

# <u>БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ</u> ИНСТИТУТ ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ С ЦЕНТЪР ПО ФИТОХИМИЯ

## ВАНЯ НИКОЛОВА МАНТАРЕВА

# ФТАЛОЦИАНИНОВИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРИ ЗА ФОТОДИНАМИЧЕН МЕТОД ПРИ ЛЕКАРСТВЕНА РЕЗИСТЕНТНОСТ

## ΑΒΤΟΡΕΦΕΡΑΤ

За научната степен "Доктор на науките", по научна специалност: 4.2. Химически науки, "Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества", 01.05.10

СОФИЯ, 2021 г.

Дисертационният труд е представен на 203 страници и съдържа 63 фигури, 25 схеми и 14 таблици и общо 367 литературни източника. Част от резултатите са публикувани в 20 статии и глава от книга, като всички те са от периода след хабилитацията (март. 2014 г.), със забелязани 128 цитирания към м. април. 2021 г..

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на Колоквиум "Функционални материали, компютърно моделиране и технологии", Институт по органична химия с Център по фитохимия – БАН (Протокол № 29/ април. 2021 г.).

#### НАУЧНО ЖУРИ

- 1. Проф. дхн Цонко Колев
- 2. Проф. дн Иво Грабчев
- 3. Проф. дн Павлина Долашка
- 4. Проф. д-р Антоанета Трендафилова
- 5. Доц. д-р Снежанка Бакалова
- 6. Доц. д-р Анифе Ахмедова
- 7. Доц. д-р Емилия Чернева

Защитата на дисертационния труд ще се проведе през платформа MS Teams.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в канцеларията на **ИОХЦФ-БАН,** ул. "Акад. Георги Бончев", **Бл. 9, стая 206.** 

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Дисертационният труд е в една много актуална научна област, обобщена с името на метода "фотодинамична терапия" (ФДТ), който започва да се развива в България в Институт по органична химия с Център по фитохимия, БАН, в началото на 80-те години (ХХ век) от учените М. Шопова и Н. Генов. В наши дни, методът ФДТ, като фотобиотехнология не се изчерпва с приложението антитуморна терапия, а все почесто и за профилактика, за контрол за безопасна околна среда, а през последните години с обостряне на лекарствената резистентност, породена от бързо изменящите се и новопоявилите се патогенни микроорганизми, и като алтернативна терапия за справяне с проблема. *С благодарност към предците ни за интересната и с не затихваща перспектива научна тематика!* 

За фталоцианини като фотосенсибилизатори за много и различни приложения научих в лабораториите на проф. Dieter Wöhrle, Bremen University и по-късно и при проф. Tomas Torres, Autonomous University of Madrid. Да са живи и здрави, и още дълги години да споделят своя опит и знания!

За развитието на тематика състояща се от различни природни науки от значение, за да се обхване в целостта си е експертизата от колеги с различни научни интереси като доц. Иван Ангелов, физика; доц. Веселин Късовски, микробиология; проф. дн Лъчезар Аврамов и доц. Екатерина Борисова, биофизика; доц. Иван Илиев и доц. Антон Крил, клетъчни култури и на колегите от аналитичните лаборатории в ИОХЦФ. *С благодарности за отзивчивостта, професионализма, безусловната помощ и за споделеното време извън лабораториите!* 

В дисертационния труд са описани резултати получени с финансиране от Фонд за научни изследвания, МОН, на четири проекта след 2014 г. по конкурси за фундаментални научни изследвания. С благодарност към фонда за подпомагане на научните ни изследвания!

С принос към този труд е и проект с проф. Махмут Дурмуш, Технически университет, Гебзе, по спогодба с ТЮБИТАК. С благодарност за ползотворната работа и за отношението на турските колеги като хора и учени!

С благодарност и признателност към всички от семейството ми!

Посвещавам на Иванка Христова Иванчова, моята баба от рода Кадрийски.

## СЪКРАЩЕНИЯ

Ac	ацетил
ADMA	9,10-антраценедил-бис(метил) дималонова киселина
Ar	ароматен
Boc	бутоксикарбонил
BSA	говежди серумен албумин
BQ	1,4-бензохинон
CEL	кремофор РЕС 40
CHCA	α-циано-4-хидроксиканелена киселина
CLSM	конфокален лазерно сканиращ микроскоп
Conc.	концентриран
DABCO	1,4-диазабицикло[2.2.2]октан или триетилендиамин
DBU	1,8-диазабицикло[5.4.0]ундек-7-ене
DHB	дихидроксибензоена киселина
DIPEA	N,N-диизопропилетиламин
DIT	дитранол
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	N,N-диметилформамид
DMS	диметилсулфат
DMSO	диметилсулфоксид
DMTMM	4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфолин хлорид
DPBF	1,3-дифенилизобензофуран
EDTA	етилендиаминотетраоцетна киселина
Et	етил
HSA	човешки серумен албумин
MALDI-TOF	матрично асистирана лазерна десорбция/ йонизация
Me	метил
MPc(s)	металофталоцианин или комплекс на фталоцианин (м.ч.)
MTT	тест за изметване на метаболитна активност на клетки по цвят
NMM	N-метилморфолин
NIR	близка инфрачервена спектрална област

n. d.	не е определено
PBS	фосфатен буферен разтвор (смес от калиеви и натриеви соли)
PET	фотон индуциран електронен пренос
Ph	фенил
PDT (ФДТ)	фотодинамична терапия
Pc(s)	фталоцианин(и)
ROS	реактивни кислородни форми
RT	стайна температура
S.D.	стандартно отклонение
SDS	натриев додецилсулфат
TCSPC	време-определящо броене на единични фотони
TFA	трифлуороцентна киселина
TLC	тънкослойна хроматография
Tol	толуен
Ts	тозилна група
UV	ултравиолетов спектър
VIS	видим спектър
v/v	отношение по обем

# СЪДЪРЖАНИЕ

I.	УВОД	7
II.	ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ	10
III.	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ	11
1. F	КАТИОННИ ФТАЛОЦИАНИНОВИ КОМПЛЕКСИ	11
1.1.	КОМПЛЕКСИ С НЕПЕРИФЕРНИ И ПЕРИФЕРНИ ГРУПИ	11
1.2.	КОМПЛЕКСИ НА СИЛИЦИЯ С АКСИАЛНИ ГРУПИ	18
2. 7	Zn(II) ФТАЛОЦИАНИНИ С БИОЛОГИЧНО-АКТИВНИ ГРУПИ	24
2.1.	ОТ АМИНОКИСЕЛИНИ	25
2.2.	ОТ ВЪГЛЕХИДРАТИ	33
2.3.	ОТ СТЕРОЛИ	39
2.4.	ОТ ПАРАБЕНИ	43
3.Ф	ТАЛОЦИАНИНОВИ КОМПОЗИТИ	47
3.1.	С титанов диоксид	<b>48</b>
3.2.	С полимерни четки	50
4. @	ФОТОДИНАМИЧЕН МЕТОД ПРИ ЛЕКАРСТВЕНА	
F	РЕЗИСТЕНТНОСТ	51
4.1.]	НА ПАТОГЕННИ БАКТЕРИИ И КАНДИДА	52
4.2.	НА ВИРУСИ	58
	ЛИТЕРАТУРА	60
IV.	ПРИНОСИ С ОБОБЩЕНИЕ	66
V.	ПРИЛОЖЕНИЯ	69
	1. Списък на публикациите	69
	2. Информация за забелязани цитати	71
	3. Списък на проекти по дисертацията	71
	4. Списък на лични участия на научни форуми	71
	5. Други	72
	БЕЛЕЖКИ	

### **І. УВОД**

Научните изследвания върху разработване на нови терапевтични средства, методи и техники с механизъм на действие различен от този на широко прилаганите антибиотици и химиотерапевтици, придобиват все по-голямо значение, поради темповете на нарастване на лекарствената резистентност. Ежегодно се използват над 2500 тона антибиотици за терапия на различни бактериални инфекции. С всяка следваща година ефективността на тези терапевтици намалява освен поради естественото еволюционно мутиране на патогените микроорганизми, което води до предвидима проява на резистентност, но и от неправилната човешка дейност на антибиотичната употреба, често пъти и със злоупотреба, което води до ускоряване на процеса. Проблемът се очертава от здравните институции като "реална заплаха за човечеството с бъдеще на "постантибиотична ера".

Фотодинамичната терапия (ФДТ или PDT) е утвърден клиничен метод с неспецифично и локално въздействие, с бърз ефект след прилагането му и без развитие на резистентност, поради особеностите на механизъма на фотодинамично действие. Понастоящем, клиничната ΦДТ заедно с одобрените фотосенсибилизатори се прилага при локални болестни състояния без алтернативно лечение. Същността на метода се състои в съвместното действие на три безвредни компонента, каквито са нетоксично на тъмно фоточувствително съединение (фотосенсибилизатор), светлината от видимия или близкия инфрачервен спектър (630-850 nm), която се прилага в не увреждащи лъчеви дози и молекулен кислород, който е в достатъчни количества в околната среда. Локализираният в патогенни клетки фотосенсибилизатор след облъчване с лъчение от спектъра му на абсорбция, преминава през електронни възбудени състояния на молекулата, които инициират фотохимични реакции, протичащи основно по два механизъма. Реакции с пренос на електрон/ протон от триплетното състояние на молекулата до обкръжаващите го биомолекули, които изграждат клетъчните структури, като в резултат се генерират краткоживущи, реактивоспособни кислородни форми (тип I механизъм). Като поефективен е установено, че е механизмът с пренос на енергия ОТ фотосенсибилизатора в триплетно възбудено състояние до молекулния кислород също триплет в основно състояние с генериране на реактивоспособната му форма синглетен кислород по механизъм тип II на фотосенсибилизация.

Развитието на метода ФДТ за различни биомедицински приложения става възможно благодарение на напредъка в химията на високоспрегнати хетероциклични съединения от порфиринов тип, както и на постиженията в развитието на светлинните източници със спектър на излъчване в т. нар. оптичен фототерапевтичен диапазон (630-850 нм), където нативните клетъчни хромофори и водата не са конкуренти за приложеното лъчение. Поредицата от случайни и целенасочени научни открития в химията на природните и синтетичните *порфириноиди*, измежду които са и *фталоцианините*, както и на координационната химия за получаване на комплекси и функционализирани мономерни съединения за синтеза на хетероциклени молекули като лиганди, предначертава и напредъка в разработването и изучаването на нови съединения като по-ефективни фотосенсибилизатори от утвърдените за клиника.

Научните разработки целят оптимизиране на структурата на добре приети фотосенсибилизатори, с цел постигане на оптимални физикохимични свойства с параметри близки до тези за идеален фотосенсибилизатор, както и фотобиологични свойства, които да имат принос върху ефекта от фотодинамичното действие. Понастоящем, трето поколение фотосенсибилизатори за ФДТ метода се разработват с приоритет, поради нарастващия проблем с резистентността на патогените, с което научното търсене на алтернативи на традиционни терапевтици придоби значим смисъл. Въпреки, че в съвремието ни, антибиотиците се актуализират и се разработват нови формули, те постепенно губят ефективността си. За преодоляването на проблема се влагат огромни инвестиции за нови структури с подобрени свойства, но с ограничен период на ефективност.

Настоящият дисертационен труд има за цел да обобщи постигнатото като ново научно познание в разработването на фотосенсибилизатори съдържащи фталоцианинова молекула, което включва синтетични схеми и процедури за получаване и следващо изучаване на новите деривати с химични анализи, по физикохимични методи и за фотодинамична активност. Всички получени фталоцианини са комплекси на неметални и метални йони, които да имат принос към свойствата им на фотосенсибилизатори. Получени са и като биоконюгати с биологично-активни съединения като аминокиселини, въглехидрати и стерол, и с хромофорни групи, и с инхибитори като заместители, със свойства подходящи за приложението фотодинамичен метод.

Получените нови фталоцианини са комплекси на йони, с доказан принос в свойствата на фотосенсибилизатори, като Zn(II) и Si(IV) и други като Pd(II), както и на йони, които са нетипични за приложения в биомедицината като Lu(III), Sn(IV)и Ni(II). В предходни наши изследвания са изучени катионни фталоцианинови комплекси на Ga(III), In(III), Ge(IV) и Al(III). Новите фталоцианинови производни са получени като деривати чрез химично свързани заместители от целенасочено подбрани функционални групи, съответно на периферни или непериферни позиции, или към координирания йон. Като изходни мономерни съединения са използвани, както нови динитрилни производни, така и добре изучени при реакции на циклотетрамеризация за получаване на фталоцианини. Новите синтетични схеми са възпроизводими и могат да се използват с добра перспектива и при други природно различни съединения извън фталоцианиновата химия. За доказване на структурата на получените съединения са приложени съвременни спектрометрични методи за анализ. Дисертационният труд съдържа описание на основни физикохимични свойства на новите фталоцианинови производни, които са получени по осъвременени и оптимизирани методи за фотофизични и фотохимични изследвания. Изучени са основните фармакологични характеристики, като натрупване и клетъчна локализация в патогенни бактерии и кандида, както и за туморни клетки спрямо нормална клетъчна линия за определяне на селективността. Приложението фотодинамичен метод на разработените нови структури на фталоцианини е изследвано при резистентни моделни щамове на патогенни бактерии и кандида, както и при вирусни щамове, за които няма достатъчно ефективна терапия. Фталоцианините заедно с метода ФДТ са определени като надежден подход за въздействие върху пропускливостта на кръвно-мозъчната бариера за въвеждане на целеви медикаменти.

Настоящият дисертационен труд обобщава нови катионни фталоцианинови деривати със заместители от групи с биологични функции, хромофорни групи и инхибитори. Подборът следва изискванията за оптимални физикохимични свойства, за клетъчна специфичност, за селективно натрупване в патогенни клетки и за фотодинамична активност без тъмнинна токсичност за приложението фотодинамично инактивиране на резистентни микроорганизми, с опит да се анализира взаимовръзката между химична структура и състав и in vitro фотодинамична активност.

#### II. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационния труд е да се обобщи постигнатото като ново научно познание в разработването и изучаването на комплекси на фталоцианинови производни като фотосенсибилизатори за фотодинамичен метод, който е актуална и алтернативна терапия при остри инфекции и състояния предизвикани от резистентни патогенни микроорганизми. Новите фталоцианинови съединения са получени като комплекси с метални и неметални йони и със заместители от 1) хромофорни групи; 2) биологичноактивни съединения и 3) инхибитори с антибактерицидни свойства, следвайки нови и с модификации на описани в литературата синтетични схеми. Функционалните групи са свързани през молекулни свързващи групи към периферните или непериферни позиции на макроцикъла, или чрез директно свързване към аксиалните позиции на координирания силициев йон. За изучаване на основните химични, физикохимични и биологични свойства на получените целеви структури са приложени познатите аналитични методи, както и нови специфични подходи за изучаване на фотоактивни съединения за биомедицински приложения. Дискутира се взаимовръзката между молекулна структура, състав и природа на йоните, както и на позиция, брой и природа на заместителите, и на свързващите групи, на заряда и фотобиологичните свойства, които са определящи за фотодинамичната активност при патогени с лекарствена резистентност.

Цели на дисертационният труд:

- 1. Да бъдат разработени и изучени нови фталоцианинови производни получени като комплекси на Lu(III), Sn(IV), Pd(II), Zn(II), Si(IV) и Ni(II) и със заместители от 1) хромофорни групи; 2) биологично-активни съединения и 3) инхибитори за патогенни микроорганизми.
- Да бъдат създадени нови синтетични процедури, които да са възпроизводими и да могат да се прилагат и за получаване на други производни съединения извън фталоцианиновата химия.
- 3. Да бъдат изучени основни химични, физикохимични и фотобиологични свойства на фталоцианиновите деривати с общоприети и с разработени нови специфични подходи за фотоактивни съединения с оптични свойства на фталоцианини.
- **4.** Да се направи опит да се установи взаимовръзката между молекулна структура и състав и ефекта върху фотодинамичната активност при резистентни патогени.

# III. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ 1. КАТИОННИ ФТАЛОЦИАНИНОВИ КОМПЛЕКСИ СЪС ЗАМЕСТИТЕЛИ 1.1. КОМПЛЕКСИ С ПЕРИФЕРНИ И С НЕПЕРИФЕРНИ ГРУПИ

Координираният метален йон, както е добре изучено, влияе върху свойствата на комплекси на фталоцианина променяйки основните им физикохимични характеристики с принос към генерирането на синглетен кислород [1]. Добре известно е, че фталоцианинови комплекси на диамагнитни йони с d електронна структура имат предимства във фотохимичните свойствата на триплетното възбудено състояние на молекулата, което е от значение за ефективността на фотодинамичния процес [2].

#### 1.1.1. Синтез и химични свойства

Фталоцианиновият макроцикъл има недостатъка на слаба разтворимост в повечето органични разтворители. Първите функционализирани фталоцианини имат за цел подобряване на разтворимостта, за да може да се изследват фталоцианините и за приложения от разтвори. Като най-застъпен е подходът чрез химично свързване на подходящи групи-заместители, повишаващи разтворимостта на макроцикъла на фталоцианина. При еднакви групи-заместители в четирите периферни ИЛИ непериферни позиции, както е при тетра- заместените фталоцианини е установена подобра разтворимост от разтворимостта на моно-, ди-, три-, както и на окта- заместените аналози, за които е определена по-ниска разтворимост. Тази особеност се дължи на съществуването на позиционни изомери при тетра- заместените фталоцианини. От друга страна, координираният йон минимизира формирането на фотонеактивни молекулни асоциати в разтвори чрез свързаните "обемни" функционални групи. Координираният йон определя също и молекулни електронни свойствата свързани с прехода към триплетно възбудено състояние на молекулата, което е необходимо за генерирането на синглетен кислород и реактивни кислородни форми като радикали, йони и радикал-йони. Ето защо фталоцианини за различни приложения се получават предимно като комплекси. Получаването на фталоцианини като цинкови комплекси и с пиридилна група като заместител на периферна позиция и следваща реакция на кватернизиране до катионни комплекси е синтетичен подход, широко прилаган във фталоцианиновата химия за различни структурни модификации [За-в].

Фталоцианинови комплекси със заместители от различни по природа функционални групи са получени чрез реакция на циклотетрамеризация от заместени фталонитрили при кипене, с или без катализатор и сол на метала за координиране. За производните на периферни 2(3),9(10),16(17),23(24)-тетра-заместени фталоцианини изходните мономери са 4-заместени фталонитрили, докато за изучените непериферни 1(4),8(11),15(18),22(25)-тетра-заместените фталоцианини са използвани 3-заместени производни. Продуктите при тетра- заместване на комплекса са смес от четири позиционни изомери, различаващи се по молекулната симетрия (C<sub>4h</sub>, C<sub>2v</sub>, C<sub>s</sub>, и D<sub>2h</sub>).

**Лутециевият йон (Lu<sup>3+</sup>)** представлява интерес в поредицата от йони, подходящи за координиране при фотосенсибилизатори, поради уникалните оптични свойства на получените комплекси като единични молекули за целите на ФДТ. Лутециевите фталоцианинови комплекси са с четири пиридилокси групи и катионните им производни, получени със заместители в периферни и със заместители в непериферни позиции (Схема 1.1.1).



съгласно модифицирана процедура въведената от Wöhrle et al, 1990 [3a]. Нов момент

при координиране с йон на лутеция е, че формирането на макроцикъла е затруднено от йони, които са извън равнината на пръстена и се изисква по-висока енергия за затваряне на пръстена на молекулата. Циклотетрамеризацията протича при кипене в хинолин (180 - 220 °C) или в две стъпки с литиев комплекс като междинен продукт. Получените тетра- метилпиридилокси- заместени комплекси на лутеция (**3a** и **4a**), както и за комплекси на други йони са смес от позиционни изомери. Опитите за изолиране на единичен продукт се свеждат само до регистрирането му, поради ограничените количества. При изследвания на тетра-заместен In(III)- фталоцианин са изолирани четирите позиционни изомери, за които е установено, че фотофизичните свойства и характеристиките на триплетното възбудено състояние и на синглетния кислород имат идентични стойности [4, 5]. Опити за разделяне на изомери са рядкост за фталоцианиновата химия [6, 7]. По аналогична синтетична схема са получени като нови съединения комплекси на калай, паладий и никел подобно на изучените в предходната ни работа комплекси на галий, индий, силиций и германий фталоцианини със същата молекула като лиганд [8, 9].

При лутеция, след добавяне на солта Lu(OAc)<sub>3</sub>, продуктът се утаява в 1-пентанол при настъпил обмен на металните йони. Получени са непериферно- (LuPc, **3**) и периферно (LuPc, **4**) пиридилокси- заместени Lu(III) фталоцианинови комплекси. Продуктът е получен като смес от три фталоцианина, а именно с координиран литий или H<sub>2</sub>, мономолекулен комплекс с лутеций и двойна структура тип double-decker с включен един лутециев йон. При използваните реакционни условия фракцията от мономолекулен комплекс преобладава спрямо останалите два продукта, включително с онечистванията.

Всички получени съединения са доказани с познатите спектрометрични и спектроскопски техники и методи за анализ на химични съединения. Масспектрометрията е проведена на MALDI-TOF спектрометър. За матрица при комплексите на лутеций е използвана 2,5-дихидроксибензоена киселина (DHB). Спектърът показва молекулен пик при (m/z): 1214.398 [M-OAc + DHB] получен за LuPc **3** и съответно при 1214.718 [M-OAc + DHB] за LuPc **4**. В ИЧ- спектрите и на двата вида (периферен и непериферен) пиридилокси-заместени комплекси се наблюдава интензивна ивица при 1237 сm<sup>-1</sup>, която се дължи на наличието на етерна връзка от вида Ar-O-Ar, която е между макроцикъла на фталоцианина и групите-заместители. Получените <sup>1</sup>HNMR спектри показаха характерно отместване на позицията на сигналите в зависимост от позициите на заместителите от периферни или непериферни групи. Катионни фталоцианини като комплекси с подбраните йони са получени с метилйодид (CH<sub>3</sub>I) или диметилсулфат (DMS) в DMF при различна температура и в инертна среда от аргон. Независимо от реагента, реакцията протича с високи добиви и чистота на продуктите **3a** и **4a** (79-93 %). Пиридилокси- групата е подходяща за кватернизиране и с други реагенти до получаване на катионни фталоцианини с пропил, хексил- и додецил- пиридилокси групи-заместители. Получените съединения се различават по разтворимост и по спектрални и физикохимични свойства. Като найподходящи за целите на метода са кватернизирани фталоцианинови комплекси. Добре изучен лутециев комплекс е тексапирина (Lu-texaphyrine) Lutrin®), който понастоящем е получил одобрение на клинични изследвания в САЩ [10, 11].

Фталоцианинови комплекси, които са получени като нови съединения са комплексите на калай Sn(IV)Pc. Изборът на този метал е, поради наличието му в комплекса етил- етиопурпурин (SnET2), който е одобрен за клинични приложения в САЩ [11а-в]. Фталоцианинови комплекси могат да бъдат получени като комплекси на Sn<sup>2+</sup> или Sn<sup>4+</sup>. В кое окислително състояние ще е координиран метала зависи от съотношението лиганд: сол на калая [12]. При калая, йонът не позволява поместването му в кухината на пръстена, което предполага намалена възможност за формиране на молекулни асоциати. Пространствените пречения могат да се дължат и на добавени като заместители групи при Sn<sup>4+</sup>, с принос за мономерно състояние на съединенията в разтвори. И при двата метални йони (Lu<sup>3+</sup> и Sn<sup>4+</sup>) по време на реакцията се образуват в минимални количества двойни молекулни структури от вида "double – decker" с един координиран йон. Синтезът на комплекси на Sn(VI/II) протича по аналогична синтетична схема, както Схема 1.1.1. Фталоцианинът без метал се получава при реакционни условия включващи кипене в 1-пентанол (137 °C) с катализатор DBU (или само с литий) или при кипене в хинолин при температура до 220 °C със сол на калая. Пречистването е с колонна хроматография (DCM: EtOH, 10: 0.1). Фталоцианиновите комплекси на калая се получават като Sn(IV)Рс при съотношение динитрил: метална сол (1:1). Конвенционалната реакция на циклотетрамеризация от деривати на фталонитрила в присъствие на сол на метала, с или без катализатор и при кипене, е успешно приложима реакционна схема за получаване на тетра-заместени фталоцианинови комплекси. Продуктите са смес от позиционни изомери, състава, на които зависи от заместителите и от природата на металния йон.

Комплекси на фталоцианина с паладий се нареждат измежду най-ефективните фотосенсибилизатори, поради високите добиви на триплетното възбудено състояние на молекулата [13]. Два нови паладиеви комплекси на фталоцианини, Pd(II)Pc, 7 и 8 са получени следвайки двустъпкова реакционна схема съгласно Wöhrle et al, 1990 [3а]. Получените продукти от непериферно (7) или периферно (8) заместен с пиридилокси групи-заместители Pd(II) фталоцианини са пречистени с колонна хроматография върху силициев диоксид със смес от разтворители (DCM: EtOH) с градиент на разтворителя. С метилйодид реакцията протича при температура до 40 °C и за време между 24-72 часа за получените паладиеви комплекси (7 и 8) преди кватернизиране имат ограничена разтворители в разтворители като DCM, THF, CHCl<sub>3</sub> и добра разтворимост в DMF и DMSO, като за комплекса с непериферни групи 7 е установена по-добра разтворимост от периферно-заместения 8 в органични разтворители. Кватернизираните Pd(II)-фталоцианинови комплекси 7а и 8а са разтворими във вода.



Схема 1.1.2. Получаване на Рd(II)- и Ni(II)фталоцианини с непериферни заместители; 60 % (7а) и 55 % (9а).

Pd(II)-

фталоцианините

са охарактеризирани с FT-IR, UV-Vis, MALDI-TOF и <sup>1</sup>HNMR методи. Така например, в FT-IR спектъра ивицата за нитрилната група е при ~2284 cm<sup>-1</sup> и не се появява след формиране на макроцикъла. За фталоцианините са характерни ивици за етерна група (C-O-C) при ~1045 cm<sup>-1</sup>; за ароматна CH група между 3088 cm<sup>-1</sup> – 3092 cm<sup>-1</sup>; за ароматна C=C от пръстена с трептене при 1655 cm<sup>-1</sup> (7 и 8). Катионните производни 7а и 8а имат характеристични ивици между 1110-1182 cm<sup>-1</sup> за S=O групата. <sup>1</sup>H NMR спектри на 7 и 8 имат брой протони съответстващи на молекулата им и с отместване на сигналите, поради позицията на заместителите. Спектрите на 7а и 8а са широки и с припокриващи се сигнали на мултиплети за пиридилокси групата (28 протона). Протоните на CH<sub>3</sub> се наблюдават като широки синглети в областта между 3.7 ррт и 4.0 ррт за DMSO-d<sub>6</sub>.

#### 1.1.2. Фотофизични и фотохимични свойства

Хидрофилните фталоцианинови комплекси на лутеция **3a** и **4a** показват интензивна Q ивица на абсорбция с  $\lambda_{max} = 685$  nm за **3a** и 675 nm за **4a**, както и слабо интензивни ивици при 610 nm за абсорбционни спектри получени за  $10^{-5}$  M разтвори. В разтвори на буфер или вода и за двата комплекса се наблюдават типичните спектри за молекулни асоциати с поява на ивица с ниска интензивност в областта 675-695 nm.

При комплекси на галий, индий, силиций и германий със същата молекула-лиганд е наблюдавана по-слаба склонност към агрегиране [8, 9]. Намаляване на образуването на фотонеактивни асоциати се постигна чрез добавяне на анионен детергент като натриев додецилсулфат (SDS) или свързващи молекули като липозоми, албумини и други с ефект върху мономерното състояние на фталоцианина.



Фигура1.1.1.Моноекспоненциалникривизаизмерванена времена животнафлуоресценциятанаLu(III)-фталоцианини3а и 4а (10<sup>-5</sup> M) в DMSOза спектър на облъчване 670 пт.

Флуоресцентните свойства на комплексите **3a** и **4a** са изучени за разтвори на PBS и DMSO. Флуоресцентните спектри показват значително батохромно отместване на емисионната ивица спрямо максимума на абсорбционната Q-ивица (675 nm и 685 nm). Спектрите на възбуждане и на абсорбция на всяко от изследваните съединения (**3**, **4**, **3a** и **4a**) показаха припокриване на получените ивици. Флуоресцентното време на живот, както е известно, е директен метод за определяне на времето, през което молекулата е фотоактивна, т.е. може да участва във процеси с генериране на синглетен кислород. За спектър на облъчване 670 nm са получени идентични моно-експоненциални криви, характерни за чисти съединения в мономерно състояние (Фиг. 1.1.1). Получените стойности за време на живот са 2.24 ns за **3a** и 3.27 ns за **4a** комплекса. Флуоресцентното време на живот са 3.99 ns). Наблюдаваното бързо гасене на флуоресценция при непериферно заместения комплекс **3a** (2.24 ns), вероятно се дължи на заместителите, които са в непосредствена

близост до макроцикъла. За сравнение периферно заместения комплекс **4a**, който показа флуоресцентно време на живот с по-висока стойност (3.27 ns).

Абсорбционните и флуоресцентни спектри на Sn(IV)Pcs с непериферни (**5a**) и периферни (**6a**) метилпиридилокси групи-заместители показаха максимуми при 681 nm за абсорбционната ивица и 707 nm за флуоресцентната за **6a** и съответно при 697 nm и 719 nm за **5a** в DMSO. Както при комплексите на лутеция и при тези на калая се наблюдава значително отместване на максимума на флуоресценция в близката инфрачервена област спрямо абсорбционния максимум. При облъчване с различен спектър (365 nm, 635 nm и 660 nm) са получени идентични ивици на спектъра на възбуждане с този на абсорбция. Получените резултати за флуоресцентно време на живот ( $\tau_F$ ) на Sn(IV)Pcs показаха стойности от 1.65 ns (**5a**) и 1.86 ns (**6a**), които са пониски с около един път и половина от стойностите получени при Lu(III)Pcs комплекси със същите групи-заместители {2.24 ns (**3a**); 3.27 ns (**4a**)}. Квантовите добиви на флуоресценция за комплексите с йони на тежки атоми се характеризират с относително ниски стойности [14-16]. За Lu(III)Pcs са получени квантови добиви на флуоресценция от 0.012 (**3a**) и 0.018 (**4a**), което е с около порядък по-ниски спрямо използвания като стандарт незаместен ZnPc,  $\phi_{FI} = 0.20$ , [17].

Абсорбционните спектри на Pd(II)Pcs 7, 8, 7а и 8а показват Q- ивица в спектрален диапазон около 680 nm и B-ивици между 320-334 nm. Ивиците в червения спектър са определени при 680 nm и 683 nm за непериферните PdPcs (7 и 7а), с батохромно отместване спрямо периферно заместените комплекси (8 и 8а). Абсорбционната Q ивица показа значително отместване в близката инфрачервена област, което се наблюдава за фталоцианини с непериферни групи-заместители [18]. Кватернизирането има принос и при двата вида паладиеви комплекси (7а и 8а), независимо от позицията за заместителите, което се регистрира с батохромно отместване спрямо комплексите 7 и 8. Флуоресцентните спектри са получени с максимум на ивицата при 682 nm (8) и 684 nm (8а) и съответно за непериферните при 689 nm (7) и 691 nm (7а) в DMSO.

Способността на кватернизираните фталоцианинови комплекси да участват в реакции с генериране на синглетен кислород е изследвана с индиректен фотохимичен метод, който се състои във фотоокисление на съединение – уловка на синглетен кислород. За целта е използван 1,3-дифенилизобензофуран (DPBF) като редуктор с абсорбционен максимум при 417 nm в DMSO разтвори. Измерванията на Lu(III)-

фталоцианините във водни разтвори са затруднени от агрегирането на **3a** и **4a**. Квантовият добив на синглетен кислород е изчислен на базата на сравнителен метод със стандарт незаместен Zn(II)-фталоцианин. Получените стойности за двата катионни комплекса на лутеция са близки, а именно 0.35 (**3a**) и 0.32 (**4a**). За катионните фталоцианини Sn(IV)Pcs в органични разтворители (DMSO, DMF) са получени стойности идентични стойности от 0.38 (**5a**) и 0.33 (**6a**), които са незначително повисоки от тези на Lu(III)Pcs. Квантовите добиви са в съответствие с получените стойности и за други фталоцианинови комплекси с диамагнитни йони и съдържащи същата заместителна група [15].

Замяната на Zn(II) с друг диамагнитен йон със значително по-голям атомен номер оказва съществен ефект върху свойствата на триплетното възбудено състояние, с принос към основните физикохимични характеристики, които са оптимални за производни на фталоцианинови комплекси. При новите Lu(III) и с изключение на Pd(II), не се наблюдава значителна разлика в квантовите добиви на синглетен кислород, в сравнение с получените за фталоцианинови комплекси на Ga(III) и In(III), с възможност за физично гасене от позицията на йона в комплекса. Всички получени комплекси следват основния ред на нарастване на квантовия добив на синглетен кислород ( $\Phi_A$ ) с нарастване на атомното число на координирания йон, както и нарастване на  $\Phi_A$  за комплексите в зависимост от групите-заместители, с принос на деривати в непериферни позиции.

#### 1.2. КОМПЛЕКСИ НА СИЛИЦИЯ С АКСИАЛНИ ГРУПИ

Фталоцианините образуват молекулни асоциати, които съпътстват както синтеза и пречистването, също така и създават трудности при химичните анализи на тези съединения [19-21]. Ефективно управление на процеса се постига и чрез структурни модификации като свързването на "обемни" групи-заместители към координирания йон, с подходящо координационно число. Типичен пример за фталоцианини с аксиални заместители са силициевите комплекси, при които агрегирането е ограничено, поради пространствено пречене и, които са и най-изучаваните след цинковите комплекси [22, 23]. Първият клинично одобрен силициев фталоцианин - **Рс4** е силициев комплекс с аксиални несиметрични заместители за приложение с ФДТ метода в САЩ [24].

#### 1.2.1. Синтез и химични свойства

Синтезът на силициеви фталоцианини с групи в аксиални позиции протича от незаместен силициев фталоцианин SiCl<sub>2</sub>Pc (1), който е търговски достъпен, но поради по-висока чистота и икономическата достъпност на синтеза се синтезира с висок добив в лабораторни условия [22]. Получени са нови силициеви комплекси с "обемни" групизаместители (Схема 1.2.1). Протича нуклеофилна заместителна реакция с добавяне на натриев хидрид (NaH) и при кипене в сух толуен за 24 часа под аргон. Пречистването се провежда с колонна хроматография с елуираща смес DCM: EtOH (20: 1). Кватернизираните деривати **3Q** и **4Q** са получени с CH<sub>3</sub>I в хлороформ при стайна температура. В хода на реакцията се образува утайка от хидрофилен продукт, който се филтрува и се промива с редица разтворители (DCM, EtAc, Ac).



Ди-(α,α-дифенил-4-пиридилметокси) Si(IV) - фталоцианин **4** и кватернизирания дериват **4Q** са получени следвайки аналогична реакционна схема (Схема 1.2.1).

Новите фталоцианинови комплекси на силиция 3, 4, 3Q и 4Q са доказани с известни аналитични методи: FT-IR, <sup>1</sup>H NMR, MALDI-TOF. FT-IR спектрите на 3 и 3Q показаха

характеристични ивици при 1078 ст-1 и 1080 ст-1 за Si-O-C връзката, други вибрационни ивици са 1520 - 1519 ст<sup>-1</sup> за -С=С- трептене, както и при 3062 ст<sup>-1</sup> и 3035 ст<sup>-1</sup> за ароматните -СН, съответно алифатните -СН се проявяват при 2922–2853 ст<sup>-1</sup> и 2919–2849 ст<sup>-1</sup>. За разлика от периферно-заместените, FT-IR спектърът на 3Q не се променя след кватернизиране. В  $^{1}$ HNMR спектрите на съединение 3 ароматните протони са при 9.69 и 8.50 ppm, и съответно за **30** при 9.75 и 8.60 ppm. Алифатните СН протони и тези при Si-O-CH групата имат сигнали в негативния диапазон (-2.77 ppm), поради "магнитна анизотропия" [40]. Получени са мас спектри на MALDI-TOF спектрометър с матрица от DHB за съединение **3** и от CHCA за съединение **3Q**. В спектъра на съединение **3** са регистрирани масите на следните фрагменти: m/z = 851.02  $[M-2CH_3]^+$ , 798.07  $[M-6CH_3]^+$ , 695.90  $[M-C11H23NO]^+$ , а съответно за **3Q**: m/z = 730.939 [M-(2I)- 12CH<sub>3</sub>] + и 559.058 ([M-(2I)+CHCA+H<sub>2</sub>O]+2)/2. FT-IR спектрите на съединенията не показаха съществени разлики, като характеристични са вибрациите при 1080 cm<sup>-1</sup> (Si-O-C), между 1524 cm<sup>-1</sup> и 1529 cm<sup>-1</sup> (-C=C-), както и между 3082 cm<sup>-1</sup> и 3054 cm<sup>-1</sup> (аром. -CH). За комплекса 4Q са характерни са вибрации между 2919 cm<sup>-1</sup> и 2849 cm<sup>-1</sup> от алифатната -СН група. Получените протонни спектри на съединение 4 показват сигнали на ароматните протони в диапазона на спектъра 9.63, 9.55-8.47 ррт и 8.08-5.75 ppm. При хидрофилния дериват 4Q, сигналите от протоните на пръстена са съответно при 9.72, 8.57, 6.90-6.86, 6.34-6.31 и 5.76 ррт. Протоните на метиловата група се проявяват като синглетен сигнал при 1.23 ppm за спектри на **4Q**. Масата на дизаместените фталоцианинови комплекси 4 и 4Q е идентифицирана чрез мас спектрометрия с MALDI-TOF спектрометър с матрица DHB за съединение 4 и без матрица за съединение 4Q. Молекулни маси, доказващи получените съединения в спектъра на 4 са 1084.056 [M+Na]<sup>+</sup> и 1233.811 [M+DHB+H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>. Мас-спектърът показва сигнали при 588.032 [M-(2I)+Na+H]<sup>2+</sup> и 1115.778 [M-(2I)+Na+H]<sup>+</sup> за деривата **40**.

#### 1.2.2. Фотофизични и фотохимични свойства

Абсорбционните спектри на аксиално ди-заместените Si(IV) фталоцианини 3 и 4 имат характеристични Q ивици на абсорбцията с максимуми при 680 nm и 676 nm в DMSO и DMF (Фиг. 1.2.1). Спектърът на кватернизирания комплекс 3Q получен и в PBS буфер показва абсорбционен максимум при 688 nm. Ивиците в УВ областта (В-ивици) са регистрирани около 360 nm и за двете производни на комплексите 3 и 3Q.

Мономерното състояние на молекулата е доказано за диапазон на концентрациите в DMSO (**3** и **3 Q**) и в PBS за **3Q**. Получените абсорбционни спектри със съединение **3** показват липса на агрегиране, както и на деривата след кватернизиране **3Q** в DMSO за изследвания концентрационен диапазон ( $10^{-6} - 10^{-5}$  M). Съединения **4** и **4Q** показаха абсорбционни спектри с максимум на Q-ивицата при 676 nm и 677 nm, както и послабо интензивната B-ивица около 357 nm, с отместване спрямо ивиците за стандарта SiCl<sub>2</sub>Pc. От друга страна и двете производни съединения съществуват в разтвори в мономерно състояние за широк концентрационен диапазон. Тенденцията за агрегиране



се запазва ниска за разтвори в DMSO и PBS.

**Фигура 1.2.1.** Абсорбционен и флуоресцентен спектър (ехс: 645 nm), и спектър на възбуждане (ехс: 680 nm) на Si(IV) фталоцианини **3** в DMSO (а) и **3Q** в DMSO (b) и PBS (c).

Флуоресцентните спектри (exc: 610 nm и 645 nm) показаха ивици с  $\lambda_{max}$ : 680 nm (4) и 684 nm и 691 nm (4Q) в DMSO PBS. Спектрите И на абсорбция, на флуоресцентна емисия и спектърът на възбуждане разгледани сравнителен аспект, показват В хомогенен разтвор и еднороден състав на измерваните разтвори (Фиг. 1.2.1). Флуоресцентната ивица при изследваните силициеви комплекси

показа типичното за фталоцианини слабо батохромно отместване с максимум при 684-685 nm за **3** и **3Q** за разтвори в DMSO. Получените резултати за квантов добив на флуоресценция (0.31 за 3), както и време на живот (5.44 ns, 3) показват стойности, които са относително високи за силициеви комплекси (Табл. 1.2.1). Полученият комплекс  $3\mathbf{Q}$  се характеризира с относително високи стойности на флуоресцентното време на живот (5.27 ns и 4.94 ns) в DMSO и PBS. За флуоресцентните квантови добиви на силициевите комплекси 4 и  $4\mathbf{Q}$  са определени стойности < 0.2, които са в съответствие със свойствата на ефективни фотосенсибилизатори. За комплекса 4, добивът е 0.17 и за катионния дериват  $4\mathbf{Q}$  е 0.08 в DMSO. Получените силициеви комплекси имат флуоресцентни квантови добиви повече от два пъти по-ниски от изходния силициев комплекс (SiCl<sub>2</sub>Pc), което е добър показател за фотосенсибилизатори. За времето на живот на флуоресценция ( $\tau_n$ ) са получени моноекспоненциални криви на затихване като доказателство за мономерни и от един вид молекули в изследваните разтвори (Фиг. 1.2.2). Получените стойности от 5.36 ns (4) и 5.27 ns (4Q) са както и при силициевия комплекс SiCl<sub>2</sub>Pc (5.37 ns) без наличието на обемни групи в аксиална позиция.

MPcs		Φ <sub>fl</sub>	τ <sub>fl,</sub> (ns)	фΔ
	разтворител			
3	DMSO	0.31	5.44	0.31
3Q	DMSO (PBS)	0.26 (0.25)	5.27 (4.94)	0.18 (0.15)
4	DMSO	0.17	5.36	0.33
4Q	DMSO	0.08	5.27	0.09
SiCl₂Pc*	DMSO	0.44	5.37	0.15
ZnPc**	DMSO	0.20	3.99	0.67

Таблица 1.2.1. Флуоресцентни свойства и квантов добив на синглетен кислород.

\*[22]; \*\*[15]



 Фигура
 1.2.2.

 Експоненциални
 криви

 получени за флуоресцентно
 време на живот на Si(IV)

 фталоцианини 3 (DMSO) и
 3Q (DMSO, PBS) (exc: 610

 nm, 645 nm).
 водания

Синглетният кислород е основната реактивна форма на кислорода, която се генерира с участието на фталоцианини [25, 26]. Квантовият добив на синглетния кислород ( $\phi\Delta$ ) е определен с редуктори от молекулна проба като "уловка" на генерирания синглетен кислород, с  $\lambda_{max}$ : 417 nm за DPBF в DMSO и при 380 nm за ADMA в PBS на абсорбционния спектър.

Комплексът **3** в DMSO има сравнително висока стойност от 0.31 на квантовия добив и два пъти по-ниска е получената за **4** в PBS. Генерираният синглетен кислород с участие на силициевите комплекси **4** и **4Q** е с квантови добиви по-високи от този на стандарта (0.33 за **4** и 0.15 за SiCl<sub>2</sub>Pc), докато за катионния силициев комплекс е определен квантов добив около два пъти по-нисък (0.09 за **4Q**) от този на стандарта и почти четири пъти спрямо комплекса **4**. Структурни промени от генерирания синглетен кислород при подбраните условия на експеримента не са наблюдавани.

Друг важен параметър, който характеризира за фотосенсибилизатори е фотостабилността на молекулата. Фталоцианините имат предимствата на термично и светлинно стабилни съединения в твърдо състояние [27]. В разредени разтвори, стабилността на молекулата силно намалява и зависи от наличието на кислород и светлина, които може да доведат до структурни промени със загуба на цикличната структура. Изследванията за фотостабилност показаха, че за времето на облъчване има несъществено намаляване на є при максимума 680 nm за **3** и **3Q**, но без промени в цялостния абсорбционен спектър, като показател за стабилност на пръстена [31].

## 2. ФТАЛОЦИАНИНОВИ КОМПЛЕКСИ С БИОЛОГИЧНО-АКТИВНИ ГРУПИ КАТО ПЕРИФЕРНИ ЗАМЕСТИТЕЛИ

Молекулата на фталоцианина има характеристиките на симетрична и планарна хетероциклична структура с шестнадесет възможни позиции за функционализиране по пръстена на макроцикъла, както и една или две аксиални позиции за свързване на заместители към координирания метален или неметален йон. Групите заместители от биологично-активни съединения са подходящи за биоконюгати с цел повишаване на селективността на натрупване на молекулата на фотосенсибилизатора чрез ефективно взаимодействие на заместителите с мембранни структури, както и за ефективен транспорт до клетките-мишена и като допълнение със специфичното им биологичноактивното въздействие. Периферните позиции на макроцикъла са по-благоприятни за свързване на биологично-активни функционални групи, поради пространственото им разположението с оптимална насоченост към клетъчните структури (Фиг. 2.1.1).



Фигура 2.1.1. Биоконюгати на Zn(II) фталоцианина с четири и осем аминокиселини - тирозин, фенилаланин, лизин и аргинин в периферни позиции.

#### 2.1. БИОКОНЮГАТИ С АМИНОКИСЕЛИНИ

Химични конюгати на фталоцианини с аминокиселини за първи път са публикувани от групата на Lukyanetz et al. [32, 33]. В тези първи стъпки, целта е създаване на структури на базата на фталоцианин и аминокиселина, които да имат принос към разтворимостта на хидрофобната молекула, както и за оптимизиране на основните фотофизични свойства на абсорбция и флуоресценция. За приложения в биомедицината, към изброените свойства се добавят и изискванията за клетъчна специфичност, за взаимодействие с рецептори, за мембранна пропускливост и като краен резултат за висока селективност и фотоцитотоксичен ефект на съединенията. Подбраните аминокиселини принадлежат към незаменимите аминокиселини, с важни физиологични функции за организма, като поддържащи, с оздравителен ефект и се прилагат като лекарства от вида "prodrugs" [34]. Освен биологичната си функция тези аминокиселини притежават специфична флуоресценция каквито са тирозина и фенилаланина, а лизина и аргинина са катионни във физиологична среда и се характеризират със способността си да преминават през клетъчни мембрани.

#### 2.1.1. Синтез и химични свойства

Zn(II)-фталоцианини с аминокиселини са получени със заместители през свързваща група към периферните позиции на фталоцианиновия пръстен (Фиг. 2.1.1). Амидната връзка е между карбоксилната група на аминокиселината и амино (аминофенокси) групата на фталоцианина. Синтетичната процедура включва две реакционни схеми за получаване на тетра- или окта аминофенокси заместени Zn(II)-фталоцианини като изходни съединения за свързване с аминокиселините. На кратко, синтезът протича с получаване на изходните динитрили с една или две аминофенокси-групи, на базата на нуклеофилна заместителна реакция от нитро- или дихлорозаместени динитрили.



Формирането на пръстена на фталоцианина протича при кипене на изходния аминофенокси-заместен динитрил в сух пентанол с добавяне на литиеви стружки за ускоряване на процеса и следващо добавяне на цинков ацетат за получаване на комплекс. Тетра- и окта нитрофенокси заместени Zn(II)-фталоцианини се преобразуват до тетра- и окта аминофенокси заместени фталоцианини с редукция на нитро- групата до амино- група. Реакцията на дехидриране започва с активиране на карбоксилната група на аминокиселината, която е със защита при амино- групите. Реакцията протича при стайна температура, а получените конюгати на Zn(II)-фталоцианини с тирозин, фенилаланин и аргинин имат добиви между 44% - 68%. При конюгати с лизин (аминофенокси) фталоцианини добивите са ~ 30% за тетра- (TZnPcLys) и ~ 28% за окта производното (OZnPcLys).

Спектрите ATR-IR, показаха ивици около 3290 - 3400 cm<sup>-1</sup> (-NH), 3065 - 3306 cm<sup>-1</sup> (-CH arom), 2851 - 2970 cm<sup>-1</sup> (-CH aliph), 1600 - 1665 cm<sup>-1</sup> (-NH), 1500 - 1507 cm<sup>-1</sup> (-ArC=C), 1360 - 1400 cm<sup>-1</sup>, 1200 - 1270 cm<sup>-1</sup>, 1000 - 1095 cm<sup>-1</sup> (Ar-O-Ar). <sup>1</sup>HNMR спектрите показват сигнали за ароматни протони в диапазона между 10.0-6.00 ррт и сигнали за алифатни протони между 4.00-1.00 ррт. Мас спектрите бяха получени на MALDI-TOF спектрометър с различни матрици DHB, CHCA и DIT. За част от новите съединения е получен йон [M]<sup>+</sup>; за други се получиха два фрагмента - [M]<sup>+</sup>, [M- $C(CH_3)$ ]<sup>+</sup>; [M-BocTyr(tBu)+2H]<sup>+</sup>; също и три фрагмента - [M]<sup>+</sup>, [M- 2x OC-BocArg(Tos)] -2H]<sup>+</sup>, [M- Phenyl-BocArg(Tos) – H]<sup>+</sup>. Абсорбционните спектри показаха ивиците, характеристични за фталоцианини ( $\lambda_{max}$ =680-683 nm и  $\lambda_{max}$ =350-365 nm, DMSO). Реакцията на деблокиране на NH<sub>2</sub> групата протича в сух THF (или DMF) с TFA, при съотношение THF:TFA от 1:2 (v/v) или 1:4 (v/v). Всички получени продукти с изключение на окта-лизин- заместения OZnPcLys са обработени с 1N NaOH. Тетра- и окта Zn(II)-фталоцианини с тирозин, фенилаланин и аргинин са получени с добиви между 48% - 87%. Получените аналитични данни показват в ИЧ- характеристични ивици около 3290 - 3400 cm<sup>-1</sup> (-NH), 3065 - 3306 cm<sup>-1</sup> (-CH arom.), 2851 - 2970 cm<sup>-1</sup> (-CH aliph.), 1600 - 1665 cm<sup>-1</sup> (-NH), 1500 - 1507 cm<sup>-1</sup> (-ArC=C), 1360 - 1400 cm<sup>-1</sup>, 1200 - 1270 cm<sup>-1</sup>, 1000 - 1095 cm<sup>-1</sup> (Ar-O-Ar). <sup>1</sup>HNMR спектрите показаха сигнали за ароматни протони в диапазона между 6-10 ррт, и за алифатни протони в диапазона между 5-1 ррт, и сигнали за протони на амино групата в слабо поле, които се припокриват със сигналите на ароматните протони. Мас спектрите също показаха основния йон, но при различни матрици, в зависимост от изследваното съединение.

Реакцията с формиране на пръстена протича при кипене на изходните динитрили в сух пентанол с катализатор DBU и в присъствие на сол на цинк в съотношение фталонитрил: сол (4:1). Получените съединения са с относително високи добиви от 69 % за 14 и 82 % за 16.



Схема 2.1.2. Синтез на тетра- и окта аминофенокси заместени Zn(II)-фталоцианини. (i) Zn(OAc)<sub>2</sub>, DBU, 1-пентанол; (iia) сух DMF, H<sub>2</sub>, Pd/C, 0° C; (iib) DMF, Na<sub>2</sub>S.H<sub>2</sub>O; 69 % (14); 8 % (15) и 12 % (17).

IR-ATR спектрите показват характеристични ивици при 3000 сm<sup>-1</sup> за -CH ароматни групи; при 1586 сm<sup>-1</sup> и 1340 сm<sup>-1</sup> за -NO<sub>2</sub>; 1515 cm<sup>-1</sup> и 1483 cm<sup>-1</sup> (Ar-C=C). <sup>1</sup>HNMR спектрите показват сигнали за ароматни протони в диапазона 7.30-8.35 ppm за 14 и 7.19ppm за 16. Абсорбционните спектри имат ивици с максимуми  $\lambda_{max}$ : 675 nm и 350 nm за при висока стойност на є (Q-ивицата) ~ 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Амино групата на съединения 15 и 17 се получава чрез редукция, като са правени опити по няколко различни реакционни процедури за получаване на количества от съединенията за свързване с аминокиселините. Трудността при изолирането на продуктите е поради ниската разтворимост на 17. Получените съединения на всеки етап от синтеза са охарактеризирани с аналитични методи.

#### 2.1.1. Фотофизични свойства

Zn(II)-фталоцианини с четири или осем аминокиселини тирозин, фенилаланин, аргинин и лизин са изучени в разтвори на DMSO за диапазон от концентрации (10<sup>-5</sup> - 10<sup>-6</sup> M). Абсорбционните спектри показаха  $\lambda_{max} = 680-683$  nm за Q- ивицата, като

доказателство за съществуването на фталоцианина в мономерно състояние. Характерна особеност е нарастването на абсорбцията по линейна зависимост с нарастване на концентрацията на фталоцианина в разтвори на DMSO. Абсорбционните максимуми в UV спектъра са разположени в UVA диапазона с λ<sub>max</sub> = 352-364 nm (табл. 2.1.1).

**Табл. 2.1.1.** Абсорбционни свойства на фталоцианинови биоконюгати с аминокиселини в DMSO (10<sup>-5</sup> M).

Tetra-Zn(II)Pc	Q band,	B band,	Octa-Zn(II)Pc	Q, λ <sub>max,</sub>	B band,
	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\lambda_{\max}$ (nm)		(nm)	$\lambda_{\max}$ (nm)
	(log ε)	(log ε)		(log ε)	(log ε)
TZnPcTyr	<b>680</b> (3.02)	352 (-)	OZnPcTyr	<b>680</b> (4.36)	<b>364</b> (3.94)
	613 (-)			<b>613</b> (3.64)	
TZnPcPhe	<b>682</b> (4.23)	<b>353</b> (3.93)	OZnPcPhe	<b>683</b> (4.17)	<b>357</b> (3.88)
	<b>615</b> (3.60)			<b>616</b> (3.52)	
TZnPcLys	<b>683</b> (3.63)	<b>356</b> (3.38)	OZnPcLys	<b>681</b> (5.28)	<b>360</b> (4.86)
	<b>618</b> (3.07)			<b>613</b> (4.48)	
TZnPcArg(Tos)	<b>682</b> (4.27)	<b>352</b> (3.97)	OZnPcArg(Tos)	<b>682</b> (4.02)	<b>355</b> (3.73)
	<b>616</b> (3.66)			<b>616</b> (3.35)	
ZnPc*	672 (5.67)		·	•	

\*[35]

Абсорбционните спектри имат максимуми на Q-ивицата във видимия спектър, които се характеризират с широка нискоинтензивна абсорбция и с появата на втори максимум при по-късите дължини на електромагнитния видим диапазон. Спектрите във вода и буфер са типични за молекулни асоциати на фталоцианини [35, 36]. В абсорбционния спектър на окта- тирозин заместен Zn(II)- фталоцианин е регистриран за  $\lambda_{max} = 682$  nm и 636 nm. При фталоцианини са изучени два типа междумолекулни взаимодействия, които имат за резултат получаването на неактивни асоциати (H и J). Получават се копланарни структури, поради взаимодействия на ниво пръстена молекула, в резултат на нековалентно взаимодействие на  $\pi$  електрони. С добавянето на детергенти или съединения носещи зарядност се наблюдава мономеризация. Абсорбционните спектри на биоконюгати с четири и осем аминокиселини като заместители не се различават съществено в позициите на максимумите, както е показано за тетра- и окта- тирозин заместените производни (Фиг. 2.1.2, А).



Фиг. 2.1.2. Спектри на абсорбция (А) и на флуоресценция (ехс: 615 nm, Б) на а) тетра- и б) окта заместени с аминокиселини Zn(II)-фталоцианини в DMSO (10<sup>-5</sup> M).

Флуоресцентните емисионни спектри на Zn(II)- фталоцианините със заместители от аминокиселините тирозин, фенилаланин, лизин и аргинин са получени за DMSO разтвори (Фиг. 2.1.2, Б). Флуоресцентната ивица има максимум, който не зависи от спектъра на възбуждане, а следователно измерваните разтвори са химически еднородни. Изследванията на двата вида биоконюгати на фталоцианина с четири и осем аминокиселини показаха позиции на емисионните максимуми (692-694 nm), които не зависят от природата на свързаната аминокиселина.

Стойностите на флуоресцентния квантов добив са показател за паралелното протичане на други процеси на гасене, които за фотосенсибилизатори са генериране на

триплетно възбудено състояние на молекулата [37]. При наличие на групи заместители, като тирозина, е възможен принос към флуоресцентните свойства на целевия фотосенсибилизатор. При свързване на заместители от обемни групи като аргинин протича и физично гасене на флуоресценцията. За фотосенсибилизатори безизлъчвателни преходи на вътрешна конверсия синглет – синглет или триплет – синглет, които протичат с отделяне на топлина не са характерни. Структурно подобни конюгирани молекули от фталоцианини и аминокиселини са изучавани с нисък квантов добив на флуоресценция (< 0.2) и от други автори [35-38)]. Флуоресценцията с нисък квантов добив се дължи и на фотон-индуциран пренос на електрон (РЕТ-ефект). Ефектът се наблюдава и при съединения съдържащи амино група и производните ѝ [39а-г)]. Резултатите са обобщени в Табл. 2.1.2.

**Таблица 2.1.2.** Време на живот и квантов добив на флуоресценцията на фталоцианинови конюгати с аминокиселини.

Tetra-AA Zn(II)Pc	$\Phi_{ extsf{F}}$	τ <sub>F</sub> (ns) λ <sub>exc</sub> : 390 nm λ <sub>exc</sub> : 405 nm	Octa-AA Zn(II)Pc	$\Phi_{ extsf{F}}$	τ <sub>F</sub> (ns) λ <sub>exc</sub> : 390 nm λ <sub>exc</sub> : 405 nm
TZnPcTyr	0.120	2.91	OZnPcTyr	0.040	2.03
TZnPcPhe	0.069	2.82	OZnPcPhe	0.018	2.67
TZnPcLys	0.047	2.85	OZnPcLys	0.030	-
TZnPcArg(Tos)	0.055	2.89	OZnPcArg(Tos)	0.038	2.56
ZnPc*	0.200		3.99		

\*[35]

По-ниски добиви на флуоресценция се наблюдават също и при тетра- и окта аминофенокси заместените Zn(II)-фталоцианини, които имат ниски стойности на квантовия добив на флуоресценция поради РЕТ ефект от амино групите. Получените резултати показват с около два порядъка по-ниски стойности за квантовите добиви на флуоресценция, с изключение на тетра-тирозин заместения конюгат, в сравнение с използвания като стандарт незаместен Zn(II)-фталоцианин (ZnPc). Времето на живот на флуоресценция е важен параметър показващ времето, през което молекулата е във възбудено синглетно състояние. В тази връзка, флуоресцентното време на живот определя и ефективността на фотодинамичния процес преди молекулата да премине в стабилното основно синглетно състояние.

Времената на живот на флуоресценция на изучаваните биоконюгати с аминокиселини показаха моно-експоненциални криви на гасене, които са типични за разтвори на еднородни по състав съединения. Получените стойности на флуоресцентно време на живот ( $\tau_F$ ) в диапазона между 2.03 ns и 2.91 ns, които в сравнение с  $\tau_F$  на незаместения ZnPc (3.99 ns) са до два пъти по-ниски. Ако сравним  $\tau_F$  на тетра- и на окта конюгатите се вижда, че при тетра конюгатите  $\tau_F$  е по-високо, т.е. имат по-продължителна флуоресценция спрямо окта заместените аналози.

Способността на новите конюгати с аминокиселини да генерират синглетен кислород е доказана с индиректен фотохимичен метод. Абсорбционните спектри, които са получени в хода на реакцията на DPBF фотоокисление, показват ефективно генериране на синглетен кислород. Интензивността на абсорбционната ивица (417 nm) на уловката бързо намалява, докато на фталоцианина (680 nm) остава непроменена, което е показателно за стабилността на молекулата.

Tetra-AA ZnPc	$\Phi_{\Delta}$	Octa-AA ZnPc	$\Phi_{\Delta}$
TZnPcTyr	0.63	OZnPcTyr	0.38
TZnPcPhe	0.71	OZnPcPhe	0.23
TZnPcLys	0.36	OZnPcLys	0.57
TZnPcArg(Tos)	0.39	OZnPcArg(Tos)	0.40

**Табл. 2.1.3.** Квантов добив на синглетен кислород на фталоцианинови конюгати с аминокиселини.

Получените стойности (Табл. 2.1.3) показват, че квантовите добиви на синглетен кислород за тетра- заместените с тирозин TZnPcTyr и фенилаланин TZnPcPhe комплекси са по-високи в сравнение с окта заместените аналози.

Фотостабилността на биоконюгатите е определена от промените на моларната абсорбируемост при  $\lambda_{max}$  на ивицата в червения спектър при облъчване с източник при 635 nm (Таблица 2.1.4).

Tetra-AA Zn(II)Pcs	$rac{dc}{dt}$ , x 10 <sup>10</sup>	Octa-AA Zn(II)Pcs	$\frac{dc}{dt}$ , x 10 <sup>10</sup>
TZnPcTyr	3.10	OZnPcTyr	32.00
TZnPcPhe	5.63	OZnPcPhe	3.50
TZnPcLys	13.50	OZnPcLys	2.20
TZnPcArg(Tos)	1.53	OZnPcArg(Tos)	7.89
ZnPc*	0.94		

Таблица 2.1.4. Фотостабилност на биоконюгати с аминокиселини при 635 nm.

За фотосенсибилизатори от съществено значение е да са стабилни във физиологични условия за времето на протичане на фотодинамичното действие. Вътрешномолекулните взаимодействия са в основата на фотостабилността при фталоцианини, която зависи от природата на групите-заместители [41].

#### 2.2. С ВЪГЛЕХИДРАТИ

Въглехидратни молекули, химично свързани като функционални групи към фотосенсибилизатори са измежду най-изучаваните биологично-активни молекулни групи, с принос към фотодинамичното действие [43, 44]. Първоначалната идея за такъв вид структури е да се получат фталоцианинови съединения с амфифилна и дори с хидрофилна природа. След първата публикация на *Maillard et al.*, 1989 [45], научният интерес към фталоцианини като конюгати с въглехидрати нараства поради биологичната активност на получените нови структури за антитуморната фотодинамична терапия [46, а-в]. Въглехидратите са подходящи като функционални групи за фталоцианина, от една страна поради приноса им за повишаване на разтворимостта и от друга, поради ефекта върху биологичните процеси на клетъчно ниво чрез рецепторните групи за въглехидратни молекули, намиращи се в големи количества в клетъчните мембрани на туморни клетки, за рецепторно-насочен транспорт с оптимално натрупване и локализация на новата структура [47, 48].

#### 2.2.1. Синтез и химични свойства

Получени са два вида биоконюгати на Zn(II)-фталоцианини със заместители от галактопираноза и галактоза в периферни и непериферни позиции на пръстенната 2.2.1). Биоконюгатите с молекула (Схема галактоза ca изучени като фотосенсибилизатори за метода ФДТ. Синтетичната процедура за получаване на галактопиранозил-заместени Zn(II)-фталоцианини включва глюкозилиране ПО модифицирана реакционна схема на публикувани реакционни схеми от различни научни групи [45-48]. Нов момент е деблокирането на хидроксилните групи при галактопиранозата, което е публикувано за първи път за аналога с осем галактопиранозни групи [48, в]. На първи етап, синтезът включва получаване на изходните 3- и 4- нитро-заместени фталонитрили. Следва получаването на заместени с въглехидратните молекулни групи 3- и 4- галактопиранозил динитрили, които са изходни мономери за циклотетрамеризация (Схема 2.2.1). Синтезът на 4гликопираноза-заместения динитрил е проведен съгласно процедура от литературата [46, б]. Реакцията протича по механизъм на нуклеофилна заместителна реакция при -ОН групата на галактоза със защита на останалите хидроксилни групи (1,2:3,4-di-Oisopropylidene- $\alpha$ -D-galactopyranose) в среда от сух DMF, сух калиев карбонат като база, при стайна температура и среда от аргон. След пречистване, съединенията са охарактеризирани с познатите аналитични техники, а получените аналитични данни са сравнени с литературни източници. Съединенията се разтварят в минимално количество ТНГ (или DCM) и се добавя около половин обем от киселината (TFA) за премахване на защитните групи. Тетра- заместените фталоцианини с галактоза са получени като смес от позиционни изомери. Синтетичната процедура за свързване на въглехидрати към фталоцианина, се провежда чрез въвеждане на заместителите към фталонитрила с реакция на директно нуклеофилно заместване при свободната хидроксилната група с производното на галактоза (1,2:3,4-di-O-isopropylidene-α-Dgalactopyranose) и нитро- групата на фталонитрила на 3- или 4- позиция, както е описано за пръв път от Hanack & Ziegler, 2006 г. [48,6].



Схема 2.2.1. Получаване на тетра-галактопираноза заместени Zn(II)- фталоцианини; A) в непериферни (nZnPc-Gal) и B) в периферни (pZnPc-Gal) позиции. Yields: 31-35%

Малък брой статии посочват получаване на фталоцианини с други въглехидрати получени при реакция с паладиев катализатор, както и по-екологично приемливи синтетични подходи [49, 50]. Свързването на различни групи заместители през триазолна група се прилага от неотдавна във фталоцианиновата химия [51a-в]. Реакцията е 1,3-присъединителна между алкилна и азидна група и протича с Cu(I)катализатор и натриев аскорбат, Cu-катализатор и протича в смес от разтворители [52-55]. Производно на галактоза с алкилна група е получено с NaH, а фталоцианинът съдържащ азидоетокси група е получен съгласно Схема 2.2.2. Този подход на свързване през триазолен пръстен е икономичен за реализация, като продуктът е с добри добиви и чистота.



Схема 2.2.2. Получаване на тетра-азидоетокси заместен Zn(II)-фталоцианин (3). Yield: 30%.

Тетра-галактопираноза заместен Zn(II)-фталоцианин е получен като нов продукт със свързващ триазолен пръстен, който е подходящ за кватернизиране до катионен дериват (Фиг. 2.2.1).





Анализите са проведени с UV-Vis, IR

и MS MALDI-TOF спектрометрия. Zn(II)-фталоцианин **4** и новият продукт **4.2** имат различни ИЧ-спектри от вибрационната ивица 1387 сm<sup>-1</sup> на триазолните пръстени. Ивиците в диапазона от 1050 сm<sup>-1</sup> до 1200 cm<sup>-1</sup> се дължат на заместители при галактопираноза. Хидроксилните групи (**4**) показаха вибрационни ивици с ниска интензивност между 3200 сm<sup>-1</sup> и 3360 сm<sup>-1</sup>. Други характеристични ивици са при 2956 сm<sup>-1</sup> и 2887 сm<sup>-1</sup> от алифатни -CH групи; C-O-C е с вибрация при 1240 сm<sup>-1</sup>. Масспектърът на **4.2**, получен чрез MALDI-TOF спектрометрия показва сигнал при m/z: 2111.497 [M]<sup>+</sup>.
#### 2.2.1. Фотофизични и фотохимични свойства

Получените по двата начина за свързване Zn(II)-фталоцианини с галактопираноза (4 и 4.2) показаха сходни спектри на абсорбция. Разлики се наблюдават в спектрите на различаващите се по позицията на заместване за фталоцианини. В диапазона на изследваните концентрации, съединенията са в мономерно състояние, което се регистрира с интензивна и тясна Q- ивица с максимум в далечната червена област (682 nm за pGal-ZnPc; 702 nm за nGal-ZnPc) за разтвори в DMSO. Абсорбционните спектри във вода показват формиране на фотонеактивни асоциати, което явление е установено и за други въглехидратно-заместени деривати на фталоцианина [56]. Получаването на молекулни асоциати е в резултат от хидрофобни взаимодействия между ароматните пръстени с образуване на водородни връзки с близко намиращите се заместителни групи. Формирането на асоциати зависи от външни фактори като концентрация, полярност на разтворителя, температура, както и от структурни фактори като вида на заместителите и на координирания йон [57].

Молекулните асоциати не участват в процеса на фотосенсибилизация, поради тази причина за изследванията на съединенията като фотосенсибилизатори са използвани биоконюгатите със защитни групи. За разлика от дериватите със свободни -OH групи, тези със защитни групи имат амфифилна природа и остават в мономерно състояние в изследваните разтвори. Флуоресценцията на получените фталоцианини се характеризира със спектър на емисията с широка ивица в диапазона между 650-800 nm, която не се припокрива с флуоресцентния спектър на природните клетъчни хромофори. Максимума на флуоресцентния сигнал при съединенията е отместен незначително спрямо абсорбционния максимум. Спектрите са сравнени спрямо незаместения ZnPc като флуоресценцията е измерена в различни разтворители, с максимално червено отместване в DMSO и минимално за разтвори в метанол. При измерване на флуоресценцията на съединенията без защитни групи, слаба емисия се детектира само след добавяне на 5% CEL, като резултат от преминаване на молекулите в мономерно състояние. Определени са ниски стойности на флуоресцентния квантов добив ( $\Phi_F$ ) от 0.13±0.01 за p-GalZnPc и 0.06±0.01 за n-GalZnPc (Табл. 2.2.1).

Флуоресцентното време на живот на двата фталоцианинови комплекса са измерени с моно-експоненциално затихване със стойности на времето на живот 2.75 ns за биоконюгата с непериферни заместители и 3.43 ns за периферни заместители. В сравнение със стандарта (ZnPc, 3.99 ns), измерените стойности са по-ниски и не зависят

от спектъра на приложения източник. Както е известно значителна фракция от молекулите във възбудено синглетно състояние се деактивират през излъчвателен преход на флуоресцентна емисия [58]. За фталоцианините с галактопираноза като заместители получените стойности на флуоресцентните параметри ( $\Phi_F$  и  $\tau_F$ ) са характерни за съединения в мономерно състояние.

Phthalocyanine	Solvent	Abs. max	Fl.	Φ <sub>F</sub>	φΔ	τ <sub>F</sub>
		(nm)	max	(SD: 0.01-		(ns)
			(nm)	0.02)		
n-GalZnPc	DMSO	702	707	0.06	0.49	2.75
	DMF	698	701	0.11		
	MeOH	696	701	0.10		
	H <sub>2</sub> O	696	702			
p-GalZnPc	DMSO	683	691	0.13	0.26	3.43
	DMF	679	686	0.12		
	MeOH	675	684	0.10		
	H <sub>2</sub> O	680	704			
ZnPc*	DMSO	672	683	0.18	0.67	3.99

Таблица 2.2.1. Фотофизични и фотохимични свойства на галактопираноза-заместени Zn(II)-фталоцианини (\*[35]).

\*[15]

Синглетният кислород в присъствие на изследваните ZnPcs производни е определен с фотохимичната реакция при облъчване (635 nm или 665 nm) в органичен разтворител и DPBF. За изследваните биоконюгати на фталоцианина, квантовият добив на синглетния кислород ( $\Phi_{\Delta}$ ) е 0.26, 0.49 и 0.52 (**4.2**) при стандарт ZnPc [15].

Фотостабилността на молекулата при облъчване със спектър и лъчеви дози, които са приложими за фотодинамичен метод е определена за абсорбционната Q-ивица (2.5 х  $10^{-3}$  min<sup>-1</sup>). За порфиринови деривати със същите молекулни групи и O- (алкокси-) са получени скоростни константи с един порядък по-високи (2-4 х  $10^{-2}$  min<sup>-1</sup>) [59]. Както е известно, по-високата фотостабилност на порфирините спрямо фталоцианиновите производни се счита за недостатък, поради продължителното време на задържане и изчистване от тъканите, с прояви на странични ефекти на фоточувствителност [60].

Фотохимичните изследвания на биоконюгата с непериферни заместители n-GalZnPc показаха квантов добив на синглетен кислород с по-висока стойност при съизмерима фотостабилност на периферно заместения p-GalZnPc. При галактозни групи към фталоцианиновия пръстен и прилагане на спектър на облъчване (635 nm) с подходящи доза и енергия се наблюдава селективност на фотоцитотоксичния отговор при изследвания върху туморни спрямо нормални клетъчни линии.

#### 2.3. СЪС СТЕРОЛИ

Структурните особености на фотосенсибилизатори за фотодинамичен метод се считат за критични за техните фотофизични и фотохимични свойства, както и за взаимодействието им с мембраните структури на патогенни клетки, което е определящо за фототоксичния ефект [61]. Натрупаното познание за оптималната структура за фотосенсибилизатор сочат като подходящи съединенията с положителен заряд и с амфифилна природа, както и заместители в пространствено разположение около равнината на пръстената молекула, както и с биологична функционалност [62].

В състава на клетъчните мембрани, естествените стеролни молекули имат физичната функция на мембранни "котви", в смисъла на молекули придаващи едновременно здравина, гъвкавост и защитна функция на мембраните. Стеролите участват като градивни молекули с ролята на "фундамент" при клетъчния растеж. За фотосенсибилизатори, добре изучени са фосфолипидите с функции да пренасят и стимулират свързването на липозомно включени фотоактивни съединения към клетъчни мембрани чрез рецепторно разпознаване на патогенни клетки [63]. Стеролите са възникнали еволюционно със зараждането на земната атмосфера, като във фунги се съдържа егростерол заедно с холестерол [64]. Холестеролът като част от мембранните структури на клетките е добре изучена молекула-мишена за окислителните реакции при болестотворни процеси [65, 66]. Малък брой са изследванията на фотосенсибилизатори свързани към стероли за фотодинамични приложения [67а-д].

#### 2.3.1. Синтез и химични свойства

Zn(II)-фталоцианинът с периферни азидоетокси групи като заместители (3) е изходното съединение в синтеза на биоконюгата с местранол (7) и след кватернизиране до катионния дериват (8) (Фиг. 2.3.1). Свързването на стерола местранол с фталоцианина е чрез 1,2,3- триазолен пръстен, следвайки стандартната процедура за клик реакция [68, 69]. На първи етап протича циклотетрамеризация до фталоцианин 3, съгласно Схема 2.2.2. Приложена е двустъпкова процедура с литиеви гранули разтворени в 1-пентанол при 60 °С и следващо добавяне на сол на цинка {Zn(OAc)<sub>2</sub>. 2 H<sub>2</sub>O} и повишаване на температурата до кипене. Синтетични стероли, които съдържат алкилна група в структурата си могат да се използват директно за клик реакция [70]. Синтезът на биоконюгата 7 се състои в присъединителна реакция между азидна и алкилна групи на съдържащите ги съединения, по реакционни условия приложени при други съединения, а имено със солите CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O (1 екв.) и натриев аскорбат (6 екв.) в смес от DMF/ DCM: H<sub>2</sub>O (1:1:0.5).



Фиг. 2.3.1. Биоконюгати на Zn(II)фталоцианин със стерол (7) и катионния дериват (8).



Получаването на деривата (8) при кватернизиране с йодометан, се наблюдава с образуване на фина утайка в DCM (RT, 24 часа). Пречистването на продуктите се извършва на всеки етап, като за фталоцианин 3 е чрез колонна хроматография {SiO<sub>2</sub>; THF: Hex (3: 1)}, а за конюгата 7 е използван Bio-beads SX-3 beads с елуент DCM, с разделяне по маса. Структурата на новите съединения е анализирана с набор от аналитични техники: FT-IR, <sup>1</sup>H NMR, MALDI-TOF спектрометрия. В ИЧ-спектъра на 2-азидоетокси Zn(II)-фталоцианин (**3**), вибрационната ивица при 2230 сm<sup>-1</sup> характерна за C≡N на мономера 4-азидоетокси фталонитрил липсва. Новите ивици показват пик при 3066 cm<sup>-1</sup> от ароматните CH групи и между 2927-2856 cm<sup>-1</sup> от алифатните CH групи. Биоконюгата фталоцианин-местранол (7) е доказан с липсата на ивицата на N<sub>3-</sub>групата при 2107 ст<sup>-1</sup> в ИЧ спектъра, както и за ароматните СН и алифатните СН групи с вибрации между 2952 - 2854 ст-1 и 1722 ст-1, и 1609 ст-1, 1577 ст-1 съответно. Дериватът 8 показа сигнали на ароматните СН групи при 3165 сm<sup>-1</sup> и 3019 сm<sup>-1</sup>, за алифатните СН съответстват вибрационните ивици при 2972 - 2754 ст<sup>-1</sup>. Мас спектрите са получените с дитранол (DIT) като MALDI матрица. Масата на молекулния йон е показана с m/z: 915.87 [M]<sup>+</sup> за **3;** m/z: 2163.318 [M+3H]<sup>+</sup> за **7**, и m/z: 560.200 [M-4I]<sup>4+</sup> за 8, като единичен сигнал. <sup>1</sup>H-NMR спектър на съединение 3 се характеризира с широки сигнали между 4.04 ppm и 8.84 ppm за ароматните протони. Протоните, отговарящи на заместителите също се проявяват в съответния диапазон.

#### 2.3.2. Физикохимични свойства

Абсорбционните спектри на Zn(II)-фталоцианинови комплекси 7 и катионния дериват 8 са измерени в DMSO (Фиг. 2.3.4). Спектрите показват интензивна ивица в червената област с максимуми с незначително отместване за конюгата с местранол 7 (684 nm) и след кватернизиране 8 (681 nm). В-ивица е по-слабо интензивна и е разположена между 330-365 nm, с максимум при 350 nm (7) и 353 nm (8). Получена е линейна зависимост при нарастваща концентрация, което е характерно за разтвори на съединения в мономерно състояние (Фиг. 2.3.4).

Флуоресцентните спектри на Zn(II)-фталоцианини 7 и 8 показаха ивици с максимуми в червения диапазон на спектъра, с  $\lambda_{max}$ (fl.): 694 nm (7) и 693 nm (8). Спрямо незаместения Zn(II)-фталоцианин ZnPc (672 nm, [35]), максимумът на ивицата при новите деривати е батохромно отместена към червения спектър, като ефект от групите-

заместители. Получените спектри на възбуждане са в добро съответствие с абсорбционните, като показател за еднородна структура, както и за мономерно състояние в DMSO разтвори.



Фиг. 2.3.4. Абсорбционни спектри на фталоцианини 7 (а) и 8 (б) в DMSO за диапазон от концентрации (Промяна на абс.  $\lambda_{max}$  с концентрацията).

Времето на живот на флуоресценция на изучаваните фталоцианинови комплекси 7 и 8 е измерено за различен спектър на възбуждане (360 nm, 610 nm, 660 nm). Получени са моно-експоненциални

криви на затихване, които показват, че флуоресценцията на съединения се дължи на един вид молекули. За фталоцианини е съществено, че комплексите 7 и 8 са в мономерно състояние в измерваните >  $10^{-6}$  М разтвори. Получените стойности за флуоресцентно време на живот са съответно 3.25 ns (7) и 3.46 ns (8), както и при други фталоцианини със заместители са по-ниски от  $\tau_{fl}$  на стандарта **ZnPc** (3.99 ns). Подобно на други фталоцианинови комплекси със заместители, са измерени стойности за време на живот на флуоресценция по-ниски от стандарта [71]. За кватернизирания дериват 8 е получена оптимална стойност за фотосенсибилизатор.

Генерираният синглетен кислород се доказа с фотоокисление на съединения редуктори (Схема 2.3.2). Окисленият продукт има ивица на абсорбция с максимум 417 nm (DMSO). Контрол на реакцията се проведе чрез сравняване на абсорбцията на **7** и **8**  преди и след фотохимичната реакция. С приложеното лъчение от източник LED 635 nm и с подходяща енергия и лъчева доза не са наблюдавани промени в абсорбционните спектри на изследваните съединения, като доказателство за фотостабилност на молекулата на фотосенсибилизатора.



 Схема
 2.3.2.

 Фотоокисление
 на

 молекулни
 проби
 със

 синглетен кислород [72].
 синглетен кислород [72].



За квантовия добив на синглетния кислород са получени стойности от 0.51 (**7**) и 0.46 (**8**), които

за фталоцианини с групи заместители в периферни позиции се определят като относително високи.

# 2.4. С ПАРАБЕНИ

Един от първите одобрени комплекси за ФДТ на тумори е Si(IV)-фталоцианин с аксиални несиметрични групи като заместители - **Pc4** [73, 74]. За Европа, различни метал-съдържащи фталоцианини, включително и силициеви комплекси, неотдавна получиха патент за приложение за фотодинамично инактивиране [75].

.OR



Фиг. 2.4.1. Структура на Cl<sub>2</sub>Si(IV)-фталоцианин и алкилов естер на р-хидроксибензоена киселина (парабени).

За създаване на ефективна структура, като сполучлив подход е свързването на фотоактивно съединение като SiCl<sub>2</sub>Pc с естер на р-бензоената киселина като инхибитор за патогени (Фиг. 2.4.1). Парабените са едни от най-разпространените консерванти в козметични и фармацевтични продукти, с важно приложение при консумативи и материали за медицината, както и в хранителната индустрия [76, 77].

#### 2.4.1. Синтез и химични свойства

Синтезирани са нови производни на Si(IV)-фталоцианини с аксиални групизаместители от парабени с различна дължина на въглеводородната верига при алкилната група (R), с доказана антимикробна активност. Комплексът с две метилпарабенови групи е описан от китайски автори с достъп само до резюме на английски език [78]. Деривати на Si(IV)-фталоцианинови комплекси със заместители от различни парабени свързани към двете аксиални позиции на комплекса SiCl<sub>2</sub>Pc [79] са получени с нуклеофилна заместителна реакция, която включва кипене на **3** в сух толуен (Схема 4.2.1).



Схема 4.2.1. Получаване на Si(IV)-фталоцианини с аксиални заместители от различни парабени (**3а-3d**). Yields: 13-14 %.

Получени са анализите с ATR-IR, <sup>1</sup>H NMR, MS и UV-Vis методи. Протоните спектри показват интензивни мултиплети в диапазона 9.5 ppm и 8.3 ppm от ароматните протони на пръстена, със сигнали на ароматните протони при 2.4 ppm, поради близкото разположение на аксиалните заместители до равнината на молекулата. Мас спектрите показват пик на молекулния йон за **3a**: 843.414 [M + H]<sup>+</sup>; **3b**: 870.52 [M]<sup>+</sup>; **3c**: 921.3292 [M + Na]<sup>+</sup> и **3d**: 940.7453 [M + Na]<sup>+</sup>. Производните съединения с метилпарабен **3a** и бутилпарабен **3d** са изучени и с подредеността на молекулите в кристални пакети, за които е установено, че се различават по структура. При подреждането си пръстените молекули не се свързват по между си с водородни връзки, а чрез два вида **C-H···** $\pi$  и  $\pi$ - $\pi$  междумолекулни взаимодействия, които имат стабилизираща роля за формираната структура с междумолекулно разстояние < **4.0** Å.

#### 2.4.2. Фотофизични и фотохимични свойства

Si(IV)-фталоцианини с аксиални заместители от различни парабени (**3a-3d**) са разтворими в повечето органични разтворители (DCM, DMF, THF) и слабо в DMSO. Добре известно е, че при формиране на молекулни асоциати фотоактивността на съединението намалява. Изследванията са проведени в разтвори на DMF (Фиг. 4.2.2). Получените спектри показват, че не се образуват асоциати за диапазона от концентрации 1.2 x 10<sup>-5</sup> - 2.0 x 10<sup>-6</sup> М. Получени са сходни зависимости и със съединения **3b-3d** с максимума в червения спектър  $\lambda_{max} = 682$  nm (Фиг. 4.2.2, а).



Фиг. 4.2.2. (а) Абсорбционни спектри на фталоцианини **3а-3d** в DMF ( $10^{-5}$  M); (b) Спектри на абсорбция, на възбуждане и на флуоресцентна емисия на **3d** (exc: 650 nm).

Ивицата в UV спектъра показа максимум при 355 nm (**3а-3d**). Следващи експерименти са проведени в разтвори на DMF за диапазон от концентрации за определяне на моларната абсорбируемост ( $\varepsilon$ ) на съединенията (Табл. 4.2.1). Резултатите показват, че с нарастване на въглеводородната верига при заместителите, стойностите на коефициента  $\varepsilon$  нарастват, но наситената въглеводородна верига не оказва влияние върху позицията на абсорбционния максимум. Сравнителни изследвания на производните с парабени показаха сходни свойства на флуоресцентната емисия за разтвори на DMF. Като пример е показан абсорбционния, флуоресцентния емисионен и на възбуждане спектри за бутилпарабен SiPc, **3d** (Фиг. 4.2.2, б). Позицията на максимума на флуоресцентната ивица е при 690 nm (DMF). Спектрите на флуоресценция са измерени за различен спектър на възбуждане и не показаха промяна на позицията на максимума на емисионната ивица, като доказателство за еднороден състав без структурни промени в резултат на приложения спектър.

Si(IV)Pc	Q band	log ε	Emission	$\Phi_{\sf d}({\sf x10}^{-5})$	$\Phi_{\Delta}$
	λ <sub>max</sub> , (nm)		λ <sub>εm</sub> (nm)		
За	683	5.10	690	6.29	0.47
3b	682	5.16	690	0.18	0.47
Зс	683	5.29	690	0.15	0.46
3d	682	5.35	690	0.13	0.48
ZnPc*	671	5.37	676	2.30	0.56
* [10]					

Табл. 4.2.1. Фотофизични и фотохимични свойства на парабен-заместени SiPcs в DMF.

Дължината на въглеводородната верига при парабена не оказва влияние на флуоресцентния квантов добив на новите деривати ( $\Phi_F = 0.27$ ). Стойности на  $\Phi_F > 0.2$ се определят като високи за фотосенсибилизатори, следователно изследваните съединени са подходящи и за целите на флуоресцентната диагностика. За различен спектър на облъчване са получени идентични стойности, които не зависят от приложеното лъчение.

Si(IV)Pc	$\Phi_{F}$	τ <sub>F</sub>	τ <sub>0</sub>	
		(ns)	(ns)	
3a	0.30	7.11	2.73	
3b	0.27	6.04	1.73	
3c	0.27	5.54	1.96	
3d	0.27	6.41	1.73	
ZnPc*	0.17	3.99	n.d.	
* [81]	•	•		

Табл. 4.2.2. Флуоресцентни свойства на фталоцианини 3а-3d в DMF.

Измерванията на флуоресцентното време на живот на комплексите **3а-3d** за спектър на възбуждане 405 nm показаха време на живот ( $\tau_F$ ) с компонента на краткоживущи молекулни асоциати за концентрация 10<sup>-5</sup> M в DMF (Табл. 4.2.2). Добре

изучено е явлението на физично гасене от димери на мономерни молекули в синглетно възбудено състояние [80]. По-висок процент (96%  $\pm$  1%) е компонентата дължаща се на молекулите в мономерно състояние със стойности между 7.11 ns и 5.54 ns в DMF. Получени са моноекспоненциални криви за THF разтвори, които показват стойности от 6.20 ns и 5.80 ns и слаба зависимост за  $\tau_F$  от въглеводородната верига.

Фотохимичната реакция е възможно да протече с отделяне на разпадни продукти, поради окисление от генерирания синглетен кислород [82]. Изчислените стойности на квантовия добив на синглетния кислород ( $\Phi_{\Delta}$ ) са между 0.46-0.48 са сравнително високи. За новите комплекси на силиция, тези стойности са около 30% по-високи от стойността на квантовия добив за силициев комплекс с хидроксилни групи в аксиални позиции SiPc,  $\Phi_{\Delta}$ = 0.28, DMSO [83]. Нарастването на въглеводородната верига на заместителите не оказва влияние на квантовия добив на синглетен кислород. Фотостабилността на макроцикъла е важна характеристика, за да няма отделяне на токсични разпадни продукти [84]. Определени са квантови добиви ( $\Phi_d$ ) характерни за висока стабилност на SiPcs (**3а-3d**) при облъчване със спектър 635 nm.

# 3. ФТАЛОЦИАНИНОВИ КОМПОЗИТНИ СТРУКТУРИ

Фотокаталитичният ефект на титанов диоксид при облъчване с дневна светлина е добре изучен и се използва за пречистване от токсични продукти на отпадни индустриални води и за поддържане на среда без инфекциозни патогени [85 а-г]. Следващо по-широко приложение е антимикробен ефект при влагане на титанов и цинков или други окиси в материали за превенция и контрол на патогени пренасяни чрез повърхности в околната среда [86]. Макар и да показва висока активност, като цяло, титанов диоксид е част от технология за пречистване на води, но като антимикробно средство, ефектът му е ограничен. Счита се, че причината е недостатък в спектъра на облъчване, който за естествената светлина е само 3 % от спектъра на металните окиси, като с различни добавки от метални и неметални окиси в състава незначително се повишава фотокаталитичната активност [87]. Foster et al. [88] описват TiO<sub>2</sub> на патогенни микроорганизми В инактивирането ПО механизъм на фотокатализатор, като подходящи за контрол и превенция от разпространение на патогени. Комбинирането на двата механизма на фотосенсибилизатор и на фотокатализатор се очаква да увеличи като вид и количество генерираните токсични продукти, както и прилагането на естествената слънчева светлина като източник.

#### 3.1. С МЕТАЛНИ ОКИСИ

Получена е нова хибридна структура, съдържаща фталоцианинов комплекс адсорбиран в кристалната решетка на титанов диоксид, като чист минерал анатаза (25 nm). Подходящ фталоцианин е хидрофобния дериват тетра- додецилпиридилокси заместен Zn(II)-фталоцианини (ZnPcDo), синтезиран в предходната ни работа [89]. За ефективно конюгиране е важно да се осигури добра адхезия с повърхността на частиците. Условно хибрида може да се опише като Zn(II)- фталоцианин с четири периферни додецилпиридилокси групи като заместители (ZnPcDo) поместен в тетрагоналната решетка от TiO<sub>2</sub>. Получаването на хибрида протича в суспензия от TiO<sub>2</sub> (~ 1 g.L<sup>-1</sup>) в етанол, към която се добавя разтворения фталоцианин ZnPcDo от концентриран разтвор в пиридин (~ 2 mM). Реакционната колба е поместена в ултразвукова вана с нагряване, а стъклената апаратура е затворена и наситена с инертен газ (аргон), за да няма загуби на фотосенсибилизатор. Контрол на реакцията се извършва чрез измерване на абсорбцията на остатъчния в течната фаза фталоцианин през интервали от време, като важно е аликвотна част взета от разтвора да се добавя към подходящ разтворител (DMF).



Фиг. 3.3.1. Абсорбционни спектри на композитен материал от фталоцианин с  $TiO_2$  (анатаза) и чиста анатаза в твърдо състояние, и ZnPcDo ( $10^{-5}$  M) в DMSO.

След насищане на абсорбцията при максимума, суспензията фталоцианин-титанов диоксид се филтрува и промива до обезцветяване на супернатантата. Композитният материал като светлозелени фини кристали се суши при 80 °C. Абсорбционният отражателен спектър измерен в твърдо състояние е съставен от спектрите на двата компонента на композитния материал (Фиг. 3.3.1). Спектърът се характеризира с широка ивица на абсорбцията във видимия диапазон (550-800 nm) и в UV областта (250-400 nm). За композита, абсорбционната ивица във видимата област се състой от два

максимума при 619 nm и 683 nm, които са батохромно отместени спрямо максимумите на включения фталоцианин (610 nm и 674 nm). Характерно за спектъра на анатаза е широка ивица покриваща UV спектралната област. С добавяне на ZnPcDo, спектърът обхваща и видимата област, което позволява да се приложи директно слънчевата светлина.

Получени са ATR-IR спектри от твърдо състояние на наночастиците TiO<sub>2</sub> и след адсорбция на фталоцианина. Инфрачервени спектри на фталоцианина ZnPcDo имат характеристична вибрация при 721 cm<sup>-1</sup>. Изоиндолните пръстени показват ивици при 1579 cm<sup>-1</sup> и при 1497 cm<sup>-1</sup> за C=N групата. Два силни сигнала с максимуми при 1394 cm<sup>-1</sup> и 1466 cm<sup>-1</sup> са характерни за C-N и C-C групи от ароматната структура. След адсорбция върху анатаза, характеристичните ИЧ ивици на фталоцианина не се проявяват. ИЧ-спектърът показа ивица за чист TiO<sub>2</sub> като анатаза при 497 cm<sup>-1</sup>. Други две ивици при 2853 cm<sup>-1</sup> и 2959 cm<sup>-1</sup> са от вибрации на CH<sub>2</sub> групи. Метилови групи от въглеводородната верига се описват с ивица при 2925 cm<sup>-1</sup>. Спектърът показва ивици типични за алифатни вериги, които са разположени при 2852 cm<sup>-1</sup> и 2959 cm<sup>-1</sup>. От спектрите може да се дискутира и ефекта на включената вода в решетката на анатазата, която маскира ивиците на пръстена.



**Фиг. 3.3.2.** Флуоресцентни спектри на  $TiO_2$ ,  $ZnPcDo-TiO_2$  от твърдо състояние и за разтвор на ZnPcDo в DMSO (exc: 330 nm).

Флуоресцентният спектър на фталоцианина в разтвор показа типичната ивица на флуоресценция (679 nm) за фталоцианинови багрила, която е батохромно отместена спрямо абсорбционната (674 nm) за разтвор в DMSO (Фиг. 3.3.2). За разлика от видимия спектър, в UV областта максимумът при 375 nm е интензивен. Тези резултати показват, че хибридната структура е подходяща за детектиране по флуоресцентния сигнал в UVA спектъра. Получените композитни материали и с други хидрофобни фталоцианини

имат флуоресцентни свойства, доказани чрез конфокален флуоресцентен микроскоп (CLFM). Резултатите с TiO<sub>2</sub> - ZnPcDo във водна суспензия и като сух слой върху предметно стъкло показват типичната флуоресцентна емисия за фталоцианини в спектрален диапазон 650-800 nm. За композитния материал и с потенциално ефективно приложение за фотосенсибилизатор е важно да се проследи молекулното състояние на фталоцианина в композитна структура с титанов диоксид.

В заключение, при използваната процедура молекулите на фталоцианина ZnPcDo са адсорбирани в мономерно състояние, което се определя по проявата с интензивна флуоресценция, като показател за фотоактивни молекули.

#### 3.2. С ПОЛИМЕРИ ЧЕТКИ

Получен е фталоцианинов хибрид с полимерни четки на базата на хидрофобни взаимодействия между молекули с различен произход. В резултат се получава водоразтворим фотосенсибилизатор подходящ за целите на метода фотодинамично инактивиране на патогени. Както е известно освобождаването на активната съставка в лекарствен продукт зависи от киселинността, полярността, заряда, на ензимите в средата, което може да се използва като подход за добро натрупване на активни молекули в таргетните клетки [90, 91]. За хидрофобния фталоцианин например, полимерът може да послужи като добър разтворител за приложенията му от разтвори, включително и вода. Zn(II)-фталоцианин без заместители (ZnPc) съществува като мономер в органични разтворители, като показва фотосенсибилизационни свойства, с добра фотоактивност, но поради липофилната си природа приложението му за биологични цели е затруднено. За тези изследвания са използвани разтвори на DMSO, но след добавяне във физиологична среда, молекулите лесно образува молекулни асоциати, които са обратими до разделянето им до мономолекули при добавяне на полимер към физиологичен разтвор (Фиг. 3.2.1). Полимерните четки имат амфифилна природа и представляват нано-контейнери за активни съединения. Използвани са два вида полимерни четки, синтезирани и охарактеризирани в Институт ПО макромолекулна химия на РАН, Русия [92 а, б]. Приложените полимери се състоят от полимерна верига, към която са прикрепени полимерни странични вериги с висока плътност на молекулните фрагменти. Хидрофобна част на полимера е подходяща за хидрофобни взаимодействия с ZnPc.



Фиг. 3.2.1. Условна конфигурация на ZnPc с полимери: PAT2: n = 53 (P1, Mw / Mn = 2,14 of GPC), m = 183 (PMAA Mw / Mn = 1,5 of GPC); PAT3: n = 53 ( P1, Mw / Mn = 2,14 of GPC), m = 155 (PMAA Mw / Mn = 1,36 of GPC).

Полученият хибрид е между хидрофобен фталоцианин (ZnPc; ZnPcDo) и полимерна четка и може да се разглежда като разтворим във вода. Проследявайки флуоресцентния сигнал, който е типичен за фталоцианина (~ 690 nm), в буфер при pH 7.4 се наблюдава образуването на мицел, тип "куха нишка", с усилване на флуоресценцията на фталоцианина, като резултат на хидрофобното взаимодействие между молекулите на полимера и фталоцианина.

# 4. ФТАЛОЦИАНИНОВИ ДЕРИВАТИ ЗА ФОТОДИНАМИЧЕН МЕТОД ПРИ ПАТОГЕНИ С РЕЗИСТЕНТНОСТ

Материалът по дисертационният труд съдържа кратко обобщаване на основните резултати, получени при фотобиологичните изследвания за натрупване, локализация и фотодинамична активност на разработените фталоцианинови производни за ФДТ приложения при резистентни патогенни микроорганизми. Въпреки дългата си история на разработване и клинични проучвания, наличните фталоцианини имат недостатъци като ниска селективност и неспецифичност на натрупване, както и тъмнинна токсичност за комплекси без заместители и като резултат ниска фотоактивност [93-95]. Фотодинамичният ефект е наблюдаван в зависимост от натрупването и локализацията на съединенията при бактериални щамове на Грам (+) *Staphylococcus* и *Streptococcus*, на Грам(-) *Pseudomonas aeruginosa, Aerumonas hydrophila* и *Salmonella enteritidis*, които предизвикват тежки инфекции както и бактеримия. За изследванията е използван и най-разпространеният фунгален щам *Candida albicans*.

#### 4.1. ИНАКТИВИРАНЕ НА ПАТОГЕННИ БАКТЕРИИ И ФУНГИ

#### 4.1.1. In vitro изследвания за фотоцитотоксичност на катионни комплекси

Изследванията за антимикробна активност са проведени с катионни Lu(III), Sn(IV) и Pd(II) фталоцианинови комплекси с периферни и непериферни заместители (т. Изследванията за проведени с Грам (-) бактериален щам *P. aeruginosa* и на фунгален на *C. albicans*, като суспензия (~ $10^6$  CFU. mL<sup>-1</sup>) и с биофилми от тези патогени, тъй като в природата бактериите се намножават и образуват биофилми, изследван е ефекта върху образци от биофилм формиран върху предметно стъкло. Комплексите Lu(III)Pcs и Sn(IV)Pcs са инкубирани с концентрации между 1 µМ - 30 µМ и активирани със спектър nm или 665 nm LEDs и доза 50 J. cm<sup>-2</sup> (60 mW. cm<sup>-2</sup>). Комплексите нямат тъмнинна токсичност за изследваните концентрации. При оптимални фотофизични свойствата на комплексите, ефект на пълно фотоинактивиране се наблюдава за сравнително високи концентрации между 20 и 30 µМ. По отношение на координирания метален йон, за комплексите на Lu(III)Pcs ефектът е по-висок  $> \log 3$  в сравнение с комплексите на Sn(IV)Pcs при аналогични условия на експеримента. Счита се, че ефектът от по-висока от log 3 е показател за добра фотодинамична активност, като за комплекса с периферни заместители (LuPc, **4a**) са необходими два по-високи концентрации за инактивиране в сравнение с комплекс на цинк със същите групи като заместители в периферна позиция Наблюдения на други автори за комплекси на In(III) показват, че тетра-заместения InPc има по-висока активност за бактерии (E. coli) отколкото моно-заместения комплекс, т.е. броят на положителните групи има принос за ефекта на инактивация [97]. Основният извод от тези изследвания е, че заместването на йон на цинка с друг с по-голям атомен номер, като лутеция или калая, има принос към физикохимичните свойства на получените комплекси, но не повлиява ефективността на инактивиране на патогени.

За биофилми от щама *P. aeruginosa* и *C. albicans* получени след 48-часа за растеж на биомасата и инкубирани с **LuPc**, **3a** е наблюдавана флуоресценция на фталоцианина. От нативната флуоресценция на клетъчните хромофори (**A**), която е в спектрален диапазон (520 - 580 nm), който не припокрива спектъра на типичната за фталоцианини флуоресценция (660 - 740 nm) е определена локализацията на съединенията в биофилма (Фиг 4.1.1). За комплекса с лутеций **3a** е наблюдаван интензивен сигнал в слой от биофилма (**B**), който показва по-голямо натрупване по периферните участъци на биофилма (**C**). При по-големите по размер *C. albicans* клетки се вижда, че разпределението на комплекса с непериферни заместители (LuPc, **3a**) е по клетъчната повърхност. Както е установено при сканиране на биомасата и при сравнение на двата флуоресцентни сигнала (на фталоцианина и на клетъчните хромофори) се наблюдава, че в части на биофилма има пълно проникване (100 %), а в други частично (~ 75 %).

Фотодинамично инактивиране на клетъчна суспензия от щама *MRSA* (10<sup>6</sup> CFU. mL<sup>-1</sup>) е наблюдавано при 10  $\mu$ M **PdPcs** и облъчване със спектър 665 nm и лъчева доза 60 J.cm<sup>-2</sup> и плътност на мощността 50 mW. cm<sup>-2</sup>. Съединенията не показаха тъмнинна токсичност за концентрации до 12  $\mu$ M. Наблюдавана е концентрационна зависимост на ефекта на инактивиране, като за концентрации до 5-6  $\mu$ M, ефектът е < 3 log.

Инактивиране с катионни комплекси на силиция (т. **2.1**, SiPc, **3Q**) се проведе върху щамове на патогенните бактерии Грам(+) *S. aureus*; *S. mutans* и Грам(-) *P. aeruginosa* като суспензия ~ $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> (Фиг. 4.1.2). Комплексите не показаха тъмнинна токсичност за широк диапазон от концентрации и при трите изследвани щама.





Фиг. 4.1.1. Снимки от CLFM на a) *P. aeruginosa* и b) *C. albicans* слой на биофилм с 520-580 nm) за нативната флуоресценция и ехс: 633 nm След облъчване, при Грам (+) щамове, комплексът **3Q** показа висока активност (> log 3) при концентрация 5  $\mu$ M. Пълно инактивиране е наблюдавано за концентрации 9-10  $\mu$ M. При Грам (-) щам, който се характеризира с висока устойчивост, резултатите показаха слаб ефект до концентрации 20  $\mu$ M. Сравнявайки ефективността на катионните комплекси на силиция се наблюдава зависимост от вида на щама, като за Грам (-) щам инактивирането е < log 3.



Фиг. 4.1.2. Преживяемост на патогенни бактерии в суспензия ( $10^6$  CFU.mL<sup>-1</sup>) за диапазон от концентрации Si(IV)Pc, **3Q** и облъчване с LED 635 nm (50 J. cm<sup>-2</sup>).

Експерименти върху S. aureus показват, че комплексът с аксиални заместители **3Q** е по-ефективен от този без заместители Cl<sub>2</sub>Si(IV)Pc, както и с четири периферни метилпиридилокси групи [9]. При локализация в биофилми, комплексите с периферни позиции имат по-интензивен флуоресцентен сигнал от комплекси с аксиални групи (30 и 4Q). Изследвания с CLSM позволяват да се определи дълбочината на проникване на фталоцианина в биофилма и разпределението му в биомасата, както и количественото натрупване по интензивността на флуоресцентния сигнал. За комплекса 4Q, който е изследван при биофилми от MRSA сканирането показа дебелина от 8-11 µm и пълно проникване във формирания биофилм. По флуоресценцията на естествените хромофори (exc: 488 nm; em: 520–580 nm) е определена дебелината на биофилма, както и проникването на 4Q (exc: 633 nm; em: 660-740 nm) в биомасата вкл. в канали без биомаса, където флуоресцентния сигнал също се регистрира, поради хидрофилността на този фталоцианин. Висока фотодинамична активност е определена за катионните комплекси на силиция (**30** и **40**) при патогенни бактерии Streptococcus mutans и Staphylococcus aureus за 3 µМ 4Q. За резистентен Грам(-) щам P. aeruginosa също се наблюдава фотоинактивиране, но при по-високи концентрации на 4Q (>10 µM, ~ 3log). По настоящем за спешни случаи на бактеримия в клиничната практиката се използват фенотиазинови багрила, като метиленово синьо (MB) и тулоидиново синьо (TBO) при прилагане на светлина със спектър ~ 660 nm [99 a, 6].

# 4.1.2. In vitro изследвания за фотоцитотоксичност при цвитер-йонни и катионни Zn(II)-фталоцианинови комплекси

Проведени са фотодинамични изследвания върху патогенни бактерии с четири водоразтворими Zn(II) фталоцианини с цвитер-йонни заместители от окси- или меркапто- пиридин 2-(N-пропансулфонова киселина). Получените резултати с комплексите ZnPc1-4 показват пълно инактивиране на патогенните бактерии на *E. faecalis* и *P. aeruginosa* с окта-заместения комплекс ZnPc3 с концентрация 6 µM. Двата тетра- заместени в периферни позиции комплекса ZnPc1 и ZnPc2 показаха съизмерими стойности, при непериферно заместване няма ефект за Грам (-) щам, за който е установена устойчивост на приложените тетра-заместени комплекси дори за много високи концентрации (30 µM). Сравнителни изследвания за фотодинамична инактивация са проведени и с аналози на цвитер-йонните, но катионни Zn(II)фталоцианини, с четири и осем броя и в периферна и непериферна позиции на метилпиридилокси и метилпиридилмеркапто групи като заместители. Най-висок ефект с напълно инактивиране при патогенни микроорганизми показаха комплексите с четири и осем катионни периферни заместители, с кислород (ZnPc1) и сяра (ZnPc4) като свързващи атоми с фталоцианиновия пръстен.

Изводът от проведените сравнителни изследвания за ефективността на комплексите като цвитерйонни е, че броят на зарядни групи от заместители към ZnPc макроцикъла оказва влияние върху натрупването в патогенните клетки, което е в пряка зависимост за фотодинамичния ефект. За окта-заместен (ZnPc3) и за катионен (ZnPc1) комплекси са установени високо натрупване в патогенните клетки, с висока селективност на фотоцитотоксичния ефект.

# Фототоксичност и натрупване на биоконюгати на фталоцианина с биологично-активни групи.

Изследванията за фотодинамична активност са проведени със суспензия *Candida albicans* (~ 10<sup>7</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>) по процедура с облъчване за светлинно активиране на фотосенсибилизатора. Протоколът за работа се състои в инкубиране с изследваните фталоцианини тетра- и окта- заместени с аминокиселините: фенилаланин (TZnPcPhe,

OZnPcPhe), с аргинин (TZnPcArg, OZnArg) и лизин (TZnPcLys, OZnPcLys) с концентрации до10 µM при източник LED 665 nm с лъчева доза 50 mW.cm<sup>-2</sup>. Получените резултати показват, че биоконюгатите са нетоксични на тъмно и след облъчване с подходящ спектър и доза имат ефект на фотоинактивиране (Фиг. 4.1.4).



**Фигура 4.1.4.** Фотоцитотоксичност на *C. albicans* след инкубиране с фталоцианини и техни конюгати с аминокиселини спрямо тъмнина токсичност на фотосенсибилизаторите ( $10^{-5}$  M).

Клетъчната стена на *Candida albicans* има свойствата на йонообменник, който може да се свърже с положително заредени йони или по-големи молекули като различни протеини. Проведени са изследвания за натрупване на базата на флуоресцентните свойства на фталоцианиновите конюгати. Резултатите показват, че молекулите се свързват към *Candida albicans*, както с хидрофобни взаимодействия от пръстенната молекула, вероятно и чрез свободните амино групи в структурата, които могат да образуват водородни връзки с биомолекули от мембраната. От значение също е, че лизин и аргинин при физиологично рН имат положителен заряд, който също допринася за натрупването и задържането в мембранните структури на патогените.

Катионни фотосенсибилизатори приложени за инактивиране на патогенни бактерии показват, че имат по-високо натрупване в микробни клетки от анионни или неутрални фоточуствителни техни деривати. Биоконюгатите с аминокиселини са изучени количествено за натрупването им в клетъчна суспензия на *Candida albicans* чрез използване на химична екстракция и флуоресцентен метод. За целта се използва натриев додецилсулфат (SDS) в смес с органичен разтворител (THF или DMF), който да разтвори съединението за пълното му извличане от клетките.



**Фигура 4.1.5.** Натрупване на конюгати на фталоцианина с аминокиселини (5.5 μM) в клетки на *C. albicans* в суспензия с различна концентрации. Всяка точка е средна стойност ±SD (n=3).

Получените резултати показват натрупване за тетра- и окта аргинин и лизин биоконюгатите в *C. albicans* показаха зависимост на намаляване на броя молекули с нарастване на гъстотата на суспензията (Фиг. 4.1.5). Явлението е наблюдавано от Т. Demidova & M. Hamblin, 2005 [100]. Получените резултати показаха, че натрупването на фотосенсибилизатора в патогенни клетки зависи от природата на фотосенсибилизатора и от гъстотата на клетъчната суспензия.

#### 4.1.4. Фототоксичност на фталоцианин адсорбиран на титанов диоксид.

Фотоинактивиране със суспензия на титанов диоксид с адсорбиран хидрофобен фталоцианин, като тетра-додецилпиридилокси Zn(II) фталоцианин (ZnPcDo), както и съставните му части от TiO<sub>2</sub> (анатаза) и ZnPcDo е наблюдавано за патогенни бактерии на Грам (+) щам methicillin-resistant *Staphylococcus aureus (MRSA)* и на Грам (-) щам *Salmonella enteritidis* (Фиг. 4.1.6). Резултатите са получени за два източника (UVA 346 nm и LED 643 nm) на облъчване. Хидрофобният фталоцианин ZnPcDo е изследван на бактерии разтворен в DMSO и не показа ефективност при инактивиране на Грам(-) щам, но адсорбиран на титанов диоксид като суспензия и след облъчване с UV 346 nm, както и след комбинирано лъчение от двата източника, ефектът нараства до 5-6 log инактивиране. След облъчване с източника във видимата област (643 nm), композитният материал показа активност ~ 3 log, но при едновременното прилагане на облъчване от двата светлинни източника.



Фиг. 4.1.6. Фотодинамично инактивиране с хибрида фталоцианин на TiO<sub>2</sub> (1 g. L<sup>-1</sup>) при облъчване с UVA 364 nm, LED 643 nm и с UVA 364 nm + LED 643 nm на *MRSA* (a) and *S. enteritidis* (б). Съставните части на материала са изследвани при същите условия.

В резултат се наблюдава пълно инактивиране на *MRSA* и с 4 log на *S. enteritidis*. За сравнение, са използвани суспензия  $TiO_2$  (1 g. L<sup>-1</sup>) и ZnPcDo в разтвор на DMSO. При облъчване с UV източника (346 nm), пробите с  $TiO_2$ 

показа ефективно фотоинактивиране и за двата щама. Ефектът е поради увреждане на клетъчните мембрани на бактериалната стена, както е установено при проследяване на липидните продукти на окисление, РНК и протеини за *E. coli* [101].

Високата фототоксичност на ZnPcs като тетра-додецилметилпиридилокси заместен Zn(II) фталоцианин (**ZnPcDo**) с ефект на тъмнинна токсичност, която не се наблюдава след адсорбцията му върху TiO<sub>2</sub>. Новият хибрид е материал съдържащ фталоцианин без тъмнинна токсичност. Проведените изследвания показват, че активността нараства, като резултат от два механизъма на действие, а именно фотокаталитичен и на фотосенсибилизация.

#### 4.2. НА ВИРУСНИ ЩАМОВЕ

Изследвания с различни фталоцианинови производни са проведени по метода фотодинамична инактивация за оценка на ефективността на комплексите при вируси. Научните изследвания по темата са разпознаваеми от последните тридесетина години, като например комплекси на Al(III) са показали ефективност при инактивиране на различни вируси (Sindbis virus, VSV и HIV-1) в кръвни продукти [102]. Структурно близките катионни порфиринови деривати Tri-P(4) са показали добър ефект за инактивиране на вирусите: bovine viral diarrhea virus (BVDV), VSV, HIV-1 и pseudorabies virus [103]. Изследванията за фотодинамична активност на катионен Zn(II)-фталоцианин (ZnPcMe) и анионния Zn(II)-фталоцианин (ZnPcS) са проведени върху вируси с произход от различни таксономични групи (BVDV, HSV-1 и VV). Характерно за тези вируси е, че имат "обвивка от липиден слой" (lipid envelope). При започването на изследванията върху вируси (след 2008 г.), почти нямаше информация за връзката структура – антивирусна активност и за зависимостта от заряда при фотодинамичен ефект на вируси.

Вирусите с обвивка имат различна чувствителност към фотодинамично инактивиране, с най-висок ефект за HSV-1 вируса при облъчване с доза 12 J. cm<sup>-2</sup>. Ефектът при инактивиране на тези вируси зависи от групите-заместители на фталоцианиновия пръстен, както *Smetana et al.*, [104] описват група от фталоцианинови деривати с различна ефективност срещу херпес вируса. Механизмът на действие се основава на нарушена липидна обвивка, което от своя страна спира адсорбцията и проникването на вируса в клетките на гостоприемника. При щам на Vaccinia virus е наблюдаван токсичен ефект на тъмно. По отношение на заряда, различията при двата фталоцианина са най-изразени при BVDV щама, при който анионния ZnPcS има два пъти по-висока активност от катионния ZnPcMe. Фотодинамично инактивиране не се наблюдава при NDV щама.

Втората група вируси, които са тествани са без липидна обвивка (Coxsackievirus B1 и human adenovirus type 5). За групата вируси без обвивка не е отчетена чувствителност към ФДТ метода с фталоцианини, което вероятно е поради устойчивостта на протеина capsid и на вирусния геном като мишена на инактивиране [105]. Costa et al., през 2012 [106 a, 6] съобщава, че вирусите с обвивка (enveloped) се инактивират по-лесно от тези без липидна обвивка, като ефективността на процеса на инактивиране зависи от щама. Резултатите от нашите изследвания показаха инактивиране на BVDV, но без ефект при грипния вирус A(H3N2). Докато ефектът при първия щам е наблюдаван и в изследванията на Ben-Hur et al., 2000 [107], то резултати за грипния вирус към 2017 г. не са публикувани за инактивирането му чрез фотосенсибилизация.

Липидната обвивка може да се разглежда като мишена на фотосенсибилизатора, където той се свързва и след облъчване генерираният синглетен кислород нарушава структурата ѝ чрез окисление на липида. Имайки в предвид, че вирусите без обвивка са относително резистентни на терапевтици, получените резултати за фотоинактивацията с катионни тетра- и окта- метилпиридилокси заместени Ga(III)-фталоцианини, особено при вируси без обвивка, като човешки аденовирус, потвърждават ефикасността на фотодинамичното инактивиране с фталоцианинови деривати като надеждна антивирусна терапия, особено в случаите на резистентност. Фталоцианиновите фотосенсибилизатори могат да бъдат ефикасно средство освен в обеззаразяването на кръвни продукти, което е първоначалното одобрено като приложение на метода при вируси, а на следващ етап и за дезинфекция на повърхности и инструменти за медицината и за антивирусен контрол на средата при новите предизвикателства [108, 109].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. C. Rager, G. Schmit, M. Hanack, *Chem. Eur. J.*, 7(11), 2001, 2459-2465.

2. O. L. Osifeco, M. Durmus, T. Nyokong, J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 301, 2015, 47-54.

**3.** (a) D. Wöhrle, N. Iskander, G. Graschew, H. Sinn, E. A. Friedrich, W. Maier-Borst, J. Stern, P. Schlag, *Photochem. Photobiol.*, 51(3), 1990, 351-356; (6) T. C. Tempesti, M. G. Alvarez, E. N. Durantini, *Dyes Pigm.*, 91(1), 2011, 6-12; (B) I. Scalise, E. N. Durantini, *Bioorg. & Med. Chem.*, 13 (8), 2005, 3037-3045.

**4.** G. N. Ngubeni, J. Britton, J. Mack, E. New, I. Hancox, M. Walker, T. Nyokong, T. S. Jones, S. Khene, *J. Mat. Chem. C*, 3, 2015, 10705-10714.

5. M. Durmus, S. Yesilot, V. Ahsen, New J. Chem., 30, 2006, 675-678.

**6.** G. N. Ngubeni, J. Britton, J. Mack, E. New, I. Hancox, M. Walker, T. Nyokong, T. S. Jones, S. Khene, *J. Mat. Chem. C*, 3, 2015, 10705-10714.

7. M. Durmuş, S. Yeşlot, B. Coşut, A. Gül Gürek, A. Kiliç, V. Ahsen, Synth. Met., 160, 2010, 436-444.

**8.** V. Mantareva, V. Kussovski, I. Angelov, D. Wöhrle, R. Dimitrov, E. Popova, S. Dimitrov, Photochem. Photobiol. Sci., 10(1), 2011, 92-102.

9. V. Mantareva, I. Angelov, V. Kussovski, R. Dimitrov, L. Lapok, D. Wöhrle, Eur. J. Med. Chem., 46, 2011, 4430-4440.

**10.** J. L. Sessler, R. A. Miller, Biochem. Pharmacol., 59, 2000, 733-739.

**11.** S. W. Young, K. W. Woodburn, M. Wright, T. D. Mody, Q. Fan, J. L. Sessler, W. D. Dow, R. A. Miller, Photochem. Photobiol., 63(6), 1996, 892-897.

**12.** (a) A. R. Morgan, G. M. Garbo, T. Krivak, M. Mastroianni, N. H. Petousis, T. St Clair, M. Weisenberger, J. E. van Lier, *Proc. SPIE* 1426, 1991, 1426; (6) R. Morgan, L. S. Cheng, D. Skalkos, G. M. Garbo, *Photochem. Photobiol.*, 52(5), 1990, 987-991; (B) L. Polo, E. Reddi, G. M. Garbo, A. R. Morgan, G. Jori, *Cancer Lett.*, 66(3), 1992, 217-223.

13. M. Idowu, T. Nyokong, J. Photochem. Photobiol. A, 199(2-3), 2008, 282-290.

**14.** K. Sannegowda Lokesh and A. Adriaens, Synthesis and characterization of tetra-substituted palladium phthalocyanine complexes, Dyes and Pigments, 96 (1), 2013, 269-277.

15. A. Ogunsipe, T. Nyokong, J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 173, 2005, 211-220.

**16.** T. Nyokong and E. Antunes, 2010, In: Handbook of Porphyrin Science, K. Kadish, K.M. Smith, R. Gulliard (eds.), World Scientific, 247-357.

**17.** N. A. Kuznetsova, V. V. Okunchikov, V. M. Derkacheva, O. L. Kalya, E. A. Lukyanets, *J. Porphyr. Phthalocyan.*, 9(6), 2005, 393-397.

**18.** N. Cauchon, H. Tian, R. Langlois, C. La Madeleine, S. Martin, H. Ali, D. Hunting, J.E. van Lier, *Bioconjugate Chem.*, 16, 2005, 80-89.

**19.** L. V.Lutkus, S. S. Rickenbach, T. M. Mc Cormick, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 378(1), 2019, 131-135.

20. A. Zare, M. Mirzaei, M. Rostami, E. Jafari, J. Med. Chem. Chem. Sci., 3(1), 2020, 55-59

21. G. Roncucci, D. Dei, G. Chiti, D. Nistri, US 2012/0135972 A1, May (31), 2012.

22. G.Y. Atmaca, C. Dizman, T. Eren, A. Erdogmus, Spectrochim. Acta, Part A, 2015, 137, 244-9.

23. B. Şahin, S.Z. Topal, D. Atilla, J. Fluoresc., 27, 2017, 407-416.

24. I. Rosenthal and E. Ben-Hur, Int. J. Rad. Biol., 67(1), 1995, 85-91.

25. P. B. Merkel, R. Nilsson, D. R. Kearns, JACS, 94(3), 1972, 1030-1031.

26. X.-F. Zhang, X. Li, J. Luminescence, 131(11), 2011, 2263-2266.

**27.** N. A. Kuznezova, D. A. Makarov, O. A. Yuzhakova, L. I. Solivieva, O.L. Kaliya, *J. Porhyr. Phthalocyan.*, 14(11), 2010, 968-974.

28. L. Trynda, H. Przywarska-Boniecka, T. Kosciukiewicz, Inorg. Chim. Acta, 135(1), 1987, 55-60.

29. Ts. G. Ganchev, R. Ouellet, J. E. van Lier, Arch. Biochem. Biophys., 366(1), 1999, 21-30.

**30.** J. Kollar, M. Machacek, M. Halaskova, J. Lenco, R. Kucera, J. Demuth, M. Rohlickova, K. Hasonova, M. Miletin, V. Novakova, P. Zimcik, *J. Med. Chem.*, 63(14), 2020, 7616-7632.

**31.** M. G. Strakhovskaya, Y. N. Antonenko, A.A. Pashkovskaya, et al., Biochem. (Moscow), 74, 2009, 1305–1314.

**32.** S.A. Mikhalenko, L.I. Soloveela, E.A. Lukyanetz, *Russ. J. Gen. Chem.* 74 (3), 2004, 451-459. Translated from Zhurnal Obshchei Khimii, Vol. 74, No. 3, 2004, 496 -505.

**33.** E.A. Lukyanetz, V.N. Nemykin, *J. Porphyr. Phthalocyan.* 14 (01), 2010, 1.

34. B.S. Vig, K.M. Huttunen, K. Laine, J. Rautio, Adv. Drug Del. Rev. 65 (10), 2013, 1370.

**35.** A. Ogunsipe, D. Maree, T. Nyokong, J. Mol. Struct. 650, 2003, 131.

**36.** T. Nyokong, *Coord. Chem. Rev.* 251 (13–14), 2007, 1707.

37. F. Dumoulin, M. Durmuş, V. Ahsen, T. Nyokong, Coord. Chem. Rev. 254, 2010, 2792-2847.

38. A. C. Tedesco, J.C. Rotta, C. N. Lunardi, Curr. Org. Chem., 7(2), 2003, 187-196.

**39.** A. Wang, R. Zhou, L. Zhou, K. Sun, J. Zhou, S. Wei, J. Jiang, *Chem. Asian J.*, 11, 2016, 3008-13; (6) B. Kiyak, A.A. Esenpinar, M. Balut, *Polyhedron* 90 (18), 2015, 183-187; (B) X.-F.-F. Zhang, X. Li, L. Niu, L. Sun, L. Liu, *J. Fluoresc.* 19, 2009, 947-954; (r) D. Lin, Y. Wang, Q. Zhan, J. Zhou, L. Zhou, S. Wei, *J. Photochem. Photobiol. A.* 315, 2016, 107.

40. A. Zare, M. Mirzaei, M. Rostami, E. Jafari, J. Med. Chem. Sci., 3 (1), 2020, 55-61.

**41.** N. A. Kuznetsova, D. A. Makarov, O. A. Yuzhakova, L. I. Solovieva, O. L. Kaliya, *J. Porphyr. Phthalocyan.*, 14 (11), 2010, 968-974.

42. Ao Wang, Li Gui, Shan Lu, Lin Zhou, Jiahong Zhou, Shaohua We, DYPI, 126, 2016, 239-250.

**43.** (a) Z. Iqbal, A. Lyubimzev, M. Hanack, T. Ziegler, *J. Porphyr. Phthalocyan.*, 18, 2010, 3097-3104; 6) U. Kumru, M.A. Ermeydan, F. Dumoulin, V. Ahsen, *J. Porphyr. Phthalocyan.*, 12, 2008, 1090-1095 ; β) X. Alvares-Mico, M.J.F. Calvete, M. Hanack, T. Ziegler, *Synthesis*, 14, 2007, 2186-2192.

44. Y. Zorlu, M.A. Ermaydan, F. Dumoulin, V. Ahsen, H. Savoie, R.W. Boyle, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 8, 2009, 312-318.

45. P. Maillard, S. Gaspard, J.-L. Guerquin-Kern, M. Momenteau, J. Am. Chem. Soc., 111, 1989, 9125.

**46.** (a) P. P. S. Lee, P.-C. Lo, E. Y. M. Chan, W.-P. Fong, W. H. Ko and D. K. P. Ng, *Tetrahedron Lett.*, 2005, 46, 1551; (б) C.-F. Choi, J.-D. Huang, P.-C. Lo, W. P. Fong and D. K. P. Ng, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, 6, 2173; (β) P.-C. Lo, C. M. H. Chan, J.-Y. Liu, W.-P. Fong and D. K. P. Ng, *J. Med. Chem.*, 2007, 50, 2100.

**47.** Z. Iqbal, N. Masilela, T. Nyokong, A. Lyubimtsev, M. Hanack, T. Ziegler, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 11 (4), 2012, 679-686.

**48.** (a) A. O. Ribeiro, J. P. C. Tome<sup>′</sup>, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tome<sup>′</sup>, J. A. S. Calvaleiro, Y. Iamamoto and T. Torres, *Tetrahedron Lett.*, 47, 2006, 9177-81; (6) X. Alvarez-Mico, M. J. F. Calvete, M. Hanack and T. Ziegler, *Tetrahedron Lett.*, 2006, 47, 3283; (в) X. Alvarez-Mico, M. J. F. Calvete, M. Hanack and T. Ziegler, *Carbohydr. Res.*, 2007, 342, 440.

49. J. L. Sessler, J. Jayawickah, A. Gouloumis, G. Dan Pantos, T. Torres, M. Guldi, *Tetrahedron*, 2006, 62, 2123.
50. M. Ramesh Reddy, N. Shibata, H. Yoshiyama, S. Nakamura, T. Toru, *Synlett.*, 2007, 628-634.

**51.** (a) H. Nandivada, X. Jiang and J. Lahann, *Adv. Mater.*, 2007, 19, 2197; (6) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 40, 2001, 2004; (β) H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Dis. Today*, 8, 2003, 1128.

**52.** (a) M. Meldal and C. W. Tornøe, *Chem. Rev.*, 2008, 108, 2952; (b)Y. Bin, F. Zhao, F. Zhang and R.-J. Wang, *Acta Cryst.*, 64, 2008, 63-71.

53. V. D. Bock, H. Hiemstra and J. H. van Maarseveen, Eur. J. Org. Chem., 2006, 51-61.

**54.** (a) V. O. Rodionov, V. V. Fokin and M. G. Finn, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, 44, 2210; (b) F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless and V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 210; (c) S. Chassaing, A. Sani Souna Sido, A. Alix, M. Kumarraja, P. Pale, J. Sommer, *Chem.–Eur. J.*, 2008, 14, 6713.

**55.** (a) M. Juricek, P. H. J. Kouwer, J. Rehak, J. Sly and A. E. Rowan, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 21; (b) H. Yoshiyama, N. Shibata, T. Sato, S. Nakamura and T. Toru, *Chem Org. Biomol.*, 2008, 6, 4498; (c) Y. Yılmaz, M. Kasım S- ener, I. Erden and U. Avcıata, *Polyhedron*, 2009, 28, 3419.

56. M.K. Kuimova, G. Yahioglu, P. R. Ogilby, J. Am. Chem. Soc., 131(1), 2009, 332–340.

**57.** A. Günsel, M.N. Yaraşir, M. Kandaz, A. Koca, *Polyhedron*, 29(18), 2010, 3394–3404.

**58.** A. Lyubimtsev, Z. Iqbal, G. Crucius, S. Syrbu, E. S. Taraymovich, T. Ziegler, M. Hanack, *J. Porphyr. Phthalocyan.*, 15(1), 2011, 39–46.

**59.** W. Spiller, H. Kliesch, D. Wöhrle, S. Hackbarth, B. Röder, G. Schnurpfeil, *J. Porphyr. Phthalocyan.*, 2(2), 1998, 145–58.

**60.** Kuznetsova NA, Gretsova NS, Kalmykova EA, Makarova EA, Dashkevich SN, Negrimovskii VM, Kaliya OL, Luk'yanets EA. *Rus. J. Gen. Chem.*, 70(1), 2000, 133–140.

61. A. Galstyan, Chem. A Eur. J., (2020). https://doi.org/10.1002/ chem.202002703

62. Sun, Y.-D., Y.-X. Zhu, X. Zhang, H.-R. Jia, Y. Xia, F.-G. Wu, 35(44), 2019, Langmuir, 14324-14331.

63. Albuquerque, H.M.T., C. M. M. Santos, A. M. S. Silva, Molecules, 24 116, 2019, 61-68.

**64.** Jia HR, Zhu YX, Chen Z, Wu FG., ACS Appl. Mater Interfaces, 9 (19), 2017, 15943-15951.

**65.** Girotti, A.W., *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 63, 2001, 103-113; (b) Girotti, A.W., W. Korytowski, In: Methods in Enzymology, Academic Press, Vol. 319, 2000, 85-100.

66. Girotti, A. W. and W. Korytowski, *Photochem. Photobiol.*, 95, 2019, 73-82.

**67.** Khan, E.H., H. Ali, H. Tian, J. Rousseau, G. Tessier, Shafiullah, J. E. van Lier, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 2003, 1287-1290; (6) Zhao, Y., J.-W. Ying, Q. Sun, M.-R. Ke, B.-Y. Zheng, J.-D. Huang, *Dyes Pigments*, 172, 2020, 107834; (B) Segalla, A., C. Milanesi, G. Jori, H.-G. Capraro, U. Isele, K. Schieweck, *Br. J. Cancer*, 69, 1994, 817-825; (r) Novakova, V., P. Zimcik, M. Miletin, K. Kopecky, J. Ivincova, *Tetrahedron Lett.*, 51, 2010, 1016-1018; (д) Zorlu, Y., I. Un, C. Hirel, F. Dumoulin, V. Ahsen, *J. Chem. Crystallogr*. 43, 2013, 636.

68. M. Meldal, C.W. Tornøe, Chem. Rev. 2008, 108, 2952–3015.

69. Dario Pasini, *Molecules*, 2013, 18, 9512-9530.

**70.** B. J. Campo, J. Duchateau, C. R. Ganivet, B. Ballesteros, J. Gilot, M. M. Wienk, et al., *Dalton Trans.*, 2011,40, 3979-88.

71. .Tao Shen, Zhen-liYuan, Hui-junXu, DYPI, 11(1), 1989, 77-80.

72. T. Entradasa, S. Waldron, M. Volk, J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 204, 2020, 111787.

**73.** N. L. Oleinick, A. Antunez, M. E. Clay, B.K. Rither, M. E. Kenney, *Photochem. Photobiol.*, 57, 1993, 242-247.

**74.** J. D. Miller, E. D. Baron, H. Scull, A. Hsia, J. C. Berlin, T. Mc Cormick, V. Colussi, M. E. Kenney, K. D. Cooper, N. L. Oleinick, *Toxicol. Appl. Pharm.*, 224, 2007, 290-299.

**75.** G Roncucci, D. Dei, G. Chiti, L. Fantetti, F. Giuliani, G. Jori, G. M. Rossolini, Antibacterial compositions comprising metal phthalocyanine analogues. patent US 86643282 B2, Monteneli Therapeutics S.R.L., 2013.

76. S. Doron, M. Friedman, M. Falach, E. Sadovnic, H. Zvia, Int. J. Antimicrob Agents, 18, 2001, 575-578.

77. N. Garner, A. Siol, I. Eikls, Chemisrty in Action, #103, 2014, 38-43.

**78.** Zhang GC, Huang JD, Chen YM, Sun JC, Liu H, Nai-sheng, Chen NS, Huang JL, *Guang pu xue yu Guang pu fen xi = Guang pu*, 01 Oct 2005, 25(10):1622-1626.

79. M. K. Lowery, A. J. Starshak, J. N. Esposito, P. C. Krueger, M. E. Kenney, Inorg Chem., 4, 1965, 128-132.

80. D. Maree, T. Nyokong, K. Suhling, D. Phillips, J. Porphyr. Phthalocyan. 6, 2002, 373-376.

81. A. Ogunsipe, J-Y. Chen, T. Nyokong, New J. Chem. 28, 2004, 822-827.

82. J. A. Lacey, D. Phillips, Photochem. Photobiol. Sci., 1, 2002, 378-383.

**83.** I. Seotsanyana-Mokhosi, N. Kuznetsova, T. Nyokong, J Photochem Photobiol A, 140, 2001, 215-222.

84. N. A. Kuznetsova, O. L. Kaliya, J. Porphyr. Phthaloc., 16(07-08), 2012, 705-712.

**85.** A. Markowska-Szczupak, K. Ulfig, A. W. Morawski, *Catalysis Today* 169, 2011, 249-257; (6) M. Heinlaan, A. Ivask, I. Blinova, H.-Ch. Dubourguier, A. Kahru,, *Chemosphere*, 71, 2008, 1308-1316; (β) T. Matsunaga, *J.* 

Antibact. Antifung. Agents, 13, 1985, 211-220; (r) J. H. Carey, B. G. Oliver, Pol. Res. J. Can. 15(2), 1980, 157-185.

86. M. N. Cheng, B. Jin, C. W, K. Chow, C. Saint, Wat. Res. 44(10), 2010, 2997-3027.

87. A. G. Rincon, C. Pulgarin, Appl. Catal. B. 49(2), 2000, 99-112.

88. H. A. Foster, I. B. Ditta, S. Varghese, et al. Appl. Microbiol. Biotechnol., 90, 2011, 1847-1868.

**89.** V. Mantareva, I. Angelov, V. Kussovski, Sl. Dimitrov, In: Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances in Microbiology", A. Mendez-Vilas (Ed.) Formatex Research Center, 2011, Vol. 1, ISBN (13): 978-84-939843-1-1, pp. 650-661.

90. S. Ghosh, K. A. Carter, J. F. Lovell, *Biomaterials*, 218, 2019, 119341.

**91.** A. M. Garcia, E. Alarcon, M. Muñoz, J. C. Scaiano, A. M. Edwardsa, E. Lissi, *Photochem. Photobiol.* Sci., 10, 2011, 507-514.

92. A. V. Yakimansky, T. K. Meleshko, D. M. Ilgach, M. A. Bauman, T. D. Ananeva, L. G. Klapshina, S. A. Lermontova, I. V. Balalaeva, W. E. Douglas, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 51(20), 2013, 4267-4281; (6)
N. Y. Shilyagina, N. N. Peskova, S. A. Lermontova, A. A. Brilkina, V. A. Vodeneev, A. V. Yakimansky, L. G. Klapshina, I. V. Balalaeva, *J. Biophotonics* 10(9), 2017, 1189-1197.

**93.** G. Jori, C. Fabris, M. Soncin, S. Ferro, O. Coppellotti, D. Dei, L. Fantetti, G. Chiti, G. Roncucci, *Las. in Surg.* & *Med.*, 38(6), 2006, 468–481.

**94.** T. Maisch, J. Baier, B. Franz, M. Maier, M. Landthaler, R.-M. Szeimies, M. Baeumler, *Proceed. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 104(17), 2007, 7223-7228.

**95.** Minnock, A; Vernon, ID; Schofield, J; Griffiths, J; Parish, HJ; Brown, BS., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000 44, 522–527.

**96.** V. Kussovski, V. Mantareva, I. Angelov, P. Orozova, D. Wöhrle, G. Schnurpfeil, E. Borisova, L. Avramov, *FEMS Microbiol Lett.*, 294, 2009, 133-140; (6) V. Kussovski, V. Mantareva, I. Angelov, L. Avramov, E. Popova, Sl. Dimitrov, In: Popp J, Drexler W, Tuchin VV, Matthews DL (Eds.), Progress in Biomed. Optics and Imaging - Proc. SPIE, Int.Soc.Opt.Eng., 2012 8427, 84273X-1-10.

97. O. L. Osifeco, M. Durmuş, T. Nyokong, J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 301, 2015, 47–54.

**98.** A. S. Garcez, M. S. Ribeiro, G. P. Tegos, Nunez, A. O. Jorge, M. R. Hamblin, *Las Surg. Med.*, 39, 2007, 59-66.

99. M. C. Teichert, J. W. Jones, M. N. Usacheva, M. A. Biel, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.,
93, 2002, 155-160; (б) G. D. M. Ewerton, A. C. Pavarina, L. N. Dovigo, C. E. Vergani, C. A. Souza, C. Kurachi, V.
S. Bagnato, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 109(3), 2010, 392-401.

**100.** T. N. Demidova, M. R. Hamblin, *Antimicrob. Agents Chem.*, 49, 2005, 2329–2335.

**101.** S. Jayawardena, Image Based Automatic Vehicle Damage Detection, PhD thesis, Nov. 2013.

**102.** S. Rywkin, L. Lenny, J. Goldstein, N. E. Geacintov, H. Margolis-Nunno, B. Horowitz, *Photochem. Photobiol.*, 56, 1992, 463–469.

**103.** L. L. Trannoy, F.G. Terpstra, D. De Korte, J. W. Lagerberg, A. J. Verhoeven, A. Brand, et al., *Vox Sang*, 91, 2006, 111–118.

104. Z. Smetana, E. Mendelson, J. Manor, J. E. Van Lier, E. Ben-Hur, S. Salzberg, et al., *J. Photochem. Photob*iol. *B.*, 22, 1994, 37–43.

**105.** M. Wainwright, Photoinactivation of viruses. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 2004, 406–411.

**106.** (a) L. Costa, M. A. Faustino, M. G. Neves, A. Cunha, A. Almeida, *Viruses*, 4, 2012, 1034-1074; (6) L. Costa, J. P. C. Tome, M. G. P. Neves, A. C. Tome, J. A. S. Cavaleiro, A. Cunha, A. F. Faustino, A. Almeida, *Photochem. Photobiol. Sci.* 11, 2012, 1520–1523.

**107.** E. Ben-Hur, W. S. Chan, Z. Yim, M. M. Zuk, V. Dayal, N. Roth, E. Heldman, A. Lazo, C. R. Valeri, B. Horowitz, Dev. Biol. Stan. 102, 2000, 149–155.

**108.** C. P. Sabino, A. R. Ball, M. S. Baptista, T. Dai, M. R. Hamblin, M. S. Ribeiro, A. L. Santos, F. P. Sellera, G. P. Tegos, M. Wainwright, *J. Photochem. Photobiol. B*, 2020, 10.1016/j.jphotobiol.2020. 111999.

**109.** V. A. Svyatchenko, S. D. Nikonov, A. P. Mayorov, M. L. Gelfond, V. B. Loktev, *Photodiag. Photodyn. Ther.*, 2020.

# **IV. ПРИНОСИ**

**1.** Получени са нови фталоцианинови производни, като комплекси с традиционни йони за фотосенсибилизатори като *цинк* и *силиций*, както и на не изучени за тези цели комплекси на *лутеций*, *калай*, *паладий и никел*.

#### 1.1. Спрямо координирания метален йон:

- комплексите на *лутеций, калай, паладий и никел* с пиридилокси групи, разположени в периферни и непериферни позиции на пръстената молекула и след кватернизиране метилпиридилокси групи за хидрофилните катионни производни, като нови са общо **16** съединения.

1.2. Спрямо заместителите, получените нови съединения са 24 производни, които са комплекси на цинк и силиций и с функционални групи, както следва:

- на аминокиселините тирозин, фенилаланин, аргинин и лизин;
- на въглехидратите галактоза (галактопираноза);
- със стерола местранол (естрадиол);
- с инхибитори като метил-, етил-, пропил- и бутил парабени.

#### 1.3. Хибридни структури с титанов диоксид и с полимери (2 вида).

2. Разработени са оригинални синтетични схеми на базата на добре изучени химични реакции, с предложени нови реакционни условия за получаване на целевите структури на новите комплекси, както и на биоконюгатите на фталоцианинови комплекси на цинка със следните молекулни групи като заместители:

1) с аминокиселини, свързани през аминофенокси група чрез амидна връзка;

2) с въглехидрати и парабени, чрез директно свързване с етерна връзка;

3) с въглехидрати и стероли, свързани през азидоетокси група *триазолен* пръстен.

Синтетичната схема на получаване включва следните подходи:

 чрез свързване на биологично-активната молекула като функционална група към фталонитрила на 3- или 4- позиция и следваща циклотетрамеризация до фталоцианин;

 чрез свързване към възможните периферни (четири и осем) и непериферни само четири позиции (поради пространствено запречване) на пръстената фталоцианинова молекула;  чрез нуклеофилно заместване при силициевия йон на комплекса Cl<sub>2</sub>Si(IV) – фталоцианин с хромофорни "обемни" групи и други с доказани антибактерицидни свойства.

- 3. Изучени са основни оптични физикохимични свойства на новите фталоцианинови производни с оригинална опитна установка, разработена за експериментални изследвания в светлинния спектър на фталоцианинови съединения. Получените стойности на основните фотофизични (на абсорбция и флуоресценция) и фотохимични (генериране на синглетен кислород и за фотостабилност) свойства доказват потенциала на разработените нови фотосенсибилизатори за биомедицински приложения с фотодинамичен метод.
- 4. Разработен е метод за фармакокинетични изследвания на базата на химична екстракция и измерване на интензивността на флуоресцентния сигнал с количествено определяне на натрупването, задържането и изчистването за фталоцианинови съединения. Методът е приложим, поради типичната флуоресценция (> 680 nm) за фталоцианини, която не се припокрива с нативната на клетъчните хромофори. Доказано е относително високо натрупване при резистентни и мултирезистентни Грам (+) и Грам (-) патогенни бактерии, и за фунгален щам на *Candida albicans*, както и при патогенни биофилми. Доказана е селективност на натрупване, с количествено нарастване без преразпределение в клетъчните мембрани при спектър на облъчване 365 nm и 635 nm за галактозилирани Zn(II) -фталоцианини.
- 5. Разработени са протоколи за (*in vitro*) фотобиологични изследвания с патогенни микроорганизми, както и за туморни клетъчни линии, които са на базата на стандартна процедура и с нов етап на светлинно облъчване. Определени са допустимия концентрационен диапазон за изследване на фталоцианини (0.1 - 20 µМ), на допустимите за прилагане лъчеви дози (12 - 60 J.cm<sup>-2</sup>) и оптимална енергия на облъчване (50 - 100 mW.cm<sup>-2</sup>) без термичен или друг ефект от светлината, като получените резултати са достоверни и възпроизводими. Разработената методика е приложима u 3*a* изследвания фотодинамичната ефективност на други фотосенсибилизатори и за други патогенни микроорганизми за определяне на ефективността на инактивиране по фотоцитотоксичен ефект.

# ОБОБЩЕНИ РЕЗУЛТАТИ ЗА ФТАЛОЦИАНИНОВИ ДЕРИВАТИ, ПОКАЗАЛИ ОПТИМАЛНИ ФИЗИКОХИМИЧНИ СВОЙСТВА И ФДТ-ЕФЕКТИВНОСТ.

MPcs	Abs.	Fl.	τ <sub>fl</sub>	ф <sub>fl</sub>	ф∆	Conc. range for
(DMSO)	λ <sub>max</sub> , nm	λ <sub>max</sub> , nm				phototoxic
						effect of log 3
Lu(III)Pc, 3a	685	721	2.24	0.012	0.35	10 - 20 μM
Sn(IV)Pc, 6a	681	707	1.86	0.09	0.43	5 - 10 μM
Pd(II)Pc, 8a	676	684	3.14	0.16	0.68	10 - 12 μM
Si(IV)Pc, Q3	680	685	5.27	0.26	0.18	4 - 8 μM
(PBS)	(688)	(693)	(4.94)	(0.25)	(0.15)	
Si(IV)Pc, 3a	683	690	7.11	0.3	0.47	5 - 10 μM
Si(IV)Pc, 3d	682	690	6.41	0,27	0.48	5 - 10 μM
T-TYR Zn(II)Pc	680	692	2.92	0.12	0.63	5 µM
T-PHE Zn(II)Pc	682	692	2.82	0.07	0.71	5 μΜ
O-ARG Zn(II)Pc	682	692	2.56	0.04	0.40	10 µM
	601	600		0.02	0.57	10
O-LYS Zn(II)PC	681	690	n.a.	0.03	0.57	το μινι
n-Gal Zn(II)Pc	702	707	2.75	0.06	0.49	6 µM
Zn(II)Pc, 8	681	693	3.47	0.08	0.46	n. d.
Zn(II)Pc	671	680	3.99	0.20	0.67	Dark toxicity

# **V.** ПРИЛОЖЕНИЯ

#### 1. Списък на публикациите, като част от дисертационния труд

**1**. Syuleyman, M.; Angelov, I.; Mitrev, Y.; Durmus, M.; **Mantareva\***, **V**., Cationic amino acids linked to Zn(II) phthalocyanines for photodynamic therapy: Synthesis and effects on physicochemical properties, *J. Photochem. Photobiol. A*, 2020, 396, 112555. (**Q1**)

#### Цитати: 2

**2.** Aliosman, M.; Goksel, M.; **Mantareva\***, **V**.; Stoineva, I.; Durmus, M., Tyrosine conjugated zinc(II) phthalocyanine for photodynamic therapy: Synthesis and photophysicochemical properties, *J. Photochem. Photobiol. A*, 2017, 334, 101. (**Q1**)

#### Цитати: 11

**3.**Taskin, G. C.; Durmus, M.; Yuksel, F.; **Mantareva, V.\*\***; Kussovski, V.; Angelov, I.; Atilla, D., Axially paraben substituted silicon(IV) phthalocyanines towards dental pathogen Streptococcus mutans: Synthesis, photophysical, photochemical and in vitro properties, *J.Photochem. Photobiol. A*, 2015, 306, 31-40. (**Q1**)

#### Цитати: 22

**4.** Omeroglu, I.; Kaya, E.N.; Goksel, M.;Kussovski, V.; **Mantareva, V.**; Durmus, M., Axially substituted silicon(IV) phthalocyanine and its quaternized derivative as photosensitizers towards tumor cells and bacterial pathogens, *Bioorg. Med. Chem.*, 2017, 25, 5415. (**Q1**)

#### Цитати: 11

**5.** Aliosman, M.; Angelov, I.; Mitrev, Y.; Iliev, I.; Durmus, M.; **Mantareva\*, V.,** Novel Zn(II) phthalocyanine with tyrosine moieties for photodynamic therapy: Synthesis and comparative study of light-associated properties, *POLYHEDRON*, 2019, 162, 121-128. (Q2) Цитати: **5** 

**6.** Mantareva\*, V.; Durmus, M.; Aliosman, M.; Stoineva, I.; Angelov, I., Lutetium(III) acetate phthalocyanines for photodynamic therapy applications: Synthesis and photophysicochemical properties, *Photodiag. Photodyn. Ther.*, 2016, 14, 98-103. (**Q2**)

#### Цитати: 10

**7. Mantareva\*, V**.; Kussovski, V.; Durmus, M.; Borisova, E.; Angelov, I., Photodynamic inactivation of pathogenic species Pseudomonas aeruginosa and Candida albicans with lutetium (III) acetate phthalocyanines and specific light irradiation, *Lasers Med. Sci.* 2016, 31, 1591-1600. (**Q2**)

#### Цитати: 9

**8.** Mantareva\*, V.; Gol, C.; Kussovski, V.; Durmus, M.; Angelov, I. Impact of watersoluble zwitterionic Zn(II) phthalocyanines against pathogenic bacteria, *Z. Naturforsch. C*, 2019, 74(7-8), 183-191. (Q3)

#### Цитати: 3

**9.** Omeroglu, I.; Goksel, M.; Kussovski, V.; **Mantareva\***, **V**.; Durmus, M., Novel Water-Soluble Silicon(IV) Phthalocyanines for Photodynamic Therapy and Antimicrobial Inactivations, *Macroheterocycles*, 2020, 12(3), 255-264. (**Q3**)

#### Цитати: 5

**10.** Kussovski, V.; **Mantareva\***, V.; Durmus, M.; Angelov, I., Quaternized Zn(II) phthalocyanines for photodynamic strategy against resistant periodontal bacteria, *Z. Naturforsch. C*, 2018, 73(5-6), 221-228. (Q3)

#### Цитати: 5

 Remichkova, M.; Mukova, L.; Nikolaeva-Glomb, L.; Nikolova, N.; Doumanova, L.; Mantareva, V.; Angelov, I.; Kussovski, V.; Galabov, A.S., Virus inactivation under the photodynamic effect of phthalocyanine zinc(II) complexes, Z. Naturforsch. C, 2017, 72(3-4), 123-129. (Q3)

## Цитати: 9

 Nikolaeva-Glomb,L.; Mukova,L.; Nikolova,N.; Kussovski,V.; Doumanova,L.; Mantareva, V.; Angelov,I.; Wohrle,D.; Galabov, A.S., Photodynamic Effect of some Phthalocyanines on Enveloped and Naked Viruses, *Acta Virologica*, 2017, 61, 341-346. (Q3)

#### Цитати: 7

**13.** Angelov, I.; Kril, A.; Dimitrov, R.; Borisova, E.; Avramov, L.; **Mantareva, V.**, Light enhancement of in vitro antitumor activity of galactosylated phthalocyanines. *Photonics & Lasers in Medicine*, 5, De Gruyter, 2016, 1-18. (**Q3**)

#### Цитати: 2

14. Mantareva\*, V.; Eneva, I.; Kussovski, V.; Borisova, E.; Angelov, I., Antimicrobial photodisinfection with Zn(II) phthalocyanine adsorbed on TiO2 upon UVA and red irradiation, *Proc. of SPIE*, 9447, 2015, 94470W1-9. (SJR)

#### Цитати: 2

 Semyachkina-Glushkovskaya, O.; Kurths, J.; Borisova, E; Sokolovski, S.; Mantareva, V.; Angelov, I.; Shirokov, A.; Novolokin, N.; Shushunova, N.; Khorovodov, A.; Ulanova, M.; Sagatova, M.; Agranovich, I.; Sindeeva, O.; Gekalyuk, A.; Bodrova, A.; Rafailov, E., Photodynamic opening of blood-brain barrier, *Biomed. Opt. Express*, 2017, 8(11), 5040-5048. (Q1)

#### Цитати: 17

16. Semyachkina-Glushkovskaya, O.; Borisova, E.; Mantareva, V.; Angelov, I.; Eneva, I.; Terskov, A.; Mamedova, A.; Shirokov, A.; Khorovodov, A.; Klimova, M.; Agranovich, I.; Blohina, I.;Lezhnev, N.;Kurths, J., Photodynamic Opening of the Blood–Brain Barrier Using Different Photosensitizers in Mice, *Appl. Sciences*, 2020, 10 (33), 1-12. (Q1)

#### Цитати: 3

17. Eneva, I.; Aliosman, M.; Angelov, I.; Popov, K.; Mantareva\*, V., Mono-ring phthalocyanine complexes of large ions Lu<sup>3+</sup> and Sn<sup>4+</sup>: synthesis and comparison of photophysical properties, *Bulg. Chem. Comm.*, Special Issue D, 2017, 246-252. (Q4)

#### Цитати: 1

 Borisova, E.; Genova, Ts.; Yakimanski, A.; Mantareva, V.; Angelov, I.; Gisbrecht, A.; Khorovodov, Al.; Agranovich, I.; Klimova, M.; Semyachkina-Glushkovskaya, O., Conjugation of Zn (II) phthalocyanine with polymeric brushes for improved photodiagnostics and photodynamic therapy, *Proc. SPIE*, 11457, 2020, 114570R (SJR)

- **19.** Mantareva\*, V.; Aliosman, M.; Durmus, M.; Angelov, I., Amino acids substituted phthalocyanine complexes: an overview on the synthetic approaches and UV-vis properties related to photodynamic applications *Bulg. Chem. Comm.*, Special Issue J, 50, 2018, 185-192. (Q4)
- 20. Aliosman, M.; Eneva, I.Z.; Stoineva, I.B.; Durmus, M.; Mantareva, V., Aminophenoxy-substituted zinc(II) phthalocyanines as basic photosensitizers for conjugation with biologically active moieties via amide bond, *Bulg. Chem. Comm.*, Special Issue E, 2017, 79-85. (Q4)
- **21. Mantareva\*, V.**; Kussovski, V.; Angelov, I., Cationic Metal Phthalocyanines as Effective Photosensitizers towards Pathogenic Microorganisms. In: *Photosensitizers: Types, Uses and Selected Research, Series: Chemistry Research and Applications*, Cody Whitmire (ed.), 2016, (24 pages). (Book Chapter)

## 2. Информация за цитирания

Съгласно попълненото в "Sonix.bas.bg/bg": **128** цитати на публикации включени в дисертационния труд към април. 2021 г..

# 3. Списък на научни проекти

**Проект 1:** Договор по конкурс «Фундаментални научни изследвания» с ФНИ, КП-06-H29/11, 18.12.2018 г. на тема: "Фталоцианинови фотосенсибилизатори срещу микробната резистентност"; р-л: доц. Ваня Мантарева; Период: 2018 г. – 2022 г.

**Проект 2**: Проект по спогодба за двустранни сътрудничества БАН – ТUBITAK, Турция на тема: "Водоразтворими силициеви фталоцианини за флуоресцентната диагностика и ФДТ"; р-л: доц. Ваня Мантарева; Период: 2013 г. – 2016 г.

**Проект** 3: С договор **B02/9/2014** на Фонд «Научни изследвания» по конкурс «Фундаментални научни изследвания» на ИЕ-БАН с организация-партньор: ИОХЦФ-БАН «Център по Биофотоника»; р-л: проф. дн Лъчезар Аврамов; Период: **2014 г.- 2017 г.** 

**Проект 4:** Договор по конкурс «Фундаментални научни изследвания» с ФНИ **КП-06-H26/11** на тема: "Иновативни фотодинамични методи за въздействие върху стволови клетки, култивирани от глиобластомни тумори УМБАЛ " Св. Иван Рилски", р-л: доц. Красимир Минкин; Период: **2018 г. – 2022 г.** 

**Проект 5**: С договор на Фонд «Научни изследвания», по конкурс «Фундаментални научни изследвания» с БО: ИЕ-БАН, на тема: «Център по Биофотоника - II»; р-л: проф. дн Лъчезар Аврамов; Период: **2019 г. – 2022 г.** 

## 4. Списък на лично участие в научни мероприятия

- <u>Vanya Mantareva</u>, Yavor Mitrev, Mahmut Durmus, Ivan Angelov, Veselin Kussovski, Bioconjugates of phthalocyanine complexes with steroid moieties towards pathogens, *Eight International Conference on Radiation in Various Fields of Research* (RAD-8), 20-24 July, 2020, virtual conference.
- 2. <u>Vanya Mantareva</u>, Ivan Angelov, Adriana Slavova-Kazakova, Ekaterina Borisova, Mahmut Durmus, Aleksandar Gisbrecht, Vesselin Kussovski, BIOCONJUGATES OF PHTHALOCYANINE WITH STEROID UNITS FOR PHOTODYNAMIC THERAPY, *XXI*

International Conference and School on Quantum Electronics: "Laser Physics and Applications", 21-24. Sept., 2020, virtual meeting.

- <u>V. Mantareva</u>, Aliosman, M., Angelov, I., Mitrev, Y., Kussovski, V., Durmus, M., Gisbrecht, A., Biologically active phthalocyanines for target-specific Antimicrobial PDT (Доклад) - 17th International Congress on Photobiology 18th Congress of the European Society for Photobiology, 25-30.08.2019, Barcelona, Spain.
- V. Mantareva, Aliosman, M., Angelov, I., Durmush, M., Kussovski, V.. Impact of substituents to phthalocyanines for targeted antimicrobial PDT, *The 4th GTU Photodynamic Day*, Istanbul, Turkey, 24-25.04.2019.
- <u>V. Mantareva</u>, Kussovski, V., Gisbrecht, A., Najdenski, H., Orozova, P., Antimicrobial Photodynamic Therapy for Control of Farm Fishes Pathogens (Ποcrep), *17th International Congress on Photobiology 18th Congress of the European Society for Photobiology*, 25-30.08.2019, Barcelona, Spain.
- <u>V. Mantareva</u>, Slavova-Kazakova, A., Aliosman, M., Mitrev, Y., Durmus, M., Angelov, I., PHOTOOXIDATION OF CHOLESTEROL via PHOTODYNAMIC ACTION OF PHTHALOCYANINE COMPLEXES AND LIGHT (Постер) - [17.09.2019], 3rd International Conference on Bio-antioxidants (BIO-ANTIOXIDANTS 2019, Nessebar, Bilgaria, 17.09.2019 - 21.09.2019.
- <u>Vanya Mantareva</u>, Cem Gol, Vesselin Kussovski, Mahmut Durmuş, Ivan Angelov Impact of water-soluble zwitterionic Zn(II) phthalocyanines against pathogenic bacteria, (Доклад) 3<sup>rd</sup> GTU Photodynamic Day, 09, May, 2018, Gebze, Turkey.
- 8. <u>V. Mantareva</u>, I. Angelov, A. Yakimanski, I. Eneva, E. Borisova, Phthalocyanine-conjugates with polymeric brushes for photodynamic therapy applications, *17<sup>th</sup> Congress European Society for Photobiology*, 04-08. Sept. 2017, Pisa, Italy.
- M. Aliosman, M. Durmus, I. Angelov, <u>V. Mantareva</u>, Zn(II) phthalocyanines functionalized with amino acids for PDT applications, *17<sup>th</sup> Congress European Society for Photobiology*, 04-08.Sept. 2017, Pisa, Italy.
- <u>V. Mantareva</u>, I. Angelov, M. Aliosman, I. Soineva, V. Kussovski, An overview on the impact of cationic phthalocyanine complexes for inactivation of drug-resistant microorganisms, *PDT and PD UPDATE*; 24-28. Oct. 2016, Nancy, France.
- M. Aliosman, V. Kussovski, I. Stoineva, I. Angelov, M. Durmus, <u>V. Mantareva</u>, Lutetium (III) acetate phthalocyanines and LED 660 nm irradiation for effective inactivation of MRSA, 19<sup>th</sup> Int. Conference and School on Quantum Electronics, 26-30. Sept. 2016, Sozopol, Bulgaria.
- I. Eneva, <u>V. Mantareva</u>, E. Borisova, V. Kussovski, L. Avramov, I. Angelov, TiO2 and ZnOconjugated phthalocyanines: nanoparticals for inactivation of wastewater bacterial strains, 19<sup>th</sup> Int. Conference and School on Quantum Electronics, 26-30. Sept. 2016, Sozopol, Bulgaria.

#### 5. Други

Научен ръководител на защитил редовен докторант: Ас. Мелиха Бахри Алиосман (Сюлейман) – зачислена на 01.01.2014 г. със заповед № РД-09-12/ 30.01.2014 г.; Защита в срок на 19.07.2019 г. със заповед № РД-09-103/ 08.05.2019 г., с диплома за ОНС "Доктор".
## БЕЛЕЖКИ