jako wartości średnie z trzech równoległych prób ± odchylenie standardowe wartości dla związków aktywnych zostały wyłuszczone.

Jak wynika z Tabeli 16, tribenzoporfirazyne magnezowa **8**, po przeprowadzeniu procedury fotodynamicznej, spowodowała redukcję żywotności komórek H413 o ponad 40% przy stężeniu $0,25 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ i aż o 90% przy stężeniu $1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Porfirazyne magnezowa **18** wykazała niższą aktywność fotodynamiczną, co potwierdza ok. 25% redukcja żywotności komórek H413 przy najwyższym stężeniu $10 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Natomiast porfirazyne demetalowana **19** nie posiadała fotocytotoksyczności względem komórek H413.

Ponadto wyniki aktywności fotodynamicznej związków **8**, **18** i **19** względem drugiej linii komórek nowotworowych HSC-3, przedstawione w Tabeli 17, potwierdziły ponownie największą fotocytotoksyczność tribenzoporfirazyne magnezowej **8**. Żywotność komórek HSC-3 po przeprowadzeniu procedury fotodynamicznej z udziałem Pz **8**, została zredukowana o ponad 80% przy stężeniu $0,25 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ i o 95% przy stężeniu $1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Natomiast trzeci z ocenianych związków, porfirazyne demetalowana **19** spowodowała redukcję żywotności komórek HSC-3 o 8% przy stężeniu $1,0 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ i o 87% przy stężeniu $10 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Natomiast porfirazyne magnezowa **18** nie wpłynęła w istotny sposób na żywotność komórek HSC-3.

IV. 5.3. Badanie aktywności fotodynamicznej porfirazyn inkorporowanych w liposomy

Ze względu na słabą rozpuszczalność badanych związków **8**, **18** i **19** oraz zaobserwowaną podczas badań aktywności fotodynamicznej silną tendencję do tworzenia agregatów, postanowiono zastosować jeden z systemów dostarczania fotouczulaczy. Dotychczas testowano wiele różnych nośników, spośród których najczęściej stosowane są liposomy. Jak opisano w części teoretycznej (Rozdz. III. 3), liposomy zwiększają rozpuszczalność lipofilowych fotouczulaczy w środowisku wodnym i obniżają tendencję do agregacji, a także mogą wpływać na poprawę aktywności fotodynamicznej oraz redukować uszkodzenia otaczających tkanek [15,143].

W pierwszej kolejności zaplanowano wstępne badania aktywności fotodynamicznej liposomów zawierających porfirazyne **8**, **18** i **19**. W tym celu wykorzystując metodę hydratacji cienkiego filmu lipidowego przygotowano liposomy zbudowane z L- α -fosfatydylo-DL-glicerolu (PG), 1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfocholiny (POPC), zawierające inkorporowane porfirazyne **8**, **18** i **19** [144]. Ponadto przygotowano wolne liposomy, niezawierające porfirazyn, jako próby kontrolne do badań aktywności fotodynamicznej. Otrzymane liposomy scharakteryzowano przy wykorzystaniu metody dynamicznego rozpraszania światła, stosując analizator wielkości cząstek Coulter N4 Plus (Beckman).

W Tabeli 18 przedstawiono podstawowe parametry przygotowanych liposomów, tj. średnicę, odchylenie standardowe średnicy oraz indeks polidispersyjności. W celu uzyskania jednowarstwowych liposomów o jednorodnym rozkładzie wielkości, zawiesiny liposomów ekstrudowano przez poliwęglanowe membrany o średnicy porów wynoszącej 100 nm, przy użyciu ekstrudera strzykawkowego (Avanti Polar Lipids). Następnie określono średnicę otrzymanych w ten sposób liposomów. Jak wynika z Tabeli 18 proces ekstruzji spowodował znaczne zmniejszenie średnicy wszystkich przygotowanych liposomów. Wartość średnia średnicy cząstek formulacji nie poddanych ekstruzji mieściła się w zakresie 337,9–891,5 nm, natomiast po ekstruzji była zawarta w przedziale 123,4–275,7 nm. Największe zmiany zaobserwowano dla liposomów wolnych (PG : POPC) oraz zawierających tribenzoporfirazynę **8** (Pz **8** : PG : POPC), których średnica po ekstruzji zmalała niemal 7-krotnie.

Tabela 18. Średnica oraz indeks polidispersyjności liposomów zbudowanych z L- α -fosfatydylo-DL-glicerolu i 1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfocholiny oraz Pz **8**, **18** i **19**

Liposomy	Przed ekstruzją		Po ekstruzji	
	Średnica* [nm]	PI	Średnica* [nm]	PI
Pz 8 : PG : POPC	857,2±385,4	1,055	123,4±32,0	0,092
Pz 18 : PG : POPC	337,9±144,7	0,689	228,4±96,9	0,629
Pz 19 : PG : POPC	406,1±176,7	0,780	275,7±117,1	0,647
PG : POPC	891,5±395,0	0,915	129,1±43,5	0,208

*średnicę liposomów podano jako wartość średnią \pm odchylenie standardowe; PI – indeks polidispersyjności

Następnie określono aktywność fotodynamiczną liposomalnych formulacji Pz **8**, **18** i **19**, względem komórek HSC-3. Badania obejmowały zarówno liposomy nie poddane ekstruzji, jak i ekstrudowane, stosując te same warunki jak w badaniu aktywności fotodynamicznej porfirazyn nieinkorporowanych w liposomy (Rozdz. IV. 4. 3). Przygotowano roztwory liposomów Pz **8** : PG : POPC w pożywce, zawierające Pz **8** w stężeniu 0,05 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, 0,25 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ oraz 1 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Natomiast roztwory liposomów Pz **18** : PG : POPC i Pz **19** : PG : POPC, zawierały fotouczulacze w stężeniach 0,1 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, 1 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ i 10 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Jako próby kontrolne służyły komórki HSC-3 wyłącznie z samą pożywką oraz z liposomami bez fotouczulaczy. Wszystkie doświadczenia przeprowadzono przygotowując dwie oddzielne płytki do hodowli komórkowych, z których jedna nie była poddawana naświetlaniu i służyła określeniu toksyczności bez dostępu światła. Jak wynika z danych przedstawionych w Tabeli

19, zawiesiny wszystkich liposomów nie poddanych ekstruzji, nie posiadały aktywności fotodynamicznej. Natomiast spośród ekstrudowanych liposomów, jedynie Pz 8: PG : POPC wykazały aktywność fotodynamiczną względem komórek HSC-3. Otrzymane wyniki potwierdzają, że wielkość liposomów ma znaczącą rolę dla ich aktywności biologicznej. W związku z tym w dalszych badaniach ekstrudowano wszystkie otrzymane liposomy. Jak wiadomo wielkość liposomów wpływa na ich właściwości farmakokinetyczne i biodystrybucję w organizmie, a także na uwalnianie inkorporowanej substancji czynnej. Ponadto szybkość wchłaniania oraz kumulacja fotosensybilizatorów w komórkach, zależą od adsorpcji liposomów na ich powierzchni. Mniejsze liposomy łatwiej ulegają wbudowaniu w błonę komórkową poprzez wymianę lipidów, a przez to mogą być wchłonięte na drodze endocytozy [16]. Kosobe i wsp. [145] określili wpływ wielkości liposomów zawierających kwas 5-aminolewulinowy (ALA) na aktywność fotodynamiczną. W tym celu przygotowano liposomy zawierające ALA, o różnej wielkości w zakresie 37-331 nm. Badanie przeprowadzono *in vitro* względem mysich komórek chłoniaka EL-4, poprzez pomiar zawartości protoporfiryny IX (PpIX), powstającej w komórkach w wyniku metabolizmu ALA. Wykazano, że ilość PpIX wzrasta proporcjonalnie ze zmniejszaniem się rozmiaru liposomów. Nagayasu i wsp. [146] w artykule przeglądowym dotyczącym wpływu wielkości liposomów na aktywność terapeutyczną liposomalnych formułacji leków przeciwnowotworowych stwierdzili, że optymalna wielkość liposomów wynosi ok. 100 nm. Liposomy o tej wielkości są efektywnie wchłaniane z krwioobiegu przez komórki nowotworowe, a także zatrzymywane w tkance nowotworowej ze względu na efekt EPR.

Tabela 19. Żywotność komórek HSC-3 po przeprowadzeniu procedury fotodynamicznej z udziałem liposomów zbudowanych z L- α -fosfatydylo-DL-glicerolu (PG) i 1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfocholiny (POPC) oraz Pz **8**, **18** i **19**

Liposomy	Stężenie [$\mu\text{mol}/\text{dm}^3$]	Żywotność komórek* [%]			
		Fotocytotoksyczność		Kontrola (w ciemności)	
		Przed ekstruzją	Po ekstruzji	Przed ekstruzją	Po ekstruzji
Pz 8 : PG : POPC	0,05	112,4 \pm 4,5	45,8\pm3,3	133,16 \pm 5,3	111,6 \pm 4,2
	0,25	108,2 \pm 9,0	3,0\pm0,5	103,74 \pm 2,6	108,0 \pm 5,6
	1,00	94,6 \pm 2,9	2,6\pm0,5	111,34 \pm 1,4	107,7 \pm 6,1
Pz 18 : PG : POPC	0,1	106,3 \pm 6,2	88,4 \pm 3,8	107,0 \pm 0,7	100,0 \pm 3,1
	1,0	112,0 \pm 4,0	91,4 \pm 3,5	102,9 \pm 2,1	105,3 \pm 5,3
	10,0	121,4 \pm 3,3	98,7 \pm 4,6	111,7 \pm 5,0	113,9 \pm 1,6
Pz 19 : PG : POPC	0,1	96,5 \pm 5,8	101,2 \pm 3,5	106,2 \pm 1,7	103,4 \pm 7,5
	1,0	98,4 \pm 1,1	97,2 \pm 4,0	105,5 \pm 3,2	95,0 \pm 3,1
	10,0	102,4 \pm 6,3	111,6 \pm 2,7	116,4 \pm 1,9	96,0 \pm 1,7

* wyniki podano jako wartości średnie z trzech równoległych prób \pm odchylenie standardowe wartości dla związków aktywnych zostały wyłuszczone.

Ze względu na wysoką aktywność fotodynamiczną liposomów zawierających tribenzoporfirazynę **8** (Pz **8**: PG : POPC), względem komórek HSC-3 (Tabela 19), zaplanowano przygotowanie oraz ocenę aktywności kolejnych rodzajów liposomów, różniących się ładunkiem powierzchniowym. Badania przeprowadzono z zastosowaniem tribenzoporfirazyny magnezowej **8** oraz porfirazyny demetalowanej **19**. Natomiast nie wykorzystano porfirazyny magnezowej **18**, ponieważ nie wykazała aktywności fotodynamicznej zarówno w postaci wolnej (Tabela 17), jak i po inkorporowaniu w liposomy PG : POPC (Tabela 19).

Przygotowano trzy kolejne rodzaje liposomów zawierające Pz **8** i **19**, składające się z:

- (i) PG : POPC : cholesterolu (Chol) – naładowane ujemnie
- (ii) chlorku N-[1-(2,3-dioleoiloksy)propylo]-N,N,N-trimetyloamoniowego (DOTAP) : POPC – naładowane dodatnio
- (iii) DOTAP : POPC : Chol – naładowane dodatnio

Otrzymane liposomy ekstrudowano przez membrany o średnicy porów wynoszącej 100 nm i scharakteryzowano przez pomiar średnicy, odchylenia standardowego średnicy oraz indeksu polidispersyjności (Tabela 20). Średnica ekstrudowanych liposomów zawierających Pz **8**

mieściła się, w zależności od rodzaju liposomów, w zakresie 123,4–167,5 nm, natomiast dla Pz **19** była większa i wynosiła 199,8–330,3 nm.

Tabela 20. Średnica oraz indeks polidispersyjności liposomów zawierających Pz **8** i **19**

Liposomy	Średnica* [nm]	PI
Pz 8 : PG : POPC : Chol	127,3±24,1	0,042
Pz 19 : PG : POPC : Chol	256,7±106,1	0,540
Pz 8 : DOTAP : POPC	135,7±44,2	0,181
Pz 19 : DOTAP : POPC	199,8±78,5	0,403
Pz 8 : DOTAP : POPC : Chol	167,5±54,2	0,180
Pz 19 : DOTAP : POPC : Chol	330,3±138,7	0,597
PG : POPC : Chol	136,8±58,1	0,373
DOTAP : POPC	145,0±51,7	0,252
DOTAP : POPC : Chol	141,2±51,0	0,296

*średnicę liposomów podano jako średnią wartość średnicy liposomów ± odchylenie standardowe;
PI – indeks polidispersyjności

Następnie oznaczono aktywność fotodynamiczną otrzymanych formułacji liposomalnych względem komórek HSC-3. W tym celu przygotowano roztwory liposomów w pożywce o stężeniu Pz **8** równym 0,05 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, 0,25 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ i 1,0 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, natomiast stężenie Pz **19** w roztworach liposomów wynosiło 0,1 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, 1,0 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ i 10,0 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Badania przeprowadzono stosując analogiczne warunki jak podczas oznaczania aktywności fotodynamicznej Pz **8**, **18** i **19** w postaci formułacji liposomalnych zbudowanych z PG : POPC. Wyniki przedstawione w Tabeli 21 wskazują, że wszystkie formułacje liposomalne zawierające Pz **8** posiadają wysoką aktywność fotodynamiczną względem komórek HSC-3, w przeciwieństwie do liposomów zawierających Pz **19**, które nie spowodowały istotnej redukcji żywotności komórek.

Tabela 21. Żywotność komórek HSC-3 po przeprowadzeniu procedury fotodynamicznej z udziałem liposomów zawierających Pz **8** i **19**

Żywotność komórek* [%]				
Porfirazyna	Stężenie [$\mu\text{mol}/\text{dm}^3$]	liposomy		
		PG:POPC:Chol	DOTAP:POPC	DOTAP:POPC:Chol
8	0,05	56,1±3,4	76,3±4,5	87,3±3,3
	0,25	7,1±0,7	18,4±2,8	29,7±1,7
	1,00	0,3±0,2	1,6±1,0	0,6±0,8
19	0,1	105,8±6,1	103,6±10,0	98,0±8,6
	1,0	96,1±4,6	102,3±5,4	99,6±3,0
	10,0	101,7±2,6	121,1±1,6	112,2±1,0
Kontrola (w ciemności)				
Porfirazyna	Stężenie [$\mu\text{mol}/\text{dm}^3$]	Żywotność komórek* [%]		
		PG:POPC:Chol	DOTAP:POPC	DOTAP:POPC:Chol
8	0,05	89,6±3,8	102,8±3,7	105,5±4,0
	0,25	101,4±1,4	101,8±3,7	100,2±7,2
	1,00	101,9±4,0	103,6±2,6	97,3±4,2
19	0,1	91,3±2,7	96,6±5,0	112,7±0,6
	1,0	90,0±3,6	94,2±6,1	112,4±0,8
	10,0	111,4±5,6	98,2±0,7	103,1±3,5
* wyniki podano jako wartości średnie z trzech równoległych prób \pm odchylenie standardowe wartości dla związków aktywnych zostały wyłuszczone.				

Dalsze badania biologiczne obejmowały porównanie aktywności badanych porfirazyn **8** i **19**, poprzez wyznaczenie wartości IC_{50} (*ang. inhibitory concentration*). Jest to parametr określający wartość stężenia związku, przy którym proliferacja komórek zostaje zahamowana w 50%, w odniesieniu do układu kontrolnego, dlatego im niższa wartość IC_{50} tym większa jest aktywność związku. Analizie poddano porfirazyny **8** i **19** oraz liposomy, które we wcześniejszych badaniach wykazały fotocytotoksyczność:

- (i) Pz **8** : PG : POPC,
- (ii) Pz **8** : PG : POPC : Chol,
- (iii) Pz **8** : DOTAP : POPC oraz
- (iv) Pz **8** : DOTAP : POPC : Chol.

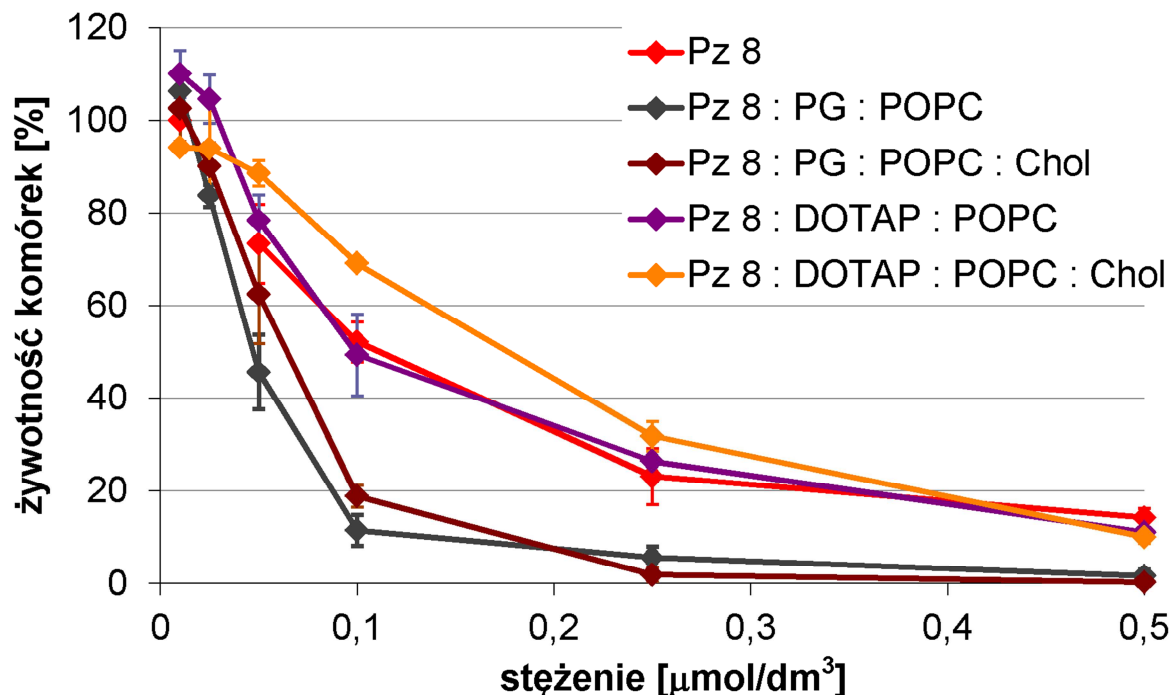
Przygotowano po 6 roztworów Pz **8** i **19** o różnych stężeniach jak podano w Tabeli 22 oraz po 6 roztworów wszystkich czterech rodzajów liposomów zawierających Pz **8** i oceniono ich aktywność fotodynamiczną względem komórek HSC-3 (Tabela 22).

Tabela 22. Żywotność komórek HSC-3 oraz wartość IC_{50} dla Pz **8** i **19** oraz formulacji liposomalnych zawierających Pz **8**

Porfirazyna	Pz 8 $IC_{50} - 129 \text{ nmol/dm}^3$					
Stężenie [$\mu\text{mol/dm}^3$]	0,01	0,05	0,10	0,25	0,50	1,0
Żywotność komórek* [%]	102,8±4,1	88,6±5,2	53,8±4,8	17,3±0,5	12,4±0,8	5,2±0,2
Porfirazyna	Pz 19 $IC_{50} - 4590 \text{ nmol/dm}^3$					
Stężenie [$\mu\text{mol/dm}^3$]	0,1	1,0	2,5	5,0	7,5	10,0
Żywotność komórek* [%]	109,8±4,0	104,0±1,6	79,6±3,4	44,4±0,0	29,8±5,5	20,2±1,8
Liposomy	Pz 8 : PG : POPC (0,1 : 2 : 8) $IC_{50} - 45 \text{ nmol/dm}^3$					
Stężenie [$\mu\text{mol/dm}^3$]	0,01	0,025	0,05	0,10	0,25	0,5
Żywotność komórek* [%]	106,3±3,0	83,7±2,4	48,7±1,6	11,5±3,3	4,2±1,4	2,6±0,4
Liposomy	Pz 8 : PG : POPC : Chol (0,1 : 1,33 : 5,34 : 3,33) $IC_{50} - 52 \text{ nmol/dm}^3$					
Stężenie [$\mu\text{mol/dm}^3$]	0,01	0,025	0,05	0,10	0,25	0,5
Żywotność komórek* [%]	105,9±3,6	97,5±5,2	56,1±3,4	13,3±1,9	7,1±0,7	0,6±0,2
Liposomy	Pz 8 : DOTAP : POPC (0,1 : 2 : 8) $IC_{50} - 126 \text{ nmol/dm}^3$					
Stężenie [$\mu\text{mol/dm}^3$]	0,01	0,025	0,05	0,10	0,25	0,5
Żywotność komórek* [%]	110,0±5,0	104,6±5,2	78,4±5,5	55,0±4,6	23,7±2,8	11,0±0,3
Liposomy	Pz 8 : DOTAP : POPC : Chol (0,1 : 1,33 : 5,34 : 3,33) $IC_{50} - 150 \text{ nmol/dm}^3$					
Stężenie [$\mu\text{mol/dm}^3$]	0,01	0,025	0,05	0,10	0,25	0,5
Żywotność komórek* [%]	94,2±1,2	100,8±1,0	88,6±2,7	69,1±1,1	29,7±1,7	10,0±1,4
* wyniki podano jako wartości średnie z trzech równoległych prób \pm odchylenie standardowe.						

Otrzymane wartości IC_{50} , podane w Tabeli 22 wskazują, że ujemnie naładowane liposomy zawierające fosfatydyloglicerol (PG) tj. Pz **8** : PG : POPC ($IC_{50}=45 \text{ nmol/dm}^3$), posiadają prawie 3-krotnie większą aktywność fotodynamiczną niż wolna postać Pz **8** ($IC_{50}=129 \text{ nmol/dm}^3$). Natomiast aktywność dodatnio naładowanych liposomów zawierających DOTAP (Pz **8** : DOTAP : POPC oraz Pz **8** : DOTAP : POPC : Chol), była równa lub niższa od wolnej postaci Pz **8**, o czym świadczą wartości IC_{50} wynoszące odpowiednio 126 nmol/dm^3 i 150

nmol/dm³. Porównanie fotocytotoksyczności Pz 8 w postaci wolnej oraz po inkorporowaniu w cztery rodzaje liposomów przedstawiono na Ryc. 58.



Ryc. 58. Porównanie fotocytotoksyczności Pz 8 w postaci wolnej oraz inkorporowanej w różnego rodzaju liposomy.

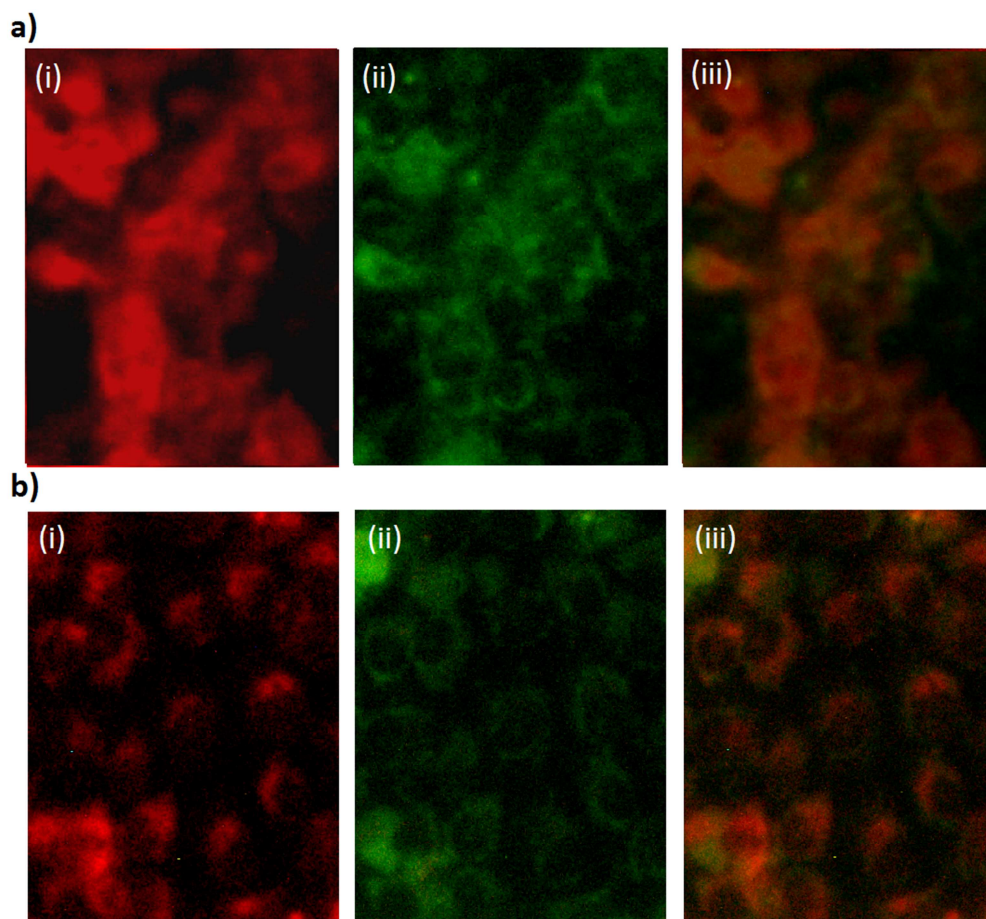
IV. 5. 4. Określenie lokalizacji wewnątrzkomórkowej porfirazyn

Śmierć komórek po przeprowadzeniu terapii fotodynamicznej zachodzi najczęściej w wyniku apoptozy lub nekrozy. Początkowo uważano, że obumieranie komórek w wyniku PDT jest procesem nekrotycznym, wynikającym z fragmentacji błon komórkowych, jednak później zaobserwowano, że może również zachodzić apoptoza, czyli naturalny, zaprogramowany proces śmierci komórki. Chociaż istnieje wiele szlaków indukcji apoptozy uważa się, że proces ten po PDT zachodzi w wyniku uwolnienia cytochromu c z mitochondriów. Zaobserwowano, że fotouczulacze gromadzące się w mitochondriach prowadzą do indukcji apoptozy, natomiast po naświetleniu komórek, natomiast sensybilizatory gromadzące się w błonie komórkowej mogą hamować lub zapobiegać apoptozie. Z tego względu lokalizacja wewnątrzkomórkowa fotouczulaczy może decydować o efekcie terapeutycznym PDT. Fotouczulacze kumulujące się w okolicach mitochondriów są uważane za najskuteczniejsze [147-149].

Lokalizacja wewnątrzkomórkowa porfirazyn **8**, **18** i **19** została oznaczona przy wykorzystaniu mikroskopii fluorescencyjnej poprzez inkubację komórek HSC-3 z roztworami porfirazyn oraz markerów fluorescencyjnych, specyficznych dla określonych organelli komórkowych [150,151]:

- MitoTracker Green FM – mitochondria
- Alexa Fluor 350 WGA – błona komórkowa
- Syto 13 – kwasy nukleinowe
- LysoTracker Red – organelle o środowisku kwasowym np. lizosomy
- Hoechst 33342 – jądro komórkowe

Przy wykorzystaniu mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Diaphot, wyposażonego w filtry firmy Chroma Technology Corporation, wykonano zdjęcia obrazujące fluorescencję pochodzącą od tribenzoporfirazyny **8** oraz demetalowanej porfirazyny **19**, skumulowanych w komórkach HSC-3. Natomiast nie zaobserwowano wewnątrz komórek fluorescencji pochodzącej od porfirazyny magnezowej **18**. Uzyskane wyniki sugerują, że zaobserwowany we wcześniejszych badaniach brak aktywności fotodynamicznej Pz **18** (Rozdz. IV. 4. 2), może wynikać z niewielkiego wchłaniania i kumulacji w komórkach nowotworowych. Następnie porównano fotografie obrazujące fluorescencję pochodzącą od Pz **8** i **19** ze zdjęciami komórek wybarwionych markerami fluorescencyjnymi specyficznymi dla różnych organelli komórkowych. Zaobserwowano, że czerwona fluorescencja pochodząca od Pz **8** i **19**, nakłada się ze zdjęciami komórek wybarwionych markerem dla mitochondriów, natomiast nie nakłada się z fotografiami komórek wybarwionych przy wykorzystaniu pozostałych markerów fluorescencyjnych. Otrzymane wyniki przedstawione na Ryc. 59 pozwalają stwierdzić, że Pz **8** i **19** kumulują się we wnętrzu komórek HSC-3. Ponadto zaobserwowano, że Pz **19** jest zlokalizowana głównie w pobliżu mitochondriów, podczas gdy Pz **8** jedynie częściowo kumuluje się w obszarze mitochondrialnym.



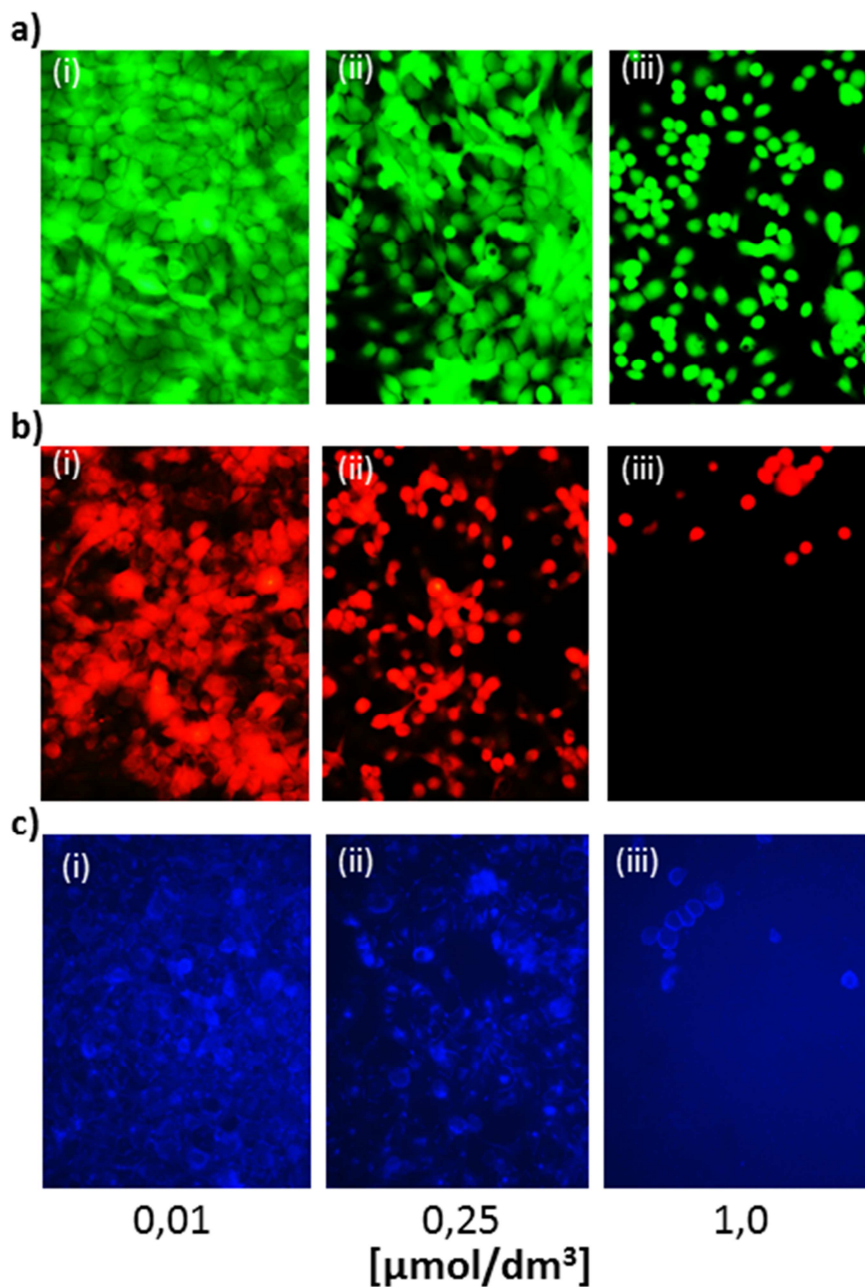
Ryc. 59. Fluorescencja komórek HSC-3 inkubowanych z: a) **Pz 8** i b) **Pz 19** wybarwionych przy użyciu MitoTracker Green; (i) **Pz 8** lub **Pz 19**, (ii) MitoTracker Green, (iii) nałożone fotografie (i) i (ii).

IV. 5. 5. Obrazowanie żywotności komórek przy wykorzystaniu mikroskopii fluorescencyjnej

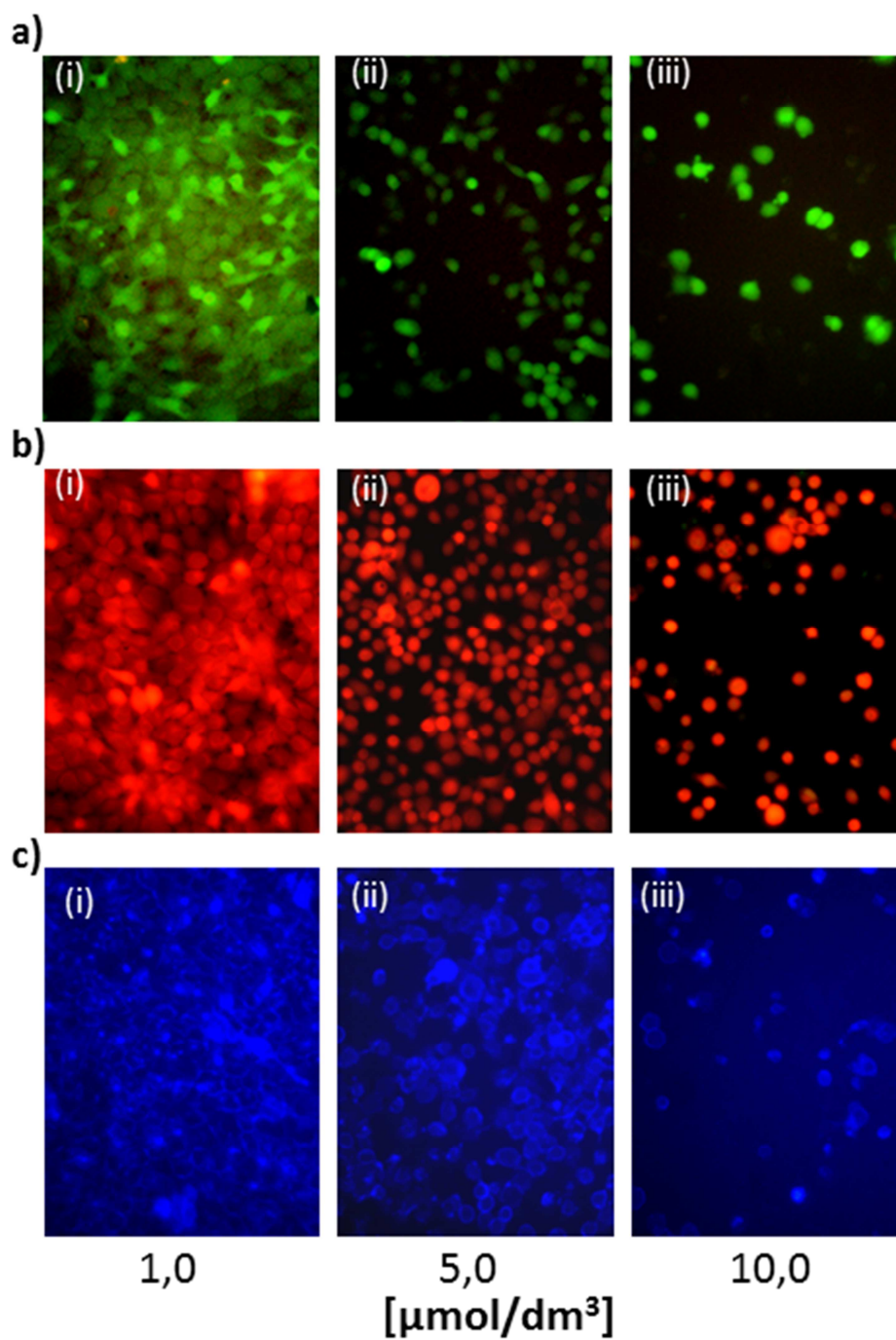
Żywotność komórek HSC-3 po przeprowadzeniu procedury fotodynamicznej z udziałem Pz **8** i **19**, zobrazowano przy wykorzystaniu mikroskopii fluorescencyjnej. W tym celu komórki HSC-3 zostały wybarwione przy użyciu trzech różnych barwników:

- (i) Calcein Green AM,
- (ii) Calcein Red-Orange AM,
- (iii) Wheat Germ Agglutinin Alexa Fluor 350 (WGA, Alexa Fluor 350).

Calcein Green AM jest barwnikiem, który może być zastosowany w celu określenia żywotności większości komórek eukariotycznych. W żywych komórkach niewykazujący fluorescencji barwnik, pod wpływem wewnątrzkomórkowych esteraz, katalizujących reakcję hydrolizy wiązań estrowych, jest przekształcany w barwnik wykazujący silną zieloną fluorescencję. Calcein Red-Orange AM również może być stosowany w celu określania żywotności komórek eukariotycznych, lecz posiada odmienny mechanizm działania. W przeciwieństwie do Calcein Green AM, natychmiast wykazuje silną pomarańczowoczerwoną fluorescencję, bez konieczności przechodzenia przemian w komórkach żywych. Jednak calcein Red-Orange AM, kumuluje się jedynie w komórkach żywych, których błona komórkowa nie jest uszkodzona. Natomiast WGA Alexa Fluor 350 jest barwnikiem wykazującym niebieską fluorescencję, który wiąże się ze składnikami błon komórkowych, kwasem sialowym oraz resztami N-acetylglikozaminy. Z tego względu również może być wykorzystywany do obrazowania żywych komórek, których błona komórkowa nie została uszkodzona [152]. Obrazowanie żywotności komórek przy wykorzystaniu mikroskopu fluorescencyjnego przeprowadzono względem komórek HSC-3, poddanych procedurze fotodynamicznej z użyciem Pz **8** w stężeniach $0,01 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, $0,25 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, $1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (Ryc. 60) oraz Pz **19** w stężeniach $1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, $5 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ i $10 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (Ryc. 61). Na uzyskanych zdjęciach można zaobserwować, że ze wzrostem stężenia Pz **8** i **19**, zmniejsza się liczba komórek nowotworowych (Ryc. 60 i 61).



Ryc. 60. Komórki HSC-3 po przeprowadzeniu procedury fotodynamicznej z udziałem **Pz 8** w stężeniu (i) $0,01 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, (ii) $0,25 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, (iii) $1,0 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, wybarwione przy użyciu: a) Calcein Green AM, b) Calcein Red-Orange, c) WGA Alexa Fluor 350.



Ryc. 61. Komórki HSC-3 po przeprowadzeniu procedury fotodynamicznej z udziałem Pz 19 w stężeniu (i) $1,0 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, (ii) $5,0 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, (iii) $10,0 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, wybarwione przy użyciu: a) Calcein Green AM, b) Calcein Red-Orange, c) WGA Alexa Fluor 350.

V. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Przeprowadzono syntezę porfirazyn posiadających peryferyjne skondensowane pierścienie diazepinowe z podstawnikiem styrylowym. Określono strukturę oraz właściwości fizykochemiczne otrzymanych związków. Oceniono również właściwości fotochemiczne oraz aktywność fotodynamiczną względem komórek nowotworowych. Ocenę przeprowadzono dla porfirazyn w postaci wolnej oraz po przeprowadzeniu enkapsulacji liposomalnej.

Analiza otrzymanych wyników oraz danych literaturowych, pozwoliła stwierdzić, że:

1. Zastosowana procedura syntetyczna umożliwiła otrzymanie nowej grupy porfirazyn, posiadających skondensowany pierścień 1,4-diazepinowy z dwoma podstawnikami styrylowymi w pozycjach C5 i C7.
2. W cząsteczkach porfirazyn pierścień 1,4-diazepiny występuje w formie tautomerycznej 6*H*, natomiast konfiguracja podstawników przy grupach etenylowych odpowiada izomerii trans.
3. 1,4-Diazepino-2,3-dikarbonitryl **11** krystalizuje w dwóch formach polimorficznych, a różnice strukturalne wynikają ze zmian konformacyjnych wokół wiązań pojedynczych przy grupach etenylowych o zdefiniowanej izomerii geometrycznej
4. Obecność skondensowanych pierścieni diazepinowych w cząsteczkach porfirazyn wpływa na zmianę intensywności absorpcji w obszarze długofalowym; ze wzrostem ich liczby w rdzeniu porfirazyny wzrasta intensywność pasma $n \rightarrow \pi^*$.
5. Porfirazyny **8**, **18** i **19** posiadają korzystne właściwości absorpcyjne, z punktu widzenia potencjalnego zastosowania w terapii fotodynamicznej m.in. intensywną absorpcję światła o długości fali z zakresu 600-750 nm.
6. Skondensowane pierścienie 1,4-diazepinowe w strukturze porfirazyn wpływają na osłabienie właściwości emisyjnych; wbudowanie jonu magnezu(II) prowadzi do wzrostu intensywności emitowanego promieniowania.

7. Najwyższą zdolność generowania tlenu singletowego wykazuje tribenzoporfirazyne magnezowa **8**.
8. Tlen singletowy nie wywiera decydującego wpływu na trwałość fotochemiczną badanych porfirazyn.
9. Tribenzoporfirazyne magnezowa **8** przy niskich nanomolowych stężeniach, posiada bardzo wysoką aktywność fotodynamiczną *in vitro* względem komórek nowotworowych jamy ustnej.
10. Inkorporacja tribenzoporfirazyne magnezowej **8** w ujemnie naładowane liposomy prowadzi do trzykrotnego wzrostu aktywności fotodynamicznej, w porównaniu z formą wolną.
11. Dla uzyskania aktywności fotodynamicznej liposomów zawierających tribenzoporfirazyne magnezowej **8**, niezbędny jest proces ekstruzji prowadzący do otrzymania cząstek o średnicy poniżej 200 nm.
12. Tribenzoporfirazyne **8** i porfirazyne demetalowana **19** kumulują się we wnętrzu komórek nowotworowych; Pz **19** jest zlokalizowana głównie w okolicach mitochondriów, podczas gdy Pz **8** jedynie częściowo kumuluje się w obszarze mitochondrialnym.

VI. CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

VI. 1. Ogólne procedury

Wszystkie reakcje wykonano w atmosferze argonu w aparaturze szklanej uprzednio wygrzanej w piecu w temperaturze 140 °C. Chromatografię kolumnową typu flash przeprowadzano w normalnym układzie faz, przy użyciu żelu krzemionkowego Merck 60 o wielkości cząstek 40–63 µm oraz w odwróconym układzie faz, wykorzystując żel krzemionkowy C-18 Fluka 90. Chromatografię cienkowarstwową (TLC) przeprowadzono techniką wstępującą na płytkach Merck Kieselgel 60 F254 (normalny układ faz) oraz DC Kieselgel 60 RP-18 F_{254S} (odwrócony układ faz) i wizualizowano w świetle UV (λ_{max} 254 i 365 nm).

Widma magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) wykonano przy użyciu spektrometru Bruker AVANCE II przy częstotliwości 400 MHz dla widm ¹H oraz 100 MHz dla widm ¹³C. Wartości wszystkich przesunięć chemicznych podano w skali δ (ppm) wobec sygnału rozpuszczalnika, natomiast stałe sprzężenia (*J*) wyrażono w hercach (Hz). Dla opisu multipletowości sygnałów zastosowano następujące skróty: s – singlet, b – szeroki, d – dublet, t – triplet, m – multiplet, ax – aksjalne, eq – ekwatorialne. Techniki dwuwymiarowe (¹H–¹H COSY, ¹H–¹³C HSQC, ¹H–¹³C HMBC) zastosowano w celu przypisania wartości przesunięć chemicznych odpowiednim atomom wodoru i węgla.

Widma spektrometrii mas (ES, MALDI) oraz analizę elementarną wykonano w Środowiskowym Laboratorium Unikalnej Aparatury Chemicznej przy Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Czystość badanych związków makrocyklicznych oceniono metodą HPLC, przy wykorzystaniu chromatografu Agilent 1200 i kolumny Eclipse XDB-C18 o długości 150 mm i średnicy 4,6 mm, wypełnionej złożem o średniej wielkości ziarna 5 µm. Analizy przeprowadzono w temperaturze 25 °C, przy szybkości przepływu fazy ruchomej 1 cm³/min.

VI. 2. Stosowane rozpuszczalniki i reagenty***Reagenty handlowe***

Pełną informację na temat charakterystyki substancji chemicznych uzyskano na stronach internetowych producentów.

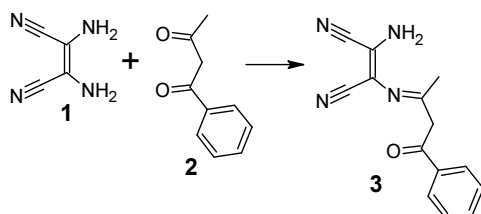
- diaminomaleonitryl (Aldrich)
- 1-fenylobutano-1,3-dion (benzoiloaceton) (Aldrich)
- kwas szczawiowy (POCH)
- tlenek fosforu(V) (Aldrich)
- 3,4,5-trimetoksybenzaldehyd (Alfa Aesar)
- piperodyna (BDH Chemicals)
- jod (POCH)
- magnez – wiórki (Aldrich)
- pentano-2,4-dion (Aldrich)
- 1-metylo-2-imidazolokarbalddehyd (Aldrich)
- 4-(trifluorometylo)benzaldehyd (Aldrich)
- 4-dietyloaminobenzalddehyd (Aldrich)
- 1,2-dicyjanobenzen (Aldrich)
- kwas trifluorooctowy (Aldrich)
- pirydyna (POCH)
- bis(cyjanobenzeno)dichlorek palladu(II) (Aldrich)
- benzen (Fluka, Alfa Aesar)
- 1,3-difenyloizobenzofuran (Aldrich)
- 1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-fosfocholina (Avanti Polar Lipids Inc)
- L- α -fosfatydylo-DL-glicerol (Avanti Polar Lipids Inc)
- chlorek N-[1-(2,3-dioleoiloksy)propylo]-N,N,N-trimetyloamoniowy (Avanti Polar Lipids Inc.)
- cholesterol (Avanti Polar Lipids Inc)
- HEPES (kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)piperazyn-1-ylo]etanosulfonowy) (Aldrich)
- chlorek sodu (Aldrich)

Rozpuszczalniki

- bezwodny metanol i etanol - przygotowywano przez ogrzewanie rozpuszczalników z jodem i wiórkami magnezowymi aż do otrzymania białej zawiesiny, a następnie oddestylowano alkohol
- dimetyloformamid, eter dietylowy, *n*-butanol, chloroform, chlorek metylenu, etanol, octan etylu, *n*-heksan, toluen, dimetoksyetan, tetrahydrofuran, propan-2-ol (POCH) – wykorzystywano w postaci dostarczonej przez producenta
- aceton – osuszono K_2CO_3 i przedestylowano

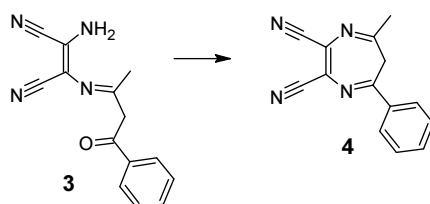
VI. 3. Synteza porfirazyn posiadających peryferyjne skondensowane ugrupowania styrylodiazepinowe

2-amino-3-[(*E*)-(4-fenyl-4-oksobut-2-ylideno)amino]-(*ZZ*)-buteno-1,4-dinitryl (**3**) (wg [66])



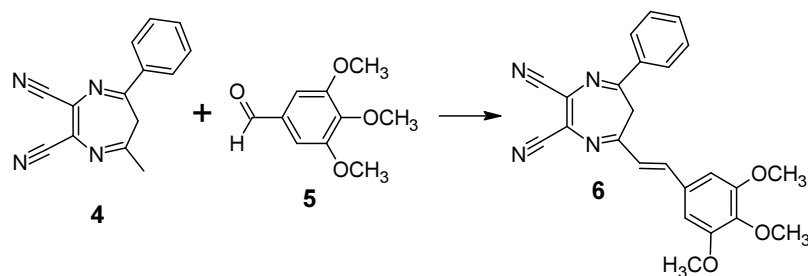
Diaminomaleonitryl (**1**; 4,324 g; 40 mmol), 1-fenylbutano-1,3-dion (**2**; 6,488; 40 mmol), kwas szczawiowy (0,125 g; 1 mmol) oraz benzen (130 cm³) mieszano w temperaturze wrzenia przez 3,5 godziny, w kolbie okrągłodennej z nasadką Dean-Starka. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej otrzymany żółtobrazowy osad odsączono i oczyszczono chromatograficznie, używając jako początkowej fazy ruchomej mieszaniny *n*-heksanu i octanu etylu, w stosunku objętościowym 7:1. Następnie fazę ruchomą zmieniono na bardziej polarną, poprzez stopniowe zwiększenie zawartości octanu etylu, uzyskując proporcje 7:3, 7:5, a ostatecznie 1:1 (*n*-heksan–octan etylu 7:1 do 1:1). Otrzymany produkt przekrystalizowano z mieszaniny *n*-heksanu i octanu etylu, uzyskując żółty osad związku **3** (5,64 g; wyd. 56%).

5-fenyl-7-metylo-6*H*-1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryl (**4**) (wg [66])



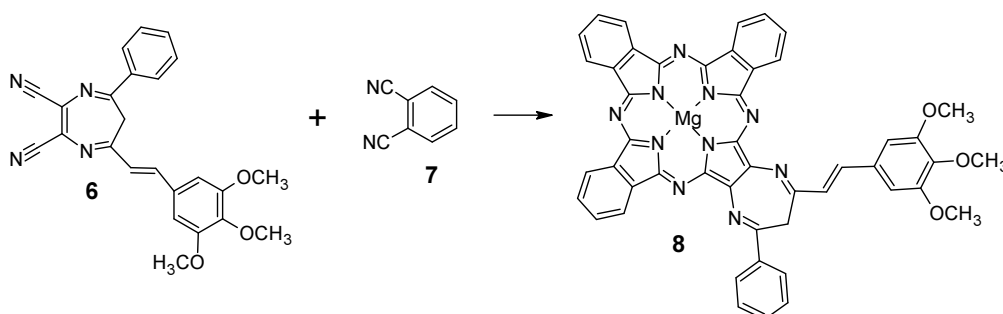
Związek **3** (1,0 mg; 4 mmol) rozpuszczono w bezwodnym etanolu (20 cm³) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 15 minut, stopniowo dodając w tym czasie tlenek fosforu(V) (207 mg; 1,45 mmol). Następnie mieszaninę reakcyjną ogrzano do temperatury wrzenia i mieszano przez kolejne 5,5 godziny. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalnik odparowano, a stałą pozostałość rozdzielono chromatograficznie, wykorzystując jako fazę ruchomą mieszaninę *n*-heksanu i octanu etylu (7:3 do 7:5). Otrzymany produkt przekrystalizowano z mieszaniny octanu etylu, *n*-heksanu i metanolu, otrzymując diazepinę **4** (233 mg; wyd. 25%).

5-fenyl-7-[(2E)-(3,4,5-trimetoksyfenyl)etenyl]-6H-1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryl (6)
(wg [75])

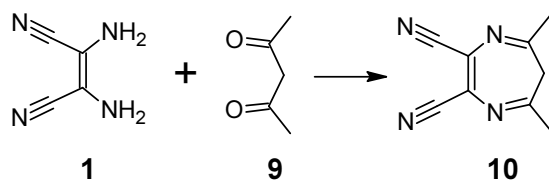


Związek **4** (351 mg; 1,5 mmol), 3,4,5-trimetoksybenzaldehyd (294 mg; 1,5 mmol), piperydynę (6 kropli) oraz benzen (30 cm³) mieszano w temp. wrzenia przez 24 godziny. Zaobserwowano zmianę barwy mieszaniny reakcyjnej z żółtej na czerwono-brunatną. Po odparowaniu rozpuszczalnika, pozostały osad oczyszczono chromatograficznie wykorzystując dichlorometan jako fazę ruchomą. Uzyskany produkt przekrystalizowano z mieszaniny dichlorometanu i *n*-heksanu, otrzymując **6** (87 mg; wyd. 14%).

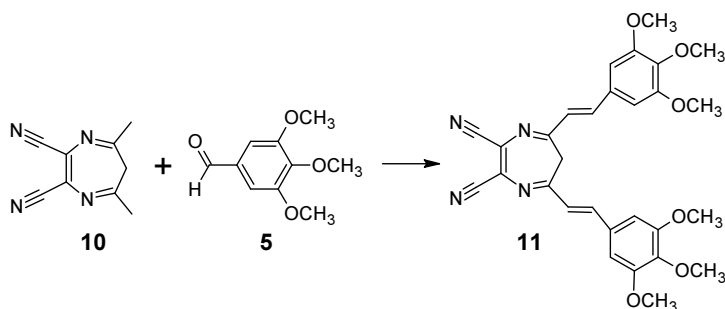
magnez(II) {5-Fenyl-7-[(2E)-(3,4,5-trimetoksyfenyl)etenyl]-6H-1,4-diazepino}[2,3-q]tribenzo[*b,g,l*]porfirazyna (8) (wg [75])



Opilki magnezu (53 mg; 2,2 mmol), *n*-butanol (40 cm³) oraz katalityczną ilość jodu ogrzewano mieszając w temperaturze wrzenia przez 4 godziny. Następnie dodano **6** (83 mg; 0,2 mmol) oraz 1,2-dicyjanobenzen (**7**) (256 mg; 2,0 mmol) i reakcję prowadzono przez kolejne 24 godziny w 100 °C. Po odparowaniu *n*-butanolu z toluenem, pozostałość rozpuszczono w dichlorometanie i przesączono przez ziemię okrzemkową. Po odparowaniu rozpuszczalnika, suchą pozostałość oczyszczono chromatograficznie. W pierwszej kolejności zastosowano normalny układ faz z mieszaniną dichlorometanu i metanolu (50:1 do 20:1), jako fazą ruchomą. Następnie wykorzystano chromatografię kolumnową w odwróconym układzie faz, używając mieszaniny metanolu i tetrahydrofuranu (20:1), co umożliwiło uzyskanie tribenzoporfirazyny **8** (15 mg; wyd. 9%).

2,3-dicyjano-5,7-dimetylo-6*H*-1,4-diazepina (10) (wg [101])

Diaminomaleonitril (**1**) (10,8 g; 100 mmol), pentano-2,4-dion (**9**) (10,3 cm³; 100 mmol), kwas szczawiowy (125 mg; 1 mmol) oraz benzen (130 cm³) mieszano w temperaturze wrzenia przez 5 godzin. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej odparowano rozpuszczalnik azeotropowo z toluenem. Suchą pozostałość rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników dichlorometan–metanol (10:1). Do uzyskanej zawiesiny dodano węgiel aktywny, ogrzano do temperatury wrzenia i przesączono. Po odparowaniu rozpuszczalnika z otrzymanego roztworu, suchą pozostałość przekryształizowano z acetonitrylu na gorąco, otrzymując jasnobezwowe kryształy związku **10** (7,48 g; wyd. 43%).

5,7-bis[(2*E*)-(3,4,5-trimetoksyfenylo)etynylo]-6*H*-1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryl (11)

Związek **10** (2,15 g; 12,5 mmol) 3,4,5-trimetoksybenzaldehyd (**5**) (4,90 g; 25 mmol), piperydynę (8 kropli) oraz benzen (100 cm³) ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 7 godzin. Kolor mieszaniny reakcyjnej zmienił się z żółtego na czerwono-brązowy. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej do temperatury pokojowej, rozpuszczalnik odparowano azeotropowo z toluenem. Suchą pozostałość rozdzielono chromatograficznie, stosując jako fazę ruchomą dichlorometan–metanol (50:1 do 20:1). Otrzymany produkt przekryształizowano z mieszaniny dichlorometanu i *n*-heksanu, otrzymując ciemnopomarańczowy (żółtopomarańczowy po rozpuszczeniu w dichlorometanie), krystaliczny związek **11** (2,76 g; wyd. 42%): $R_f=0,89$ (dichlorometan–metanol 10:1). UV-Vis (dichlorometan) λ_{\max} nm (log ϵ) 359 (4,69), 425 (4,42). MS (ES) m/z 527 [M-H]⁻, 529 [M+H]⁺, 551 [M+Na]⁺, 563 [M+Cl]⁻. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ_H , ppm 7,55 (d, 2H, ³ $J=16$ Hz, C5(7)-CH=CH), 6,79 (d, nałożony, 2H, ³ $J=16$ Hz, C5(7)-CH=CH), 6,77 (s, nałożony, 4H, 4×ArH), 4,96 (s, 1H, N=C-CH^{eq}), 3,87 (s, 6H, 2×OCH₃), 3,86 (s, 12H, 4×OCH₃), 1,83

(s, 1H, N=C-CH^{ax}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ_C, ppm 153,6; 149,5; 144,5; 141,2; 129,7; 123,7; 123,1; 115,4; 105,7; 61,0; 56,2; 39,8. Analizę elementarną obliczono dla C₂₉H₂₈N₄O₆: C 65,90; H 5,34; N 10,60. Znaleziono: C, 65,69; H 5,40; N 10,98%.

Przy wykorzystaniu metody powolnego odparowania rozpuszczalnika uzyskano dwie formy polimorficzne **11**:

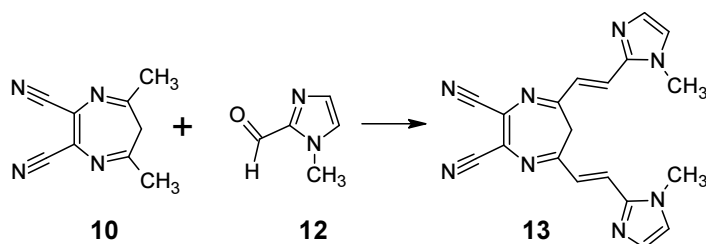
- **11a**: ciemnopomarańczowe kryształy o temperaturze topnienia 236-237 °C (z rozkładem), powstałe w trakcie odparowywania dichlorometanu i propanolu (1:1),
- **11b**: żółte kryształy o temperaturze topnienia 232-233 °C (z rozkładem), otrzymane z mieszaniny octanu etylu i *n*-heksanu (1:1)

Dane krystalograficzne:

11a: C₂₉H₂₈N₄O₆; M=528,55, trójskośny, P-1, a=9,6434(7) Å, b=11,3819(6) Å, c=12,4798 (9) Å, α=88,093(5)°, β=74,017(7)°, γ=89,538(5)°; V=1316,1(2) Å³; Z=2, D_C=1,334 g cm⁻³; μ(MoK_α)=0,095 mm⁻¹, T=130 K; 4641 niezależnych refleksji; 3661 refleksji z I> 2σ(I); R_{int}=0,030; θ_{max}=25,0°; R1(obs.)=0,039; wR2(wszystkie)=0,092; 358 parametrów. CCDC 858633.

11b: C₂₉H₂₈N₄O₆, M=528,55, jednoskośny, P21/n=13,4790(3) Å, b = 14,5163(3) Å, c=13,8322(3) Å, β=101,363(2)°, V=2653,4(1) Å³, z=4, D_c=1,323 g cm⁻³, μ(MoK_α)=0,094mm⁻¹, T=130 K, 4671 niezależnych refleksji, 3830 refleksji z I> 2σ(I); R_{int}=0,032; θ_{max}=25,0°; R1 (obs.)=0,036; wR2 (wszystkie)=0,087; 358 parametrami. CCDC 858634.

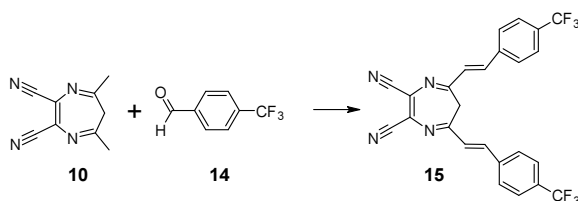
5,7-bis[(2*E*)-(1-metylo-1*H*-imidazol-2-ilo)etenyl]-6*H*-1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryl (**13**)



Diazepinę **10** (0,861 g; 5,0 mmol), 1-metylo-2-imidazolokarbalddehyd (**12**) (1,10 g; 10 mmol) oraz piperydynę (8 kropli) ogrzewano w benzenie (30 cm³) w temperaturze wrzenia przez 6 godzin. Kolor mieszaniny reakcyjnej zmienił się z żółtego na czerwono-brązowy. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej do temperatury pokojowej, rozpuszczalnik odparowano azeotropowo z toluenem. Suchą pozostałość oczyszczono chromatograficznie, stosując jako fazę ruchomą dichlorometan–metanol (50:1 do 20:1). Następnie otrzymany produkt wykrystalizowano z mieszaniny dichlorometanu i *n*-heksanu, uzyskując czerwony

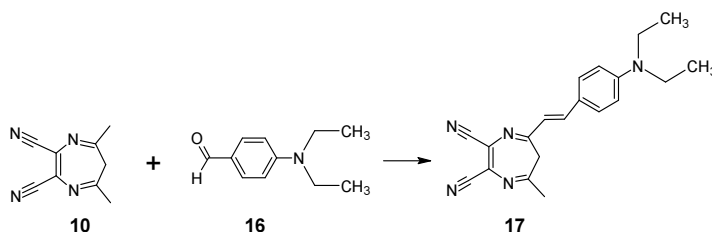
(żółtopomarańczowy po rozpuszczeniu w dichlorometanie), krystaliczny osad związku **13** (1,40 mg; wyd. 78%): t.top. 228-230 °C (z rozkładem), R_f 0,35 (dichlorometan–metanol, 10:1). MS (ES) m/z 355 [M-H]⁻, 357 [M+H]⁺, 379 [M+Na]⁺, 391 [M+Cl]⁻. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ_H, ppm 7,87 (d, ³J=16 Hz, 2H, 2 × =CH), 7,40 (s, 2H), 7,14 (d, nałożony, ³J=16 Hz, 2H, 2 × =CH), 7,12 (s, ukryty, 2H), 5,62 (1H, N=C-CH^{eq}), 3,86 (s, 6H, 2 × NCH₃), 2,15 (1H, N=C-CH^{ax}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ_C, ppm 151,8; 143,1; 130,7; 129,5; 125,7; 125,0; 122,8; 116,0; 39,5 (ukryty); 32,8. Analizę elementarną obliczono dla C₁₉H₁₆N₈: C 64,03; H 4,53; N 31,44. Znaleziono: C 63,76; H 4,53; N 31,52%.

5,7-bis[(2E)-(4-trifluorometylofenylo)etenylo]-6H-1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryl (**15**)



Związek **10** (860 mg; 5 mmol), 4-trifluorometylobenzaldehyd (**14**) (1,37 cm³; 10 mmol), piperydynę (8 kropli) oraz benzen (30 cm³) ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 15 godzin. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej do temperatury pokojowej, rozpuszczalnik odparowano azeotropowo z toluenem. Następnie suchą pozostałość poddano chromatografii kolumnowej, stosując jako fazę ruchomą dichlorometan–metanol (50:1) oraz octan etylu–*n*-heksan (7:1 do 7:5). Otrzymany produkt przekrystalizowano z mieszaniny dichlorometanu i *n*-heksanu, uzyskując ciemnoczerwoną substancję **15** (170 mg, wyd. 7%): t.top. 170 °C (z rozkładem), $R_f=0,41$ (dichlorometan). MS (ES) m/z 483 [M-H]⁻, 485 [M+H]⁺.

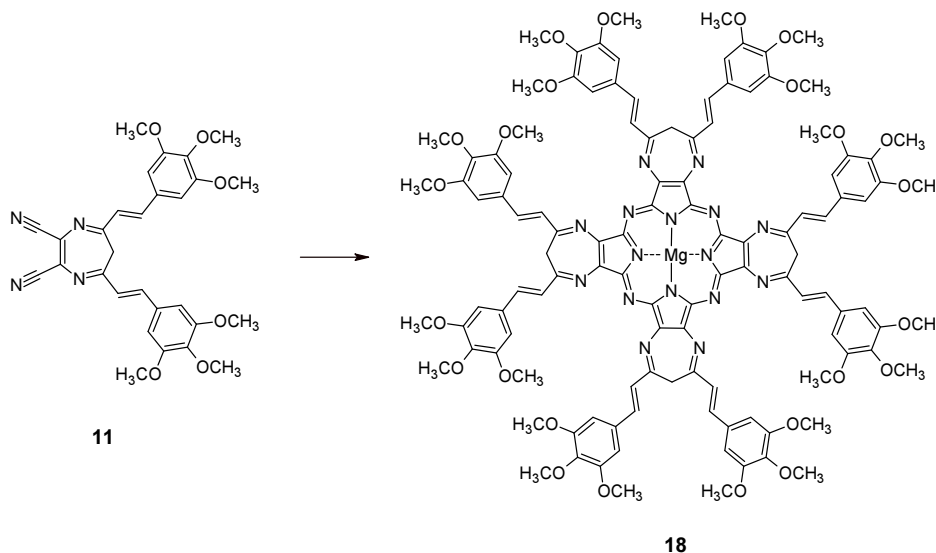
5-[(2E)-(4-dietyloaminofenylo)etenylo]-7-metylo-6H-1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryl (**17**) (wg [66])



Związek **10** (860 mg; 5 mmol) 4-dietyloaminobenzaldehyd (**16**) (1,77 g; 10 mmol), piperydynę (8 kropli) oraz benzen (30 cm³) ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 15 godzin. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej do temperatury pokojowej, rozpuszczalnik odparowano azeotropowo z toluenem. Suchą pozostałość poddano

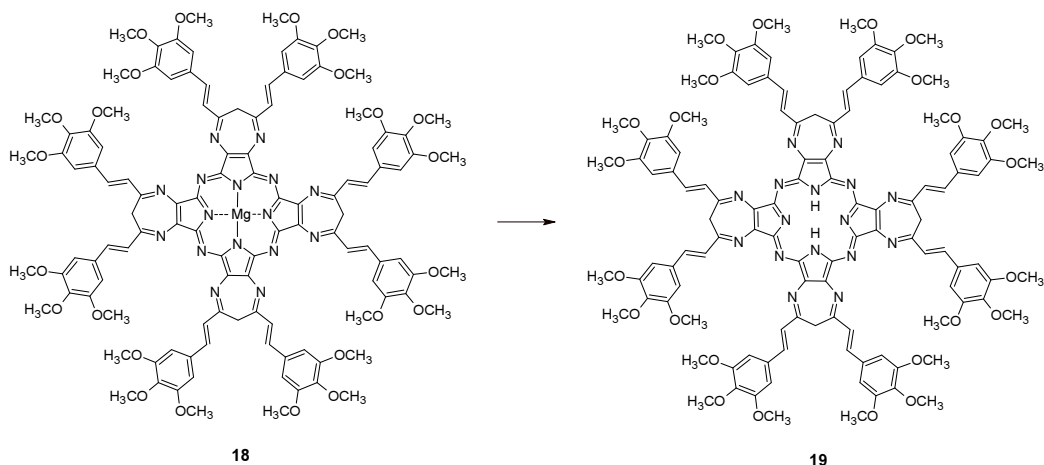
chromatografii kolumnowej, stosując jako fazę ruchomą dichlorometan–metanol (50:1 do 20:1). Otrzymany produkt przekrystalizowano z mieszaniny dichlorometanu i *n*-heksanu, uzyskując związek **17** (1,62 g; wyd. 98%).

magnez(II) tetrakis[5,7-bis{(2*E*)-(3,4,5-trimetoksyfenylo)etenilo}-6*H*-1,4-diazepino][2,3-*b*;2',3'-*g*;2'',3''-*l*;2''',3'''-*q*]porfirazyna (18**)**



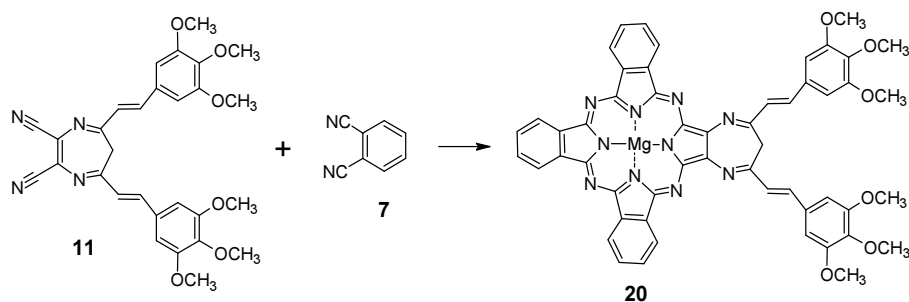
Opilki magnezu (48 mg; 2,0 mmol), *n*-butanol (100 cm³) i katalityczną ilość jodu, ogrzewano w temp. wrzenia przez 6 godzin. Następnie dodano diazepinę **11** (1,06 g; 2,0 mmol) i ogrzewano w temperaturze wrzenia przez następne 20 godzin. Mieszaninę reakcyjną przesączono przez ziemię okrzemkową i przemyto dichlorometanem. Po odparowaniu rozpuszczalnika suchą pozostałość oczyszczono chromatograficznie w normalnym układzie faz, stosując jako fazę ruchomą dichlorometan–metanol (50:1 do 10:1) oraz w odwróconym układzie faz używając mieszaniny metanolu i tetrahydrofuranu (20:1). Otrzymano ciemnozieloną porfirazynę **18** (97 mg; wyd. 9%): $R_f=0,74$ (dichlorometan–metanol 10:1), R_f (odwrócona faza), 0,41 (metanol–tetrahydrofuran, 20:1). UV-Vis (dichlorometan): λ_{\max} nm (log ϵ) 383 (5,10), 703 (4,76). MS (MALDI) m/z 2140 $[M+H]^+$. MS (MALDI) m/z 2138 $[M-H]^-$. ¹H NMR (500 MHz, pirydyna-*d*₅) δ_H , ppm 8,46 (d, 8H, ³*J*=16 Hz, 8×C5-(7)-CH=CH), 8,20 (d, 8H, ³*J*=16 Hz, 8×C5(7)-CH=CH), 7,07 (s, 16H, 16×ArH), 6,68 (d, 4H, ²*J*=10 Hz, 4×N=C-CH₂), 6,05 (d, 4H, ²*J*=10 Hz, 4×N=C-CH₂), 3,99 (s, 24H, 8×OCH₃), 3,88 (s, 48H, 16×OCH₃). ¹³C NMR (126 MHz, pirydyna-*d*₅): δ_C , ppm 154,5; 153,9; 147,6; 142,3; 140,1; 139,1; 132,3; 129,1; 105,6; 60,5; 56,0; 39,2.

tetrakis[5,7-bis{(2*E*)-(3,4,5-trimetoksyfenylo)etenylo}-6*H*-1,4-diazepino][2,3-*b*;2',3'-*g*;2'',3''-*l*;2''',3'''-*q*]porfirazyna (19**)**



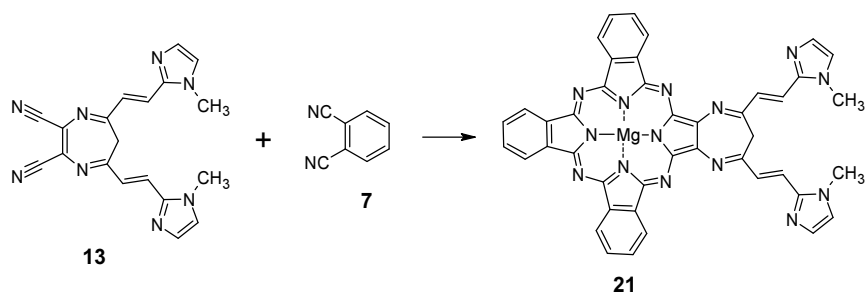
Porfirazynę magnezową **18** (232 mg, 0,1 mmol) rozpuszczono w kwasie trifluorooctowym (15 cm³) i mieszano przez 30 minut w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Następnie mieszaninę reakcyjną wylano do wody z lodem (300 cm³) i zobojętniono nasyconym roztworem NaHCO₃. Fazę organiczną wyekstrahowano dichlorometanem, po czym rozpuszczalnik odparowano, a suchą pozostałość oczyszczono chromatograficznie w normalnym układzie faz, używając jako fazy ruchomej mieszaniny dichlorometan–metanol (50:1 do 20:1). Następnie przeprowadzono chromatografię kolumnową w odwróconym układzie faz, przy użyciu mieszaniny metanolu i tetrahydrofuranu (25:1), uzyskując porfirazynę **19** (33 mg, wyd. 14%): *R_f*=0,35 (dichlorometan–metanol 20:1), UV-Vis (DMF): λ_{max} (log ε)=368 (4,14), 662 nm (4,58); (DMSO): λ_{max} (log ε)=368 (4,14), 664 nm (4,56). MS (MALDI) *m/z* 2117 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, pirydyna *d*₅): δ_H, ppm 8,52 (d, 8H, ³*J*=16 Hz, 8×C5 (7)-CH=CH), 8,17 (d, 8H, ³*J*=16 Hz, 8×C5 (7)-CH=CH), 7,04 (s, 16H, 16×ArH), 6,75 (d, 4H, ²*J*=12 Hz, 4×N=C-CH₂), 5,86 (d, 4H, ²*J*=12 Hz, 4×N=C-CH₂), 3,99 (s, 24H, 8×OCH₃), 3,85 (s, 48H, 16×OCH₃), -3,63 (s, 2H, 2×NH). ¹³C NMR (100 MHz, pirydyna *d*₅) δ_C, ppm 154,2; 154,0; 150,2; 142,9; 140,7; 140,4; 132,0; 128,6; 105,8; 60,5; 56,0; 38,8 (zaobserwowany na widmach ¹H-¹³C HSQC oraz ¹H-¹³C HMBC) ppm.

magnez(II) {5,7-bis[(2E)-(3,4,5-trimetoksyfenylo)etenylo]-6H-1,4-diazepino}[2,3-q]tribenzo[b,g,l]porfirazyna (20)



Magnez (132 mg, 5,5 mmol), *n*-butanol (80 cm³) oraz katalityczną ilość jodu ogrzewano mieszając w temperaturze wrzenia przez 4 godziny. Następnie dodano **11** (264 mg; 0,5 mmol) oraz 1,2-dicyjanobenzen (**7**) (640 mg; 5,0 mmol) i reakcję prowadzono przez kolejne 24 godziny w temperaturze wrzenia. Po odparowaniu *n*-butanolu z toluenem, pozostałość rozpuszczono w dichlorometanie i przesączono przez ziemię okrzemkową. Po odparowaniu rozpuszczalnika suchą pozostałość oczyszczono chromatograficznie w normalnym układzie faz, stosując dichlorometan–metanol (50:1 do 20:1) jako fazę ruchomą. Następnie przeprowadzono chromatografię kolumnową w odwróconym układzie faz, używając mieszaniny metanolu i tetrahydrofuranu (10:1 do 5:1), otrzymując tribenzoporfirazynę **20**. MS (MALDI) 938 [M+H⁺].

magnez(II) {5,7-bis[(2E)-(1-metylo-1H-imidazol-2-ilo)etenylo]-6H-1,4-diazepino}[2,3-q]tribenzo[b,g,l]porfirazyna (21)



Magnez (132 mg, 5,5 mmol), *n*-butanol (50 cm³) oraz katalityczną ilość jodu ogrzewano mieszając w temperaturze wrzenia przez 6 godzin. Następnie dodano **13** (178 mg; 0,5 mmol) oraz 1,2-dicyjanobenzen (**7**) (640 mg; 5,0 mmol) i reakcję prowadzono przez kolejne 13 godzin w temperaturze wrzenia. Po odparowaniu *n*-butanolu z toluenem, pozostałość rozpuszczono w dichlorometanie i przesączono przez ziemię okrzemkową. Po odparowaniu rozpuszczalnika suchą pozostałość oczyszczono chromatograficznie w normalnym układzie faz, stosując dichlorometan–metanol (50:1 do 10:1) jako fazę ruchomą. Następnie

przeprowadzono chromatografię kolumnową w odwróconym układzie faz, używając mieszaniny metanolu i tetrahydrofuranu (25:1) i otrzymano tribenzoporfirazyne **21**. MS (MALDI) 766 [M+H]⁺.

VI. 4. Metodyka badań właściwości fizykochemicznych

VI. 4. 1. Właściwości absorpcyjne i emisyjne

Widma UV-Vis wykreślono w zakresie 200-900 nm przy użyciu spektrofotometru Shimadzu UV-160A z oprogramowaniem PC160 PLUS. Molowe współczynniki absorpcji wyznaczono zgodnie z równaniem: $\epsilon=A/(c \cdot l)$, gdzie A odpowiada absorbancji przy badanej długości fali, c – stężeniu badanego roztworu [mol/dm³], l – długości drogi optycznej.

Widma fluorescencji wyznaczono przy użyciu spektrofluorymetru Jasco 6200. Wydajność kwantową fluorescencji wyznaczono stosując wzór:

$$\Phi_F = \Phi_{F\text{odniesienia}} \cdot (F_{\text{badanego związku}}/F_{\text{odniesienia}}) \cdot (A_{\text{odniesienia}}/A_{\text{badanego związku}}),$$

gdzie F odpowiada polu powierzchni pod pikiem emisji, natomiast A wartości absorbancji przy długości fali wzbudzenia (360 nm) [119]. Ftalocyjanina cynkowa została zastosowana jako związek referencyjny, posiadający $\Phi_{F\text{ZnPc}}=0,17$ w DMF i 0,20 w DMSO [120].

VI. 4. 2. Właściwości agregacyjne

W celu określenia tendencji badanych związków do agregacji, przygotowano serię 10 roztworów każdej z porfirazyn **8**, **18** i **19** w DMF i DMSO w zakresie stężeń:

- $1,53 \cdot 10^{-6}$ - $1,53 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ dla Pz **8** w DMF
- $1,51 \cdot 10^{-6}$ - $1,51 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ dla Pz **18** w DMF
- $4,02 \cdot 10^{-6}$ - $4,02 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ dla Pz **19** w DMF
- $1,48 \cdot 10^{-6}$ - $1,48 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ dla Pz **8** w DMSO
- $1,47 \cdot 10^{-6}$ - $1,47 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ dla Pz **18** w DMSO
- $4,05 \cdot 10^{-6}$ - $4,05 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ dla Pz **19** w DMSO

Następnie wykreślono widma UV-Vis przygotowanych roztworów oraz wyznaczono zależność absorbancji (A) przy długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji pasma Q, a stężeniem porfirazyn (c). Przeprowadzono analizę statystyczną zależności $A=f(c)$ i określiło słuszność absorpcji Lamberta-Beera.

VI. 4. 3. Fotodegradacja

Ocenę fototrwałości przeprowadzono po ekspozycji badanych związków na światło o długości fali powyżej 450 nm, przy wykorzystaniu wysokociśnieniowej lampy ksenonowej (150 W, Optel) oraz szklanego filtra odcinającego (HCC16). Przygotowano roztwory Pz **8**, **18** i **19** oraz ZnPc w DMF i DMSO wykazujące wartość absorpcji ok. 0,7, przy długości fali odpowiadającej maksimum pasma Q. Następnie uzyskane roztwory naświetlano w kuwetach cylindrycznych o długości drogi optycznej 1 cm oraz objętości 2,8 cm³. Natężenie światła padającego na próbkę wyznaczone przy użyciu luksomierza TES-1335 wynosiło 130 klux [116,138].

VI. 4. 4. Generowanie tlenu singletowego

Wydajność kwantową generowania tlenu singletowego wyznaczono metodą porównawczą, przy wykorzystaniu reakcji fotoutleniania 1,3-difenyloizobenzofuranu (DPBF) względem ftalocyjaniny cynkowej (ZnPc) jako odnośnika [136-138]. Roztwory badanych porfirazyn oraz ZnPc w DMF i DMSO, w obecności DPBF naświetlano w kuwetach kwarcowych (3 cm³) o długości drogi optycznej 1 cm, światłem monochromatycznym o długości fali dostosowanej do maksimum absorpcji pasma Q fotouczulacza (absorbancja fotouczulaczy w maksimum pasma Q wynosiła ~ 0,5). Jako źródła światła użyto wysokociśnieniowej lampy ksenonowej (150 W, Optel) oraz monochromatora M250/1200/U. W celu uniknięcia reakcji łańcuchowych zachodzących w obecności tlenu singletowego, stężenie DPBF ustalono na poziomie ok. $3,0 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ [153]. Intensywność światła zmierzona przy użyciu radiometru RD 0,2/2 (Optel) wynosiła 0,5 mW/cm². Badania przeprowadzono w atmosferze powietrza w temperaturze pokojowej.

VI. 6. Metodyka badań biologicznych

VI. 6. 1. Hodowla komórek

Komórki HSC-3, pochodzące z raka płaskonabłonkowego jamy ustnej [154] zostały dostarczone przez dr. R. Kramera (University of California, San Francisco, USA, UCSF). Komórki H413 wywodzące się z raka płaskonabłonkowego błony śluzowej policzka [155] otrzymano od dr. R. Jordana (UCSF). Komórki HSC-3 hodowano w zmodyfikowanej

pożywce Eagle Dulbecco (DMEM), z dodatkiem 10% (v/v) inaktywowanej ciepłym płodowej surowicy bydlęcej (FBS), penicyliny (100U/cm³), streptomycyny (100 ng/cm³) oraz L-glutaminy (4 mmol/dm³) (DMEM/10). Natomiast komórki H413 hodowano w DMEM/10 z dodatkiem mieszanki odżywczej Ham F12 (DMEM/10/F12). Komórki inkubowano w butelkach do hodowli tkankowych w 37 °C w wilgotnej atmosferze zawierającej 5% CO₂ i pasażowano dwa razy w tygodniu, w stosunku objętościowym 1:6, stosując roztwór trypsyny i EDTA. Wszystkie roztwory, w tym penicyliny, streptomycyny, L-glutaminy, FBS, trypsyny, EDTA, soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS) oraz roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanami Dulbecco (DPBS), zakupiono w Pracowni Hodowli Komórek Uniwersytetu UCSF. Porfirazy **8**, **18** i **19** rozpuszczono w DMSO (Aldrich), a następnie rozcieńczono roztworem DMEM lub DMEM/F12 (bez FBS i czerwieni fenolowej) do uzyskania odpowiedniego stężenia fotosensybilizatora, stosowanego w badaniach aktywności fotodynamicznej oraz toksyczności bez dostępu światła. Stężenie DMSO w końcowym roztworze nie przekraczało 0,5%.

VI. 6.2. Badanie toksyczności bez dostępu światła

Jeden dzień przed eksperymentem, przygotowano roztwory komórek HSC-3 i H413 w pożywce DMEM lub DMEM/F12 o gęstości $1,8 \cdot 10^5$ (HSC-3) lub $1,4 \cdot 10^5$ (H413) komórek na 1 cm³ pożywki. Następnie otrzymane roztwory komórek osadzono w 48-dołkowych płytkach. Komórki przemyto dwukrotnie używając po 0,5 cm³ roztworu PBS i do każdej studzienki, z wyjątkiem prób kontrolnych, dodano po 1 cm³ pożywki zawierającej fotosensybilizator, bez FBS (żeby uniknąć wiązania fotosensybilizatorów do białek surowicy) i czerwieni fenolowej. Po 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 37 °C, komórki przemyto dwukrotnie roztworem PBS, następnie do każdej studzienki dodano po 1 cm³ pożywki DMEM lub DMEM/F12 i komórki inkubowano przez kolejne 24 godziny w temperaturze 37 °C. Żywotność komórek oceniano ilościowo testem Alamar Blue. Komórki inkubowane jedynie w pożywce DMEM lub DMEM/F12 oraz w pożywce z dodatkiem 0,5% DMSO niezawierającej fotouczulaczy, wykorzystano jako próbę kontrolną.

VI. 6. 3. Badanie aktywności fotodynamicznej

Jeden dzień przed eksperymentem, przygotowano roztwory komórek HSC-3 i H413 w pożywce DMEM lub DMEM/F12 o gęstości $1,8 \cdot 10^5$ (HSC-3) lub $1,4 \cdot 10^5$ (H413) komórek na 1 cm^3 pożywki. Następnie otrzymane roztwory komórek osadzono w 48-dołkowych płytkach. Komórki przemyto dwukrotnie używając po $0,5 \text{ cm}^3$ roztworu PBS i do każdej studzienki z wyjątkiem prób kontrolnych dodano po 1 cm^3 pożywki zawierającej fotosensybilizator, bez FBS i czerwieni fenolowej. Po 24-godzinnej inkubacji w temperaturze $37 \text{ }^\circ\text{C}$, komórki przemyto dwukrotnie roztworem PBS, następnie dodano do każdej studzienki po 1 cm^3 pożywki DMEM lub DMEM/F12 bez FBS i czerwieni fenolowej. Przygotowane w ten sposób komórki naświetlano przez 20 minut przy wykorzystaniu diod LED, emitujących promieniowanie o długości fali 690 nm (9,8 V, High Power LED Multi Chip Emitter, Roithner Lasertechnik). Intensywność światła padającego na powierzchnię płytki, którą określono przy wykorzystaniu miernika mocy optycznej Thorlabs TM100A wynosiła $3,0 \text{ mW/cm}^2$. Natomiast całkowita dawka promieniowania była równa $3,6 \text{ J/cm}^2$. Jedna płytka z każdego doświadczenia nie była poddawana naświetlaniu i służyła jako próba kontrolna. Bezpośrednio po ekspozycji na światło pożywkę bez FBS i czerwieni fenolowej, zastąpiono kompletną pożywką i komórki inkubowano przez 24 godziny w temperaturze $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Żywotność komórek oceniano testem Alamar Blue.

VI. 6. 4. Określenie żywotności komórek

Morfologię komórek oceniano przy wykorzystaniu mikroskopu Nikon TMS, z odwróconym kontrastem fazowym przy 100-krotnym powiększeniu. Liczbę żywych komórek wyznaczono testem Tryptan Blue (Gibco-Invitrogen Corporation). Żywotność komórek oceniano ilościowo stosując zmodyfikowany test Alamar Blue [156,157]. W tym celu do każdego dołka dodano $1,0 \text{ cm}^3$ 10% (v/v) roztworu barwnika Alamar Blue w odpowiedniej pożywce. Po inkubacji przez 2-3 godziny w $37 \text{ }^\circ\text{C}$, po $0,2 \text{ cm}^3$ roztworu z każdej studzienki przeniesiono do 96-dołkowej płytki i oznaczano absorbancję przy 570 nm i 600 nm wykorzystując spektrofotometr płytkowy Versa max (Molecular Devices). Żywotność komórek obliczono według następującego wzoru:

$$\text{Żywotność komórek} = [(A_{570}-A_{600})_{\text{komórek badanych}}] \cdot 100 / [(A_{570}-A_{600})_{\text{komórek kontrolnych}}].$$

VI. 6. 5. Przygotowanie liposomów

Lipidy, 1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfocholina (POPC), L- α -fosfatydylo-DL-glicerol (PG), chlorek N-[1-(2,3-dioleoiloksy)propylo]-N,N,N-trimetyloamoniowy (DOTAP) i cholesterol (Chol) zakupiono w Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, USA). Przygotowano 4 różne formułacje liposomalne metodą hydratacji cienkiego filmu lipidowego [144]. Odpowiednie ilości roztworów lipidów w chloroformie (POPC - 20 mg/cm³, PG - 25 mg/cm³, DOTAP - 10 mg/cm³, Chol - 10 mg/cm³) oraz fotouczulacza (0,4 mg/cm³) umieszczono w probówkach szklanych, wymieszano i odparowano do sucha. Warstwę lipidów wytworzoną na dnie probówki wysuszono w piecu próżniowym w temperaturze pokojowej przez ok. 20 godzin. Następnie lipidy uwodniono roztworem HEPES wykazujących pH=7,5 o składzie: (10 mmol/dm³ HEPES (kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)piperazyn-1-ylo]etanosulfonowy), 140 mmol/dm³ NaCl). Tak przygotowaną próbę mieszano przy wykorzystaniu wytrząsarki Vortex Genie 2 przez 5-10 minut. W celu uzyskania jednowarstwowych liposomów o jednorodnym rozkładzie wielkości, otrzymane zawiesiny liposomów przepuszczono 21 razy przez poliwęglanowe membrany o średnicy porów 100 nm, przy użyciu ekstrudera strzykawkowego (Avanti Polar Lipids).

Stosunki molowe składników w otrzymanych liposomach wynosiły:

- (i) Pz **8**/Pz **18**/Pz **19** (0,1), PG (2), POPC (8);
- (ii) Pz **8**/Pz **19** (0,1), PG (1.33), POPC (5.34) Chol (3.33);
- (iii) Pz **8**/Pz **19** (0,1), DOTAP (2) POPC (8);
- (iv) Pz **8**/Pz **19** (0,1), DOTAP (1,33) POPC (5,34), Chol (3,33).

Wielkość otrzymanych liposomów określono metodą dynamicznego rozpraszania światła, stosując analizator wielkości cząstek Coulter N4 Plus (Beckman). Liposomy przechowywano w temperaturze 2-8 °C, w atmosferze argonu bez dostępu światła. Stężenie fotosensybilizatora w zawiesinach liposomów wynosiło 100 μ mol/dm³. Otrzymane liposomy przed badaniem aktywności biologicznej względem komórek HSC-3, rozcieńczano pożywką DME (bez FBS i czerwieni fenolowej) do osiągnięcia odpowiedniego stężenia. Przygotowano również wolne liposomy bez fotouczulaczy jako próbki kontrolne.

VI. 6. 6. Oznaczenie lokalizacji wewnątrzkomórkowej oraz żywotności komórek przy wykorzystaniu mikroskopu fluorescencyjnego

Przygotowano roztwory komórek HSC-3 i H413 w pożywce DMEM o gęstości $1,8 \cdot 10^5$ komórek na 1 cm^3 pożywki. Następnie otrzymane roztwory komórek osadzono w 48-dółkowych płytkach i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Komórki przemyto dwukrotnie używając po $0,5 \text{ cm}^3$ roztworu PBS i do każdej studzienki dodano 1 cm^3 pożywki (bez FBS i czerwieni fenolowej), zawierającej Pz **8** w stężeniu $1 \text{ } \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ lub Pz **19** w stężeniu $10 \text{ } \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Po 24-godzinnej inkubacji w temperaturze $37 \text{ }^\circ\text{C}$, komórki przemyto dwukrotnie roztworem PBS. Następnie dodano roztwory barwników fluorescencyjnych (Molecular Probes) o określonym stężeniu w PBS i inkubowano z: MitoTracker Green FM ($0,4 \text{ } \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) 15 minut, Alexa Fluor 350 WGA ($5 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^3$) 15 minut, Syto 13 ($5 \text{ } \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) 30 minut oraz Hoechst 33342 ($6 \text{ } \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) 30 minut. Komórki przemyto roztworem PBS i obrazowano przy wykorzystaniu mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Diaphot oraz aparatu Jenaoptik z oprogramowaniem Capture ProgRes, używając obiektywu fazowego o powiększeniu 20-krotnym. Zastosowano filtry firmy Chroma Technology Corporation (Bellows Falls, USA): filtr 49006 dla porfirazyn, filtr 61000v2 dla MitoTracker Green i Syto 13, filtr 49000 dla Alexa Fluor 350 i Hoechst 33342.

Obrazowanie żywotności komórek pod mikroskopem fluorescencyjnym przeprowadzono na komórkach HSC-3, poddanych procedurze fotodynamicznej z użyciem Pz **8** w stężeniu $0,01 \text{ } \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, $0,25 \text{ } \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, $1,0 \text{ } \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ oraz Pz **19** w stężeniu $1,0 \text{ } \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, $5,0 \text{ } \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ i $10,0 \text{ } \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Po odczytaniu wyników metodą spektrofotometryczną testem Alamar Blue, komórki przemyto dwukrotnie roztworem PBS. Następnie do każdej z trzech studzienek dodano roztwór PBS zawierający jeden z barwników: Calcein Green AM ($5 \text{ } \mu\text{mol}/\text{dm}^3$), Calcein Red-Orange AM ($5 \text{ } \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) oraz WGA Alexa Fluor 350 ($5 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^3$). Komórki inkubowano przez 30 minut w temperaturze $37 \text{ }^\circ\text{C}$, po czym przemyto dwukrotnie roztworem PBS i ponownie inkubowano 30 minut w celu odmycia barwnika znajdującego się w przestrzeni międzykomórkowej. Komórki obrazowano przy wykorzystaniu mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Diaphot z filtrem 61000v2 dla Calcein Green AM i Calcein Red-Orange AM oraz filtrem 49000 dla WGA Alexa Fluor 350 oraz aparatu Jenaoptik za pomocą oprogramowania Capture ProgRes.

VII. STRESZCZENIE

W części teoretycznej pracy dokonano przeglądu literatury dotyczącego następujących zagadnień: (i) historii otrzymania pierwszych azotowych pochodnych porfiryn, (ii) porfirazyn diazepinowych jako związków o obiecujących właściwościach fotouczulających, (iii) liposomów jako nośników fotouczulaczy stosowanych w terapii fotodynamicznej.

W części eksperymentalnej przeprowadzono syntezę, ocenę właściwości fizykochemicznych i biologicznych porfirazyn, posiadających skondensowane ugrupowania styrylodiazepinowe. Otrzymano siedem nowych związków chemicznych w tym cztery porfirazyny (**18**, **19**, **21**, **22**) oraz trzy związki (**11**, **13**, **15**), które wykorzystano jako substraty w reakcjach makrocyclizacji, prowadzących do docelowych makrocycli.

1. 5,7-bis[(2*E*)-(3,4,5-trimetoksyfenylo)etenyl]-6*H*-1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryl (**11**)
2. 5,7-bis[(2*E*)-(1-metylo-1*H*-imidazol-2-ilo)etenyl]-6*H*-1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryl (**13**)
3. 5,7-bis[(2*E*)-(4-trifluorometylofenylo)etenyl]-6*H*-1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryl (**15**)
4. magnez(II) tetrakis[5,7-bis{(2*E*)-(3,4,5-trimetoksyfenylo)etenyl}-6*H*-1,4-diazepino][2,3-*b*;2',3'-*g*;2'',3'''-*l*;2''',3''''-*q*]porfirazyna (**18**)
5. tetrakis[5,7-bis{(2*E*)-(3,4,5-trimetoksyfenylo)etenyl}-6*H*-1,4-diazepino][2,3-*b*;2',3'-*g*;2'',3'''-*l*;2''',3''''-*q*]porfirazyna (**19**)
6. magnez(II) {5,7-bis[(2*E*)-(3,4,5-trimetoksyfenylo)etenyl]-6*H*-1,4-diazepino}[2,3-*q*]tribenzo[*b*,*g*,*l*]porfirazyna (**20**)
7. magnez(II) {5,7-bis[(2*E*)-(1-metylo-1*H*-imidazol-2-ilo)etenyl]-6*H*-1,4-diazepino}[2,3-*q*]tribenzo[*b*,*g*,*l*]porfirazyna(II) (**21**)

Budowę chemiczną związków **11**, **13**, **18**, **19** określono przy wykorzystaniu spektrofotometrii UV-Vis, spektrometrii mas (ES, MALDI), a także różnych technik spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HMBC i ¹H-¹³C HSQC). Ponadto dla 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryli **11** i **13** wykonano analizę elementarną. Dwie różne formy polimorficzne związku **11**, otrzymano w postaci monokryształów, które scharakteryzowano metodą analizy rentgenostrukturalnej. Natomiast tożsamość związków **15**, **20**, **21** potwierdzono przy zastosowaniu spektrometrii mas. Syntezę magnez(II) {5-fenylo-7-

[(2*E*)-(3,4,5-trimetoksyfenylo)etenilo]-6*H*-1,4-diazepino}[2,3-*q*]tribenzo[*b,g,l*]porfirazyny (**8**), przeprowadzono zgodnie z opracowaną wcześniej procedurą.

Porfirazyny **8**, **18** i **19** poddano badaniom fizykochemicznym i biologicznym. Czystość związków potwierdzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, a następnie określono właściwości absorpcyjne i emisyjne, tendencję do agregacji, trwałość fotochemiczną, a także wydajność kwantową generowania tlenu singletowego. Spośród badanych związków – najkorzystniejsze właściwości jako potencjalny fotouczulacz – wykazywała tribenzoporfirazyna magnezowa **8**, w tym (i) intensywną absorpcję promieniowania z zakresu 600-750 nm, (ii) najwyższą wydajność kwantową fluorescencji, (iii) najmniejszą tendencję do tworzenia agregatów, (iv) największą wydajność kwantową generowania tlenu singletowego równą 0,28 w DMF i 0,31 w DMSO. Formulacje liposomalne porfirazyn przygotowano przy wykorzystaniu metody hydratacji cienkiego filmu lipidowego. Liposomy naładowane dodatnio oraz ujemnie uzyskano poprzez zastosowanie odpowiednio, chlorku N-[1-(2,3-dioleoiloksy)propylo]-N,N,N-trimetyloamoniowego oraz L- α -fosfatydylo-DL-glicerolu.

Aktywność fotodynamiczną *in vitro* porfirazyn **8**, **18** i **19**, określono względem dwóch linii komórek nowotworowych jamy ustnej, tj. HSC-3 i H413. Badania obejmowały inkubację komórek nowotworowych z porfirazynami, zarówno w postaci wolnej, jak i inkorporowanej w liposomy, a następnie ekspozycję na światło czerwone z zastosowaniem diod LED. Oceniono również cytotoksyczność fotouczulaczy bez dostępu światła. Najwyższą aktywność fotodynamiczną względem obu linii komórek nowotworowych wykazała tribenzoporfirazyna magnezowa **8**. Natomiast porfirazyna demetalowana **19**, posiadała aktywność względem komórek HSC-3, podczas gdy porfirazyna magnezowa **18**, nie wpływała na żywotność badanych komórek nowotworowych. Wykazano, że wbudowanie tribenzoporfirazyny **8** w ujemnie naładowane liposomy, powoduje niemal trzykrotny wzrost aktywności fotodynamicznej. Świadczą o tym wyznaczone wartości IC₅₀, które wynoszą 129 nmol/dm³ i 45 nmol/dm³ odpowiednio dla Pz **8** w postaci wolnej oraz po inkorporacji w liposomy zbudowane z L- α -fosfatydylo-DL-glicerolu i 1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfocholiny. Uzyskane wyniki oraz analiza danych z piśmiennictwa, pozwala zaklasyfikować liposomalną postać tribenzoporfirazyny magnezowej **8**, jako jeden z najbardziej obiecujących fotouczulaczy porfirazynowych, ze względu na zaobserwowaną fotocytotoksyczność na poziomie nanomolowym.

VIII.ABSTRACT

Porphyrazines possessing annulated diazepine ring: synthesis, physicochemical properties and photodynamic activity against cancer cells

Theoretical part of the dissertation concerns the following subjects (i) the synthesis, properties and applications of azaanalogs of porphyrins, (ii) diazepinoporphyrines possessing promising photosensitizing properties and (iii) liposomes as vehicles for photosensitizers used in photodynamic therapy.

In the experimental part synthesis, physical-chemical and biological properties of porphyrazines with annulated styryldiazepine groups are presented. Seven novel compounds were synthesized including four porphyrazines (**18**, **19**, **21**, **22**) and three compounds (**11**, **13**, **15**), which were used as substrates for the macrocyclization reactions leading to the desired macrocycles:

1. 5,7-bis[(2*E*)-(3,4,5-trimethoxyphenyl)ethenyl]-6*H*-1,4-diazepine-2,3-dicarbonitrile (**11**)
2. 5,7-bis[(2*E*)-(1-methyl-1*H*-imidazol-2-yl)ethenyl]-6*H*-1,4-diazepine-2,3-dicarbonitrile (**13**)
3. 5,7-bis[(2*E*)-(4-trifluoromethylphenyl)ethenyl]-6*H*-1,4-diazepine-2,3-dicarbonitrile (**15**)
4. magnesium(II) tetrakis[5,7-bis{(2*E*)-(3,4,5-trimethoxyphenyl)ethenyl}-6*H*-1,4-diazepine][2,3-*b*;2',3'-*g*;2'',3''-*l*;2''',3'''-*q*]porphyrazine (**18**)
5. tetrakis[5,7-bis{(2*E*)-(3,4,5-trimethoxyphenyl)ethenyl}-6*H*-1,4-diazepine][2,3-*b*;2',3'-*g*;2'',3''-*l*;2''',3'''-*q*]porphyrazine (**19**)
6. magnesium(II) {5,7-bis[(2*E*)-(3,4,5-trimethoxyphenyl)ethenyl]-6*H*-1,4-diazepine}[2,3-*q*]tribenzo[*b*,*g*,*l*]porphyrazine (**20**)
7. magnesium(II) {5,7-bis[(2*E*)-(1-methyl-1*H*-imidazol-2-yl)ethenyl]-6*H*-1,4-diazepine}[2,3-*q*]tribenzo[*b*,*g*,*l*]porphyrazine (**21**)

The structure of compounds **11**, **13**, **18**, **19** was determined using UV-Vis spectrophotometry, mass spectrometry (ES, MALDI), as well as various techniques of Nuclear Magnetic Resonance (¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HMBC i ¹H-¹³C HSQC). Moreover, elemental analyses were performed for the 1,4-diazepine-2,3-dicarbonitriles **11** and **13**. Single crystals for two different polymorphic forms of the compound **11** were obtained and

characterized by X-ray crystallography. On the other hand, the identities of the compounds **15**, **20**, **21** were confirmed using mass spectrometry. In addition, a synthesis of magnesium(II) {5-phenyl-7-[(2*E*)-(3,4,5-trimethoxyphenyl)ethenyl]-6H-1,4-diazepine}[2,3-*q*]tribenzo[*b,g,l*]porphyrzine (**8**) was elaborated, according to the procedure previously developed at the Department of Chemical Technology of Drugs.

Porphyrzines **8**, **18** and **19**, were subjected to physical-chemical and biological studies. The purity of these compounds was confirmed by HPLC analysis and then absorption and emission properties, a tendency to form aggregates, photochemical stability, and the quantum yield of singlet oxygen generation were evaluated. Magnesium tribenzoporphyrzine **8**, showed the best properties for potential application in photodynamic therapy among the tested compounds, including (i) intensive absorption of radiation in the range of 600-750 nm, (ii) the highest fluorescence quantum yield, (iii) the smallest tendency to form aggregates and (iv) the highest ability to generate singlet oxygen equals 0,28 in DMF and 0,31 in DMSO. Liposomes containing incorporated porphyrzines were prepared by a thin film hydration method. Four different types of liposomes carrying embedded porphyrzines were obtained, including positively charged due to the presence of N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride and that negatively charged with L- α -phosphatidyl-DL-glycerol.

Photodynamic activity of porphyrzines **8**, **18**, **19** was determined *in vitro* against two oral cancer cell lines (HSC-3 and H413). These studies included incubation of cancer cells with porphyrzines, both in free form and incorporated into liposomes, and then irradiation with red light using LED diodes. Moreover, cytotoxicity of photosensitizers without irradiation was also examined. Tribenzoporphyrzine **8** showed the highest photodynamic activity against both cancer cell lines. Demetalled porphyrzine **19** exhibited activity against HSC-3 cells, whereas magnesium porphyrzine **18**, did not affect the viability of examined cancer cells.

It was found that the incorporation of tribenzoporphyrzine **8** in negatively charged liposomes resulted in an almost threefold increase of its photodynamic activity. This was evidenced by IC₅₀ values of 129 nmol/dm³ and 45 nmol/dm³ for Pz **8** in free form and after incorporation in liposomes composed of L- α -phosphatidyl-DL-glycerol and 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, respectively. The results of research and analysis of the literature data concerning the porphyrzines of potential usage in photodynamic therapy, allow to classify the magnesium tribenzoporphyrzine **8**, incorporated into liposomal formulation, as one of the most promising photosensitizers, due to the observed photocytotoxicity at nanomolar level.

IX. SPIS ZAMIESZCZONYCH SKRÓTÓW

- ALA – (*ang. 5-aminolevulinic acid*) – kwas 5-aminolewulinowy
- BNCT – (*ang. Boron Neutron Capture Therapy*) – terapia boronowo neutronowa
- Chol – cholesterol
- COSY – (*ang. Corelation Spectroscopy*) – homojądrowa spektroskopia korelacyjna, należąca do technik 2D NMR
- DLS – (*ang. Dynamic Light Scattering*) – metoda dynamicznego rozpraszania światła
- DMEM – (*ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium*) - podłoże hodowlane Dulbecco zmodyfikowane przez Eagle'a
- DMF – N,N-dimetyloformamid
- DMPC – 1,2-dimirystoilo-sn-glicero-fosfatydylocholina
- DMSO – dimetylosulfotlenek
- DOPC – 1,2-dioleoilo-sn-glicero-fosfocholina
- DOPE – 1,2-dioleoilo-sn-glicero-fosfo-etanolamina
- DOTAP – chlorek N-[1-(2,3-dioleoiloksy)propylo]-N,N,N-trimetyloamoniowy
- DPBF – difenylizobenzofuran
- DPBS – (*ang. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) – buforowany roztwór soli fizjologicznej Dulbecco
- EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy
- EPR – (*ang. enhanced vascular permeability and retention*) – efekt zwiększonej przepuszczalności naczyń i zatrzymywania
- ES – (*ang. electrospray*) - jonizacja przez rozpylanie w polu elektrycznym
- FBS – (*ang. Fetal bovine serum*) – inaktywowana ciepłem płodowa surowica bydłęca
- HMBC – (*ang. Heteronuclear Multibond Correlation*) – heterojądrowa spektroskopia korelacyjna, badająca oddziaływania przez dwa lub więcej wiązań
- HPLC – (*ang. High Performance Liquid Chromatography*) – wysokosprawna chromatografia cieczowa
- HSQC – (*ang. Heteronuclear Single Quantum Correlation*) – heterojądrowa spektroskopia korelacyjna badająca oddziaływania sąsiednich atomów
- IC₅₀ – (*ang. inhibitory concentration*) – stężenie badanego związku, przy którym proliferacja komórek zostaje zahamowana w 50% w odniesieniu do układu kontrolnego

LED	–	(<i>ang. light-emitting diode</i>) – dioda elektroluminescencyjna
MALDI	–	(<i>ang. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>) – desorpcja laserowa z udziałem matrycy
MS	–	(<i>ang. mass spectrometry</i>) – spektrometria mas
NMR	–	(<i>ang. Nuclear Magnetic Resonance</i>) – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
OSCC	–	(<i>ang. oral squamous cell carcinoma</i>) - komórki raka płaskonabłonkowego jamy ustnej
PACT	–	(<i>ang. Photodynamic Antimicrobial Therapy</i>) – terapia fotodynamiczna skierowana przeciw mikroorganizmom
PBS	–	(<i>ang. Phosphate Buffered Saline</i>) – roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanami
PDD	–	(<i>ang. Photodynamic Diagnosis</i>) – diagnostyka fotodynamiczna
PDT	–	(<i>ang. Photodynamic Therapy</i>) – terapia fotodynamiczna
PEG	–	polietylenoglikol
PG	–	L- α -fosfatydylo-DL-glicerol
POPC	–	1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfocholina
Pz	–	porfirazyna
R _f	–	(<i>ang. retardation factor</i>) – współczynnik opóźnienia
SAXS	–	(<i>ang. Small-angle X-ray scattering</i>) – metoda małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego
SOD	–	(<i>ang. superoxide dismutase</i>) – dysmutaza ponadtlenkowa
t.top.	–	temperatura topnienia
TLC	–	(<i>ang. Thin-layer chromatography</i>) – chromatografia cienkowarstwowa
TOF	–	(<i>ang. Time of Flight</i>) – analizator czasu przelotu
UV-DAD	–	detektor spektralny z matrycą diodową
WGA	–	(<i>ang. Wheat Germ Agglutinin</i>) – aglutynina kielków pszenicy
ZnPc	–	ftalocyjanina cynkowa
Φ_F	–	wydajność kwantowa fluorescencji
Φ_Δ	–	wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego

X. SPIS RYCIN, SCHEMATÓW I TABEL

X. 1. Ryciny

Ryc. 1.	Struktury porfirynoidów: porfiryna (I), ftalocyjanina (II), porfirazyna (III) oraz możliwe modyfikacje peryferyjne porfirazyn, M = kation metalu, X = atomy: węgla, azotu, tlenu lub siarki	1
Ryc. 2.	Przebieg terapii fotodynamicznej wraz ze schematem reakcji fotodynamicznej.....	2
Ryc. 3.	Struktury pochodnych porfirazyn, posiadających zamiast skondensowanych pierścieni benzenu, inne pierścienie aromatyczne; naftalen (IV), tiofen (V), tionaften (VI), pirydynę (VII) oraz pirazynę (VIII).....	7
Ryc. 4.	Struktury związków makrocyclicznych: tetrabenzoporfina (IX), tetrabenzotriazaporfina (X), tetrabenzomonoazaporfina (XI), oktafenyloporfirazyna (XII), tetraimidoetioporfiryna (XIII), tetracykloheksenoporfirazyna (XIV), oktametyloporfirazyna (XV).....	9
Ryc. 5.	Struktury pochodnych 1,4-benzodiazepiny: 1,4-benzodiazepin-2-on (A), 1,4-benzodiazepin-2,5-dion (B), dibenzodiazepinon (C) oraz pirolobenzodiazepina (D).....	11
Ryc. 6.	Struktury pochodnych 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryli XVIa-d, XVIIa-d.....	13
Ryc. 7.	Struktury pochodnych 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryli XVIIIa-f.....	14
Ryc. 8.	Struktury pochodnych 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryli XIXa-e.....	15
Ryc. 9.	Możliwe izomery 1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryli XIXa-e.....	17
Ryc. 10.	Struktury związków makrocyclicznych XX – XXIV.....	18
Ryc. 11.	Struktury związków makrocyclicznych XXV, XXVI.....	20
Ryc. 12.	Budowa liposomu.....	21
Ryc. 13.	Struktury związków makrocyclicznych XXVII – XXXIII.....	24
Ryc. 14.	Struktury związków makrocyclicznych XXXIV – XXXVII.....	26
Ryc. 15.	Struktury związków makrocyclicznych XXXVIII – XLI.....	28
Ryc. 16.	Struktury związków makrocyclicznych XLII – XLIV.....	30

Ryc. 17.	Struktury związków makrocyclicznych XLV – XLVI	31
Ryc. 18.	Chromatogram oraz widma UV-Vis Pz 8 , detekcja przy $\lambda=360$ nm.....	40
Ryc. 19.	Chromatogram oraz widma UV-Vis Pz 8 , detekcja przy $\lambda=655$ nm.....	41
Ryc. 20.	Chromatogram oraz widma UV-Vis Pz 18 , detekcja przy $\lambda=370$ nm.....	42
Ryc. 21.	Chromatogram oraz widma UV-Vis Pz 18 , detekcja przy $\lambda=660$ nm.....	42
Ryc. 22.	Chromatogram oraz widma UV-Vis Pz 19 , detekcja przy $\lambda=360$ nm.....	43
Ryc. 23.	Chromatogram oraz widma UV-Vis Pz 19 , detekcja przy $\lambda=660$ nm.....	44
Ryc.24.	Analiza widm NMR 11 z przypisaniem przesunięć chemicznych [ppm] dla ^1H NMR (^{13}C NMR) oraz sprzężeń obserwowanych w widmach ^1H - ^1H COSY i ^1H - ^{13}C HMBC.....	47
Ryc. 25.	Struktury krystalograficzne dwóch form polimorficznych dikarbonitrylu 11 wraz z oznaczeniami atomów. Strzałki wskazują wiązania, wokół których zaobserwowano zmiany konformacji obu form polimorficznych.	48
Ryc. 26.	Widmo ^1H NMR porfirazyny (18) w pirydynie- d_5 , wykonane w temp 25°C (298K). W ramce przedstawiono widma ^1H NMR wykreślone w różnych temperaturach dla zakresu 5,9-6,8 ppm. Symbole * i x wskazują resztkowe sygnały pirydyny i wody.....	49
Ryc. 27.	Analiza widm ^1H NMR i ^{13}C NMR porfirazyny 18 z przypisaniem przesunięć chemicznych [ppm] oraz sprzężeń obserwowanych w widmach ^1H - ^1H COSY i ^1H - ^{13}C HMBC.....	50
Ryc. 28.	Analiza widm ^1H NMR oraz ^{13}C NMR porfirazyny 19 z przypisaniem przesunięć chemicznych [ppm] oraz sprzężeń obserwowanych na widmach ^1H - ^1H COSY i ^1H - ^{13}C HMBC.....	52
Ryc. 29.	Widma ^1H - ^{13}C HMBC (a) i ^1H - ^{13}C HSQC (b) Pz 19 w pirydynie- d_5 . Symbole * i $^\#$ wskazują resztkowe sygnały pirydyny i <i>n</i> -heksanu.....	53
Ryc. 30.	Widma UV-Vis porfirazyn 8 , 18 , 19 w DMF.....	55
Ryc. 31.	Widma UV-Vis porfirazyn 8 , 18 , 19 w DMSO.....	56
Ryc. 32.	Widma absorpcji i emisji w zakresie pasma Q Pz 8 w: a) DMF, b) DMSO.....	59
Ryc. 33.	Widma absorpcji i emisji w zakresie pasma Q Pz 18 w a) DMF, b) DMSO.....	59
Ryc. 34.	Widma absorpcji i emisji w zakresie pasma Q Pz 19 w a) DMF, b) DMSO.....	59

- Ryc. 35.** Widma absorpcji w zakresie pasma Q roztworów Pz **8** w DMF ($c=1,53 \cdot 10^{-6}$ – $1,53 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³) oraz zależność stężenia i absorbancji odpowiadającej maksimum absorpcji pasma Q ($\lambda=689$ nm)..... 63
- Ryc. 36.** Widma absorpcji w zakresie pasma Q roztworów Pz **8** w DMSO ($c=1,48 \cdot 10^{-6}$ – $1,48 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³) oraz zależność stężenia i absorbancji odpowiadającej maksimum absorpcji pasma Q ($\lambda=692$ nm)..... 63
- Ryc. 37.** Widma absorpcji w zakresie pasma Q roztworów Pz **18** w DMF ($c=1,51 \cdot 10^{-6}$ – $1,51 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³) oraz zależność stężenia i absorbancji odpowiadającej maksimum absorpcji pasma Q ($\lambda=695$ nm)..... 64
- Ryc. 38.** Widma absorpcji w zakresie pasma Q roztworów Pz **18** w DMSO ($c=1,47 \cdot 10^{-6}$ – $1,47 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³) oraz zależność stężenia i absorbancji odpowiadającej maksimum absorpcji pasma Q ($\lambda=689$ nm)..... 64
- Ryc. 39.** Widma absorpcji w zakresie pasma Q roztworów Pz **19** w DMF ($c=4,02 \cdot 10^{-6}$ – $4,02 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³) oraz zależność stężenia i absorbancji odpowiadającej maksimum absorpcji pasma Q ($\lambda=662$ nm)..... 65
- Ryc. 40.** Widma absorpcji w zakresie pasma Q roztworów Pz **19** w DMSO ($c=4,05 \cdot 10^{-6}$ – $4,05 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³) oraz zależność stężenia i absorbancji odpowiadającej maksimum absorpcji pasma Q ($\lambda=664$ nm)..... 65
- Ryc. 41.** Zmiany w widmie UV-Vis w zakresie pasma Q podczas naświetlania roztworu Pz **8** w DMF oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A/A_0=f(t)$ 69
- Ryc. 42.** Zmiany w widmie UV-Vis w zakresie pasma Q podczas naświetlania roztworu Pz **8** w DMSO oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A/A_0=f(t)$ 69
- Ryc. 43.** Zmiany w widmie UV-Vis w zakresie pasma Q podczas naświetlania roztworu Pz **18** w DMF oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A/A_0=f(t)$ 69
- Ryc. 44.** Zmiany w widmie UV-Vis w zakresie pasma Q podczas naświetlania roztworu Pz **18** w DMSO oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A/A_0=f(t)$ 70
- Ryc. 45.** Zmiany w widmie UV-Vis w zakresie pasma Q podczas naświetlania roztworu Pz **19** w DMF oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A/A_0=f(t)$ 70
- Ryc. 46.** Zmiany w widmie UV-Vis w zakresie pasma Q podczas naświetlania roztworu Pz **19** w DMSO oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A/A_0=f(t)$ 70
- Ryc. 47.** Zmiany w widmie UV-Vis w zakresie pasma Q podczas naświetlania roztworu ZnPc w DMF oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A/A_0=f(t)$ 71

- Ryc. 48.** Zmiany w widmie UV-Vis w zakresie pasma Q roztworu ZnPc w DMSO podczas naświetlania oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ 71
- Ryc. 49.** Reakcja rozkładu 1,3-difenylizobenzofuranu pod wpływem tlenu singletowego..... 75
- Ryc. 50.** Zmiany w widmie UV-Vis podczas naświetlania roztworu zawierającego Pz 8 i DPBF w DMF oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A_0/A = f(t)$ 76
- Ryc. 51.** Zmiany w widmie UV-Vis podczas naświetlania roztworu zawierającego Pz 8 i DPBF w DMSO oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A_0/A = f(t)$ 76
- Ryc. 52.** Zmiany w widmie UV-Vis podczas naświetlania roztworu zawierającego Pz 18 i DPBF w DMF oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A_0/A = f(t)$ 76
- Ryc. 53.** Zmiany w widmie UV-Vis podczas naświetlania roztworu zawierającego Pz 18 i DPBF w DMSO oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A_0/A = f(t)$ 77
- Ryc. 54.** Zmiany w widmie UV-Vis podczas naświetlania roztworu zawierającego Pz 19 i DPBF w DMF oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A_0/A = f(t)$ 77
- Ryc. 55.** Zmiany w widmie UV-Vis podczas naświetlania roztworu zawierającego Pz 19 i DPBF w DMSO oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A_0/A = f(t)$ 77
- Ryc. 56.** Zmiany w widmie UV-Vis DMF podczas naświetlania roztworu zawierającego ZnPc i DPBF w oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A_0/A = f(t)$ 78
- Ryc. 57.** Zmiany w widmie UV-Vis podczas naświetlania roztworu zawierającego ZnPc i DPBF w DMSO oraz wykres przedstawiający zależność $\ln A_0/A = f(t)$ 78
- Ryc. 58.** Porównanie fotocytotoksyczności Pz 8 w postaci wolnej oraz inkorporowanej w różnego rodzaju liposomy..... 92
- Ryc. 59.** Fluorescencja komórek HSC-3 inkubowanych z: a) Pz 8 i b) Pz 19 wybarwionych przy użyciu MitoTracker Green; (i) Pz 8 lub Pz 19, (ii) MitoTracker Green, (iii) nałożone fotografie (i) i (ii). 94
- Ryc. 60.** Komórki HSC-3 po przeprowadzeniu procedury fotodynamicznej z udziałem Pz 8 w stężeniu (i) $0,01 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, (ii) $0,25 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, (iii) $1,0 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, wybarwione przy użyciu: a) Calcein Green AM, b) Calcein Red-Orange, c) WGA Alexa Fluor 350..... 96
- Ryc. 61.** Komórki HSC-3 po przeprowadzeniu procedury fotodynamicznej z udziałem Pz 19 w stężeniu (i) $1,0 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, (ii) $5,0 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, (iii) $10,0 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, wybarwione przy użyciu: a) Calcein Green AM, b) Calcein Red-Orange, c) WGA Alexa Fluor 350..... 97

X. 2. Schematy

- Schemat 1.** Reagenty i warunki reakcji: (i) (COOH)₂, benzen, temp. wrzenia, 3,5 godz.; (ii) P₂O₅, etanol, temp. wrzenia, 4 godz.; (iii) piperydyna, benzen, temp. wrzenia, 24 godz. (iv) *n*-butanolan magnezu, *n*-butanol, temp. wrzenia, 17 godz..... 32
- Schemat 2.** Reagenty i warunki reakcji: (i) (COOH)₂, benzen, temp. wrzenia, 5 godz..... 33
- Schemat 3.** Reagenty i warunki reakcji: (i) (COOH)₂, benzen, temp. wrzenia, 6-15 godz... 34
- Schemat 4.** Reagenty i warunki reakcji: (i) (*n*-BuO)₂Mg, *n*-butanol, temp. wrzenia, 20 godz., (ii) CF₃COOH, temp. pok. 30 min. 36
- Schemat 5.** Reagenty i warunki reakcji: (i) (*n*-BuO)₂Mg, *n*-butanol, temp. wrzenia, 24 godz. (20) lub 13 godz. (21).....37

X. 3. Tabele

- Tabela 1.** Skład fazy ruchomej w analizie HPLC Pz 8..... 40
- Tabela 2.** Wyniki analizy HPLC Pz 8..... 41
- Tabela 3.** Skład fazy ruchomej w analizie HPLC Pz 18..... 41
- Tabela 4.** Wyniki analizy HPLC Pz 18..... 43
- Tabela 5.** Skład fazy ruchomej w analizie HPLC Pz 19..... 43
- Tabela 6.** Wyniki analizy HPLC Pz 19..... 44
- Tabela 7.** Parametry charakteryzujące właściwości absorpcyjne porfirazyn 8, 18 i 19..... 58
- Tabela 8.** Wydajności kwantowe fluorescencji porfirazyn 8, 18 i 19..... 60
- Tabela 9.** Parametry statystyczne zależności absorbancji od stężenia Pz 8, 18 i 19 w DMF..... 66
- Tabela 10.** Parametry statystyczne zależności absorbancji od stężenia Pz 8, 18 i 19 w DMSO.....67
- Tabela 11.** Parametry kinetyczne zależności $\ln A/A_0=f(t)$ dla Pz 8, 18 i 19 w DMF..... 73
- Tabela 12.** Parametry kinetyczne zależności $\ln A/A_0=f(t)$ dla Pz 8, 18 i 19 w DMSO..... 74

Tabela 13. Wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego przez Pz 8, 18 i 19 w DMF oraz parametry kinetyczne zależności $\ln A/A_0=f(t)$ opisującej szybkość rozkładu DPBF	80
Tabela 14. Wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego przez Pz 8 i 18 w DMSO oraz parametry kinetyczne zależności $\ln A/A_0=f(t)$ opisującej szybkość rozkładu DPBF	81
Tabela 15. Żywotność komórek HSC-3 i H413 inkubowanych z Pz 8, 18 i 19 bez dostępu światła	83
Tabela 16. Żywotność komórek H413 po przeprowadzeniu procedury fotodynamicznej z udziałem Pz 8, 18 i 19	84
Tabela 17. Żywotność komórek HSC-3 po przeprowadzeniu procedury fotodynamicznej z udziałem Pz 8, 18 i 19	84
Tabela 18. Średnica oraz indeks polidispersyjności liposomów zbudowanych z L- α -fosfatydylo-DL-glicerolu i 1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfocholiny oraz Pz 8, 18 i 19	86
Tabela 19. Żywotność komórek HSC-3 po przeprowadzeniu procedury fotodynamicznej z udziałem liposomów zbudowanych z L- α -fosfatydylo-DL-glicerolu (PG) i 1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfocholiny (POPC) oraz Pz 8, 18 i 19	88
Tabela 20. Średnica oraz indeks polidispersyjności liposomów zawierających Pz 8 i 19	89
Tabela 21. Żywotność komórek HSC-3 po przeprowadzeniu procedury fotodynamicznej z udziałem liposomów zawierających Pz 8 i 19	90
Tabela 22. Żywotność komórek HSC-3 oraz wartość IC_{50} dla Pz 8 i 19 oraz formułacji liposomalnych zawierających Pz 8	91

XI. LITERATURA

1. M.S. Rodriguez-Morgade, P.A. Stuzhin, *J. Porphyr. Phthalocya.* **2004**, 8, 1129.
2. R.R. Allison, C.H. Sibata, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2010**, 7, 61.
3. T. Dai, Y.Y. Huang, M.R. Hamblin, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2009**, 6, 170.
4. A. Sieroń, W. Stręk, H. Podbielska red., *Diagnostyka i terapia fotodynamiczna*; rozdz. 3, Diagnostyka fotodynamiczna; rozdz. 4, Nowotwory skóry; rozdz. 5, PDT w ginekologii; Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław **2004**, 185.
5. K. Konopka, T. Goslinski, *J. Dent. Res.* **2007**, 86, 694.
6. T. Nyokong, V. Ahsen, red. *Photosensitizers in Medicine, Environment and Security*; rozdz. 1, Design and Conception of Photosensitisers; rozdz. 2, Recent Developments of Synthetic Techniques for Porphyrins, Phthalocyanines and Related Systems; rozdz. 6, The Use of Phthalocyanines and Related Complexes in Photodynamic Therapy, Springer **2012**.
7. J.P. Celli, B.Q. Spring, I. Rizvi, C.L. Evans, K.S. Samkoe, S. Verma, B.W. Pogue, T. Hasan, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 2795.
8. D. Nevozhay, U. Kańska, R. Budzyńska, J. Boratyński, *Postepy Hig. Med. Dosw.* **2007**, 61, 350.
9. M. Stringer, K. Moghissi, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2004**, 1, 9.
10. M. Csanády, J.G. Kiss, L. Iván, J. Jóri, J. Czigner, *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **2004**, 261, 262.
11. Y.N. Konan, R. Gurny, E. Allemann, *J. Photochem. Photobiol. B* **2002**, 66, 89.
12. S. Wang, R. Gao, F. Zhou, M. Selke, *J. Mater. Chem.* **2004**, 14, 487.
13. D.K. Chatterjee, L.S. Fong, Y. Zhang, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, 60, 1627.
14. E. Paszko, C. Ehrhardt, M.O. Senge, D.P. Kelleher, J.V. Reynolds, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2011**, 8, 14.
15. P. Skupin-Mrugalska, J. Piskorz, T. Goslinski, J. Mielcarek, K. Konopka, N. Düzgüneş, *Drug Discov. Today* **2013**, 18, 776.
16. C.S. Jin, G. Zheng, *Lasers Surg. Med.* **2011**, 43, 734.
17. A. Pashkovskaya, E. Kotova, Y. Zorlu, F. Dumoulin, V. Ahsen, I. Agapov, Y. Antonenko, *Langmuir* **2010**, 26, 5726.
18. A. Aygun, K. Torrey, A. Kumar, L.D. Stephenson, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, 167, 743.

19. M.A. Dahlen, *Ind. Eng. Chem.* **1939**, *31*, 839.
20. R.P. Linstead, *J. Chem. Soc.* **1934**, 1016.
21. G.T. Byrne, R.P. Linstead, A.R. Lowe, *J. Chem. Soc.* **1934**, 1017.
22. R.P. Linstead, A.R. Lowe, *J. Chem. Soc.* **1934**, 1022.
23. C.E. Dent, R.P. Linstead, *J. Chem. Soc.* **1934**, 1027.
24. R.P. Linstead, J.M. Robertson, *J. Chem. Soc.* **1936**, 1736.
25. C.E. Dent, R.P. Linstead, A.R. Lowe, *J. Chem. Soc.* **1934**, 1033.
26. E.F. Bradbrook, R.P. Linstead, *J. Chem. Soc.* **1936**, 1744.
27. R.P. Linstead, E.G. Noble, J.M. Wright, *J. Chem. Soc.* **1937**, 911.
28. G.P. Moss, *Pure Appl. Chem.* **1987**, *59*, 779.
29. P.A. Barrett, R.P. Linstead, G.A.P. Tuey, J.M. Robertson, *J. Chem. Soc.* **1939**, 1809.
30. R.P. Linstead, G.A. Rowe, *J. Chem. Soc.* **1940**, 1070.
31. P.A. Barrett, R.P. Linstead, J.J. Leavitt, G.A. Rowe, *J. Chem. Soc.* **1940**, 1076.
32. P.A. Barrett, R.P. Linstead, F.G. Rundall, G.A.P. Tuey, *J. Chem. Soc.* **1940**, 1079.
33. A.H. Cook, R.P. Linstead, *J. Chem. Soc.* **1937**, 929.
34. R.P. Linstead, *J. Chem. Soc.* **1953**, 2873.
35. R.P. Linstead, M. Whalley, *J. Chem. Soc.* **1952**, 4839.
36. G.E. Ficken, R.P. Linstead, *J. Chem. Soc.* **1952**, 4846.
37. M.E. Baguley, H. France, R.P. Linstead, M. Whalle, *J. Chem. Soc.* **1955**, 3521.
38. P.M. Brown, D.B. Spiers, M. Whalle, *J. Chem. Soc.* **1957**, 2882.
39. C.E. Barnett, *Ind. Eng. Chem.* **1949**, *41*, 272.
40. P. Gregory, *J. Porphyr. Phthalocya.* **2000**, *4*, 432.
41. C.G. Claessens, U. Hahn, T. Torres, *Chem. Rec.* **2008**, *8*, 75.
42. S. Jakucewicz, *Farby Drukowe*, Michael Huber Polska, Wrocław 2001.
43. M. Kryjewski, A. Śmigielska, T. Gośliński, *Przem. Chem.* **2010**, *89*, 727.
44. A.R. Katritzky, C.W. Rees, red. *Comprehenshive heterocyclic chemistry; tom 4*, Smith K.M., *Porphyrins, corrins and phthalocyanines*, Pergamon Press, Oxford. **1984**, 377.
45. W. Szczołko, S. Szpunt, S. Lijewski, M. Nowak, S. Sobiak, T. Gośliński, *Farm. Pol.* **2011**, *67*, 441.
46. B. Gerratana, *Med. Res. Rev.* **2012**, *32*, 254.
47. B.E. Leonard, *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* **1999**, *14*, 125.
48. P. van Vliet, R.C. van der Mast, M. van den Broek, R.G.J. Westendorp, A.J.M. de Craen, *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **2009**, *24*, 500.

49. A.C. Araújo, F. Nicotra, C. Airoidi, B. Costa, G. Giagnoni, P. Fumagalli, L. Cipolla, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 635.
50. D.J. Parks, L.V. LaFrance, R.R. Calvo, K.L. Milkiewicz, J.J. Marugán, P. Raboisson, C. Schubert, H.K. Koblish, S. Zhao, C.F. Franks, J. Lattanze, T.E. Carver, M.D. Cummings, D. Maguire, B.L. Grasberger, A.C. Maroney, T. Lu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3310.
51. W. Wang, Y. Hu, *Med. Res. Rev.* **2012**, *32*, 1159.
52. A. Sznarkowska, R. Olszewski, J. Zawacka-Pankau, *Postepy Hig. Med. Dosw.* **2010**, *64*, 396.
53. L. Loudni, J. Roche, V. Potiron, J. Clarhaut, C. Bachmann, J.P. Gesson, I. Tranoy-Opalinski, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4819.
54. T.M. Francis, T.B. Sundberg, J. Cleary, T. Groendyke, A.W. Pipari, Jr., G. D. Glick, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2423.
55. L. Nover, M. Luckner, *Eur. J. Biochem.* **1969**, *10*, 268.
56. A. Heguy, P. Cai, P. Meyn, D. Houck, S. Russo, R. Michitsch, C. Pearce, B. Katz, G. Bringmann, D. Feineis, D.L. Taylor, A.S. Tyms, *Antivir. Chem. Chemother.* **1998**, *9*, 149.
57. M. Kassiou, R.W. Read, X. Shi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 799.
58. H. Gourdeau, J.B. McAlpine, M. Ranger, B. Simard, F. Berger, F. Beaudry, P. Falardeau, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2008**, *61*, 911.
59. T. Bertomeu, V. Zvereff, A. Ibrahim, S.P. Zehntner, A. Aliaga, P. Rosa-Neto, B.J. Bedell, P. Falardeau, H. Gourdeau, *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *80*, 1572.
60. Y. Huang, S. Wolf, M. Bista, L. Meireles, C. Camacho, T.A. Hola, A. Dömling, *Chem. Biol. Drug. Des.* **2010**, *76*, 116.
61. G. Li, X. Wang, C. Tian, T. Zhang, Z. Zhang, J. Liu, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 5193.
62. A.F. Eweas, G. Allam, A.S.A. Abuelsaad, A.H. ALGhamdi, I.A. Maghrabi, *Bioorg. Chem.* **2013**, *46*, 17.
63. P. Zhang, N. Zhang, B.E. Korba, R.S. Hosmane, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5397.
64. P. Zhang, N. Zhang, B.E. Korba, R.S. Hosmane, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2225.
65. N. Zhang, P. Zhang, A. Baier, L. Cova, R.S. Hosmane, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 1154.

66. E. Horiguchi, K. Shirai, J. Jaung, M. Furusyo, K. Takagi, M. Matsuoka, *Dyes Pigm.* **2001**, *50*, 99.
67. E. Horiguchi, K. Shirai, M. Matsuoka, M. Matsui, *Dyes Pigm.* **2002**, *53*, 45.
68. E. Horiguchi, S. Matsumoto K. Funabiki, M. Matsui, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2005**, *78*, 1167.
69. M.P. Donzello, C. Ercolani, P.A. Stuzhin, A. Chiesi-Villa, C. Rizzoli, *Eur. J. Inorg. Chem.* **1999**, 2075.
70. S. Angelino, C. Ercolani, *J. Porphyr. Phthalocya.* **2000**, *4*, 474.
71. M.P. Donzello, D. Dini, G. D'Arcangelo, C. Ercolani, R. Zhan, Z. Ou, P.A. Stuzhin, K.M. Kadish, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14190.
72. M.P. Donzello, C. Ercolani, L. Mannina, E. Viola, A. Bubnova, O. Khelevina, P.A. Stuzhin, *Aust. J. Chem.* **2008**, *61*, 262.
73. S.M. Baum, A.A. Trabanco, A.G. Montalban, A.S. Micallef, C. Zhong, H.G. Meunier, K. Suhling, D. Phillips, A.J.P. White, D.J. Williams, A.G.M. Barrett, B.M. Hoffman, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1665.
74. P.A. Tarakanov, M.P. Donzello, O.I. Koifman, P.A. Stuzhin *Macroheterocycles* **2011**, *4*, 177.
75. T. Goslinski, J. Piskorz, D. Brudnicki, A.J.P. White, M. Gdaniec, W. Szczolko, E. Tykarska, *Polyhedron* **2011**, *30*, 1004.
76. L.A. Muehlmann, G.A. Joanitti, J.R. Silva, J.P.F. Longo, R.B. Azevedo, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2011**, *44*, 729.
77. B. Chen, B.W. Pogue, T. Hasan, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2005**, *2*, 477.
78. M. Kępczyński, K. Nawalany, M. Kumorek, A. Kobierska, B. Jachimska, M. Nowakowska, *Chem. Phys. Lipids* **2008**, *155*, 7.
79. D. Man, R. Słota, M.A. Broda, G. Mele, J. Li, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, *16*, 173.
80. F.M. Engelmann, I. Mayer, D.S. Gabrielli, H.E. Toma, A.J. Kowaltowski, K. Araki, M.S. Baptista, *J. Bioenerg. Biomembr.* **2007**, *39*, 175.
81. S. Ballut, A. Makky, B. Looock, J.P. Michel, P. Maillard, V. Rosilio, *Chem. Commun.* **2009**, 224.
82. K. Nawalany, A. Rusin, M. Kępczyński, A. Mikhailov, G. Kramer-Marek, M. Śnietura, J. Połtowicz, Z. Krawczyk, M. Nowakowska, *J. Photochem. Photobiol. B* **2009**, *97*, 8.
83. K. Nawalany, A. Rusin, M. Kępczynski, P. Filipczak, M. Kumorek, B. Kozik, H. Weitman, B. Ehrenberg, Z. Krawczyk, M. Nowakowska, *Int. J. Pharm.* **2012**, *430*, 129.

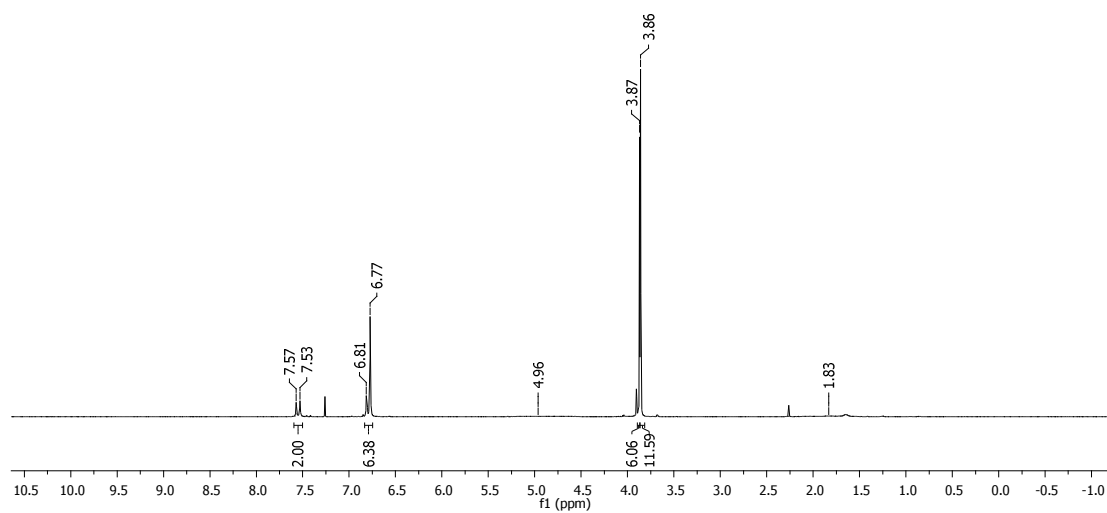
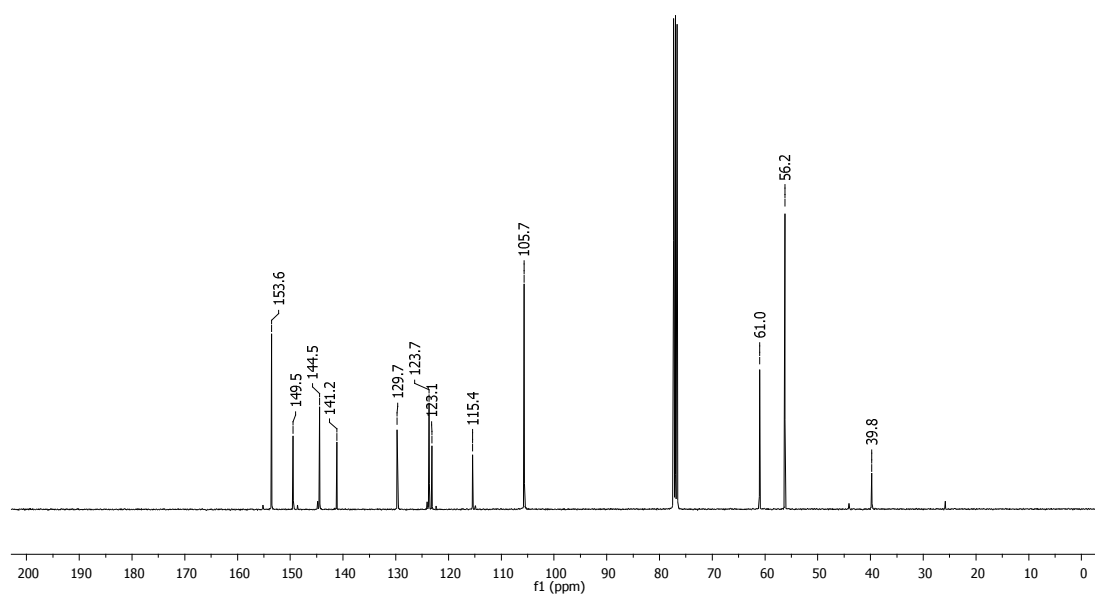
84. K. Hiraka, M. Kanehisa, M. Tamai, S. Asayama, S. Nagaoka, K. Oyaizu, M. Yuasa, H. Kawakami, *Colloids Surf. B* **2008**, *67*, 54.
85. T. Ohse, S. Nagaoka, Y. Arakawa, H. Kawakami, K. Nakamura, *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *85*, 201.
86. V.M. Taylor, D.L. Cedeño, D.L. Muñoz, M.A. Jones, T.D. Lash, A.M. Young, M.H. Constantino, N. Esposito, I.D. Vélez, S.M. Robledo, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 4755.
87. D.M. Gardner, V.M. Taylor, D.L. Cedeño, S. Padhee, S.M. Robledo, M.A. Jones, T.D. Lash, I.D. Vélez, *Photochem. Photobiol.* **2010**, *86*, 645.
88. D. Pietrangeli, A. Rosa, S. Ristori, A. Salvati, S. Altieri, G. Ricciardi, *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257* 2213.
89. R.L. Moss, *Appl. Radiat. Isot.* **2014**, *88*, 2.
90. S. Ristori, A. Salvati, G. Martini, O. Spalla, D. Pietrangeli, A. Rosa, G. Ricciardi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 2728.
91. A. Salvati, S. Ristori, J. Oberdisse, O. Spalla, G. Ricciardi, D. Pietrangeli, M. Giustini, G. Martini, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 10357.
92. A. Salvati, S. Ristori, D. Pietrangeli, J. Oberdisse, L. Calamai, G. Martini, G. Ricciardi, *Biophys. Chem.* **2007**, *131*, 43.
93. S. Altieri, M. Balzi, S. Bortolussi, P. Bruschi, L. Ciani, A.M. Clerici, P. Faraoni, C. Ferrari, M.A. Gadan, L. Panza, D. Pietrangeli, G. Ricciardi, S. Ristori, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7829.
94. M.P. Donzello, E. Viola, M. Giustini, C. Ercolani, F. Monacelli, *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 6112.
95. N. Nombona, K. Maduray, E. Antunes, A. Karsten, T. Nyokong, *J. Photochem. Photobiol. B* **2012**, *107*, 35.
96. J.P.F. Longo, S.P. Lozzi, A.R. Simioni, P.C. Morais, A.C. Tedesco, R.B. Azevedo, *J. Photochem. Photobiol. B* **2009**, *94*, 143.
97. J.P.F. Longo, S.C. Leal, A.R. Simioni, M. de Fátima Menezes Almeida-Santos, A.C. Tedesco, R.B. Azevedo, *Lasers Med. Sci.* **2012**, *27*, 575.
98. N.B.R. Vittar, C.G. Prucca, C. Strassert, J. Awruch, V.A. Rivarola, *Int. J. Biochem. Cell B* **2008**, *40*, 2192.
99. A. Szurko, M. Rams, A. Sochanik, K. Sieroń-Stołtny, A.M. Koziolec, F.P. Montforts, R. Wrzalik, A. Ratuszna, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 8197.

100. J. Zhang, L. Deng, J. Yao, P. Gu, F. Yang, X. Wang, W. Liu, Y. Zhang, X. Ke, X. Jing, J. Chen, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 5520.
101. R.W. Begland, D.R. Hartter, F.N. Jones, D.J. Sam, W.A. Sheppard, O.W. Webster, F.J. Weigert, *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 2341
102. E. Horiguchi, K. Funabiki, M. Matsui, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2005**, *78*, 316.
103. S.L.J. Michel, B.M. Hoffman, S.M. Baum, A.G.M. Barrett, "Peripherally Functionalized Porphyrazines: Novel Metallomacrocycles with Broad, Untapped Potential" w Progress in Inorganic Chemistry, Vol. 50 (Ed.: K. D.Karlin), Wiley, New York, 2001, 473.
104. W. Szczolko, L. Sobotta, P. Fita, T. Koczorowski, M. Mikus, M. Gdaniec, A. Orzechowska, K. Burda, S. Sobiak, M. Wierzchowski, J. Mielcarek, E. Tykarska, T. Goslinski, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 2040.
105. J. Vacus, G. Memetidis, P. Doppelt, J. Simon, *J. Chem. Soc. Commun.* **1994**, 697.
106. R. Decréau, M. Chanon, M. Julliard, *Inorg. Chim. Acta* **1999**, *293*, 80.
107. T.P. Forsyth, D.B.G. Williams, A.G. Montalban, C.L. Stern, A.G.M. Barrett, B.M. Hoffman, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 331.
108. C. Framme, H.G. Sachs, B. Flucke, D. Theisen-Kunde, R. Birngruber, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2006**, *47*, 5437.
109. U.S. Pharmacopeia, http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m88105.html, dostę: 22.09.2014
110. Y. Kashiya, H. Kitazato, N. Ohkouchi, *J. Chromatogr. A* **2007**, *1138*, 73.
111. Z. Jiang, J. Shao, M. Chen, J. Wang, L. Jia, *The Analyst* **2013**, *138*, 4385.
112. P.A. Stuzhin, P. Tarakanov, S. Shiryaeva, A. Zimenkova, O.I. Koifman, E. Viola, M.P. Donzello, C. Ercolani, *J. Porphyr. Phthalocya.* **2012**, *16*, 968.
113. J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Organic Chemistry*, Oxford, 2000.
114. A.C. Kübler, *Med. Laser Appl.* **2005**, *20*, 37.
115. Z.A. Bayir, E. Hamuryudan, A.G. Gürek, Ö. Bekaroğlu, *J. Porphyr. Phthalocya.* **1997**, *1*, 349.
116. L. Sobotta, P. Fita, W. Szczolko, M. Wrotynski, M. Wierzchowski, T. Goslinski, J. Mielcarek, *J. Photochem. Photobiol. A* **2013**, *269*, 9.
117. T.D. Mody, *J. Porphyr. Phthalocya.* **2000**, *4*, 362.
118. M. Ethirajan, Y. Chen, P. Joshi, R.K. Pandey, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 340.
119. V. Chauke, M. Durmus, T. Nyokong, *J. Photochem. Photobiol. A* **2007**, *192*, 179.
120. A. Ogunsipe, D. Maree, T. Nyokong, *J. Mol. Struct.* **2003**, *650*, 131.

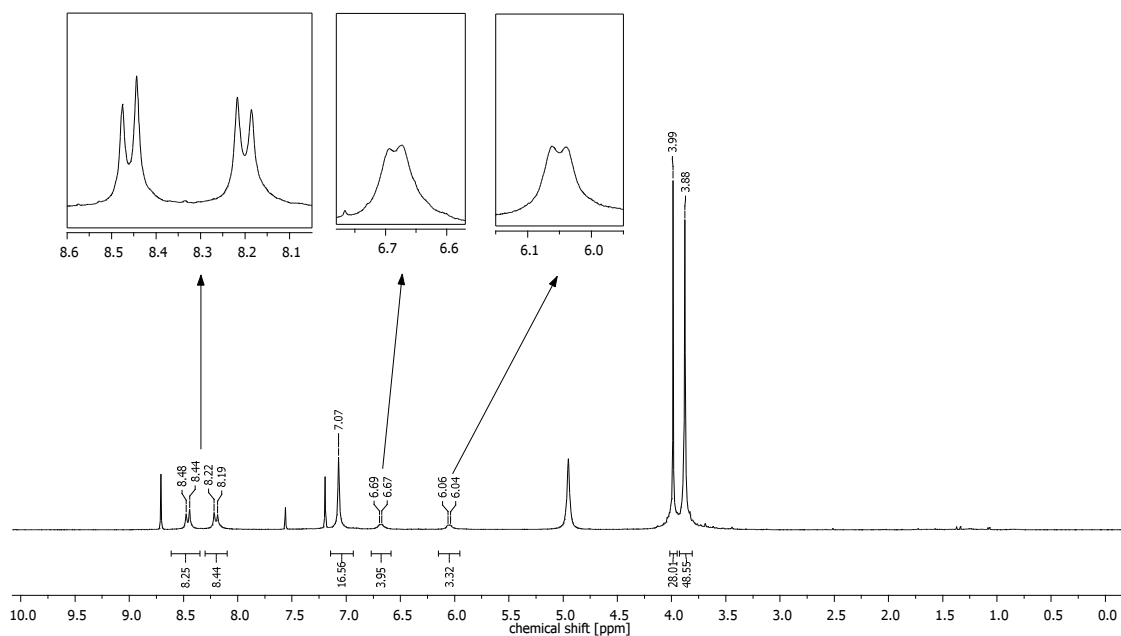
121. V.N. Knyukshto, V.A. Kuzmitsky, E.A. Borisevich, D.I. Volkovich, A.S. Bubnova, P.A. Stuzhin, K.N. Solovyov, *J. Appl. Spectrosc.* **2009**, 3, 341,
122. M. Kostka, P. Zimcik, M. Miletin, P. Klemra, K. Kopecky, Z. Musil, *J. Photochem. Photobiol. A* **2006**, 178, 16.
123. D.J. Ball, S.R. Wood, D.I. Vernon, J. Griffiths, T.M.A.R. Dubbelman, S.B. Brown, *J. Photochem. Photobiol. B* **1998**, 45, 28.
124. F.C. Rossetti, L.B. Lopes, A.R.H. Carollo, J.A. Thomazini, A.C. Tedesco, M.V.L.B. Bentley, *J. Control. Release* **2011**, 155, 400.
125. A. Wang, X. Chen, L. Zhang, G. Zhang, L. Zhou, S. Lu, J. Zhou, S. Wei, *J. Photochem. Photobiol. A* **2014**, 288, 1.
126. A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2004**, 1, 279.
127. R.F. Pasternack, J.I. Goldsmith, S. Szép, E.J. Gibbs, *Biophys. J.* **1998**, 75, 1024.
128. S. Hagiwara, Y. Ishida, D. Masui, T. Shimada, S. Takagi, *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53, 5800.
129. C. Hadjur, N. Lange, J. Rebstein, P. Monnier, H. van den Bergh, G. Wagnières, *J. Photochem. Photobiol. B* **1998**, 45, 170.
130. H. Yang, F. Wang, Z. Zhang, *Dyes Pigm.* **1999**, 43, 109.
131. R. Rotomskis, G. Streckyte, S. Bagdonas, *J. Photochem. Photobiol. B* **1997**, 39, 167.
132. K. Das, A. Dube, P.K. Gupta, *Dyes Pigm.* **2005**, 64, 201.
133. R. Bonnett, G. Martinez, *Tetrahedron* **2001**, 57, 9513.
134. E.A. Mayeda, A.J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 6223.
135. W. Spiller, H. Kliesch, D. Wöhrle, S. Hackbarth, B. Röder, G. Schnurpfeil, *J. Porphyr. Phthalocya.* **1998**, 2, 145.
136. I. Seotsanyana-Mokhosi, S. Maree, M.D. Maree, T. Nyokong, *J. Porphyr. Phthalocya.* **2003**, 7, 167.
137. M.P. Cormick, M. Rovera, E.N. Durantini, *J. Photochem. Photobiol. A* **2008**, 194, 220.
138. T. Goslinski, T. Osmalek, J. Mielcarek, *Polyhedron* **2009**, 28, 3839.
139. E.G. Sakellariou, A.G. Montalban, S.L. Beall, D. Henderson, H.G. Meunier, D. Phillips, K. Suhling, A.G.M. Barrett, B. M. Hoffman, *Tetrahedron* **2003**, 59, 9083.
140. M.T. Jarvi, M.S. Patterson, B.C. Wilson, *Biophys. J.* **2012**, 102, 661.
141. I. Georgakoudi, T.H. Foster, *Photochem. Photobiol.* **1998**, 67, 612.

142. M. Wierzchowski, L. Sobotta, P. Skupin-Mrugalska, J. Kruk, W. Jusiak, M. Yee, K. Konopka, N. Düzgüneş, E. Tykarska, M. Gdaniec, J. Mielcarek, T. Goslinski, *J. Inorg. Biochem.* **2013**, *127*, 62.
143. A.S.L. Derycke, P.A.M. de Witte, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 17.
144. N. Düzgüneş, *Methods Enzymol.* **2003**, *367*, 23.
145. T. Kosobe, E. Moriyama, Y. Tokuoka, N. Kawashima, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2005**, *31*, 623.
146. A. Nagayasu, K. Uchiyama, H. Kiwada, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1999**, *40*, 75.
147. D. Kessel, Y. Luo, Y. Deng, C.K. Chang, *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 422.
148. D. Kessel, Y. Luo, *J. Porphyr. Phthalocya.* **2001**, *5*, 181.
149. R.D. Almeida, B.J. Manadas, A.P. Carvalho, C.B. Duarte, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1704*, 59.
150. J.T.F. Lau, P.C. Lo, W.P. Fong, D.K.P. Ng, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5446.
151. A.L. Gryshuk, Y. Chen, W. Potter, T. Ohulchansky, A. Oseroff, R.K. Pandey, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1874.
152. Charakterystyka barwników fluorescencyjnych firmy Molecular Probes, www.lifetechnologies.com, dostęp: 22.09.2014
153. M. Durmuş, V. Ahsen, T. Nyokong, *J. Photochem. Photobiol. A* **2007**, *186*, 323.
154. K. Matsumoto, M. Horikoshi, K. Rikimaru, S. Enomoto, *J. Oral Pathol. Med.* **1989**, *18*, 498.
155. S.S. Prime, S.V.R. Nixon, S.I.J. Crane, A. Stone, J.B. Matthews, N.J. Maitland, L. Remnant, S.K. Powell, S.M. Game, C. Scully, *J. Pathol.* **1990**, *160*, 259.
156. R.D. Fields, M.V. Lancaster, *Am. Biotechnol. Lab.* **1993**, *11*, 48.
157. K. Konopka, E. Pretzer, P.L. Felgner, N. Düzgüneş, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1312*, 186.

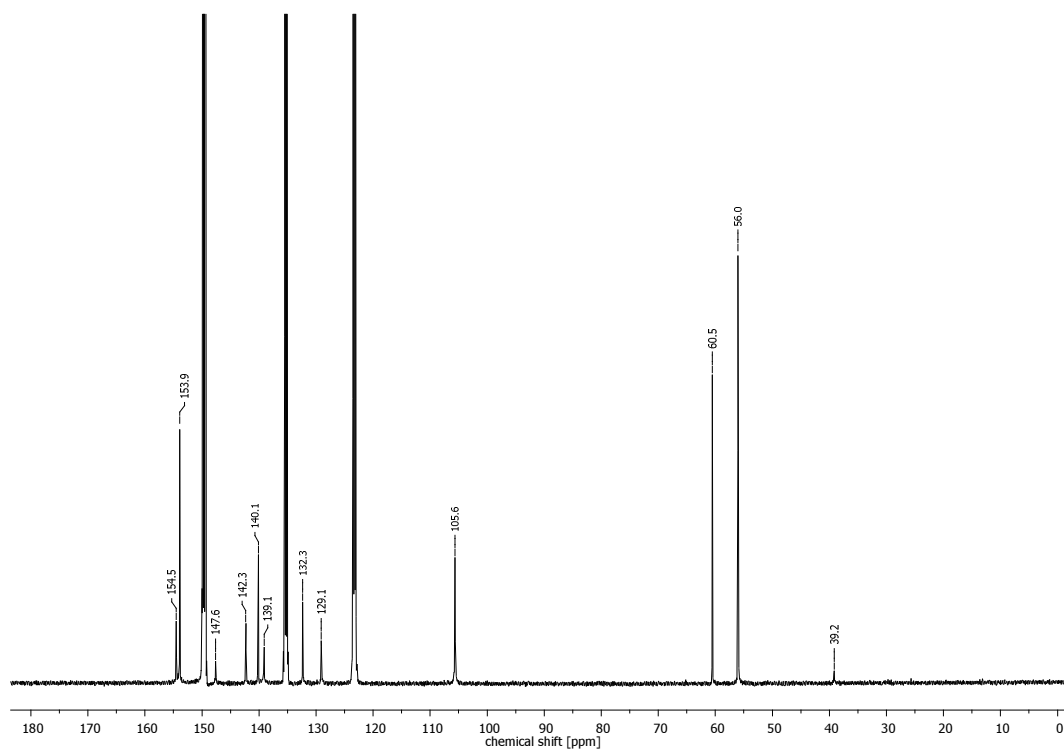
XII. SUPPLEMENT

5,7-bis[(2E)-(3,4,5-trimetoksyfenylo)etenylo]-6H-1,4-diazepino-2,3-dikarbonitryl (**11**)¹H NMR¹³C NMR

magnez(II) tetrakis[5,7-bis{(2*E*)-(3,4,5-trimetoksyfenylo)etenylo}-6*H*-1,4-diazepino][2,3-b;2',3'-g;2'',3''-l;2''',3'''-q]porfirazyna (**18**)

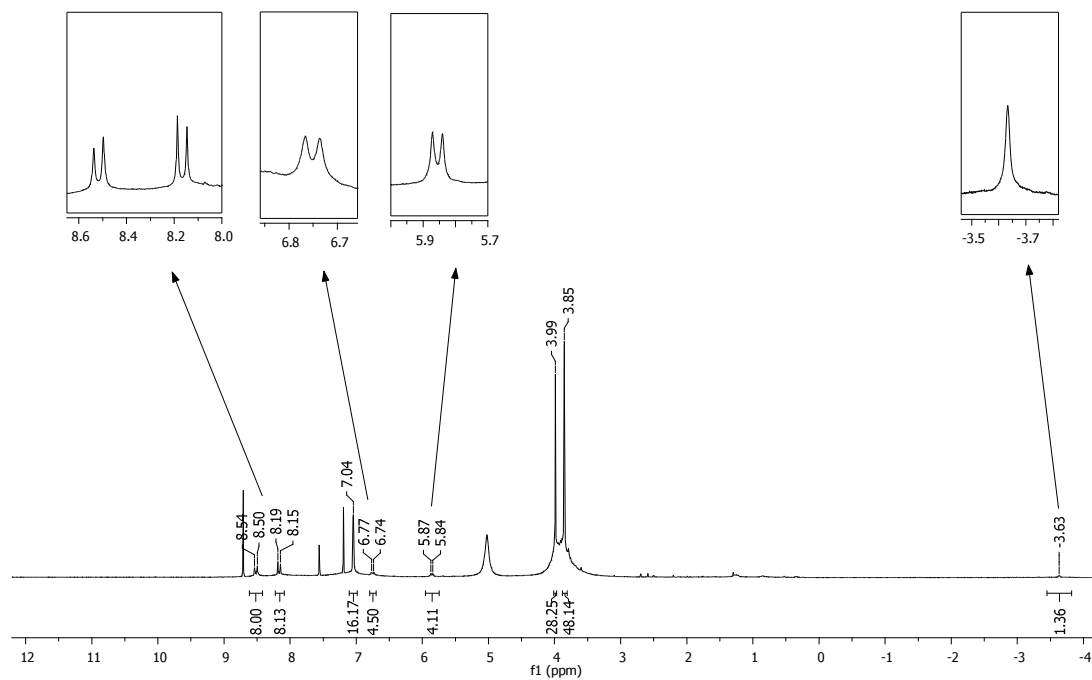


¹H NMR

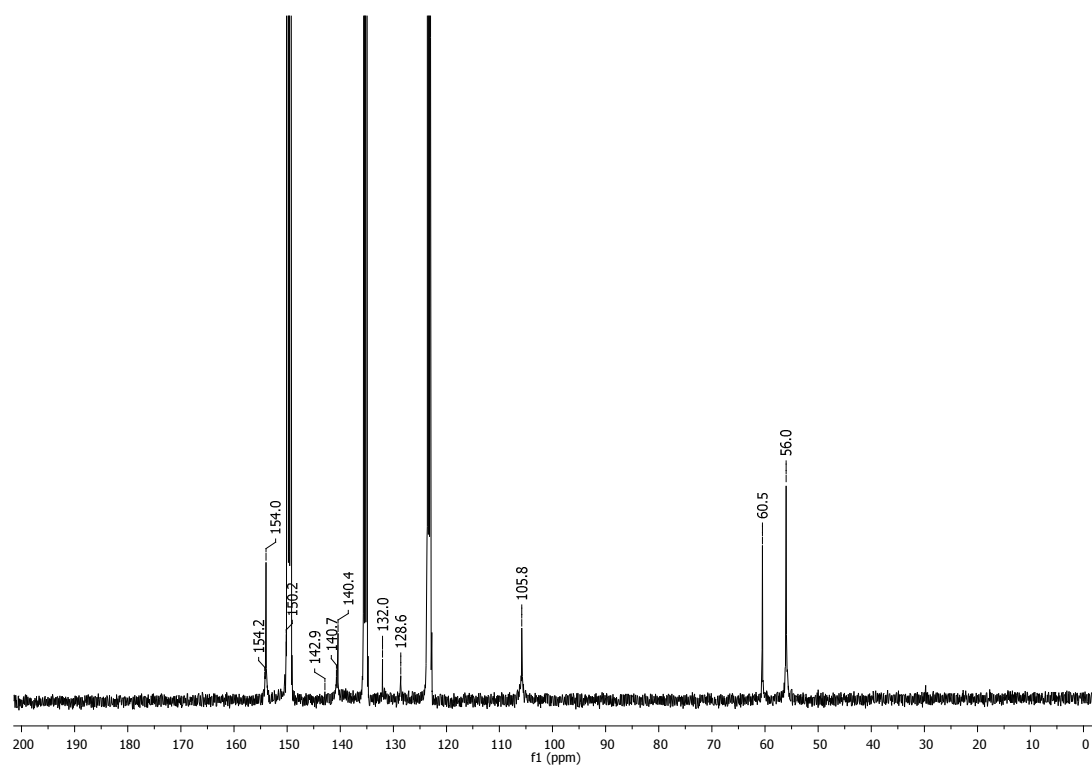


¹³C NMR

tetrakis[5,7-bis{(2*E*)-(3,4,5-trimetoksyfenylo)etenylo}-6*H*-1,4-diazepino][2,3-*b*;2',3'-*g*;2'',3''-*l*;2''',3'''-*q*]porfirazyna (**19**)



¹H NMR



¹³C NMR

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.....

.....

(podpis)

OŚWIADCZENIE

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

" Porfirazyny posiadające skondensowany pierścień diazepinowy: synteza, właściwości fizykochemiczne oraz aktywność fotodynamiczna względem komórek nowotworowych".

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 płyta DVD 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.

Imię i nazwisko

Data, podpis