

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Syntéza derivátů flavonolu jako molekul uvolňujících oxid uhelnatý pomocí světla

**Vojtěch Orel
Jihomoravský kraj**

Brno, 2018

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

**Syntéza derivátů flavonolu jako molekul
uvolňujících oxid uhelnatý pomocí světla**

**Synthesis of flavonol derivatives as a carbon
monoxide photoreleasing molecules**

Autor: Vojtěch Orel
Škola: Gymnázium Brno, Vídeňská, příspěvková organizace,
Vídeňská 55/47, 639 00 Brno
Kraj: Jihomoravský kraj
Konzultanti: Mgr. Peter Štacko, Ph.D.
prof. RNDr. Petr Klán, Ph.D.
RNDr. Radka Kočí Voznicová, Ph.D.

Brno, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně a použil jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 10. 2. 2019

Vojtěch Orel

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat Mgr. Petru Štackovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, podporu, pomoc v laboratoři a nesmírné množství věnovaného času a úsilí. Velký dík patří prof. RNDr. Petru Klánovi, Ph.D. za umožnění vědecké práce v laboratořích organické fotochemie na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity, za možnost pracovat v jeho výzkumné skupině a za podnětné rady a připomínky k práci.

Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Miroslavě Bittové, Ph.D. za měření hmotnostní spektroskopie, Mgr. Štěpánu Havlovi za pomoc při měření NMR spekter a Mgr. Petře Valáškové za změření cytotoxicity látek. Za možnost uskutečnit biologické experimenty děkuji prof. MUDr. Liboru Vítkovi, Ph.D. a MUDr. Lucii Muchové, Ph.D. z 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

V neposlední řadě děkuji Mgr. Lence Filipové za korekturu práce a rady k této práci. Také děkuji rodině za trpělivost a podporu během práce.

Anotace

Cílem této práce je návrh a syntéza nových derivátů flavonolu za účelem studia fotochemického mechanismu uvolňování oxidu uhelnatého (CO) z těchto molekul. Tyto látky mají velký farmaceutický potenciál, neboť oxid uhelnatý je v živočišných buňkách důležitou signální molekulou, která dokáže regulovat mnohé vnitrobuněčné pochody (viz 2.1.3).

V teoretické části práce je obsažen popis molekuly CO a její role v živých organismech. Dále je zde charakterizován význam CO pro živé organismy. Následně je zpracován přehled molekul uvolňujících CO (*CO releasing molecules*, CORM), kterých bylo popsáno v literatuře velké množství, ale většina z nich jen těžko splňuje atributy potřebné k *in vivo* aplikaci. V části práce je zpracován i souhrn molekul uvolňujících CO fotochemicky (foto-CORMy), kde se mimo jiné také pojednává o flavonolech (součást skupiny flavonoidů), které se v posledních letech staly inspirací pro vývoj nové třídy foto-CORMů, kterým je věnována experimentální část. Fotochemické uvolňování CO nabízí slibné možnosti, například při léčbě rakoviny.

V experimentální části práce je primárním cílem syntéza nových derivátů flavonolu za účelem studia mechanismu fotochemického uvolňování CO. Pochopení mechanismu je klíčovým krokem pro návrh nových derivátů s vylepšenými vlastnostmi (zejména rozpustnost, posunutí absorpce k vyšším vlnovým délkám) pro biologické aplikace.

V práci je popsána syntéza doposud neznámých derivátů, které byly charakterizovány pomocí nukleární magnetické rezonance a hmotnostní spektroskopie (^1H NMR a ^{13}C NMR, HRMS). Tyto deriváty byly studovány pomocí UV-Vis spektroskopie a jejich schopnost fotochemicky uvolňovat CO byla studována pomocí plynové chromatografie (GC). Také byla stanovena cytotoxicita vybraných derivátů a jejich aplikace *in vitro* monitorována pomocí fluorescenční mikroskopie.

Annotation

The aim of this work was design and synthesis of new derivatives of flavonol that photochemically release carbon monoxide (CO). These derivatives may possess promising therapeutical properties because CO serves as a signalling molecule in many animal cells, regulating their functions.

The theoretical part of this work contains the description of CO molecule and its role and importance in both animals and plants. Numerous CO-releasing molecules have been described in the literature, however, not all of them are suitable for *in vivo* applications. In the next part, naturally occurring flavonol compounds (part of the flavone family) are discussed. These compounds have recently become a great inspiration for the development of a new class of photoCORMs, which are also the aim of this work. Photocontrolled release of CO offers novel and promising options of cancer treatment.

The experimental part describes the synthesis of new derivatives of flavonol for the purpose of studying the mechanism of photochemical CO release. Understanding the mechanism is a crucial step for designing new derivatives with improved properties for biological applications, such as better aqueous solubility and shifting the optical absorption to higher wavelengths.

Most of the compounds have been prepared for the first time, and they were characterized using nuclear magnetic resonance and mass spectroscopies (^1H NMR and ^{13}C NMR, HRMS). The photochemical behavior of the derivatives was studied by UV-Vis spectroscopy, and their ability to release CO was analyzed by gas chromatography (GC-headspace). In addition, cytotoxicity was determined and the photolysis was monitored *in vitro* by fluorescence microscopy.

Klíčová slova

Flavonoly, oxid uhelnatý (CO), fotochemie, absorpce, uvolňování CO, viditelné spektrum

Keywords

Flavonols, carbon monoxide, photochemistry, absorption, CO release, visible wave spectrum

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část	9
2.1	Oxid uhelnatý	9
2.1.1	Hemoglobin	9
2.1.2	Přirozený výskyt oxidu uhelnatého v lidském těle	10
2.1.3	Význam a účinky oxidu uhelnatého.....	11
2.1.4	Léčba rakoviny pomocí molekul uvolňujících CO.....	12
2.1.5	Transport oxidu uhelnatého	12
2.2	Molekuly uvolňující oxid uhelnatý – CORMy	13
2.2.1	Komplexy přechodných kovů uvolňující oxid uhelnatý pomocí světla	15
2.2.2	Nekovové molekuly uvolňující oxid uhelnatý pomocí světla	16
2.2.3	α -Hydroxyketony	19
2.2.4	Známé deriváty flavonolu	22
2.2.5	Flavonoidy	25
2.2.6	Propustnost tkání pro světlo.....	26
3	Výsledky a diskuse	28
3.1	Navržené deriváty flavonolu	28
3.2	Retrosyntetická analýza	30
3.3	Reakční mechanismus kondenzace	31
3.4	Syntéza derivátů	32
3.5	Absorpční a kinetická charakteristika nových derivátů	38
3.6	Ozařování připravených derivátů	39
3.7	Uvolňování oxidu uhelnatého	42
3.8	Fluorescenční mikroskopie	43
3.9	Cytotoxicita připravených derivátů.....	45
4	Experimentální část.....	46
4.1	Metodika	46
4.2	Příprava derivátů flavonolu.....	48
5	Závěr	53
6	Použitá literatura	55
7	Seznam obrázků a tabulek	59
8	Příloha 1: NMR spektra připravených látek	61
9	Příloha 2: Výpočet molárních absorpčních koeficientů.....	75

1 ÚVOD

Oxid uhelnatý (CO) je znám především kvůli svým smrtícím účinkům na lidský organismus, neboť se během dýchání váže na molekuly hemoglobinu (karboxyhemoglobin) silněji než kyslík (oxyhemoglobin) [1].

V jisté míře však v lidském těle molekuly CO vznikají při rozkladu hemoglobinu působením hemoxygenázy a mohou vznikat i při dalších běžných biochemických reakcích v lidském těle, přičemž nejde o oxid uhelnatý ze vzduchu [2].

Během posledních let je této molekule věnována pozornost ve farmaceutickém výzkumu, protože spolu s dalšími signálními molekulami (H₂S, NO) vykazuje silné protizánětlivé účinky a dále dokáže fungovat jako antioxidační činidlo a vazodilatační látka (rožširuje cévy) [3].

Velká výhoda této molekuly je v její velikosti, protože dokáže volně pronikat přes lipidové dvojvrstvy tvořící membrány buněk nebo organel. Vystává tedy otázka, jak doručit molekulu, která má obrovský potenciál ve zdravotnictví, do lidské tkáně a v kontrolované míře ji uvolnit navzdory její akutní toxicitě, která znemožňuje jakoukoli přímou aplikaci do tkání. Výběr přesného místa a času v těle pro uvolňování CO je naprosto klíčové, protože bude následně možné molekuly uvolňující CO použít pro terapeutické aplikace bez jakéhokoli mechanického narušení tkáně („neinvazivní skalpel“).

Přestože molekul, které uvolňují CO („*CO releasing molecules*” – CORMs) fotochemicky, tedy pomocí světla o specifické vlnové délce, je známa celá řada, ne všechny jsou vhodné pro aplikaci *in vivo*, ať už z důvodu obsahu těžkých kovů, pro špatnou rozpustnost či nevhodné absorpční vlastnosti, kde musí být zohledněna absorpce lidské tkáně, která je pro světlo nejvíce propustná mezi 600-900 nm [4].

Cílem práce tedy bylo vytvořit deriváty již známé molekuly flavonolu, fotochemicky uvolňující CO, na kterých bude možno analyticky studovat mechanismus uvolňování molekuly CO. Objasnění mechanismu uvolňování nám umožní navrhovat nové molekuly, které budou splňovat všechny výše uvedené podmínky, včetně nízké toxicity a velkých výtěžků CO.

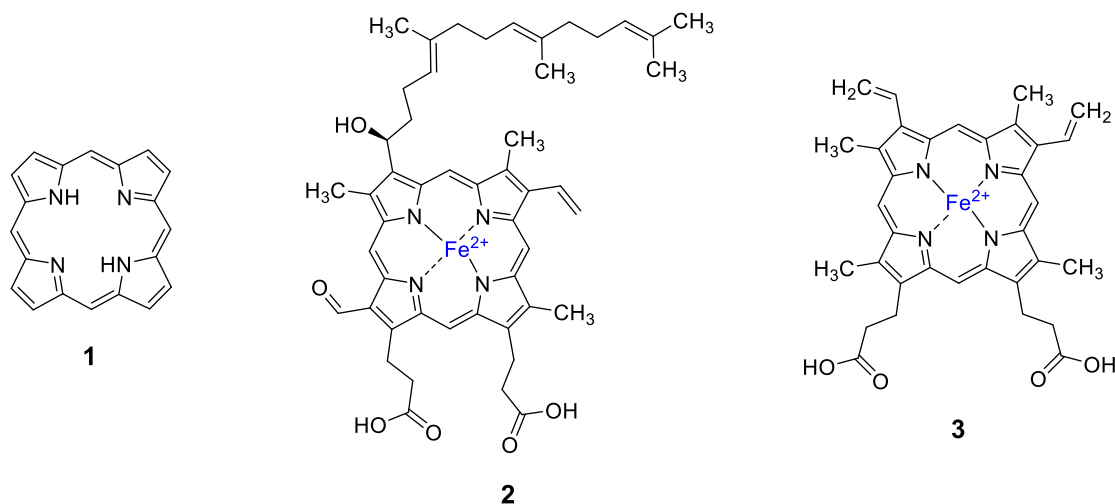
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Oxid uhelnatý

Oxid uhelnatý běžně vzniká například při nedokonalé oxidaci (spalování). Má menší hustotu než vzduch ($1,25 \text{ g/dm}^3$) a vyskytuje se v zemské atmosféře vlivem lidské činnosti, ale třeba i kvůli lesním požárům nebo aktivitě mikroorganismů v oceánech (40–60 % CO v atmosféře vzniká přirozeně) [1]. Na rozdíl od nedýchatelného, ale nikoli toxického oxidu uhličitého, je pro člověka tento plyn při vdechnutí akutně toxický a způsobuje poškození orgánů [5]. Ve vyšších koncentracích je extrémně hořlavý a není možné ho sensoricky identifikovat, protože se jedná o bezbarvý plyn bez zápachu [1].

2.1.1 Hemoglobin

Toxicita CO pro člověka spočívá především v jeho specifické, velmi silné vazbě na *hemoglobin*, konkrétně na centrální kov prostetické skupiny této transportní bílkoviny – *hemu*. V buňkách obratlovců se vyskytuje několik typů hemu (*hem A*, *hem B*, atd.). Molekuly hemu jsou tvořeny porfinovým skeletem (**1**, Obrázek 1) s různými substituenty a koordinačně-kovalentní vazbou vázaným atomem železa v oxidačním stavu Fe^{2+} . Hem A (**2**, Obrázek 1) se vyskytuje v *cytochromech a3* (transportní membránová bílkovina) [6],[7]. V hemoglobinu erythrocytů (červené krvinky) se u dospělých jedinců člověka vyskytuje hem B (**3**, Obrázek 1) [8]. Na centrální atom železa se dokáže dočasně vázat molekula kyslíku O_2 , co je podstatou přenosu kyslíku v krvi [9].



Obrázek 1: Porfinový kruh (**1**), molekula *hemu A* (**2**), *hemu B* (**3**). Převzato z citace: [10].

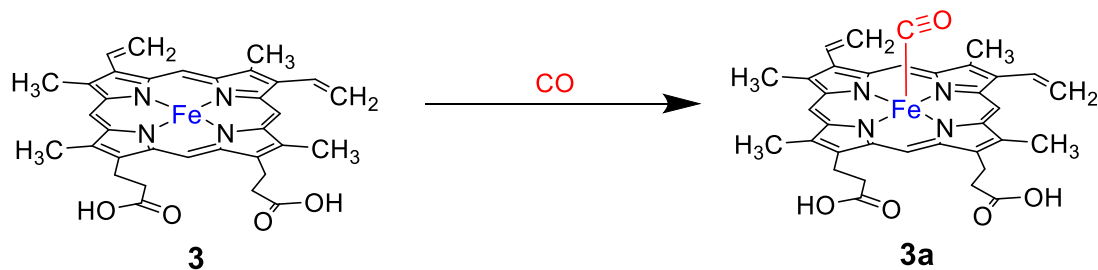


Schéma 1: Navázání CO na centrální atom železa **3** za vzniku **3a**.

Pokud však dojde k navázání molekuly CO (Schéma 1, karboxyhemoglobin **3a**), vznikne vazba mezi kationtem železa a CO, která je mnohonásobně (220×) silnější než vazba s kyslíkem [11],[12]. Dojde tedy k zablokování transportní funkce této bílkoviny, neboť molekula kyslíku není schopna molekulu CO vytlačit [11]. U člověka se tato nemoc nazývá *tkáňová hypoxie*, která se projevuje závratí, bolestí hlavy a apatií [5]. Tato nemoc se léčí zvýšením parciálního tlaku kyslíku v plicích (alveolách), což v praxi znamená vystavit člověka inhalaci čistého kyslíku, avšak při dlouhé expozici CO hrozí nedostatek kyslíku ve tkáních a trvalé neléčitelné poškození nervové soustavy [11].

Přesto si však málokdo uvědomuje, že hemoproteinů je celá řada a blokování přenosu kyslíku je jen jeden z problémů, který CO způsobuje. Při expozici tkání se CO váže na výše zmíněný *cytochrom a3*, který zprostředkovává transport elektronů přes lipidové membrány v mitochondriích a jeho inhibice může způsobit produkci kyslíkových volných radikálů [13]. Peroxidace myelinových obalů neuronů (peroxidace lipidů) má fatální následky a může dojít až k chronickému poškození nervové soustavy [5],[7].

Mimo hemoglobin se však CO dokáže vázat i na myoglobin a znemožnit navázání kyslíku. To může způsobit nedostatek kyslíku (zmenšení zásob O₂) ve svalech. Myoglobin ve svalech je identický jako v myokardu a jeho zablokování molekulou CO může vést k disfunkci srdce a kardiovaskulární soustavy [7].

2.1.2 Přírozený výskyt oxidu uhelnatého v lidském těle

Přestože je tento plyn výše charakterizován jako toxický a jeho delší respirace může způsobit i smrt, vyskytuje se tento plyn v minimálním množství i v lidském těle zcela běžně a denně ho naše tělo vyprodukuje několik mililitrů [14]. CO vzniká působením enzymu *hemoxygenázy* (HO), která zajišťuje rozklad hemoproteinů. Tetramer hemoglobinu je nejdříve rozdělen na jednotlivé monomerní podjednotky a následně dojde k hydrolýze peptidového řetězce. Molekula *hemu* (**3**) je poté působením HO rozložena na Fe²⁺, které následně vstupuje do syntézy ferritinu za katalýzy enzymem *ferroxidásou* [3], CO a biliverdinu-IXa (**4**, Schéma 2). Ten je u člověka dále metabolizován na bilirubin-IXa, který je vylučován v moči (Schéma 2) [2]. Existují celkem tři isomerní formy HO, přičemž na rozkladu hemu erythrocytů se podílí HO-1 [2]. HO-1 je také významnou signální molekulou, která signalizuje extracelulární stres buněk [2].

Oxidu uhelnatého v těle vniká asi 20 $\mu\text{mol/h}$, což je relativně velké množství [13]. Významné množství vznikne rozkladem hemu (> 86 %) a zbytek je produkován jako zbytek po fotooxidaci, peroxidaci lipidů a metabolismu xenobiotik [13],[15].

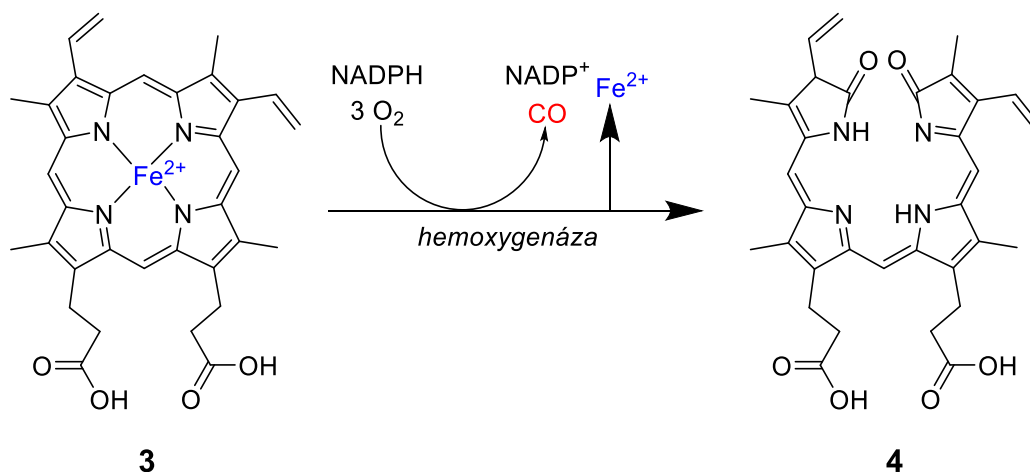


Schéma 2: Rozklad hemoglobinu působením HO. *Převzato z citace:* [2].

Pokud dojde k exogenní expozici, tak se CO, který je do našeho těla vstřebán plicemi, vyskytuje v krvi jako karboxyhemoglobin (COHb). V těle živočichů se COHb vyskytuje ve velmi malém množství přirozeně, krev zdravého člověka obsahuje 0,4–0,7 % COHb [16], tedy vázané formy CO. Koncentrace COHb je vyšší například u těhotných žen, u nichž dochází ke zrychlení metabolických procesů (~1,2 % COHb) [16]. U kuřáků se může množství COHb vůči hemoglobinu (Hb) pohybovat okolo 3,0–8,0 % [16],[5]. Některé zdroje však uvádí u chronických kuřáků i mnohem větší množství [17]. Pro srovnání, symptomy hypoxie jako jsou bolest hlavy a zvracení nastává při obsahu COHb 20 % [1]. Smrt může nastat už při 50–70 % COHb v krvi [1].

2.1.3 Význam a účinky oxidu uhelnatého

Během posledních patnácti let se předmětem mnoha výzkumů stává právě molekula CO. Tato molekula slibuje budoucí uplatnění v medicíně. Pro svou nižší reaktivitu se CO spolu s H_2S jeví jako vhodnější signální molekuly než NO, který je v těle rychle katabolizován [18].¹

Molekula CO v lidském těle zástává několik stěžejních funkcí. CO uvolňuje hladkou svalovinu kardiovaskulárního systému a snižuje riziko některých nemocí kardiovaskulárního systému [15]. Mimo jiné se vlivem inhibice cytochromu P450 molekulou CO může zpomalit syntéza 12-hydroxyeikosatetraenové kyseliny (12-HETE), která je zodpovědná za arteriosklerózu, tedy zužování cév [13].

Oxid uhelnatý také hraje důležitou roli v regulaci nervové soustavy a působí neuroprotektivně. Ukázalo se, že reguluje cirkadiánní rytmus mozku a má vliv na zraková,

¹ Oxid dusnatý (NO), který má jeden nespárovaný elektron a tudíž velkou reaktivitu, se chová se jako volný radikál (vyskytuje se jako NO^+/NO).

sluchová a paměťová centra mozku [19]. Bylo zjištěno, že neurodegenerativní choroby (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba) mohou být následkem špatné či inhibované produkce CO v šedé kůře mozkové [13]. Exogenní CO má možná také důležitou ochrannou roli a dokáže potenciálně uzdravovat nervovou soustavu [13].

Mnohé výzkumy prokázaly, že CO působí protizánětlivě, některé studie dokonce prokázaly, že pomocí CO lze léčit celkovou sepsi organismu [18]. Vlivem CO může docházet i ke zvýšení produkce ATP (adenosintrifosfát), jakožto hlavní makroenergetické molekuly v buňkách [13].

2.1.4 Léčba rakoviny pomocí molekul uvolňujících CO

CORMy (molekuly uvolňující oxid uhelnatý – „*CO releasing molecules*”) se vyvíjejí jako potenciální pro-léčiva proti rakovině. CO, jakožto produkt metabolismu HO-1, může snížit aktivitu proteinu teplotního šoku 90 (HSP90) a snížit aktivitu dalších proteinů stojících za rakovinou prsu [20]. Po ozáření těchto rakovinotvorných buněk (MDA-MB-231) za přítomnosti foto-CORMů $[MnBr(azpy)(CO)_3]$ a $[Mn(azpy)(CO)_3(PPh_3)](ClO_4)$ o koncentraci $75 \mu M$ došlo vlivem uvolnění CO ke zmenšení kolonie asi o 40 % [20].

Při aplikaci molekuly **5** (Obrázek 2) byla prokázána inhibice proliferace buněk PaTu-8902 a při koncentraci $50 \mu M$ byla zaznamenána apoptóza CAPAN-2 rakovinných buněk ve slinivce břišní [21]. Trvalá aplikace **5** nebo přímá aplikace CO v množství 500 ppm vedla ke snížení aktivity proliferovaných buněk [22].

Nedávno byl také demonstrován pozitivní vliv CO při léčbě nádorů [20]. Nádorové buňky používají k získávání energie převážně laktátovou fermentaci glukózy, na rozdíl od oxidativní fosforylace využívané normálními buňkami, a to dokonce i v aerobním prostředí [23]. Tento jev se nazývá Warburgův efekt a je pravděpodobně důsledkem částečně nefunkčních mitochondrií [24]. Ukázalo se, že CO má velký vliv na bioenergetiku rakovinných buněk [23]. Na zdravé buňky CO působí cytoprotektivně a podporuje aerobní glykolýzu, naopak v nádorových buňkách akceleruje oxidativní metabolismus (anti-Warburgův efekt) [25]. Tím dochází ke generování reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), buněčnému vyčerpání z důvodu nedostatku energie a následně smrti nádorové buňky [25].

2.1.5 Transport oxidu uhelnatého

Je zřejmé, že molekula CO má ve zdravotnictví velký potenciál. Problémem je však přímá aplikace inhalací, protože kvůli toxicitě není možné takto CO aplikovat ve velkých koncentracích. Nicméně už byly publikovány výzkumy, kde byl CO aplikován přímo, ale pouze v malých dávkách a nízkých koncentracích (~250–500 ppm, není karcinogenní) [18]. Vystává tedy otázka, jak doručit a uvolnit CO přímo v postižené tkáni (v dostatečné koncentraci) a nikoli tam, kde je to nepotřebné. Z tohoto důvodu byly vyvinuty CORMy, které jsou schopné CO uvolňovat a kontrolovat jejich aktivitu. Těchto molekul byla vyvinuta celá řada a budou přiblíženy v následujících kapitolách.

2.2 Molekuly uvolňující oxid uhelnatý – CORMy

Molekul uvolňujících oxid uhelnatý je ve dnešní době známo relativně velké množství a uvolňování CO může probíhat několika způsoby: enzymatickým rozkladem, volnou výměnou ligandů, protonací nebo indukčním ohřevem [26]. Velmi zajímavou skupinou CORMů jsou ty, které uvolňují CO pomocí světla tzv. foto-CORMy (anglicky “photoactivatable CO-releasing molecules”) [27],[28].

Prvními objevenými CORMy byly jednoduché karbonylové komplexy přechodných kovů rozpustné pouze v organických rozpouštědlech [29]. Tyto molekuly jsou tvořeny centrálním atomem kovu a ligandy kovalentně vázané na centrální atom [30]. Tento typ CORMů však uvolňuje CO mechanismem spontánní výměny ligandů. Mechanismus vychází z interakce CORMu s molekulou rozpouštědla a následné substituce CO ligandu (Schéma 3) [30]. Následkem je nízká kontrola nad farmakokinetickým profilem uvolňování CO. Postupně byly objeveny další CORMy, více vhodné pro biologické použití.

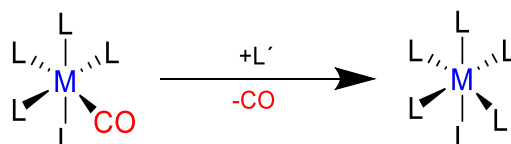
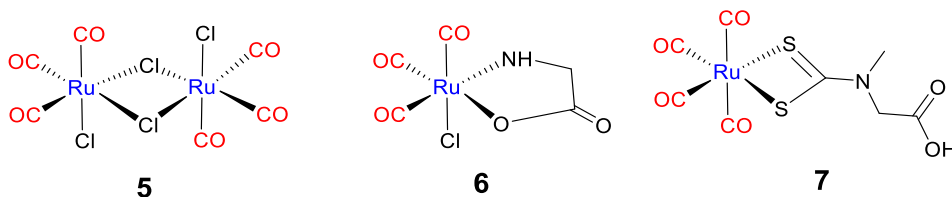


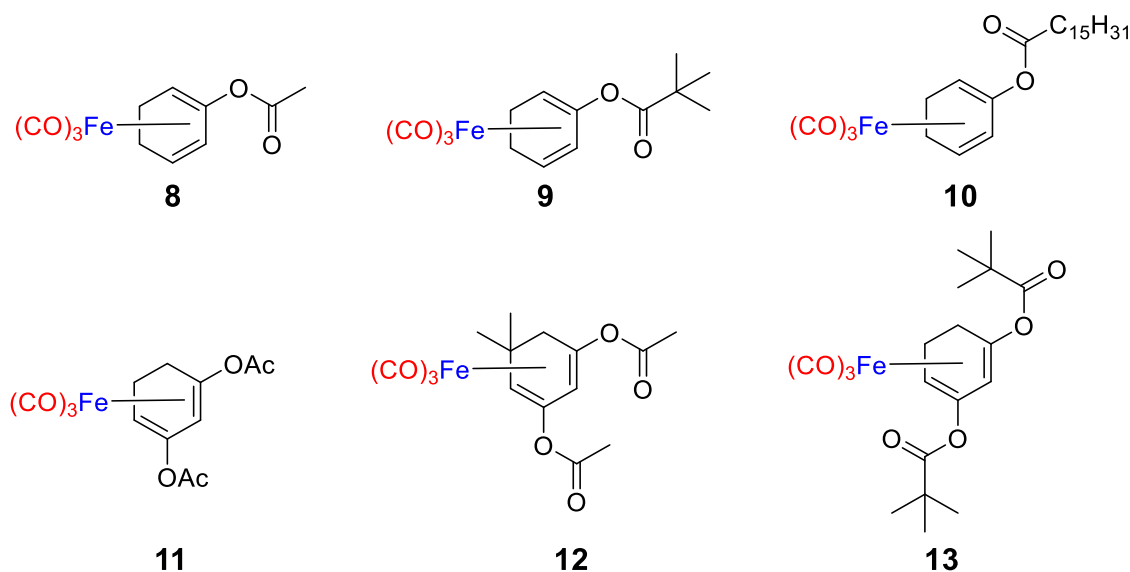
Schéma 3: Mechanismus uvolnění CO prostřednictvím výměny ligandů. *Převzato z citace:* [30].

Mezi další CORMy, u kterých dochází k uvolnění CO prostřednictvím substituce ligandů, patří například molekuly **5**, **6**, **7** (Obrázek 2) [31],[30]. Doručení takovýchto molekul do tkáně však není vůbec jednoduché, například **5** má poločas rozpadu v lidské krevní plasmě ~4 min [14]. Také je rozpustná pouze v bazickém vodném prostředí a rychlost uvolňování CO reguluje změna pH [32]. Molekula **5** je rozpustná pouze v ethanolu (EtOH) a dimethylsulfoxidu (DMSO), tudíž ji nelze v krevní plasmě ani rozpustit, neboť EtOH je pro buňky toxický [32].



Obrázek 2: Příklady CORMů uvolňujících CO substitucí ligandů. *Převzato z citace:* [30].

CO může být uvolněn z molekuly také enzymatickou katalýzou. Příkladem takových molekul mohou být deriváty acyloxydien-Fe(CO)₃, níže uvedené jako **8**, **9**, **10** (Obrázek 3) [29]. Těchto enzymaticky aktivovaných CORMů existuje celá řada a jedná se především o enony (**12**, **13**) a o deriváty cyklohexa-1,3-dienů (Obrázek 3; **8**, **9**, **10**, **11**, **12**, **13**) [29].



Obrázek 3: Přehled enzymaticky řízených CORMů. *Převzato z citace:* [29].

Tyto komplexní sloučeniny (Obrázek 3) se také využívají pro uvolňování CO, ale produkty po uvolnění CO bývají pro buňky často toxické (toxicita klesá podle substituentů acetát > pivalát > palmitát) [29]. Uvolnění CO probíhá ve třech sekvenčních krocích (Schéma 4). Uvolnění acylového zbytku z **8a** je katalyzováno enzymem esterázou a produkt **8b** po katalýze podléhá tautomerizaci za vzniku **8c**. Molekula **8c** se následně oxidačně rozkládá za vzniku **8d**, Fe^{3+} a tří molekul CO, které se následně můžou podílet na biologické aktivitě [27].

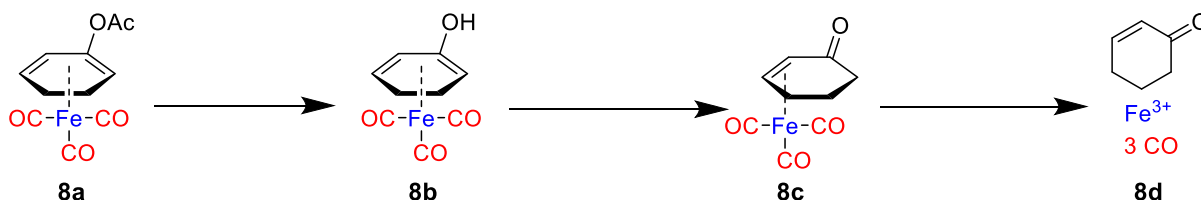


Schéma 4: Průběh uvolnění CO z molekuly **8a**. *Převzato z citace:* [27].

Nevýhodou těchto enzymaticky spouštěných CORMů je jejich špatné sledování *in vivo* a regulace uvolňování, protože nelze vnějšími vlivy regulovat množství uvolněného CO. Tyto molekuly tedy nejsou pro aplikaci *in vivo* zcela vhodné, navíc některé tyto CORMy nejsou také dostatečně stálé ve fyziologickém prostředí a samovolně hydrolyzují [29].

Proto se hledají alternativní metody spuštění uvolňování CO, jako je například fotoaktivace světlem. Foto-CORMy patří mezi pokročilejší CORMy, je jim také věnována experimentální část této práce, jsou nepochybně nejatraktivnější skupinou. Uvolnění molekuly CO pomocí světla je elegantní pro aplikaci *in vivo* [30]. Existuje mnoho takovýchto molekul, ale často jsou omezeny mnoha faktory.

2.2.1 Komplexy přechodných kovů uvolňující oxid uhelnatý pomocí světla

Foto-CORMy lze rozdělit do dvou základních skupin, obsahující nebo neobsahující přechodný kov. Obecně lze uvolnění CO z karbonylových komplexů přechodných kovů popsat dvěma kroky (Schéma 5). V prvním kroku dochází k excitaci molekuly **A** a k uvolnění jednoho nebo více ekvivalentů CO za vzniku intermediátu **B**, přičemž ostatní ligandy zůstávají vázány (Schéma 5) [14]. V druhém kroku reaguje intermediát **B** většinou s molekulou rozpouštědla (**L'**) a vzniká fotoproduct **C** (Schéma 5) [14].

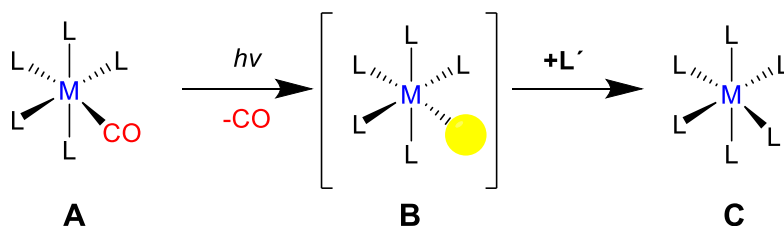
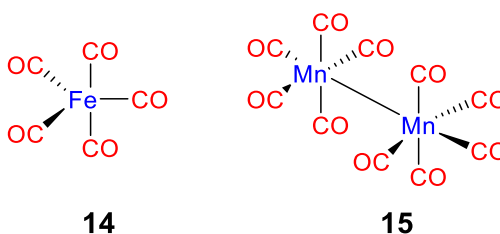


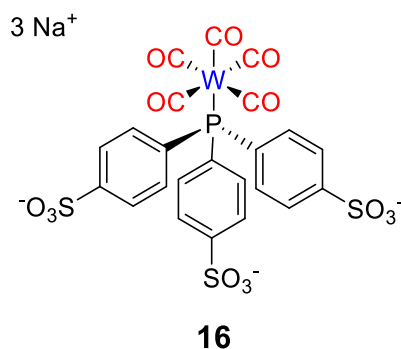
Schéma 5: Základní schematický mechanismus fotoindukovaného uvolnění molekuly CO z foto-CORMy. Převzato z citace: [14].

Prvními vyvinutými foto-CORMy z roku 2002 byly *dekakarbonyl dimanganu* **15** a *pentakarbonyl železa* **14** (Obrázek 4). Během fotolýzy **14** bílým světlem za přítomnosti myoglobinu (Mb) došlo k vygenerování CO, který byl stanoven spektroskopicky jako karboxymyoglobin (MbCO) [14],[33]. Tyto molekuly mají však nepříznivé vlastnosti, neboť fotoproducty jsou toxické. Dnes bývají nahrazovány komerčně dostupnými látkami **5** a **6** (Obrázek 2) [14].



Obrázek 4: Pentakarbonyl železa a dekarbonyl dimanganu.

V jednoduchých karbonylových komplexech přechodných kovů se kromě železa a manganu může vyskytovat ještě celá řada dalších kovů, jako například wolfram, chrom nebo molybden [34],[26],[14]. Například nedávno publikovaný wolfram-pentakarbonylový komplex tris(sulfonatofenyl)fosfinu, vyskytující se jako sůl se třemi Na^+ (**16**, Obrázek 5), je ve vodě rozpustná a stabilní molekula, která uvolňuje CO ($\lambda_{max} = \sim 410$ nm) za fyziologického pH [35]. Tato molekula uvolňuje jeden ekvivalent CO a při další aerobní expozici světlem nebo termolytickým rozkladem uvolňuje další dva ekvivalenty CO v závislosti na reakčních podmínkách [14]. Je zřejmé, že molekuly uvolňující více ekvivalentů CO se vyznačují složitou reakční kinetikou [30].



Obrázek 5: Wolfram-pentakarbonylový komplex tris(sulfonatofenyl)fosfinu.

2.2.2 Nekovové molekuly uvolňující oxid uhelnatý pomocí světla

Ačkoli jsou dnes jednoduché karbonylové komplexy s kovy jako foto-CORMy široce využívány, vyvstává otázka toxicity kovových fotoproduktů (obsahují např. molybden, mangan) [36]. Například toxicita fotoproduktu *fac*-[MnBr(azpy)(CO)₃] byla přirovnána k expozici 5-fluorouracilem, který zamezuje replikaci DNA a ve farmacii se využívá jako cytostatikum (buňky v přítomnosti této látky umírají – dochází k apoptóze) [37]. Těmto toxickým vlastnostem lze předejít použitím lehčích kovů (Fe, Mn). Mimo cytotoxicitu jsou kovové komplexy kovů často špatně rozpustné, mají nevhodné absorpční vlastnosti, např. λ_{\max} v ultrafialovém (UV) spektru, jsou nestabilní na vzduchu a mají omezené možnosti na vylepšení z hlediska substituentů a designu nových derivátů [37]. Kovové CORMy se tedy obecně snažíme nahrazovat látkami bez kovového centrálního atomu. Kovový atom může působit jako kofaktor pro řadu enzymů, poškodit membrány organel v buňce nebo narušit strukturu deoxyribonukleové kyseliny (DNA) [12].

Mezi striktně organické foto-CORMy lze zařadit několik skupin obsahujících karbonylovou skupinu. Z nejvýznamnějších je nutno uvést α -diketony, α -hydroxyketony, cyklopropenony a deriváty xanthen-9-karboxylové kyseliny (uvedeny níže) [38]. Další foto-CORMy, jako například 1,3-diketony, nejsou vhodné pro biomedicínské využití kvůli nevhodným absorpčním vlastnostem a nerozpustnosti ve vodném prostředí [26].

Mezi deriváty xanthen-9-karboxylové kyseliny se řadí například 6-hydroxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-karboxylová kyselina (**17**, Schéma 6, $\lambda_{\max} = 488$ nm při pH = 7,4), která je analogem fluoresceinu [39]. Fotoproduktem po uvolnění CO je 3,6-dihydroxy-9*H*-xanthen-9-on (**18**, Schéma 6) [39]. Uvolnění CO probíhá přes α -laktonový intermediát za vzniku ketonu [39]. Vzhledem k tomu, že **17** obsahuje hydroxylovou a karboxylovou funkční skupinu, množství uvolněného CO je značně závislé na pH, které ovlivňuje kvantové výtěžky ($\Phi \approx 7 \times 10^{-4}$, $\text{ph} \approx 7$) [39]. Oba substráty jsou fluorescenčně aktivní, což umožňuje dobré monitorování procesu uvolňování CO [39]. Absorpční spektrum se nepodařilo posunout k vyšším vlnovým délkám a kvůli náročné syntéze nebylo možné dosáhnout velkých výtěžků, které by umožnily studium mechanismu [39].

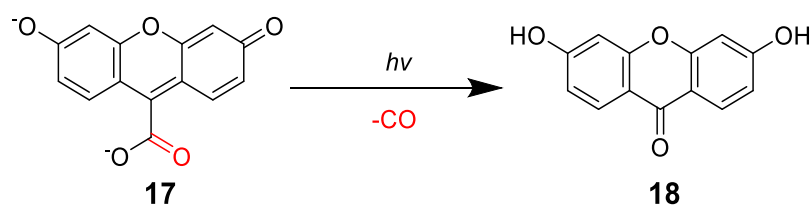
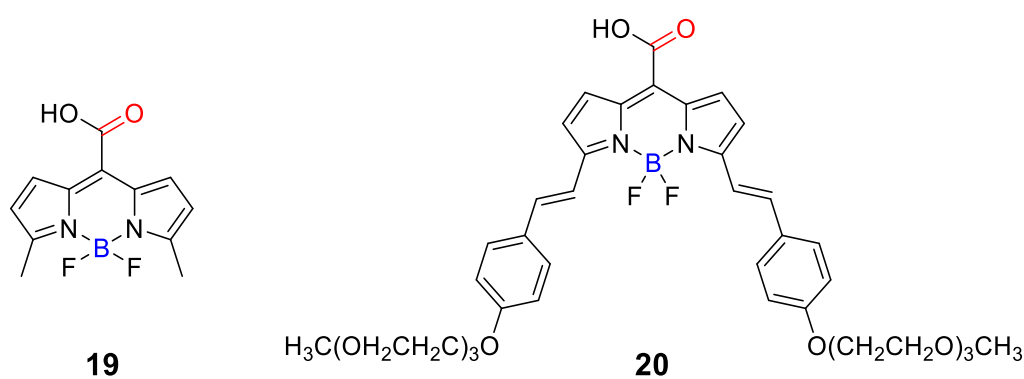


Schéma 6: Uvolnění CO z 6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-karboxylové kyseliny. *Převzato z citace:* [39].

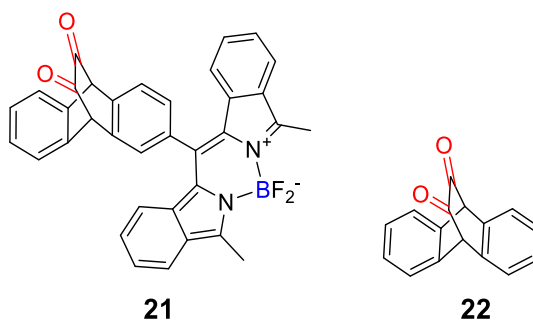
Na základě předpovědi elektronových vlastností molekulových orbitalů HOMO (highest occupied molecular orbital) a LUMO (lowest unoccupied molecular orbital) byla navržena molekula *meso*-boron-dipyrrromethenové (BODIPY) karboxylové kyseliny (**19**, Obrázek 6, $\lambda_{\max} = 502$ nm) [40]. Je analogická molekule **17**, ale lze ji snadněji syntetizovat a izolovat ve vyšších výtěžcích [40].



Obrázek 6: *Meso*-BODIPY karboxylová kyselina **19** a její styrylový derivát **20**.

Molekuly **19** ($\lambda_{\max} = 502$ nm) a její derivát **20** (Obrázek 6, $\lambda_{\max} = 640$ nm) absorbují také ve viditelné oblasti spektra, přičemž lidská kůže je schopná propouštět světlo $\lambda = 600\text{--}900$ nm [4]. Derivát **20** byl připraven kvůli posunu absorpčního spektra [40],[41]. Obě molekuly jsou rozpustné ve fyziologickém prostředí pH = 7, 4 a tyto látky **19**, **20**, a ani jejich fotoproducty nevykazují žádnou cytotoxicitu ($c < 100$ $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) [40]. Použití **20** pro uvolnění CO bylo demonstrováno *in vivo* na myších [40].

Cyklické α -diketony se vyznačují tím, že na rozdíl od ostatních foto-CORMů dokáží uvolňovat 2 ekvivalenty CO. Mají také největší podíl hmotnosti CO ve struktuře (**22**, 24 % wt) [38]. Nevýhoda těchto látek založených na anthracenu **21**, **22** (Obrázek 7) je špatná rozpustnost ve vodě, avšak byly vyvinuty micely interagující s touto molekulou a zvyšující její rozpustnost, a zároveň zabraňující adici vody na karbonyl [42]. Ačkoli mnoho polyaromatických uhlovodíků působí karcinogenně a mutagenně, u těchto derivátů nebyla tato toxicita pozorována do koncentrace < 40 μM [38]. Molekula 9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracen-11,12-dionu (**22**, Obrázek 7, $\lambda_{\max} = 513$ nm) vykazuje také aktivní fluorescenci, tudíž ji lze *in vivo* také monitorovat [38]. Mechanismus uvolnění CO je popsán níže (Schéma 7).



Obrázek 7: Molekula Benzo-DK (**21**) a 9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracen-11,12-dionu (**22**).

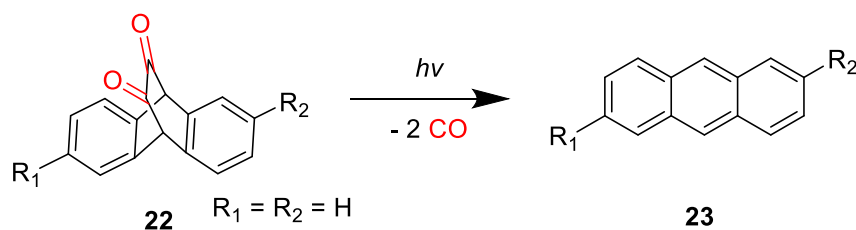


Schéma 7: Uvolnění CO z 9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracen-11,12-dionu (**22**) za vzniku anthracenu (**23**). *Převzato z citace:* [26].

Cyklopropenony podléhají taktéž fotoindukované dekarbonylaci. Problémem jsou však jejich absorpční vlastnosti. Například 2,3-bis-(4'-methoxyfenyl)-cyklopropenon disponuje $\lambda_{\max} = 340$ nm v methanolu (CH₃OH), tzn. v ultrafialové (UV) oblasti spektra [26]. 2,3-Bis-naftyl-cyklopropenony obvykle absorbují o něco výše ($\lambda = 400\text{--}440$ nm) a navíc nejsou rozpustné ve vodě [26]. Při ozáření 2,3-di(anthracen-9-yl)cykloprop-2-en-1-onu (**24**) dochází k excitaci molekuly a následné dekarbonylaci [26]. Níže uvedená dekarbonylace je velmi rychlá, adiabatická reakce, které chromofor podléhá při ozáření UV světlem ($\lambda_{\max} = 267$ nm) za vzniku alkyne **25** jako fotoprojektu (Schéma 8) [43].

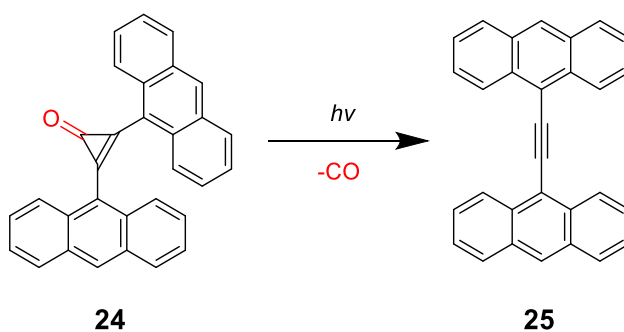
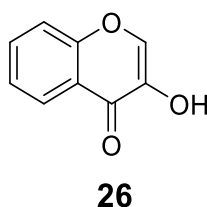


Schéma 8: Uvolnění CO z 2,3-di(anthracen-9-yl)cykloprop-2-en-1-onu **24**. *Převzato z citace:* [43].

2.2.3 α -Hydroxyketony

Mezi α -hydroxyketony, jakožto čistě organické molekuly (neobsahující atom kovu), řadíme i 3-hydroxyflavony, které obsahují ve své struktuře základní skelet flavonoidů (Obrázek 8). Flavonoidy jsou přírodní látky vyskytující se jako účinné látky v mnoha rostlinách (Tabulka 1). Tato základní kostra je dále substituována, čímž dochází ke zlepšení absorpčních vlastností.



Obrázek 8: 3-Hydroxyflavon.

Základní myšlenka využití 3-hydroxyflavonů jako CORMů vychází z enzymatického rozkladu quercetinu **27** (Schéma 9), který se řadí mezi běžné účinné látky rostlin a patří taktéž do skupiny flavonoidů [44]. Pokud není enzymatická reakce možná, například z důvodu absence enzymu, pak může dojít k dalším typům oxidativního rozkladu a jedním z nich je rozklad indukovaný UV světlem [44]. K takovéto reakci je nutná přítomnost tzv. fotosenzitizátoru, který generuje singletový kyslík pomocí viditelného světla [44]. Excitovaný singletový kyslík pak dále reaguje s molekulou **27** a rozkládá ji za vzniku CO a **28** (Schéma 9). Ukázalo se však, že je možné použít k rozkladu i samotné UV světlo a na základě této hypotézy jsou 3-hydroxyflavony zkoumány jako nové CORMy [44].

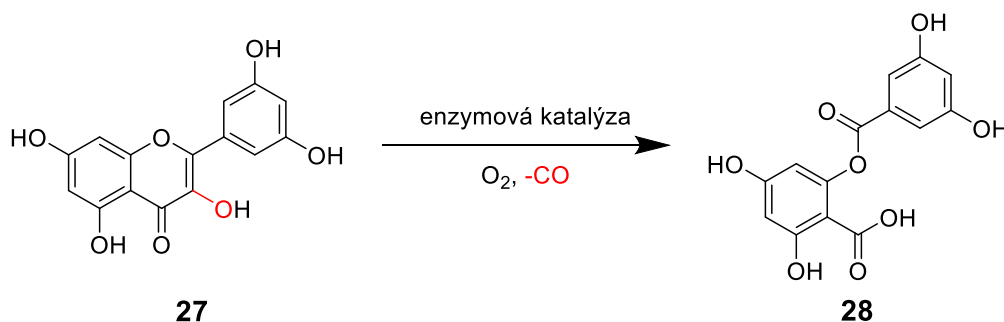
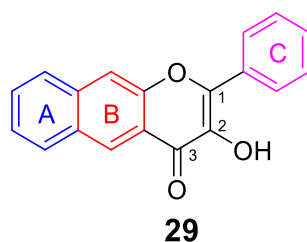


Schéma 9: Enzymatický aerobní rozklad quercetinu generující CO. Převzato z citace: [44], [45].

Jako CORM bylo doposud publikováno jen několik molekul založených na struktuře 3-hydroxyflavonu, kterým se také jinak říká flavonoly. Na obrázku níže vidíme 3-hydroxy-2-fenyl-2,3-dihydro-4H-benzo[*g*]chromen-4-on (**29**, Obrázek 9, $\lambda_{\max} = 409$ nm), z jehož struktury se odvozují všechny deriváty 3-hydroxyflavonu, které se chovají jako CORMy [44]. O dalších derivátech bude pojednáno dále. Na rozdíl od **26** obsahuje **29** další benzenové jádro C (Obrázek 9), které posouvá absorpční vlastnosti více do červené oblasti, ovlivňuje mechanismus uvolnění CO a umožňuje uvolnění CO bez nutnosti dalšího substituentu zvyšujícího podíl tripletového excitovaného stavu [46].



Obrázek 9: 3-Hydroxy-2-fenyl-2,3-dihydro-4*H*-benzo[*g*]chromen-4-on (**29**).

3-Hydroxyflavony jsou schopné uvolňovat CO za aerobních i anaerobních podmínek, což většina CORMů neumožňuje. První krok anaerobního rozkladu probíhá bez přístupu O₂ za vzniku nestabilního intermediátu **31** (Schéma 10), který je následně rozkládán působením silného UV světla ($\lambda = 200\text{--}400\text{ nm}$) a vzniká fotoprodukt **32** a jedna molekula CO [47].

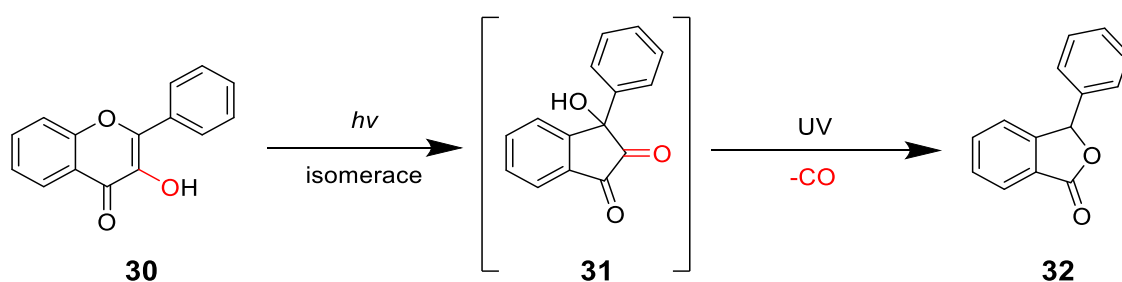


Schéma 10: Anaerobní (bez přístupu O₂) uvolnění CO z 2-fenyl-4*H*-chromen-4-onu (**30**). Převzato z citace: [26].

Aerobní rozklad **29** za přímé fotochemické excitace nebyl dosud zcela přesně objasněn. Zatím byly navrženy dva mechanismy. Předpokládá se, že první způsob dekompozice spočívá v [3 + 2] cykloadici singletového kyslíku za vzniku cyklického peroxidu **33a**, který podléhá β -otevření peroxidového kruhu (Schéma 11, cesta **a**). Současně vzniká molekula CO a uhlíky C2 a C3 jsou přeměněny na karbonylové funkční skupiny. V tomto případě je nutné zmínit přítomnost volné hydroxylové skupiny na C2, bez které se **29** nejeví jako chromofor a je na světle stabilní. Nedávná studie mechanismu fotolýzy **29** se přiklání k této alternativě mechanismu ([3+2] adice; Schéma 11, cesta **a**), protože meziproduct **33b** (Schéma 11, cesta **b**) je vysoce nestabilní a je krajně nepravděpodobné, že rozklad probíhá touto cestou. Fotoproduktem rozkladu **29** je v obou případech 2-(benzoyloxy)benzoová kyselina **35**, která je derivátem salicylové kyseliny (2-(hydroxy)benzoová kyselina) [26].

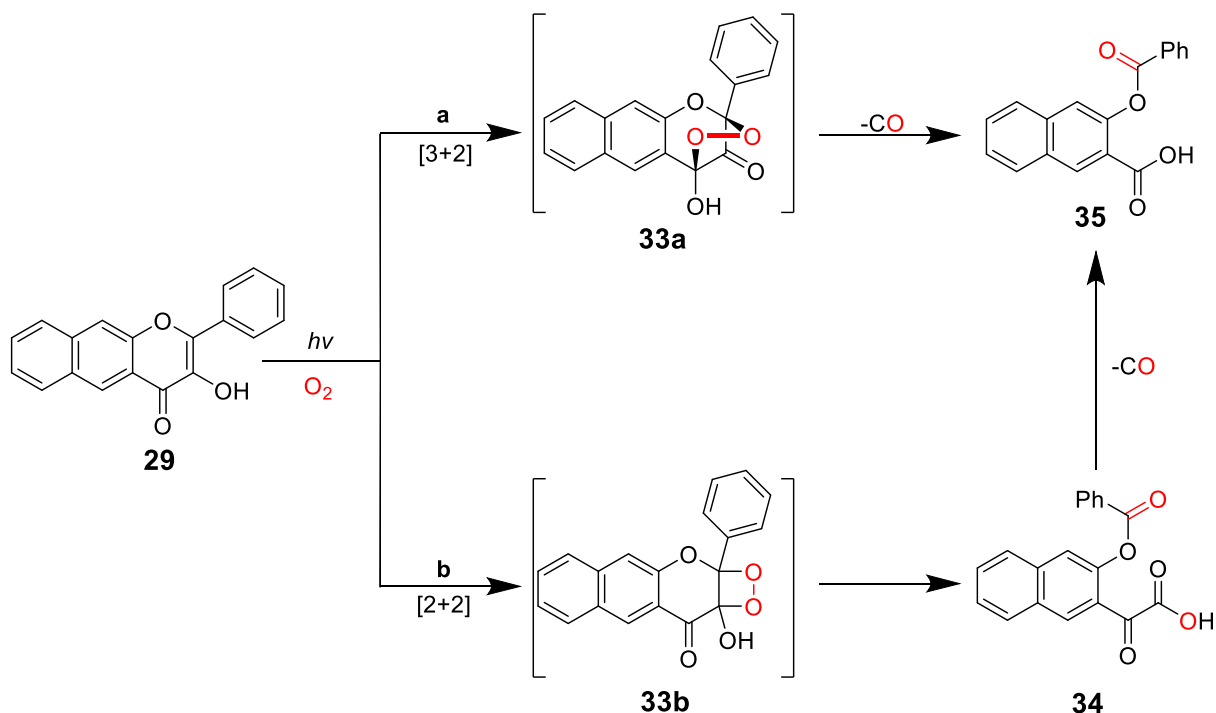


Schéma 11: Mechanismus aerobního fotoindukovaného uvolnění CO z molekuly **29**. Převzato z citace: [26].

Druhý zmíněný způsob dekompozice **29** probíhá [2 + 2] cykloadicí singletového kyslíku na aktivovanou dvojnou vazbu za vzniku **33b** (Schéma 11, cesta **b**). Protože jsou 1,2-dioxetany nestabilní látky, rychle se rozkládají na dva karbonylové fragmenty za vzniku intermediátu **34**, který následně dekarbonyluje na **35** a CO (Schéma 11, **b**). Mechanismus probíhá stejně i u **30**, protože druhé aromatické jádro A (Obrázek 9), které molekula **29** obsahuje, nemá na mechanismus reakce vliv [47].

Pro využití molekul *in vivo* je také důležité objasnit jejich chování v simulovaném fyziologickém prostředí. Specifické pro **29** ($\lambda_{\max} = 409 \text{ nm}$, $\Phi = 7 \times 10^{-3}$) je, že mění svou absorbanci v závislosti na formě, ve které se vyskytuje. Ve směsi DMSO:TRIS pufr (1 : 1) se při $\text{pH} = 7,4$ vyskytovala převážně ve své neutrální formě a absorpční spektrum je podobné jako v roztoku $\text{CH}_3\text{CN} : \text{DMSO}$ (1 : 1) a $\text{DMSO} : \text{H}_2\text{O}$ (1 : 1). Pro **29** je v obou případech $\lambda_{\max} = \sim 409 \text{ nm}$ [28]. Při měření absorpce ve směsi DMSO : PBS pufru (1 : 1) při $\text{pH} = 7,4$ se v absorpčním spektru objevuje pík $\lambda_{\max} = \sim 480 \text{ nm}$, což značí deprotonaci hydroxy skupiny, která byla potvrzena měřením absorpce po přidání dvou ekvivalentů roztoku NaOH do roztoku **29** v $\text{DMSO} : \text{H}_2\text{O}$ (1 : 1), potvrzené vznikem **29a** ($\lambda_{\max} = 483 \text{ nm}$) [28]. Tato vlastnost je klíčová pro tvorbu komplexů se Zn^{2+} (Schéma 12).

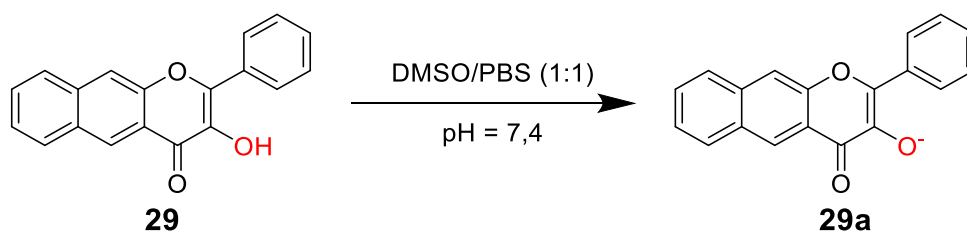
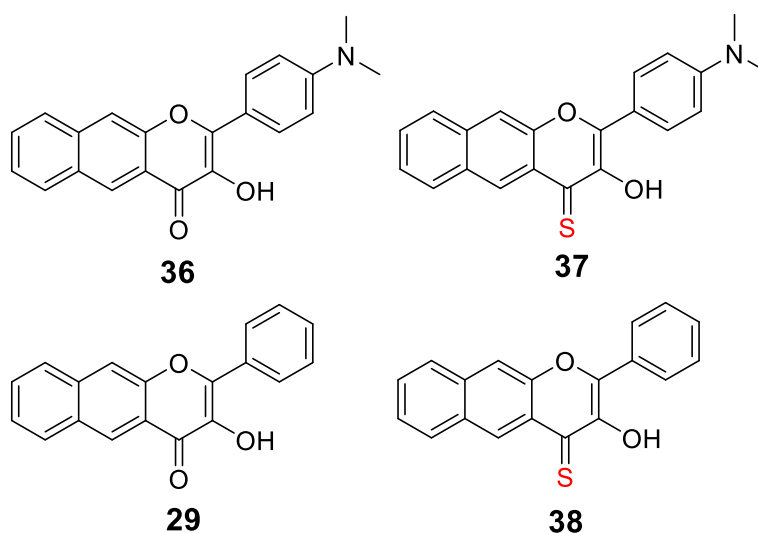


Schéma 12: Deprotonace hydroxy skupiny na uhlíku C2 **29**. Převzato z citace: [28].

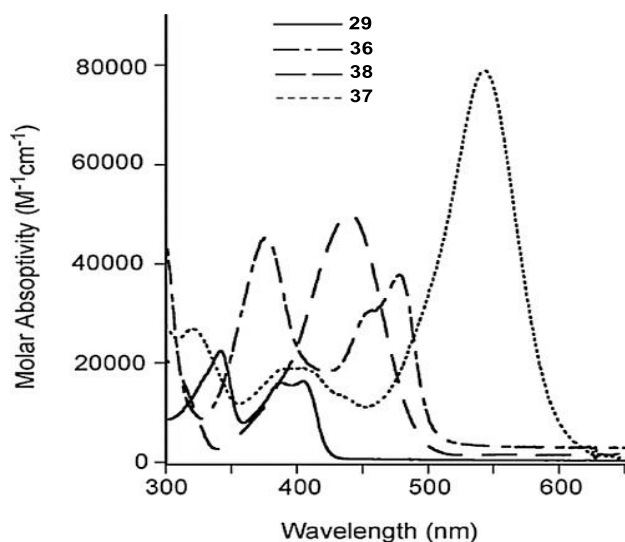
2.2.4 Známé deriváty flavonolu

Od molekuly **29** lze odvodit další deriváty, které se fotolyticky jedнокrokově rozkládají výše zmíněným mechanismem [3 + 2] adice singletového kyslíku (Schéma 11). Z molekul **36** a **38** byly odvozeny deriváty připravené v rámci experimentální části práce (Obrázek 10). Níže můžeme vidět absorpční spektra těchto derivátů (Obrázek 11) [44].



Obrázek 10: Známé deriváty molekuly **29**.

Z grafu absorpčních spekter (Obrázek 11) je patrné, že při zvýšené elektronové hustotě na aromatickém kruhu C dochází k posunu absorpčního maxima λ_{max} k vyšším vlnovým délkám. Spektra byla podle literatury doposud měřena pouze v acetonitrilu nebo v PBS pufru s velkým podílem DMSO (až 50 %) [44].



Molekula	λ_{\max} [nm]	ε [$M^{-1} \text{cm}^{-1}$]
29	409	16 600
36	442	51 000
38	478	36 700
37	544	85 500

Obrázek 11: Vlevo absorpční spektra derivátů **29**, **36**, **38**, **37** v acetonitrilu; závislost molárního absorpčního koeficientu ($M^{-1} \text{cm}^{-1}$) na vlnové délce (nm) [44] a vpravo přehled absorpčních maxim a molárních absorpčních koeficientů molekul **29**, **36**, **38**, **37**. Převzato z citace: [28],[48].

Flavonoly jsou skupina látek, která se vyznačuje velmi dobrou variabilitou pro další vylepšování, protože umožňují další vývoj derivátů, ale i tvorbu komplexních molekul s anorganickými heteroatomy. Obdobně i uvolňování CO přímo z pevné látky přináší mnoho výhod, přičemž se podle literatury dařilo dosahovat srovnatelných výtěžků CO [48].

Nejnovějším derivátem **29** je 3-hydroxy-2-fenylbenzo[*g*]chinolin-4(1*H*)-on (**40**, Schéma 13, $\lambda_{\max} = 445 \text{ nm}$, $\varepsilon = 7800 M^{-1} \text{cm}^{-1}$) [49]. Od ostatních flavonolů se liší přítomností sekundárního aminu. Má obdobné chemické výtěžky uvolňování CO jako **29** a dobře uvolňuje CO i v anaerobním prostředí, což je důležité například v nádorových buňkách, kde je často velmi nízká koncentrace kyslíku, silně redukující prostředí a nižší pH [50],[49],[51]. Molekula **40** tudíž běžně existuje ve své oxidované formě **39** v podobě diketonu a vlivem redukujícího prostředí thiolových skupin (albumin v rakovinných buňkách) dochází k jeho redukci na funkční chromofor **40** (Schéma 13) [49]. Mezi foto-CORMy se jedná o první molekulu neobsahující kov, která byla testována na účinky proti rakovině [49]. Vyznačuje se také silnou afinitou k proteinům, komplex **40** s hovězím albuminem naznačuje snadnou intracelulární aplikaci [49].

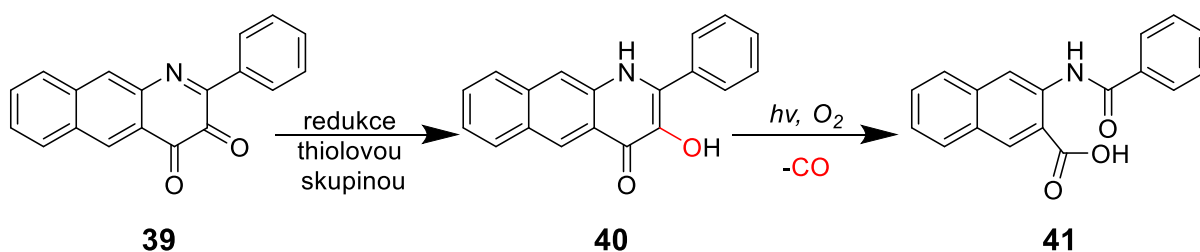
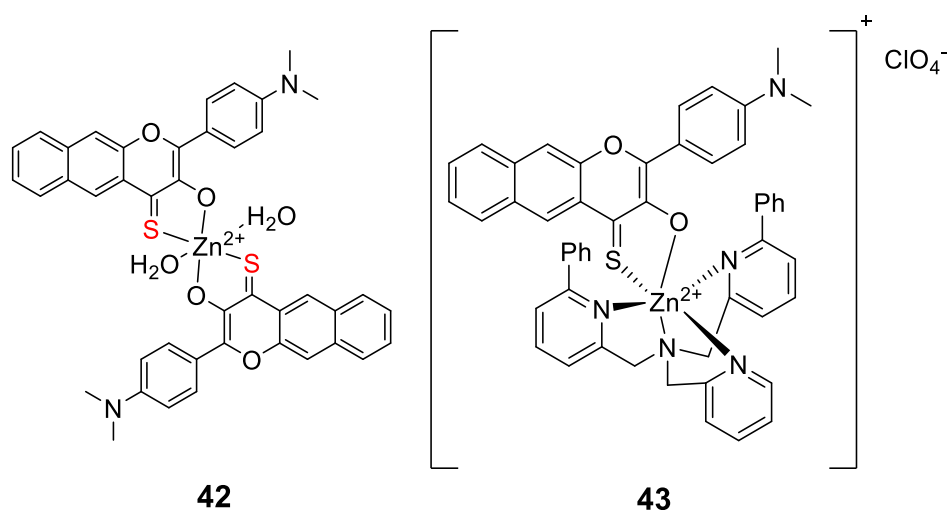


Schéma 13: 3-Hydroxy-2-fenylbenzo[*g*]chinolin-4(1*H*)-on (**40**), jeho oxidovaná forma 2-fenylbenzo[*g*]chinolin-3,4-dion (**39**) a fotoproduct 3-benzamido-2-naftoová kyselina (**41**). Převzato z citace: [49].

Dále existuje několik dalších derivátů v podobě komplexů, které nejsou tak stěžejní jako výše zmíněné. Mezi ně patří například zinečnaté komplexy (Obrázek 12). Tyto komplexy byly prvními deriváty, které absorbovaly světlo v oblasti viditelného světla [48]. Molekula **42** (Obrázek 12, $\lambda_{\max} = 609 \text{ nm}$, $\varepsilon = 189\,750 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) je zinečnatý komplex molekuly **37** (**37**, Obrázek 10) [48]. Molekula absorbuje v oblasti viditelného světla, konkrétně žluté [48]. Ne všechny tyto komplexní deriváty flavonolů umožňují anaerobní uvolnění CO a nejsou rozpustné ve vodném prostředí (všechny experimenty s nimi byly prováděny v pyridinu) [48]. U některých komplexů bylo potvrzeno uvolňování CO v pevném stavu při ozařování viditelným světlem [48].

Pokročilejší molekula **43** ($\lambda_{\max} = 600 \text{ nm}$, $\varepsilon = 111\,700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) má vyšší chemické výtěžky CO a dovede uvolňovat CO anaerobně, i jako nerozpuštěná tuhá látka v práškovém stavu [48]. Absorpční maximum **43** tedy zasahuje do fototerapeutického okna, neboli vlnové oblasti, kterou propouští lidská tkáň (viz 2.2.6).



Obrázek 12: Molekuly $\text{Zn}(\mathbf{37})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**42**) a $[(6\text{-Ph}_2\text{TPA})\text{Zn}(\mathbf{37})]\text{ClO}_4$ (**43**), kde *TPA* je *N,N*-bis((6-fenyl-2-pyridyl)methyl)-*N*-((2-pyridyl)methyl)amin, Ph – fenyl. Převzato z citace: [48].

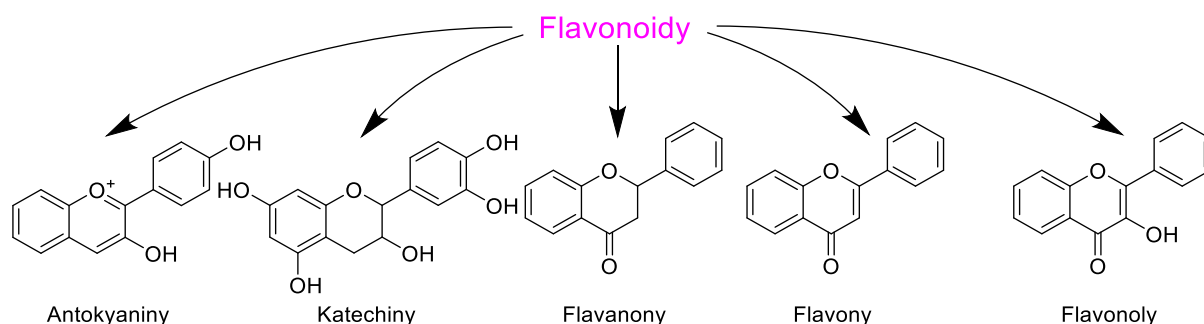
2.2.5 Flavonoidy

Doposud byl pojednáno pouze o flavonolu **29** a jeho derivátech a komplexních formách s kovy či proteiny. Látky obsahující ve své struktuře kostru flavonolu (jsou tudíž i 3-hydroxyketony) jsou však přírodní látky, které tvoří skupinu zvanou flavonoidy (Obrázek 13) [52]. Jedná se především o polyfenoly, které se hojně vyskytují v rostlinách a jsou hůře rozpustné ve vodě [53]. Většinou se jedná o sekundární metabolity rostlin, které slouží jako zdroje potravin (Tabulka 1) [53].

Skupina	Molekula	Výskyt
Flavonoly	Chrysin	Borůvky
	Myricetin	Hrozny
	Rutin	Celer
	Quercetin	Brokolice
Flavanony	Fisetin	Citrusové plody
	Hesperetin	
Katechiny	Katechin	Červené víno Čajovník
	Epikatechin	
Antokyaniny	Kyanidin	Jahody Červené víno Čajovník
	Malvidin	
	Petunidin	
Flavony	Apigenin	Červené víno
	Tangeritin	
	Rpofolin	

Tabulka 1: Přehled vybraných molekul a podskupin flavonoidů a jejich výskyt v potravinách. *Převzato z citace:* [53], [54].

Především katechiny v lidském těle reagují s volnými kyslíkovými radikály reakcí s hydroxylovou skupinou na C2 uhlíku a formují stabilnější a méně reaktivní radikál [54]. Tato aktivita chrání nízkodenzitní lipoproteiny a teoreticky se předchází již zmíněným nemocem (viz kapitola 2.1.3) [54].



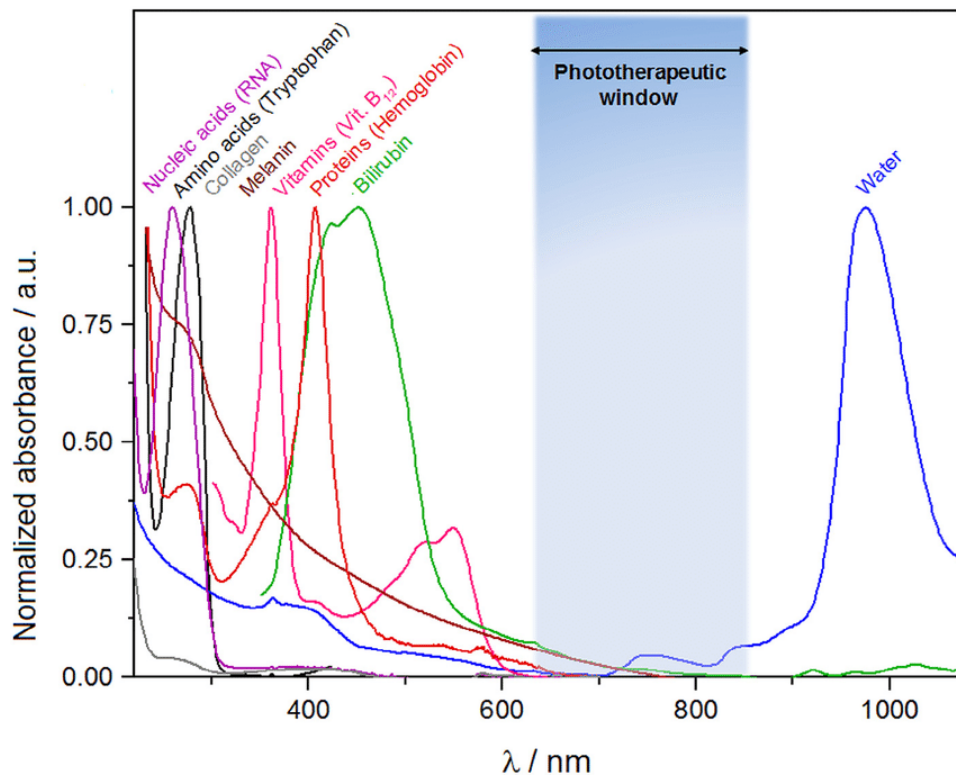
Obrázek 13: Schématické zachycení několika významných podskupin flavonoidů, vpravo struktura základního flavonolu **30** patřícího mezi foto-CORMy. *Převzato z citace:* [53].

2.2.6 Propustnost tkání pro světlo

V současnosti se foto-CORMy stávají předmětem výzkumu malých bioaktivních fotomolekul. Hlavním cílem je navrhovat molekuly, které budou vysoce selektivní pro své cílové subjekty a zároveň se „aktivují“ jen v místě, kde je to nezbytné, čímž se předejde nepříznivým vedlejším účinkům (kapitola 2.2) [12].

Fotochemické aplikace pro ozařování buněk a tkání jsou závislé na použité vlnové délce. Problém nastává v oblasti UV světla, které na buňky působí toxicky a karcinogenně [55]. Většina potenciálních bioaktivních molekul má absorpční maxima situována právě do UV oblasti [55]. Nicméně existuje rozmezí vlnových délek, které se nazývá „transparent tissue window“ – fototerapeutické okno (Obrázek 14, „Phototherapeutic window“), které se vymezuje mezi 600 a 900 nm [56]. Světlo o těchto vymezených vlnových délkách je schopné s určitou mírou pronikat do tkání, než dojde k jeho pohlcení a přeměně na tepelnou energii. Míra penetrace silně závisí na konkrétní tkáni, saturaci kyslíkem, na použitém zdroji světla a podobně. Přesto se potvrdilo, že 800 nm světlo dokáže pronikat do tkání až do hloubky 2 cm [57]. Absorpční maxima nových bioaktivních molekul se cíleně snažíme dostávat právě do tohoto intervalu vlnové délky.

Na Obrázek 14 je modrým sloupcem vymezeno tzv. fototerapeutické okno – interval mezi 600–900 nm, kde významně neabsorbují žádná významná skupina látek obsažených ve tkáních. Zleva jsou pojmenovány křivky pro: nukleové kyseliny, aminokyseliny, kolagen, melanin, vitamíny, bílkoviny a bilirubin. Při vyšší vlnové délce od horní hranice absorbuje světlo intenzivně voda. Graf nezahrnuje absorpční spektra všech látek ve tkáni, jde pouze o schématické znázornění [56].



Obrázek 14: Graf závislosti absorpance (formálně bezrozměrná veličina) na vlnové délce (nm) pro vybrané typy molekul v lidských tkáních. *Převzato z citace:* [56].

Propustnosti tkání pro světlo se dnes běžně využívá v terapeutické metodě známé jako fotodynamická terapie (PDT), za použití metaloporfirů (obsahují porfírový kruh, Obrázek 1) jako fotosenzitizátorů [56]. Při ozáření takovéto molekuly světlem o dané vlnové délce a intenzitě je schopná fotochemicky generovat singletový kyslík [56]. Ten pak v nádorové tkáni (musí obsahovat kyslík) způsobuje přímou apoptózu nebo nekrózu nádorových buněk [56]. Pokud oxidační stres nádorovou buňku přímo neničí, může dojít ke stimulaci imunitního systému a fagocytaci proliferovaných buněk [56]. Metody léčby nádorů založené na tomto principu se už v dnešní době běžně využívají v nemocnicích.

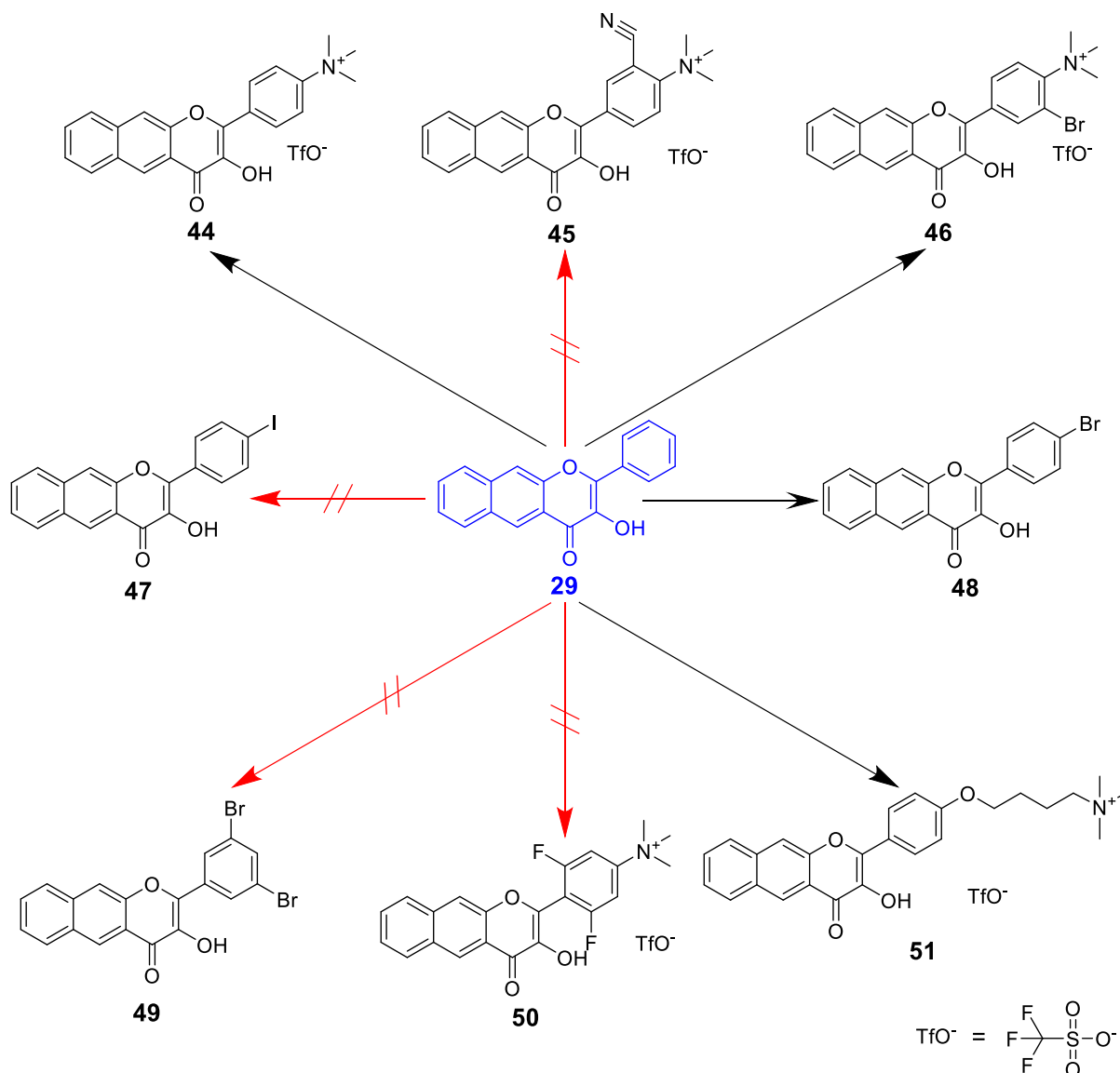
3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Navržené deriváty flavonolu

Pro úspěšné biologické aplikace foto-CORMů je nevyhnutné zlepšit vlastnosti, jako jsou jejich rozpustnost ve vodě, chemický výtěžek CO, kvantový výtěžek uvolňování CO a v neposlední řadě posunout absorpční maximum do fototerapeutického okna (Obrázek 14). Právě studium mechanismu fotochemického uvolňování CO je klíčové k pochopení, jakým způsobem konkrétní pozice modifikovat, abychom zkonstruovali analogy s žádanými vlastnostmi.

Na základě doposud známých poznatků o foto-CORMech založených na flavonolovém skeletu jsme navrhli sérii derivátů, které byly odvozeny z původních struktur, konkrétně **29** a **36** [44]. Jelikož je derivatizace kruhů A a B synteticky náročná kvůli komerční nedostupnosti odpovídajících výchozích látek, nebo jejich jednoduché přípravě, zaměřili jsme se v této práci na derivatizaci kruhu C. Námi navržené molekuly jsou zobrazeny níže (Obrázek 15).

Jako první je potřebné pochopit, jestli fotochemická transformace probíhá ze singletového nebo tripletového excitovaného stavu. Tripletový excitovaný stav je déle žijící a tím se zvyšuje pravděpodobnost následné chemické reakce. Přítomnost těžkých atomů v molekule vede ke zvýšení podílu tripletového excitovaného stavu [41]. Z tohoto důvodu byl navržen flavonol **44-51** nesoucí na C fenylovém kruhu těžký atom halogenu (Br, I). Následně byly navrženy deriváty obsahující elektron akceptorní (**44**, **45**, **46**, **50**) a elektron donorní (**51**) substituenty na fenylu C (Obrázek 15). V této fázi jsme se snažili, aby deriváty byly rozpustné v PBS pufru, jelikož je to jediné relevantní médium pro biologické aplikace. Z tohoto důvodu byly na flavonol instalovány polární skupiny pro zvýšení rozpustnosti ve vodě. Kromě experimentů popsanych v další části této práce byly tyto molekuly použity ve skupině prof. Klána k dalším studiím pomocí transientní absorpční spektroskopie. Dalšími fotochemickými experimenty pak bude možné přesně objasnit dosud nejasný mechanismus fotolýzy a vyvíjet nové foto-CORMy s vhodnějšími vlastnostmi pro *in vivo* aplikaci.



Obrázek 15: Navržené deriváty molekuly **29** nesoucí různé substituenty na jádře C.

Deriváty jsou navržené na základě předchozích poznatků o flavonolech jakožto kategorie α -hydroxyketonů. Výchozí molekula **29** je znázorněna modrou barvou uprostřed. TfO^- je anion zvaný trifluormethylsulfonát, jehož struktura je znázorněna v pravém dolním rohu. Jeho výhodou je značná odolnost proti světlu, neboť nepodléhá chemickým změnám jako je fotooxidace a neovlivňuje tak studium fyzikálně-chemických vlastností. Červené šipky znázorňují kroky syntézy, které se nepodařilo uskutečnit. Meziprodukty, které se podařilo připravit, ale finální krok syntézy nebylo možno provést, budou uvedeny v následujících kapitolách.

3.2 Retrosyntetická analýza

Aldolovou kondenzací a oxidací odpovídajícího aldehydu a ketonu **52** se získá flavonolový skelet (Schéma 14). Při přípravě analogu **29** bylo užito stejného postupu jako v literatuře [44], který byl optimalizován. Jako výchozí látka pro přípravu ketonu **52** se využívá 3-hydroxy-2-naftoová kyselina **54**, která je běžně dostupnou komerční látkou. Nukleofilní adicí methyl synthonu na 3-hydroxy-2-naftoové kyselinu **54** se získá keton **52** (Schéma 14).

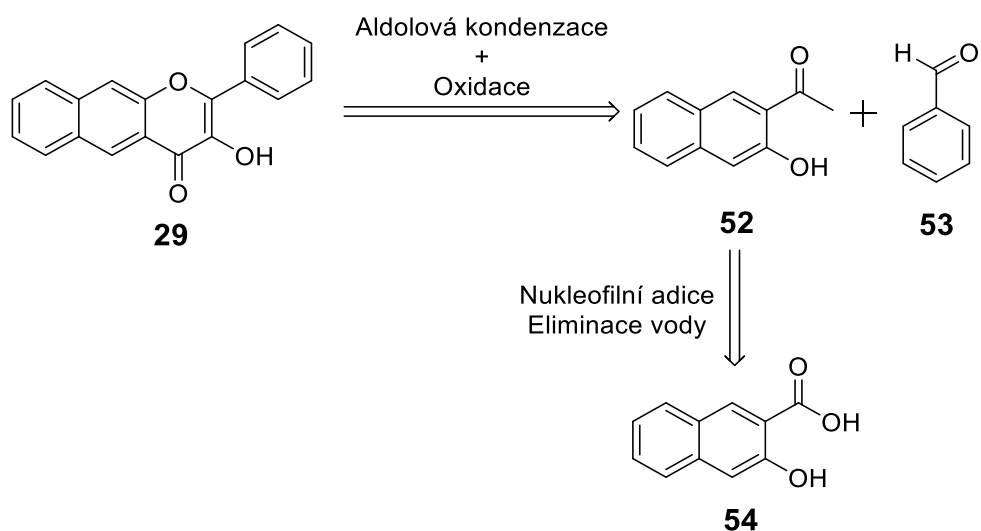


Schéma 14: Retrosyntetická analýza syntézy molekuly **29** a jejích analogů.

Příslušné aldehydy jsou komerční látky nebo se připraví standartními postupy (alkylace, formylace, bromace). Na deriváty *N,N*-dimethylanilinu **55** se zavede formylová skupina pomocí Vilsmeier-Haackovy formylace (produkt **56**, Schéma 15). Benzenové jádro je aktivované elektron-donorní dimethylaminovou skupinou, která diriguje elektrofilní substituci do polohy para. Poloha ortho je stericky bráněna oběma methyly (Schéma 15).

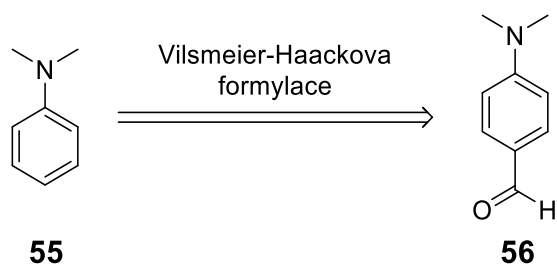


Schéma 15: Retrosyntetické schéma formylace derivátů *N,N*-dimethylanilinu.

Kvarternizace dusíku derivátů nesoucích na aromatickém kruhu C dimethylaminovou skupinu se provádí pomocí metylačních činidel (trifluormethansulfonát, MeI) v jednom kroku.

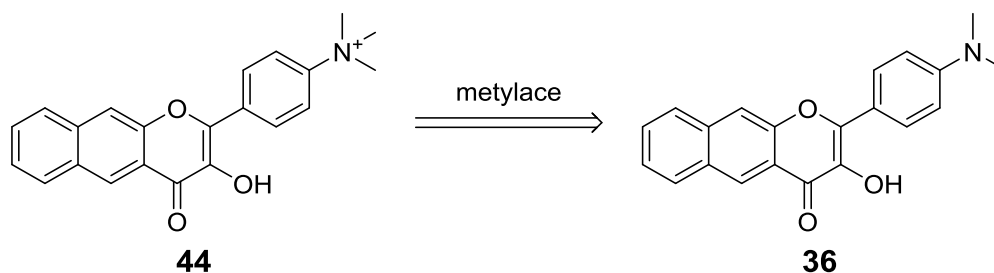


Schéma 16: Retrosyntetická analýza metylace aminových derivátů **29**.

3.3 Reakční mechanismus kondenzace

Na níže uvedeném schématu (Schéma 17) je uveden podrobný mechanismus syntézy **29**, kterou jsme převzali z literatury a modifikovali [44]. Pravděpodobně je mechanismus kondenzace obdobný i pro ostatní vytvořené analogy flavonolu.

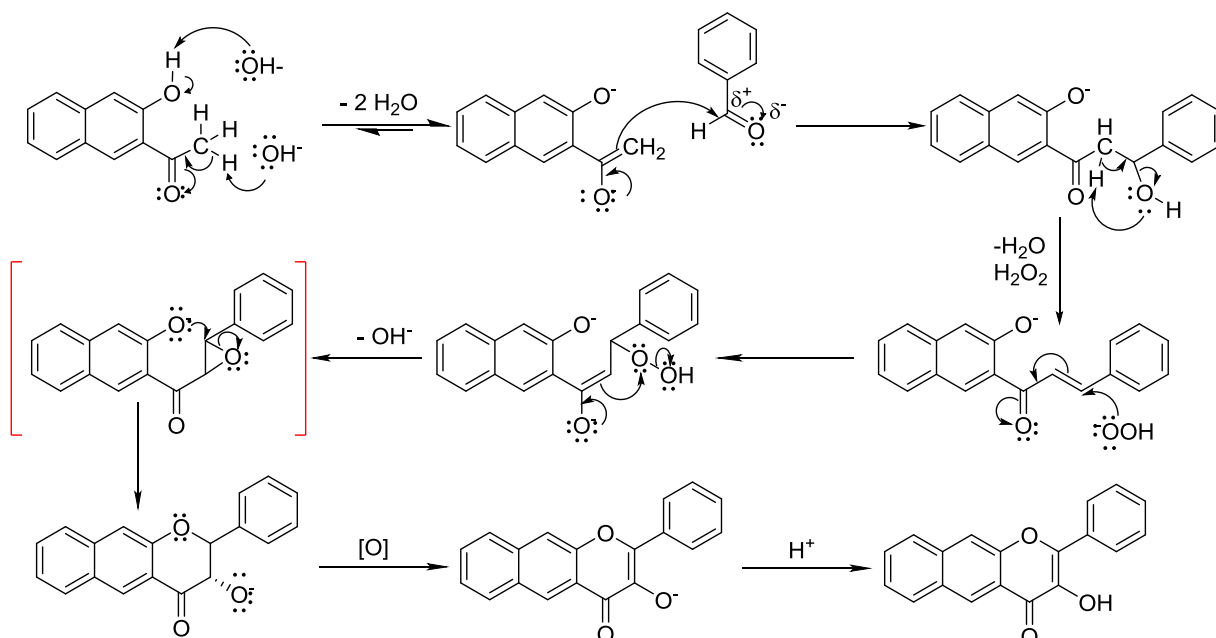


Schéma 17: Návrh mechanismu kondenzace **29**.

Nejdříve dojde k deprotonaci na α -uhlíku a k elektrofilní adici benzaldehydu a následné eliminaci vody za vzniku dvojné vazby. Poté dojde k reakci deprotonovaného peroxidu v alkalickém prostředí za vzniku epoxidového kruhu, který se otevírá a dochází k uzavření flavonolového kruhu [58]. Následně dochází k oxidaci a protonaci hydroxy skupiny.

Podle literatury však údajně nebyl pozorován epoxidový intermediát (červeně, Schéma 17), proto byl tento mechanismus prohlášen za nepravděpodobný [59],[60]. Přesný mechanismus syntézy doposud nebyl zcela objasněn.

3.4 Syntéza derivátů

Výchozí keton je poměrně finančně nákladný, tudíž byl připraven v jednom kroku reakcí s methylolithiem z 3-hydroxy-2-naftoové kyseliny, tento postup je již znám a nejedná se o nově připravenou látku [44].

Pro přípravu **59** bylo nutné syntetizovat 4-(dimethylamino)-2,6-difluorbenzaldehyd **58** (Schéma 18), který není komerčně dostupný a v literatuře dosud popsán nebyl. Využili jsme Vilsmeier-Haackovy formylace pro zavedení aldehydové skupiny na aromatické jádro. Reakční roztok po zastavení vodou a neutralizací NaOH vyžadoval extrakci produktu **58** z dimethylformamidu (DMF) do diethyletheru, ve kterém byl špatně rozpustný a tudíž se po čištění pomocí kolonové chromatografie výtěžek ještě snížil. Místo diethyletheru se ukázalo vhodnější použít pro extrakci ethyl acetát. Před kolonou bylo nutno odpařit rozpouštědlo s přidáním heptanu kvůli zbavení zbytkového DMF.

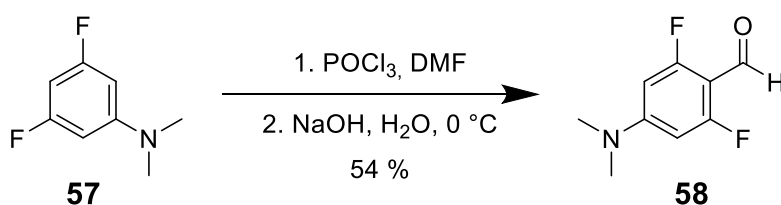


Schéma 18: Syntéza benzaldehydu **58**.

Získaný aldehyd **58** byl následně použit pro přípravu **50** (Schéma 19). Kondenzací **58** a **52** a následnou oxidací jednoduché vazby vznikl po protonaci HCl produkt **59** (Schéma 19). Finální metylaci (produkt **50**) se nepodařilo uskutečnit, protože meziproduct **59** nebyl rozpustný v dichloromethanu (DCM), tetrahydrofuranu (THF), ani v acetonitrilu. Další možností metylace byla reakce s methyljodidem při 100 °C, která dle NMR neproběhla a byla pozorována pouze komplexní směs neznámých produktů. Látku **59** se ani za vysoké teploty ve zmíněných rozpouštědlech kromě DMF nepodařilo rozpustit a žádná reakce nebyla pozorována.

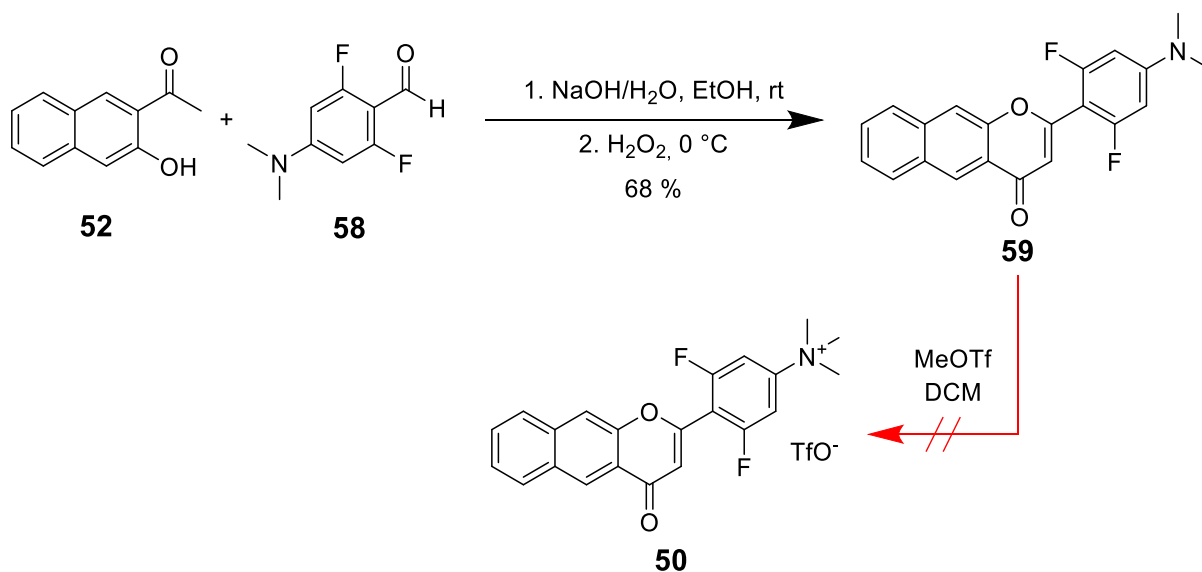


Schéma 19: Syntéza derivátu 50.

Na přípravu **61** (Schéma 20) byl použit 3-bromo-4-(dimethylamino)benzaldehyd, který byl připraven bromací 4-(dimethylamino)benzaldehydu pomocí *N*-bromosukcinimidu (NBS). Produkt **61** byl hůře rozpustný v DCM, tudíž bylo potřeba reakční směs po dokončení druhého kroku důkladně promýt DCM, aby se dosáhlo požadované čistoty **46**.

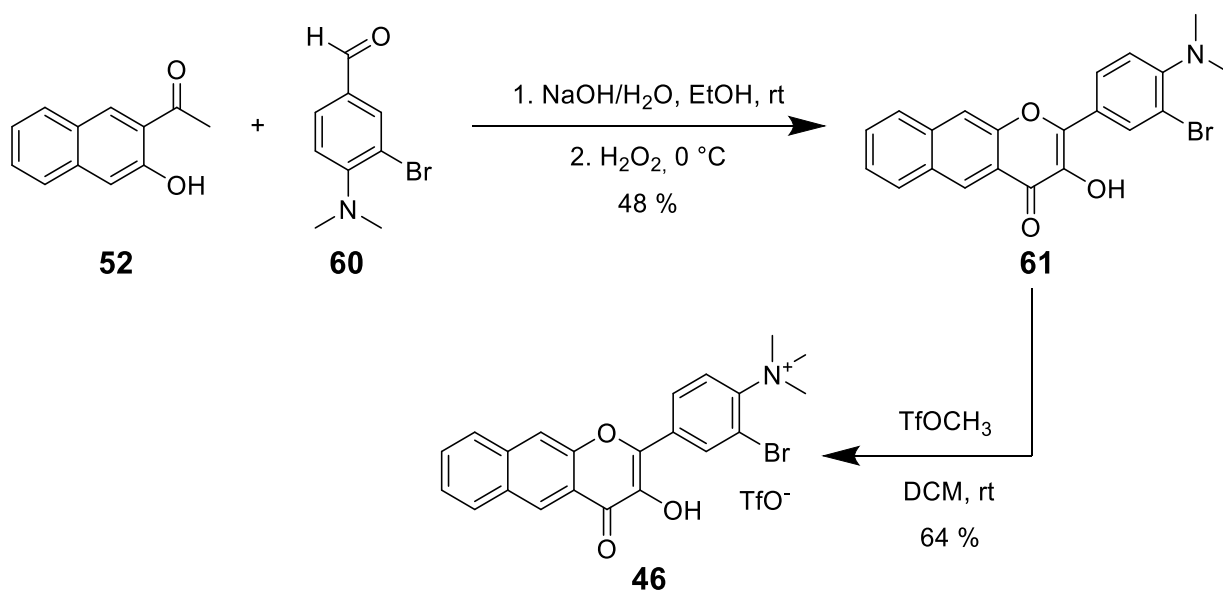


Schéma 20: Syntéza derivátu 46.

Nepolární derivát **48** byl připraven kondenzací **52** a 4-bromobenzaldehydu (Schéma 21), který je běžně dostupnou komerční látkou. Produkt **48** byl izolován filtrační z reakční směsi jako sraženina, která byla vyčištěna promýváním ethanolem, jelikož v methanolu se **48** velmi dobře rozpouští. Jde o jediný připravený nepolární derivát s těžkým atomem bromu.

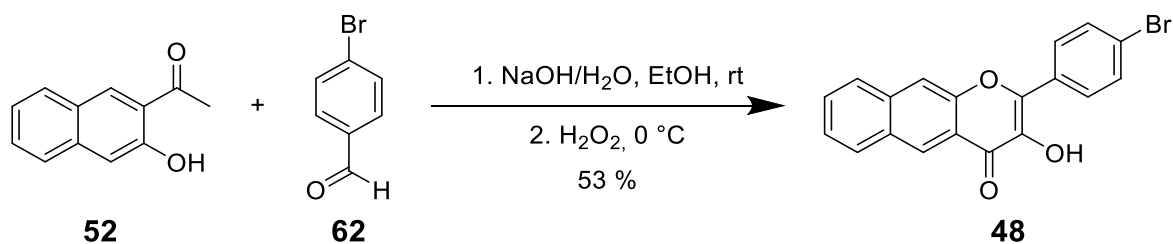


Schéma 21: Syntéza derivátu **48**.

Derivát **44** (Schéma 22) je nejjednodušší analog flavonolu, na který byla zavedena trimethylammoniová skupina pro zvýšení rozpustnosti ve vodě. Derivát **44** (Schéma 22) byl připraven podle již známého postupu v literatuře [44] s dobrými výtěžky v obou krocích. Methylace se podařila až s použitím methyl trifluormethansulfonátu, při reakci methyljodidu v acetonitrilu za zvýšené teploty nebyla pozorována žádná reakce, resp. Podle $^1\text{H NMR}$ se potvrdilo malé množství produktu, které však nebylo možné kvantitativně vyizolovat. Dichlormethan je vhodným rozpouštědlem, protože je velmi nepolární a po kvarternizaci dusíku se finální látka okamžitě sráží z roztoku, což usnadňuje izolaci a purifikaci.

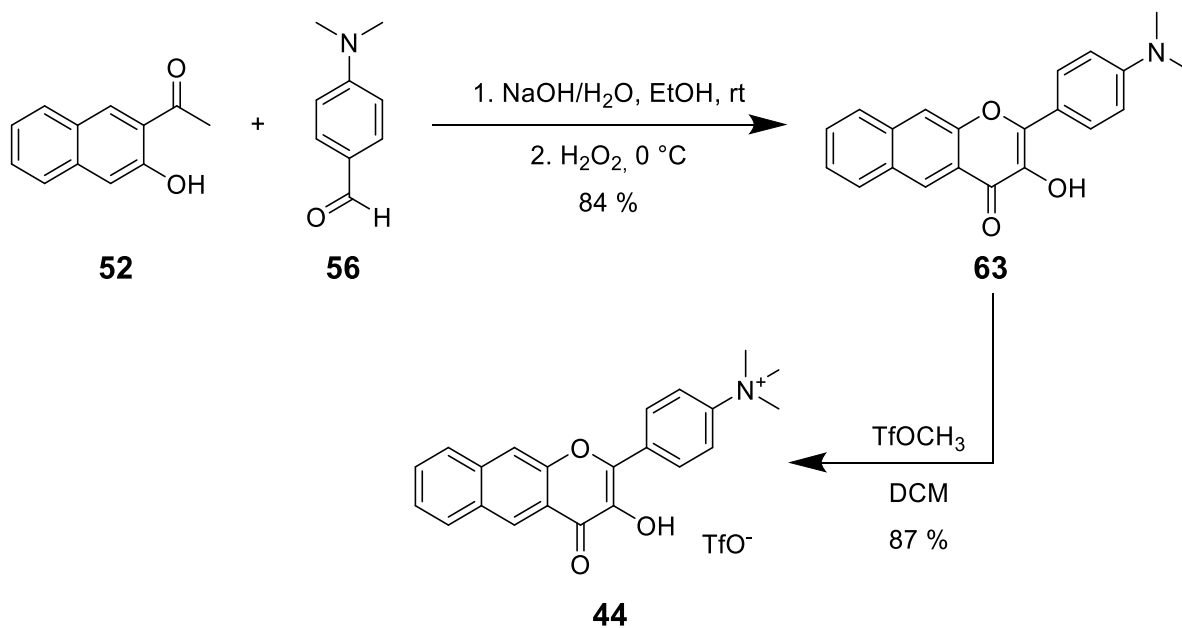


Schéma 22: Syntéza derivátu **44**.

Výchozím aldehydem pro syntézu **51** (Schéma 23) byla molekula **66**; syntéza začala z 4-hydroxybenzaldehydu **64** alkylací pomocí nadbytku 1,4-dibromobutanu s dobrým výtěžkem **65** (Schéma 23). Nadbytek alkylačního činidla potlačil případnou sekundární reakci na druhé straně řetězce. Následná nukleofilní substituce na **65** nadbytkem dimethylaminu poskytla požadovaný aldehyd **66** (Schéma 23). Jelikož 4-(dimethylamino)butoxy skupina v *para* pozici působí jako elektron donor, bylo nutno nechat probíhat aldolovou kondenzaci po delší dobu a v koncentrovanějším roztoku. Nižší reaktivita je způsobena nižší elektrophilicitou karbonylového uhlíku. Methylace **67** proběhla rychle za vzniku **51** s dobrým výtěžkem.

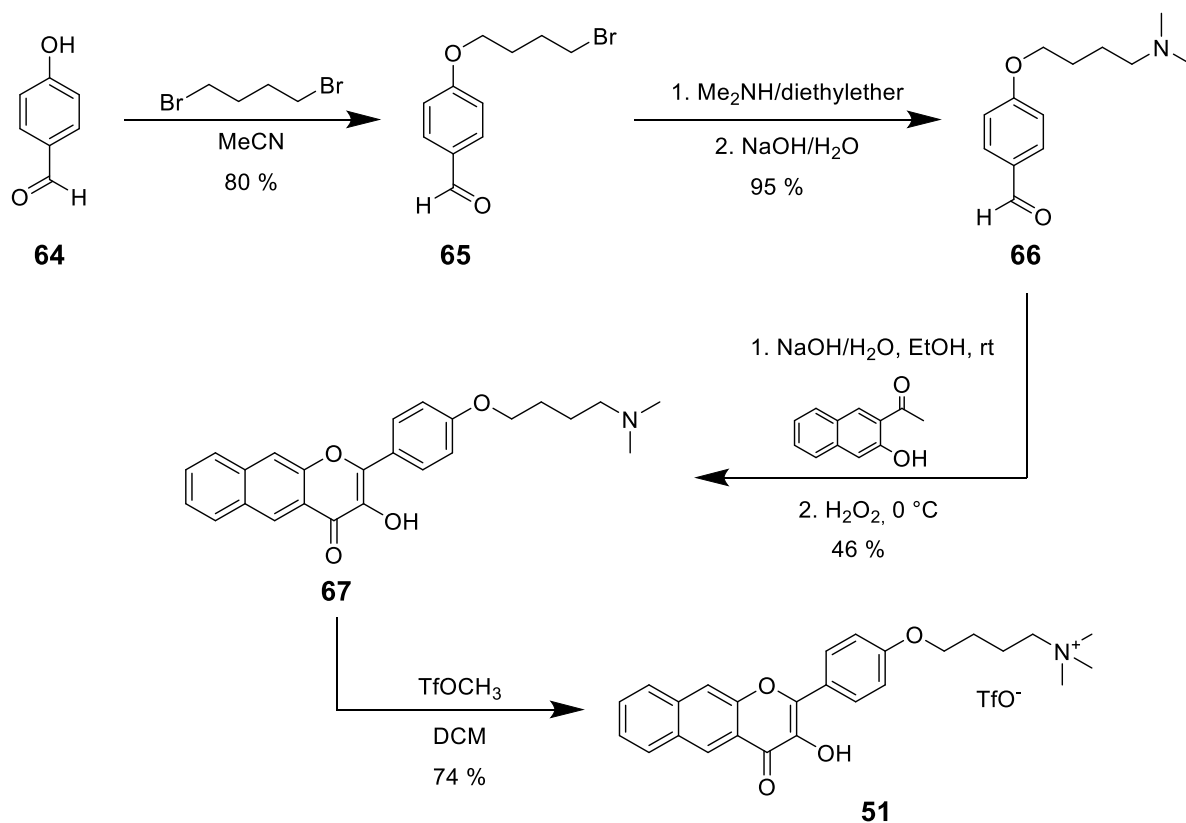


Schéma 23: Syntéza derivátu **51**.

Výsledná molekula **52** však už není tak polární a dobře rozpustná ve vodě jako **44** (Schéma 22) a **46** (Schéma 20). Proto se jí také nepodařilo rozpustit v čistém pufru (PBS, pH = 7.4, I = 100 mM), ze kterého se srážela a roztok nebylo možné připravit v dostatečné koncentraci potřebné pro měření absorbance a kinetiky. Následně byl připraven roztok **51** v DMSO, který byl doředen PBS pufrem, přičemž se nám podařilo dosáhnout koncentrace DMSO pouhých 5 %. Oproti literatuře kde se molekulu flavonolu podařilo rozpustit až v přítomnosti 50 % DMSO to představuje výrazný pokrok [28]. Horší rozpustnost našeho analogu je způsobena relativně dlouhým butylovým řetězcem, kterým se polární skupina trimethylammonia vzdaluje od nepolárního aromatického jádra.

Obecně jsou flavonoly velmi špatně rozpustné v polárních rozpouštědlech. Základní molekulu flavonolu **29** se daří bez problémů rozpouštět v acetonitrilu a methanolu (organická polární

rozpouštědla) [44]. Podle literatury se dařilo **29** rozpustit ve směsi DMSO/TRIS pufru (tris(hydroxymethyl)aminomethanový pufr), avšak koncentrace DMSO se stále pohybují kolem 50 %. Pro biologickou aplikaci a například pro měření buněčné viability jsou přijatelné koncentrace max. 2–5 %.

Derivát **69** nesoucí na fenylovém kruhu C v para poloze atom jodu se taktéž nepodařilo připravit (Schéma 24). Během reakce nejspíš flavonol vznikne, nicméně pravděpodobně dojde k sekundární oxidaci peroxidem vodíku. Po přidání peroxidu vodíku jsme totiž pozorovali zbarvení reakce do zelena, což pro tuto transformaci není typické. ¹H NMR spektrum získaného produktu potvrdilo absenci očekávaného produktu a komplexní směs produktů.

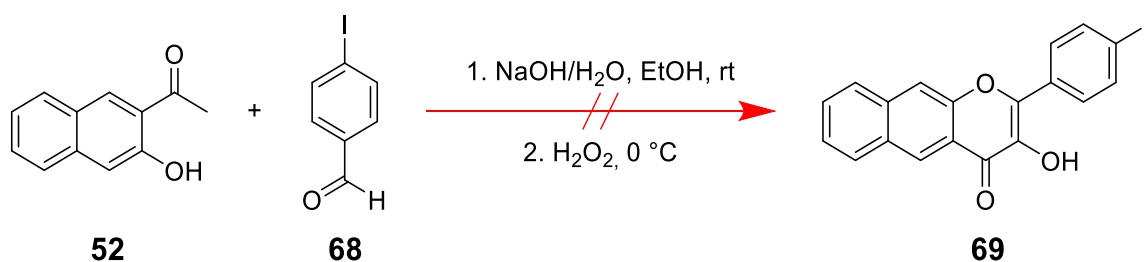


Schéma 24: Syntéza derivátu **69**.

Kyano-substituovaný analog **50** (Schéma 25) se nám bohužel také připravit nepodařilo. Formylová skupina byla na 2-(dimethylamino)benzonitril **70** zavedena taktéž Vilsmeier-Haackovou formylací s relativně dobrým výtěžkem **71** vzhledem k náročnosti extrakce produktu (metoda vyžaduje další optimalizace). Následná reakce aldehydu **71** s ketonem **52** (Schéma 25) podle ¹H NMR spektroskopie neproběhla úspěšně, ačkoli byl získán očekávaný žlutý prášek.

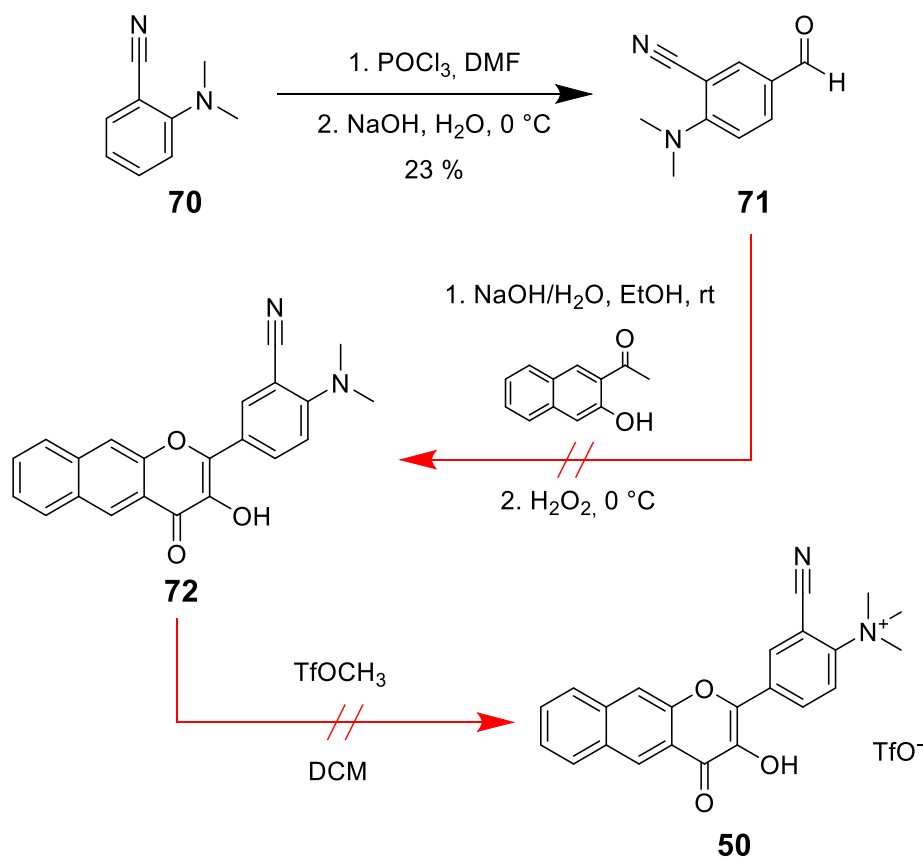


Schéma 25: Syntéza derivátu 50.

Taktéž nebylo možno připravit derivát nesoucí na C fenylovém kruhu dva atomy bromu (Schéma 26). Je však zajímavé, že **48** nesoucí brom pouze v para pozici byl získán s dobrým výtěžkem (Schéma 21), zatímco reakce **52** s 3,5-dibrombenzaldehydem **73** dle ^1H NMR spektroskopie poskytla jenom komplexní směs neindifikovaných produktů. Brom jako substituent v alkalickém prostředí obsahující peroxid vodíku nemá snahu tvořit radikály, proto by tato reakce měla také fungovat. Žádný další derivát nesoucí víc těžkých atomů se nám připravit nepodařilo.

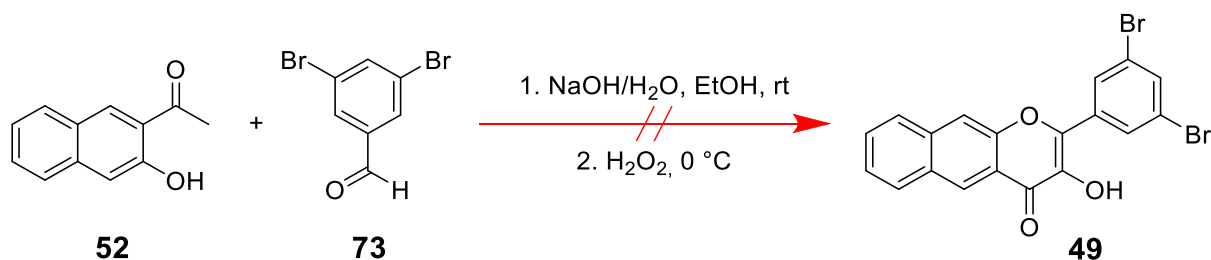
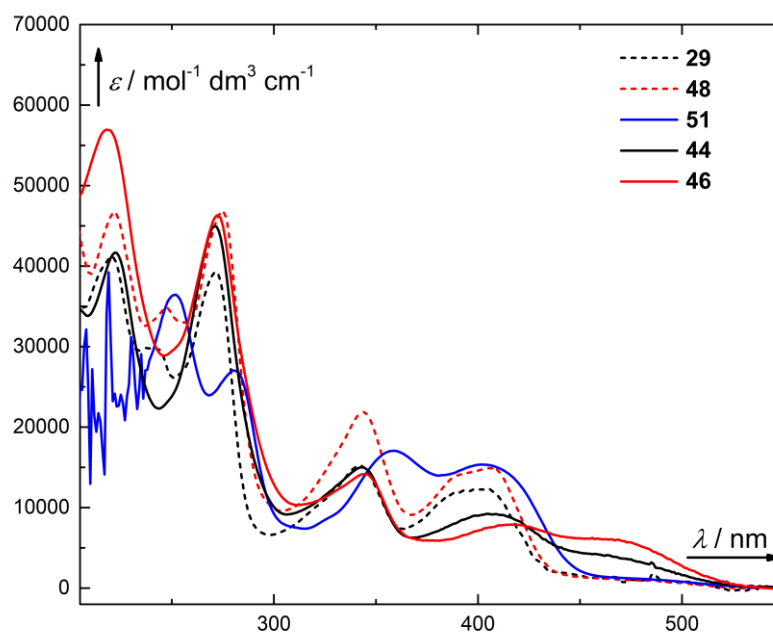


Schéma 26: Syntéza derivátu 49.

3.5 Absorpční a kinetická charakteristika nových derivátů

Absorpce elektromagnetického záření byla studována pomocí UV-Vis spektroskopie. Pro porovnání absorpčních vlastností všech derivátů byla absorbance přepočtena na molární absorpční koeficient ε v závislosti na vlnové délce (Obrázek 16).



Obrázek 16: Absorpční spektra **29**, **48**, **51**, **44**, **46**.

Absorpční spektrum **29** se shoduje s literaturou [44]. Spektra **29** a **48** vykazují absorpční pásy při téměř stejných vlnových délkách (272 resp. 275 nm, 344 nm a 406 nm), a liší se v podstatě jenom v jejich intenzitě (Obrázek 16, přerušována černá a červená). Deriváty **44** a **46**, rozpustné v PBS (10 mM; pH 7,4; $I = 100$ mM), také vykazují obdobný tvar absorpčního spektra a dva hlavní pásy při ~272 a ~345 nm. Pík u ~400 nm je méně intenzivní a navíc se objevuje nový široký pás u ~470 nm, který je způsoben deprotonovanou hydroxy skupinou na uhlíku C2 (Obrázek 9). V případě bromo derivátu **46** je tento pás zodpovídající aniontu o něco intenzivnější než pro **44**. To je pravděpodobně z důvodu vyšší kyselosti hydroxylové skupiny způsobené elektron akceptorním charakterem atomu bromu.

V případě **51** došlo k malému bathochromnímu posunu absorpce dvou pásů ze 272 a 343 nm na 285 a 358 nm (Obrázek 16, modrá čára). Hydroxylová skupina derivátu **51** obsahujícího na fenylu C elektron donorní skupinu není tak kyselá a v pufru PBS při pH 7,4 je jen minimálně deprotonována. U derivátu **51** dochází v absorpčním spektru při $\lambda < 250$ ke zkreslení absorbance, kvůli interferenci s DMSO (obsahuje 5 %), které v této oblasti absorbuje. Nicméně tato UV oblast není pro biologickou aplikaci relevantní. Příprava dalších derivátů se silnými elektron akceptorními skupinami na C fenylu bude předmětem dalšího výzkumu. Také bude nutno v budoucnosti stanovit pK_a hydroxylové skupiny na C3 uhlíku pro všechny deriváty.

Podle literatury molekula **29** podléhá v aerobním prostředí přímé fotolýze (Schéma 27) za uvolnění jednoho ekvivalentu CO a za vzniku 3-(benzoyloxy)-2-naftoové kyseliny **35** (derivát naftoové kyseliny) [44]. Předpokládáme, že fotolýza probíhá stejným mechanismem i u námi připravených analogů.

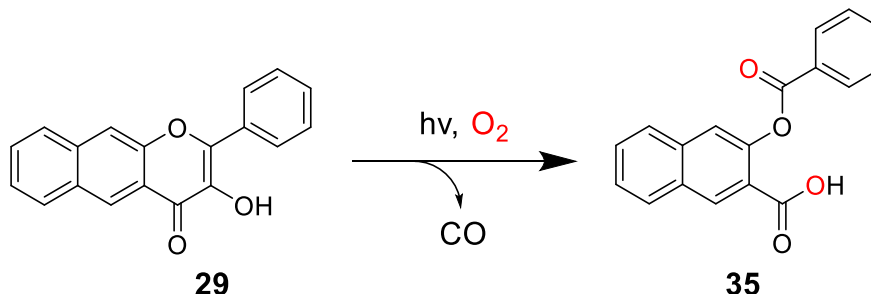
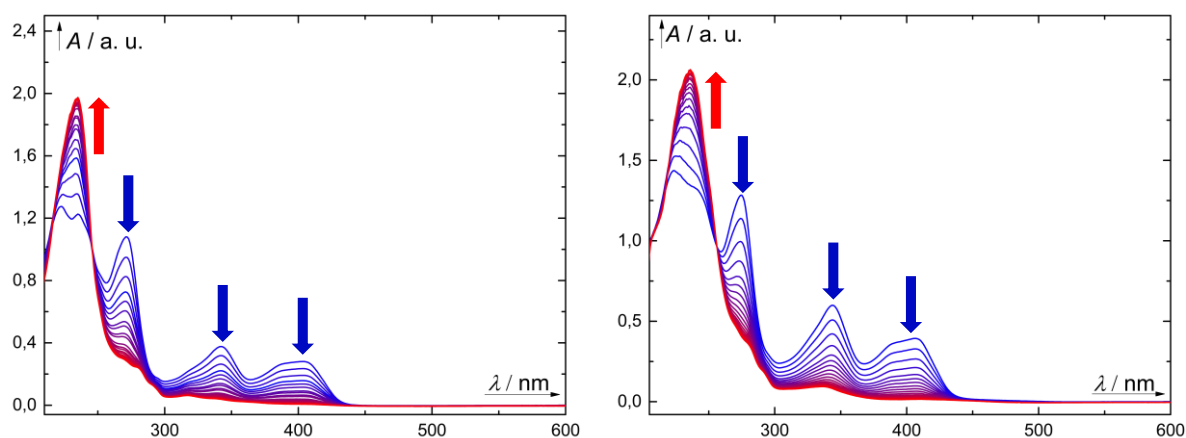


Schéma 27: Fotoindukované uvolnění CO z **29**, Převzato z citace: [44].

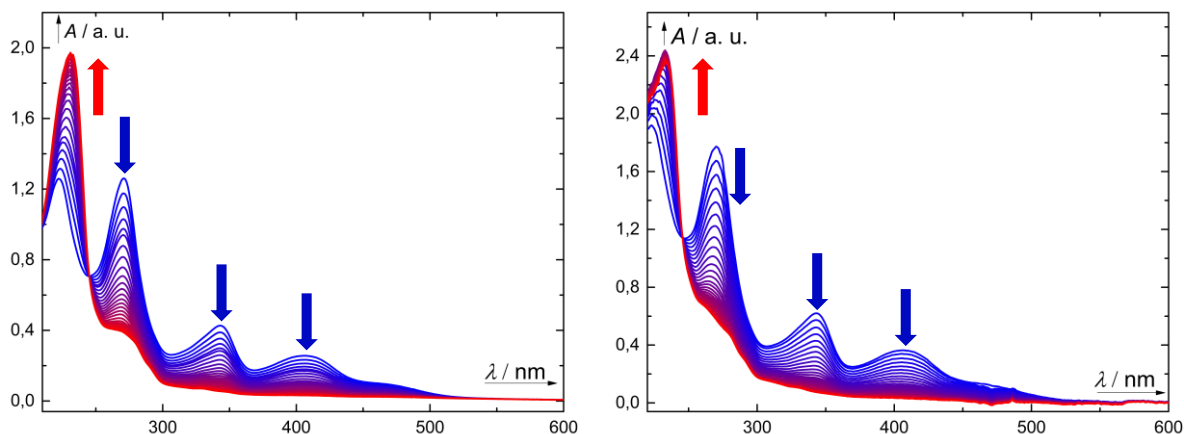
3.6 Ozařování připravených derivátů

Schopnost molekul se fotolyzovat a uvolňovat CO byla experimentálně testována pomocí UV-Vis absorpční spektroskopie. Experimenty byly prováděny v reaktoru, do kterého se umístí vzorek v křemíkové kyvetě a z jedné strany je ozařován LED diodami o dané vlnové délce (v našem případě 410 a 470 nm). Kolmo na paprsky diod prochází paprsky světla z UV-Vis spektrometru, který měří absorpci látky v roztoku. Při kalibraci spektrometru se bere v úvahu i světlo vyzářené z LED diod, přesto však dochází k částečnému rozptylu až do detektoru. Tím dochází k pozorování artefaktu, který se v grafu jeví jako ostrý zub při 410 nm nebo 470 nm. U všech derivátů byla měřena kinetika při 410 nm, u derivátů rozpuštěných v pufru (**51**, **44**, **46**) i při 470 nm, protože anion po deprotonaci hydroxyly absorbuje až při téměř 500 nm (viz absorpční spektrum výše, Obrázek 16). U derivátu **51** byla zkušebně použita i vyšší vlnová délka ($\lambda_{\text{irr}} = 510$ nm), nicméně fotolýza pak běží přibližně pětikrát pomaleji.



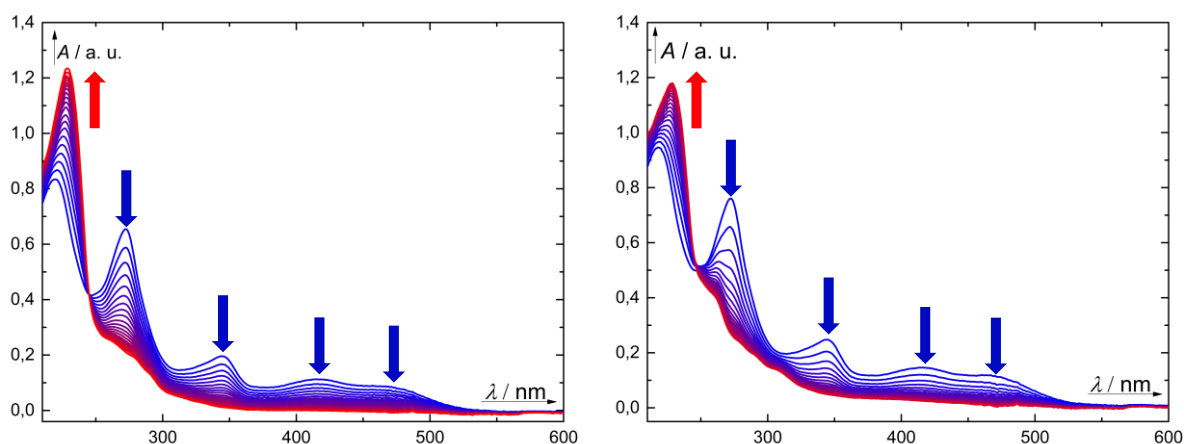
Obrázek 17: UV-Vis absorpční spektra: *vlevo* **29** ($c = 1,45 \times 10^{-5}$ mol/dm³; $\lambda_{\text{irr}} = 410$ nm; MeOH; krok: 10 s) a *vpravo* **48** ($c = 3,09 \times 10^{-5}$ mol/dm³; $\lambda_{\text{irr}} = 410$ nm; MeOH; krok: 10 s).

Základní molekula flavonolu **29** se při ozáření chová velmi podobně jako připravený bromo derivát **48** (Obrázek 17). Absorbance se liší pouze v maximech, pro **29** ($\lambda_{\max} = 405$ nm) a pro **48** ($\lambda_{\max} = 408$ nm). Fotolýza **48** (Obrázek 17, *vpravo*) probíhá zdánlivě o něco rychleji než u látky **29** (Obrázek 17, *vlevo*), pravděpodobně důsledkem přítomnosti bromu a tedy zvýšeného podílu tripletového stavu. Pro další potvrzení bude nutno uskutečnit další experimenty, např. měření kvantových výtěžků.



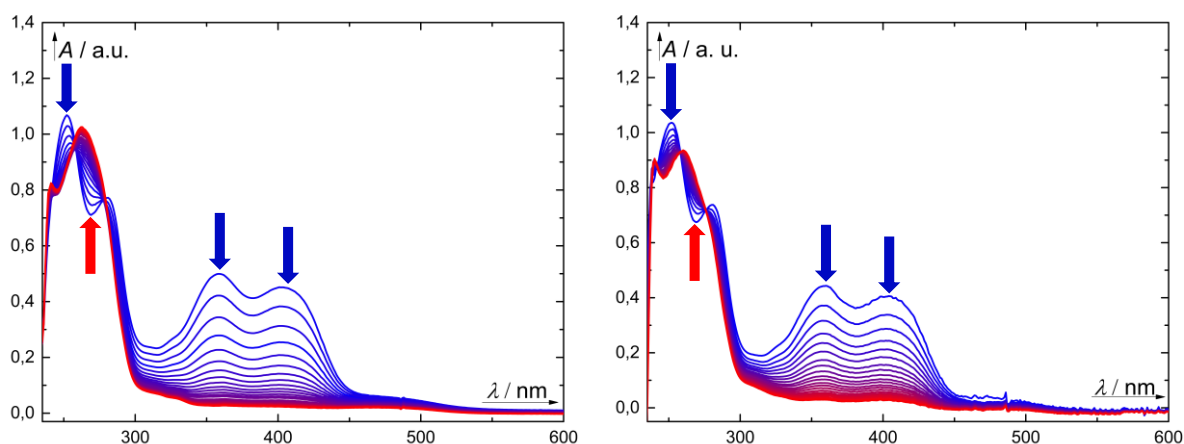
Obrázek 18: UV-Vis absorpční spektra: *vlevo* **44** ($c = 2,70 \times 10^{-5}$ mol/dm³; $\lambda_{\text{irr}} = 410$ nm; PBS; krok: 10 s) a *vpravo* **44** ($c = 3,81 \times 10^{-5}$ mol/dm³; $\lambda_{\text{irr}} = 470$ nm; PBS; krok: 30 s).

U **44** (Obrázek 18) je velmi důležité zmínit, že pouhou deprotonací hydroxylové skupiny na C2, dokážeme posunout absorpci téměř k 500 nm na rozdíl od **29**, kde pík prudce klesá při 430 nm a dál molekula téměř neabsorbuje. Absorbance píku aniontu je však skoro poloviční oproti absorbanci při 410 nm, tudíž roztok absorbuje méně světla a fotolýza pak probíhá značně pomaleji (Obrázek 18, *vpravo*). Ve všech spektrech se také objevují isosbestické body, které indikují jednoduchou A→B transformaci.



Obrázek 19: UV-Vis absorpční spektra: *vlevo* **46** ($c = 1,47 \times 10^{-5}$ mol/dm³; $\lambda_{\text{irr}} = 410$ nm; PBS; krok: 10 s) a *vpravo* **46** ($c = 1,64 \times 10^{-5}$ mol/dm³; $\lambda_{\text{irr}} = 470$ nm; PBS; krok: 15 s).

U molekuly **46** (Obrázek 19) obsahující atom bromu, je fotolýza ještě efektivnější než u **44**. To se projevuje hlavně při ozáření molekuly 470 nm světlem (Obrázek 19, *vpravo*), kdy dochází k dekompozici srovnatelně rychle jako při ozařování 410 nm světlem (Obrázek 19, *vlevo*) a podstatně rychleji než u **44**. Bylo by proto v budoucnu výhodné připravit molekuly s více těžkými atomy a lépe objasnit jejich vliv na fotochemii flavonolů. Pík aniontu hydroxylové skupiny podobně jako u **44** dosahuje až za 500 nm, což v budoucnu po objasnění mechanismu pomocí tranzientní absorpční spektroskopie umožní navrhnout molekuly absorbující v oblasti fototerapeutického okna.

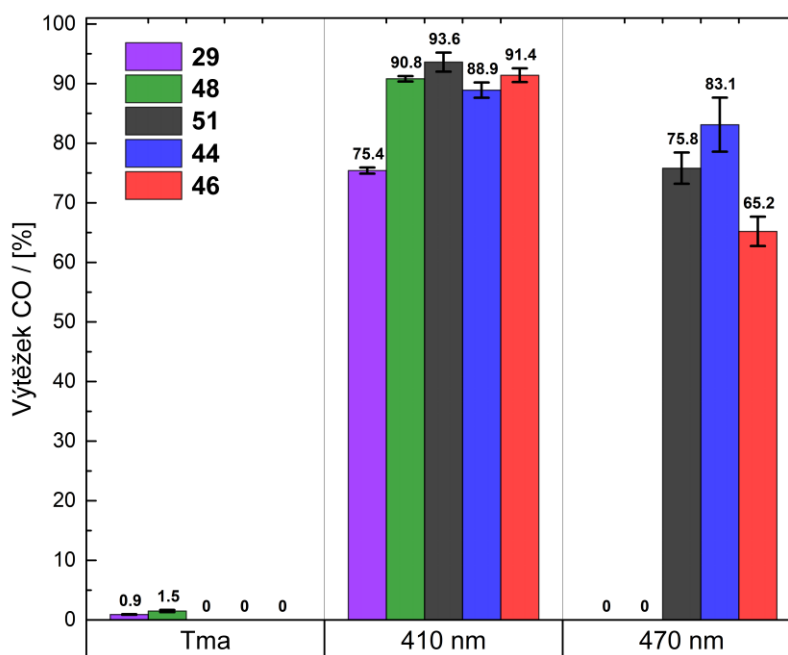


Obrázek 20: UV-Vis absorpční spektra: *vlevo* **51** ($c = 1,64 \times 10^{-5}$ mol/dm³; $\lambda_{\text{irr}} = 410$ nm; 5% DMSO/PBS; krok: 10 s) a *vpravo* **51** ($c = 2,59 \times 10^{-5}$ mol/dm³; $\lambda_{\text{irr}} = 470$ nm; 5% DMSO/PBS; krok: 30 s).

Derivát **51** vykazuje také dva píky při 355 nm a 415 nm (Obrázek 20). Podíl hydroxylového aniontu, který zasahuje až k 500 nm však není tak velký, protože u molekuly zřejmě nedojde k úplné deprotonaci. Molekulu **51** nebylo možné ani rozpustit v čistém PBS, proto musel být použit malý podíl DMSO (5%). Tímto experimentem se také potvrdilo, že zvýšená elektronová hustota na C fenylovém kruhu způsobená elektron donorní skupinou má za následek nižší kyselost hydroxylového protonu a signál aniontu je tedy zásadně méně intenzivní než u předchozích derivátů měřených v čistém PBS. To se projevilo i při ozáření **51** $\lambda_{\text{irr}} = 470$ nm, kdy probíhá fotolýza znatelně pomaleji (Obrázek 20, *vpravo*).

3.7 Uvolňování oxidu uhelnatého

Schopnost námi navržených derivátů uvolňovat CO jsme experimentálně stanovili pomocí plynové chromatografie GC-headspace. Při použití této metody se analyzuje atmosféra nad roztokem v hermeticky uzavřených vialkách. Vzorky jsou před analýzou ponechány ve tmě nebo ozářeny danou vlnovou délkou. Chemické výtěžky CO jsou znázorněny spolu s jejich směrodatnými odchylkami (Obrázek 21).



Obrázek 21: Chemické výtěžky CO po fotolýze syntetizovaných derivátů.

V levé sekci grafu jsou znázorněna kontrolní měření neozářených vzorků. Vzorky **29** a **48** obsahovaly nepatrné množství CO pravděpodobně kvůli neopatrné manipulaci a expozici světlem (Obrázek 21, tma). I když jsou roztoky všech našich připravených derivátů ve tmě enormně stabilní a vydrží skladování ve tmě, mohlo navzdory opatřením dojít k částečné fotolýze při manipulaci před samotným měřením.

Deriváty byly ozářeny světlem o $\lambda_{irr} = 410$ nm v methanolu (**29**, **48**) nebo v případě **51**, **44** a **46** v pufru (PBS, 10 mM, pH = 7.4, $I = 100$ mM). Všechny nové deriváty **48**, **51**, **44**, **46** dosahují přibližně stejných výtěžků CO okolo 90 %. Flavonol **29** uvolnil méně CO pravděpodobně kvůli nižší elektronové hustotě v konjugovaném elektronovém systému, to samé lze ovšem prohlásit o molekule **48**, která však obsahuje těžký atom bromu, který zvyšuje podíl tripletového excitovaného stavu. Všechny deriváty uvolňují CO velmi rychle v řádu desítek minut, je tudíž nepravděpodobné, že by nedošlo k úplné fotolýze, ale mohlo dojít například k úniku CO přes septum vialky.

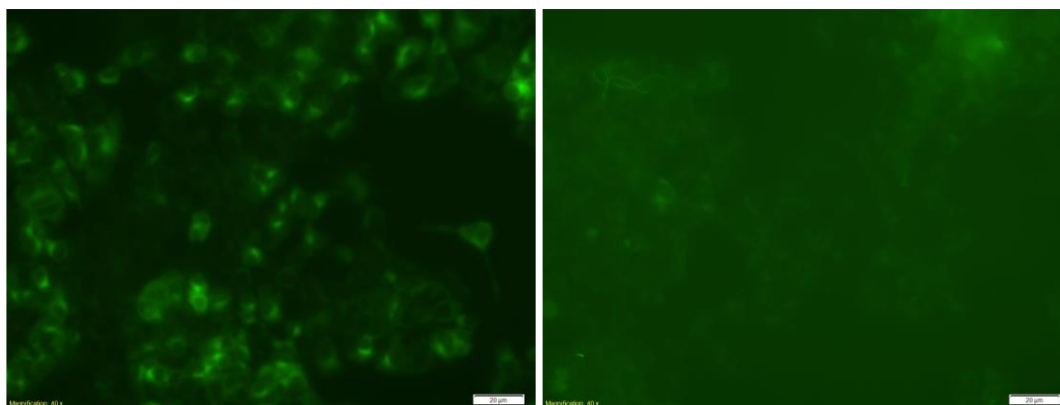
Deriváty **29** a **48** jsme neozářovali světlem o $\lambda_{irr} = 470$ nm, protože v této oblasti spektra vůbec neabsorbují (viz absorpční spektra, Obrázek 16). Oba dva deriváty jsou obecně špatně

rozpuštěné a v methanolu nedepronují. Naopak, deriváty **51**, **44** a **46** v této části spektra v pufru (PBS, 10 mM, pH = 7.4, I = 10 mM) částečně absorbují kvůli deprotonaci hydroxylové skupiny na C2 uhlíku.

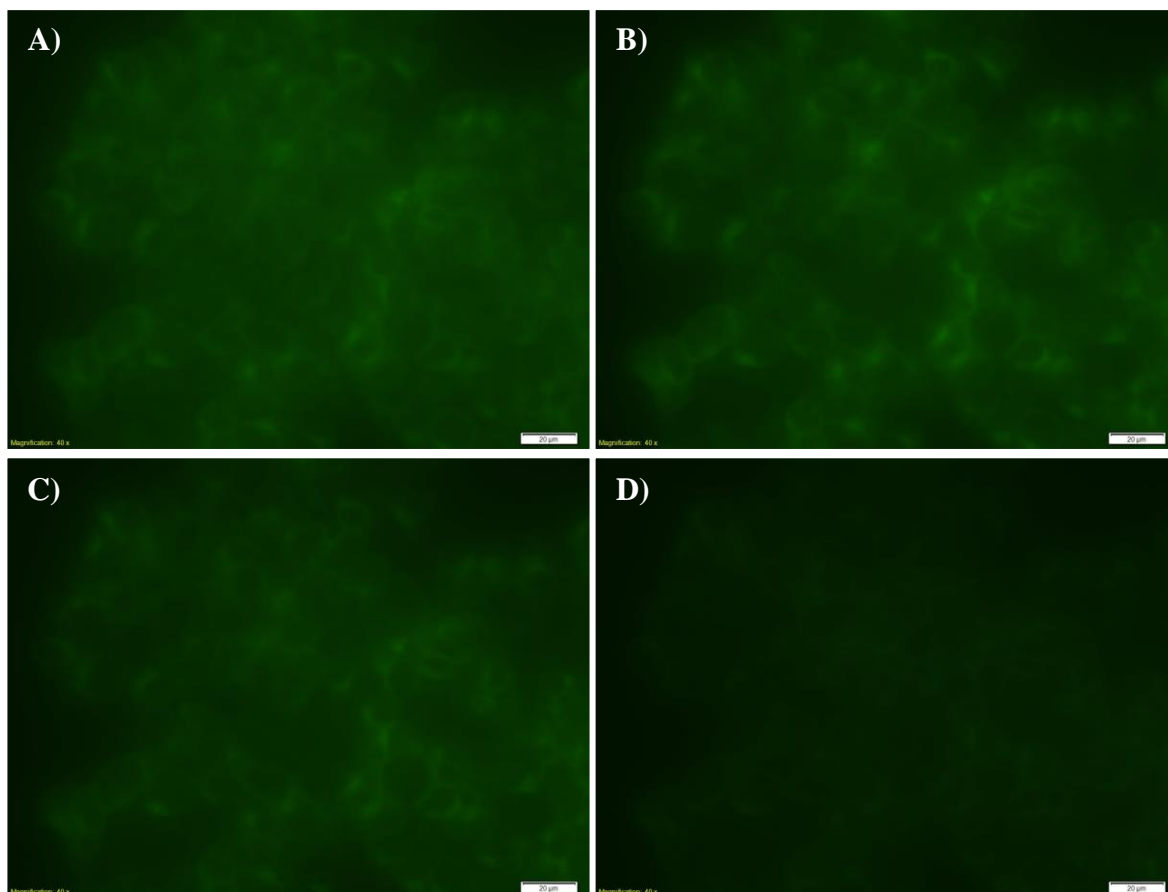
3.8 Fluorescenční mikroskopie

Pro biologickou aplikaci byly vybrány deriváty **51** a **44**, které vykazují nejlepší fluorescenční vlastnosti. Dle literatury emituje základní flavonol **29** světlo při $\lambda_{\max} = 582$ nm. Fotoproducty naopak nevykazují žádnou emisi světla. To umožňuje měřit a sledovat látky v biologickém prostředí pomocí fluorescenční mikroskopie a zároveň monitorovat fotolýzu *in vitro*. Lidské Hep1-6 buňky byly inkubovány v médiu v přítomnosti flavonolů **51** a **44** a následně vizualizovány pomocí fluorescenční spektroskopie.

Předběžné experimenty uskutečněné ve spolupráci s pracovištěm na Karlově univerzitě v Praze naznačují, že sloučeniny **51** a **44** se převážně lokalizují v cytoplazmatické membráně a částečně procházejí dovnitř buněk (Obrázek 22). Na rozdíl od **29**, která proniká do cytoplasmy [44], zůstává **51** zachycena převážně na membráně buňky. To může být způsobeno silně polární trimethylammoniovou skupinou, která sťažuje přechod přes nepolární lipidovou vrstvu. Tento problém by se dal vyřešit použitím méně polární funkční skupiny. Flavonolový skelet je ve vodném prostředí tak špatně rozpustný, že by pravděpodobně zavedení například PEG (polyethylenglykol) řetězců nestačilo. Pro podrobnější určení lokalizace budou v blízké budoucnosti provedeny experimenty za použití konfokálního mikroskopu.



Obrázek 22: Snímky fluorescenční mikroskopie myších hepatoblastomových buněk (Hep1-6) inkubované v médiu s **51** (vlevo) a **44** (vpravo) $c = 50 \mu\text{M}$ v MEM, po dobu 10 minut. Médium bylo odstraněno těsně před pořízením snímků.

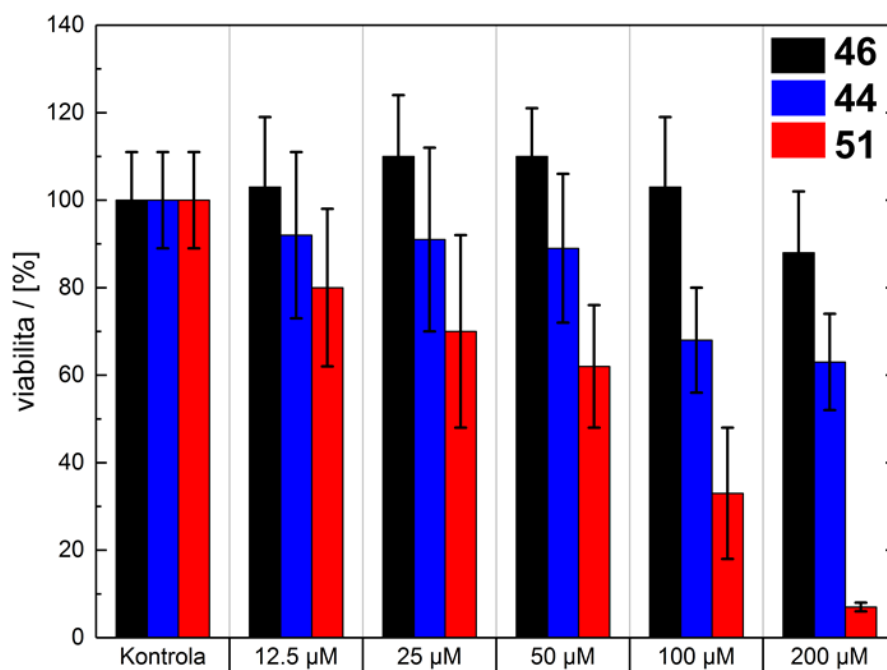


Obrázek 23: Snímky fluorescenční mikroskopie myších hepatoblastomových buněk (Hep1-6) inkubované v médiu s **51** ($c = 10 \text{ mmol/dm}^3$), snímky bez média, ozařováno excitačním zdrojem mikroskopu (LED, $\lambda \sim 450 \text{ nm}$). A) 0 min, B) 1 min, C) 2 min, D) 3 min.

Následně jsme sledovali fotolýzu **51** *in vitro* pomocí fluorescenční spektroskopie. Buňky v přítomnosti média a **51** byly ozařovány excitačním zdrojem mikroskopu ($\lambda \sim 450 \text{ nm}$). Periodicky každou minutu byly pořizovány snímky při stejné expozici (Obrázek 23). Ze snímků bylo evidentní, že důsledkem ozařování klesá intenzita fluorescence až do jejího vymizení (Obrázek 23). Fotolýza probíhá velmi rychle, neboť po 4 minutách už vzorek nevykazoval téměř žádnou emisi světla, což znamená, že se molekula rozložila za uvolnění CO [44].

3.9 Cytotoxicita připravených derivátů

Experimentálně byla stanovena akutní cytotoxicita námi připravených derivátů **44**, **46**, **51** na HepG2 buňkách s dobou expozice 24 h. Buněčná viabilita je v grafu vstažena procentuálně vůči kontrolnímu vzorku (čisté medium bez látek) spolu se směrodatnými odchylkami.



Obrázek 24: Akutní cytotoxicita (LC_{50}) připravených derivátů flavonolů **44**, **46** a **51** na HepG2 buňkách. Graf vyjadřuje procento přeživších buněk (viabilita) po vystavení dané koncentraci látky po dobu 24 h. Stanoveno vůči kontrolnímu vzorku.

Látky **44** a **46** jsou minimálně toxické, obě vykazují hodnotu $LC_{50} > 200 \mu\text{M}$ (LC_{50} je koncentrace zkoumané látky, jejíž expozici přežije právě 50 % buněk). Derivát **51** vykazuje mírnou toxicitu ($LC_{50} = 50\text{--}100 \mu\text{M}$), což je však pro naše biologické experimenty dostačující. Výsledky naznačují, že bude možné tyto deriváty testovat *in vitro*.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Metodika

Reagenty a rozpouštědla byla koupena od dodavatelů (Sigma-Aldrich, Acros, Fluorochem, TCI, Penta, Mikrochem) a během experimentů použita ve stavu, ve kterém byla zakoupena, popřípadě byla dočištěna či vysušena standartními metodami. Suchá rozpouštědla byla sušena a uskladněna s 3 Å molekulárními sítí pod inertní atmosférou. Deuterovaná rozpouštědla byla uskladněna taktéž pod inertní atmosférou. Syntéza byla prováděna za volného přístupu okolní atmosféry, pokud konkrétní reakce nevyžadovala inertní atmosféru (N₂). Při nutnosti bezvodého prostředí bylo laboratorní sklo sušeno přes noc při 150 °C a reakce probíhala taktéž v inertní atmosféře bez přístupu vzduchu.

Kolonová chromatografie byla prováděna na silikagelu (230–400 μm, Merck). Pro TLC (tenkovrstvá chromatografie) byly využity silikagelové destičky (Merck Silicagel 60 F254), které byly vizualizovány pomocí UV lampy (254 nm nebo 365 nm).

UV-Vis absorpční spektra byla měřena na Agilent Technologies Cary 8454 spektrofotometru za použití 1,0 cm křemíkové kyvety a rozpouštědel spektroskopické čistoty při teplotě 26±1 °C. Získaná data byla zpracována pomocí programů Microsoft Excel 2010 a OriginLabPro 2016.

Nukleární magnetická rezonance (NMR) molekul byla měřena na Bruker AVANCE II 300 a Bruker AVANCE III 500 spektrometrech. ¹H NMR spektra byly měřena při 500 MHz nebo 300 MHz a ¹³C NMR při 125 MHz nebo 75 MHz. Měření byla prováděna při 303±1 K v kyvetách o průměru 5 mm. Chemické posuny (δ) jsou uváděny v ppm relativně proti tetramethylsilanu (0,00 ppm), za použití deuterovaného rozpouštědla jako referenčního píku. Pro měření byly použity (CD₃)₂SO a CDCl₃. ¹H NMR posuny jsou uváděny v ppm s (CD₃)₂SO (δ = 2,50 ppm) a CDCl₃ (δ = 7,26 ppm) jako vnitřními standardy [61]. ¹³C NMR posuny spekter jsou uváděny v ppm s (CD₃)₂SO (δ = 39,52 ppm) a CDCl₃ (δ = 77,16 ppm) jako vnitřními standardy [61].

Plynová chromatografie (GC–Headspace) byla použita pro stanovení obsahu uvolněného CO po ozařování. Agilent Technologies 6890N GC System v zapojení s autosamplermem Agilent 7683B a hmotnostním detektorem Agilent 5973 MS byl vybaven kolonou plněnou molekulovými sítí (MXT-MSieve 5 Å, Restek). Obsah CO v atmosféře nad vzorkem byl analyzován nástřikem alikvotu atmosféry (50 μl) do přístroje a následnou integrací píku odpovídajícího CO. Přístroj byl kalibrován použitím cyklopropenu, který kvantitativně fotochemicky uvolňuje CO [62].

Měření molárních absorpčních koeficientů. Absorpční spektra molekul **29** a **48** byla měřena v methanolu; **46** a **44** ve vodném fosfátovém pufru PBS (10 mM, pH 7,4; I = 100 mM); a molekula **51** ve směsi PBS : DMSO (95 : 5). Ze zásobního roztoku ($c = 3\text{--}7 \times 10^{-5}$ M) bylo připraveno pět vzorků o klesající koncentraci ($c = 10^{-6}$ až 10^{-5} M), pro které

byla změřena absorbance v 1,0 cm křemíkové kyvetě. Ze závislosti absorbance na koncentraci podle Lambert-Beerova zákona byly pomocí lineární regrese stanoveny molární absorpční koeficienty (Příloha 2: Výpočet molárních absorpčních koeficientů). Data byla zpracována v programech Microsoft Excel 2010 a OriginLabPro 2016.

Fotolýza a její sledování pomocí UV-Vis absorpční spektroskopie. Roztoky derivátů **29**, **44**, **46**, **48**, **51** ($c = 1\text{--}3 \times 10^{-5}$ M) v MeOH nebo vodném fosfátovém pufru PBS (10 mM; pH = 7,4; $I = 100$ mM) v 1,0 cm křemíkové kyvetě byly ozařovány v reaktoru 410 nm nebo 470 nm LED-diodami (celkem 28 LED, ~ 10 mW/cm²). Během ozařování byly periodicky (10–30 s) měřeny UV-Vis absorpční spektra až do úplné fotolýzy výchozích roztoků (cca 5–15 min). Výsledné série spekter byly zpracovány v programu OriginLabPro 2016.

Stanovení uvolněného CO pomocí GC–Headspace. Roztok příslušné látky (800–1000 μ l, $c = 1\text{--}5 \times 10^{-5}$ M) v MeOH (methanol) nebo fosfátovém pufru PBS (10 mM; pH = 7,4; $I = 100$ mM) byl umístěn do GC vialky (2 ml) a zakrimpován vrškem s teflonovým septem. Vzorek byl následně umístěn do tmy, nebo ozařován v reaktoru pomocí 410 nm (30 min) nebo 470 nm (60 min) LED diodami (90 mW/cm²). Atmosféra nad roztokem byla následně analyzována na výše popsaném plynovém chromatografu.

Fluorescenční mikroskopie v myších buňkách. Buňky z linie myších hepatoblastomů Hep1-6 byly vypěstovány podle protokolu výrobce ve “48-well“ destičkách. Buňky byly udržovány při 37 °C a 5 % CO₂ před a během experimentů. Na začátku bylo přidáno MEM médium obsahující látku **44** nebo **51**. Po 10 minutách inkubace byla tato směs vyměněna za čisté médium a buňky byly vizualizovány pomocí fluorescenční mikroskopie (Olympus IX51, rtuťová výbojka, zelený filtr fluorescence Olympus WIB). V případě ozařování vzorků byl jako zdroj světla použit excitační zdroj mikroskopu ($\lambda \sim 450$ nm) a buňky byly periodicky vizualizovány při konstantní expozici každou minutu.

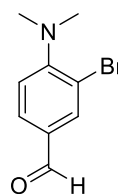
Stanovení *in vitro* toxicity. Lidské hepatoblastomové buňky HepG2 byly pěstovány podle protokolu výrobce v „96-well“ destičkách se sterilními roztoky **44**, **46** (PBS, $c = 10$ mM, pH 7.4, $I = 100$ mM), **51** (PBS : DMSO – 95 : 5) o koncentraci $c = 12,5\text{--}200$ μ M po dobu 24 h. Buněčná viabilita byla stanovena pomocí mitochondriálně závislé redukce MTT na formazan. Po 2 h inkubace s roztokem MTT byla spektroskopicky stanovena absorbance formazanu. Deriváty **44**, **46**, **51** nevykazují interferenci s formazanem (při 545 nm neabsorbují). Pro každý derivát byla provedena nejméně tři měření.

4.2 Příprava derivátů flavonolu

V této kapitole je uveden postup všech připravených látek v rámci tohoto projektu. Grafy ^1H NMR, ^{13}C NMR jsou uvedeny v přílohách (Příloha 1: NMR spektra připravených látek). HRMS bylo měřeno pouze pro dosud nepublikované molekuly.

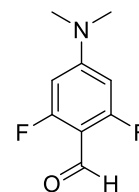
3-Bromo-4-(dimethylamino)benzaldehyd (60).

K roztoku 4-(dimethylamino)benzaldehydu (3,00 g; 20,1 mmol) v DCM (30 ml) byl přidán pevný *N*-bromosukcinimid (5,37 g; 30,2 mmol) a reakční roztok byl míchán při pokojové teplotě přes noc. Reakce byla zastavena přidáním vodného roztoku NaOH (30%; 100 ml). Směs byla extrahována DCM (2×50 ml) a kombinované organické vrstvy byly vysušeny MgSO_4 . Rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku a surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (silikagel, hexan : ethyl-acetát – 10 : 1). Produktem **60** je bezbarvý olej (3,08 g; 68 %). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 9.77 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.68 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 7.03 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 2.91 (s, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 189.4, 156.7, 135.8, 130.9, 129.8, 119.3, 116.4, 43.3.



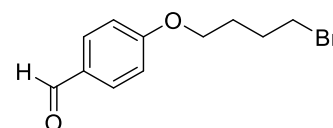
4-(Dimethylamino)-2,6-difluorobenzaldehyd (58).

Bezvodý POCl_3 (1,78 ml; 19,0 mmol) byl po kapkách přidán do intenzivně míchaného suchého dimethylformamidu (DMF; 20 ml; 4 eq). Směs se míchala v inertní atmosféře po dobu 30 minut při 0 °C. 3,5-Difluoro-*N,N*-dimethylanilin (2,00 g; 12,7 mmol) byl přidán do připraveného roztoku a míchající se směs byla ponechána 1 hodinu při pokojové teplotě a následně byla zahřata na 100 °C po dobu 1 hodiny. Poté byla reakční směs ochlazena na pokojovou teplotu a míchána přes noc. Reakční roztok byl ochlazen na 0 °C a reakce byla zastavena vodným NaOH (20 ml, 2 M). Surový produkt byl extrahován ethyl-acetátem (2×10 ml), kombinované organické vrstvy byly vysušeny MgSO_4 a rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, hexan : ethyl-acetát – 3 : 1) za vzniku produktu **58** jakožto bezbarvého oleje (1,27 g; 54 %). b.t. 93,7–95,8 °C. ^1H NMR (500 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) 9.91 (s, 1H), 6.42 (d, 2H, $J = 13.9$ Hz), 3.04 (s, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) 164.1 (dd, $J_1 = 254.6$ Hz, $J_2 = 10.5$ Hz), 155.3 (dd, $J_1 = 15.6$ Hz, $J_2 = 15.6$ Hz), 102.1 (dd, $J_1 = 12.0$ Hz, $J_2 = 12.0$ Hz), 94.4 (d, $J = 27.7$ Hz), 39.7. ^{19}F NMR (470 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) -115.4 (s). HRMS (APCI): Vypočteno pro $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{F}_2\text{NO}$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 186.0725, nalezeno 186.0723.



4-(4-Bromobutoxy)benzaldehyd (65).

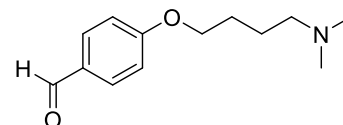
Směs 4-hydroxybenzaldehydu **64** (2,00 g; 16,4 mmol), 1,4-dibromobutanu (10,60 g; 49,1 mmol) a K_2CO_3 (4,53 g; 32,8 mmol) byla v MeCN refluxována (100 ml) přes noc. Směs byla následně ochlazena na laboratorní teplotu a po přidání vody (100 ml) byla extrahována ethyl-acetátem (3×70 ml). Kombinované organické vrstvy byly vysušeny MgSO_4 . Rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku a surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, hexan : ethyl-acetát – 5 : 1).



Produkt **65** je bezbarvý olej (3,35 g; 80 %). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 9.87 (s, 1H), 7.81 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 6.98 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz), 4.07 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz), 3.48 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 1.95–2.09 (m, 4H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 190.8, 164.0, 132.1, 130.1, 114.9, 67.4, 33.3, 29.5, 27.8. HRMS (APCI): Vypočteno pro $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{BrO}_2^+$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 257.0177, nalezeno 257.0179

4-(4-(Dimethylamino)butoxy)benzaldehyd (**66**).

K roztoku aldehydu **65** (1,68 g; 6,5 mmol) v EtOH (30 ml) byl přidán roztok dimethylaminu (5,6 M v EtOH; 23,3 ml; 131 mmol) a výsledná směs byla míchána přes noc za laboratorní teploty. Následně byl přidán vodný roztok K_2CO_3



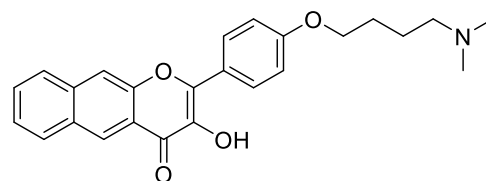
(1M, 100 ml) a tato směs byla míchána další hodinu. Následně byla reakční směs vyextrahována pomocí ethyl-acetátu (3×70 ml). Kombinované organické vrstvy byly vysušeny MgSO_4 . Rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku a surový produkt byl použit v následující reakci bez dalšího čištění. Produkt **66** je bezbarvý olej (1,38 g; 95 %). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 9.84 (s, 1H), 7.79 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 6.95 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 4.03 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 2.30 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 2.20 (s, 6H), 1.77–1.86 (m, 2H), 1.57–1.67 (m, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 190.8, 164.3, 132.1, 130.0, 114.9, 68.3, 59.4, 45.5, 27.1, 24.2. HRMS (APCI): Vypočteno pro $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{NO}_2^+$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 222.1494, nalezeno 222.1497.

Obecný postup pro přípravu derivátů flavonolu (**29**, **48**, **59**, **61**, **63**, **67**).

1-(3-hydroxynafthalen-2-yl)ethanon (10,7 mmol) byl rozpuštěn v ethanolu (EtOH; 30 ml). Ke směsi byl následně přidán NaOH (42,9 mmol) ve vodě (6 ml). Po 5 minutách míchání roztoku byl přidán odpovídající aldehyd (13,9 mmol) a reakční směs se míchala při pokojové teplotě 4 hodiny. Vodný roztok peroxidu vodíku byl přidán po kapkách (30%; 29,0 mmol) a reakce byla dále míchána přes noc. Nakonec byla reakční směs okyselena vodným roztokem HCl (1 M) na pH 6,5. Sraženina byla odfiltrována, promyta ethanolom (3×15 ml) a vysušena na vzduchu.

2-(4-(4-(Dimethylamino)butoxy)fenyl)-3-hydroxy-4H-benzo[g]chromen-4-on (**67**).

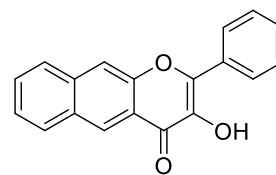
Připraveno podle obecného postupu pro přípravu derivátů flavonolu z ketonu **52** (7,25 g; 4,0 mmol) a aldehydu **66** (1,34 g; 6,1 mmol) se 46% výtěžkem (760 mg) za vzniku produktu **67**; žlutý prášek.



b.t. 153–155 °C. ^1H NMR (500 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) 9.43 (brs, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.27 (d, 2H, $J = 9.1$ Hz) 8.24 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 8.07 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 7.67 (dd, 1H, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 7.5$ Hz), 7.57 (dd, 1H, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 7.5$ Hz), 7.15 (dd, 2H, $J = 9.1$ Hz), 4.10 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 2.31 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 2.17 (s, 6H), 1.80–1.74 (m, 2H), 1.61–1.55 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) 173.5, 160.0, 150.8, 146.4, 136.9, 135.2, 129.6, 129.4, 129.3, 128.6, 127.1, 125.8, 125.7, 123.6, 120.9, 114.5, 114.0, 67.6, 58.5, 44.9, 26.4, 23.3. HRMS (APCI): Vypočteno pro $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{NO}_4^+$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 404.1856, nalezeno 404.1857.

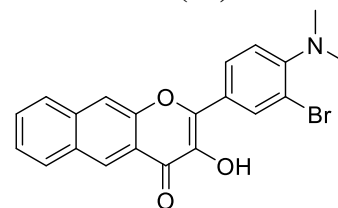
3-Hydroxy-2-fenyl-4H-benzo[g]chromen-4-on (29).

Připraveno podle obecného postupu pro přípravu derivátů flavonolu z 1-(3-hydroxynafthalen-2-yl)ethanonu **52** (9,50 g; 51,0 mmol) a benzaldehydu (6,75 ml; 7,04 g; 66,3 mmol) se 44% výtěžkem (6,50 g) za vzniku produktu **29**; žlutý prášek. b.t. 200–202 °C. ¹H NMR (500 MHz, *d*₆-DMSO): δ (ppm) 9.57 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.31–8.28 (m, 3H), 8.25 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 8.07 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.68 (dd, 1H, *J*₁ = 7.9 Hz, *J*₂ = 7.2 Hz), 7.54–7.62 (m, 4H). ¹³C NMR (125 MHz, *d*₆-DMSO): δ (ppm) 173.9, 150.8, 146.0, 137.7, 135.4, 131.5, 130.0, 129.4, 129.3, 128.7, 128.5, 127.9, 127.1, 125.9, 125.8, 120.9, 114.1.



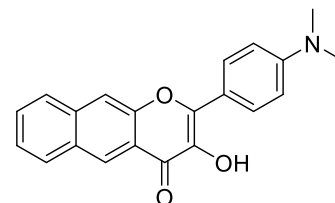
2-(3-Bromo-4-(dimethylamino)fenyl)-3-hydroxy-4H-benzo[g]chromen-4-on (61).

Připraveno podle obecného postupu pro přípravu derivátů flavonolu z 1-(3-hydroxynafthalen-2-yl)ethanonu **52** (0,50 g; 2,7 mmol) a 3-bromo-4-(dimethylamino)benzaldehydem **60** (0,86 g; 3,8 mmol) se 48% výtěžkem (0,52 g) za vzniku produktu **61**; žlutý prášek. b.t. 169–171 °C. ¹H NMR (500 MHz, *d*₆-DMSO): δ (ppm) 9.64 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.51 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.26–8.23 (m, 2H), 8.07 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.67 (dd, 1H, *J*₁ = 7.5 Hz, *J*₂ = 7.4 Hz), 7.57 (dd, 1H, *J*₁ = 7.5 Hz, *J*₂ = 7.5 Hz), 7.33 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 2.86 (s, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, *d*₆-DMSO): δ (ppm) 173.5, 152.7, 150.7, 144.7, 137.4, 135.3, 132.9, 129.4, 129.3, 128.7, 128.0, 127.1, 126.1, 125.8, 125.7, 120.9, 120.2, 116.6, 114.1, 43.3. HRMS (APCI): Vypočteno pro C₂₁H₁₇BrNO₃ [M+H⁺] 410.0386, nalezeno 410.0387.



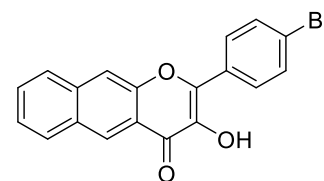
2-(4-(dimethylamino)fenyl)-3-hydroxy-4H-benzo[g]chromen-4-on (63).

Připraveno podle obecného postupu pro přípravu derivátů flavonolu z 1-(3-hydroxynafthalen-2-yl)ethanonu **52** (2,00 g; 10,7 mmol) a 4-(dimethylamino)benzaldehydu **56** (2,08 g; 13,9 mmol) s 84% výtěžkem (3,00 g) za vzniku **63**; žlutý prášek. b.t. 219–221 °C. ¹H NMR (500 MHz, *d*₆-DMSO): δ (ppm) 9.13 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.20–8.25 (m, 3H), 8.06 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.65 (dd, 1H, *J*₁ = 7.5 Hz, *J*₂ = 7.5 Hz), 7.55 (dd, 1H, *J*₁ = 7.4 Hz, *J*₂ = 7.4 Hz), 6.87 (d, 2H, *J* = 9.1 Hz), 3.04 (s, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, *d*₆-DMSO): δ (ppm) 172.6, 151.1, 150.7, 147.6, 136.0, 135.0, 129.3, 129.2 (2×C), 128.4, 127.1, 125.6, 125.4, 121.1, 118.0, 113.7, 111.4, 111.0, 39.6. HRMS (APCI): Vypočteno pro C₂₁H₁₈NO₃ [M+H⁺] 332.1281, nalezeno 332.1281.



2-(4-bromofenyl)-3-hydroxy-4H-benzo[g]chromen-4-on (48).

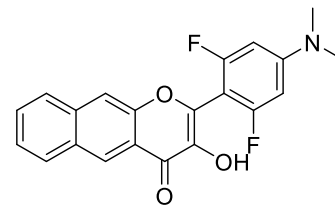
Připraveno podle obecného postupu pro přípravu derivátů flavonolu z 1-(3-hydroxynafthalen-2-yl)ethanonu **52** (0,40 g; 2,1 mmol) a 4-bromobenzaldehydu (0,59 g; 3,2 mmol) s 53% výtěžkem (0,42 g) za vzniku **48**; oranžový prášek. b.t. 209–211 °C. ¹H NMR (500 MHz, *d*₆-DMSO): 9.79 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.23–8.25 (m, 3H), 8.07 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.81 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 7.68 (dd, 1H, *J*₁ = 7.4 Hz, *J*₂ = 7.3 Hz), 7.57 (dd, 1H, *J*₁ = 7.5 Hz, *J*₂ = 7.4 Hz). ¹³C NMR (125 MHz,



d_6 -DMSO): δ (ppm) 174.0, 150.8, 144.8, 138.0, 135.4, 131.6, 130.7, 129.7, 129.39, 129.35, 128.8, 127.1, 125.90, 125.85, 123.5, 120.8, 114.2. HRMS (APCI): Vypočteno pro $C_{19}H_{12}BrO_3$ $[M+H^+]$ 366.9964, nalezeno 366.9966.

2-(4-(Dimethylamino)-2,6-difluorofenyl)-3-hydroxy-4H-benzo[g]chromen-4-on (59).

Připraveno podle obecného postupu pro přípravu derivátů flavonolu z 1-(3-hydroxynaftalen-2-yl)ethanonu **52** (0,40 g; 2,2 mmol) a 4-(dimethylamino)-2,6-difluorbenzaldehydu **58** (0,63 g; 3,2 mmol) s 68% výtěžkem (0,53 g) za vzniku **59**; oranžový prášek. b.t. >260 °C (rozklad). 1H NMR (500 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) 9.21 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.25 (d, 1H,



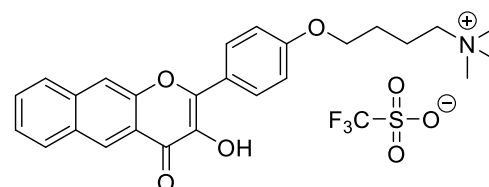
$J = 8.2$ Hz), 8.19 (s, 1H), 8.05 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 7.68 (dd, 1H, $J_1 = 7.3$ Hz, $J_2 = 7.2$ Hz), 7.58 (dd, 1H, $J_1 = 7.4$ Hz, $J_2 = 7.2$ Hz), 6.53 (d, 2H, $J = 12.0$ Hz), 3.02 (s, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) 173.3, 161.86, 161.78, 159.90, 159.82, 153.2, 151.3, 141.0, 139.0, 135.3, 129.3, 128.8, 127.1, 126.0, 125.9, 121.4, 114.0, 94.76, 84.54. ^{19}F NMR (470 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) 110.15 (s). HRMS (APCI): Vypočteno pro $C_{21}H_{16}F_2NO_3$ $[M+H^+]$ 368.1093, nalezeno 368.1095.

Obecný postup pro metylaci derivátů flavonolu (44, 46, 51).

Odpovídající derivát flavonolu **61**, **63**, **67** (1,50 mmol) byl rozpuštěn v suchém dichlormetanu (DCM; 10 ml) v inertní atmosféře. Methyl trifluoromethansulfonát (2,25 mmol) byl přidán do reakční směsi po kapkách injekční stříkačkou. Reakční směs byla míchána přes noc, sraženina byla odfiltrována, promyta DCM (3×8 ml) a vysušena vzduchem za vzniku kvarterní amoniové soli **44**, **46**, **51**.

4-(4-(3-Hydroxy-4-oxo-4H-benzo[g]chromen-2-yl)fenoxy)-N,N,N-trimethylbutan-1-amonium trifluoromethansulfonát (51).

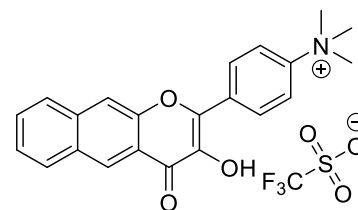
Připraveno podle obecného postupu pro metylaci derivátů flavonolu z **67** (0,35 g; 0,87 mmol) a methyl trifluormethansulfonátu (0,15 ml; 1,30 mmol) s výtěžkem 74 % (0,37 g) za vzniku **51**; žlutý prášek. b.t. 208–210 °C. 1H NMR (500 MHz, d_6 -DMSO): δ



(ppm) 9.44 (brs, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.28–8.30 (m, 3H), 8.24 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 8.07 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7.68 (dd, 1H, $J_1 = 7,5$ Hz; $J_2 = 7,5$ Hz), 7.57 (dd, 1H, $J_1 = 7,8$ Hz, $J_2 = 7,2$ Hz), 7.18 (d, 2H, $J = 9,1$ Hz), 4.15 (t, 2H, $J = 6,0$ Hz), 3.39 (m, 2H), 3.08 (s, 9H), 1.90 (m, 2H), 1.80 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) 173.5, 159.8, 150.8, 146.3, 136.9, 135.2, 129.7, 129.4, 129.3, 128.7, 127.1, 125.8, 125.7, 124.5 (TfO $^-$), 123.8, 121.9 (TfO $^-$), 120.9, 119.4 (TfO $^-$), 116.8 (TfO $^-$), 114.6, 114.0, 66.9, 65.0, 52.2, 25.5, 19.2. HRMS (ESI): Vypočteno pro $C_{26}H_{28}NO_4^+$ $[M^+]$ 418.2013, nalezeno 418.2015.

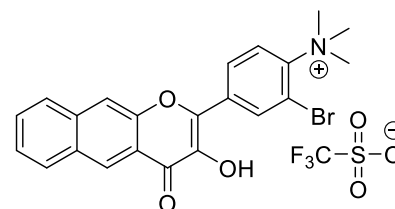
4-(3-Hydroxy-4-oxo-4*H*-benzo[*g*]chromen-2-yl)-*N,N,N*-trimethylbenzenamonium trifluoromethansulfonát (44).

Připraveno podle obecného postupu pro metylaci derivátů flavonolu z **63** (0,49 g; 1,5 mmol) a methyl trifluormethan sulfonátu (0,26 ml; 2,3 mmol) s 87% výtěžkem (0,65 g) za vzniku **44**; tmavě žlutý prášek. b.t. 240–242 °C. ¹H NMR (500 MHz, *d*₆-DMSO): δ (ppm) 9.97 (brs, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.47 (d, 2H, *J* = 9.2 Hz), 8.34 (s, 1H), 8.27 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 8.19 (d, 2H, *J* = 9.2 Hz), 8.09 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.70 (dd, 1H, *J*₁ = 7.6 Hz, *J*₂ = 7.2 Hz), 7.59 (dd, 1H, *J*₁ = 7.5 Hz, *J*₂ = 7.5 Hz), 3.69 (s, 9H). ¹³C NMR (125 MHz, *d*₆-DMSO): δ (ppm) 174.1, 150.8, 147.5, 143.9, 138.5, 135.5, 133.1, 129.44, 129.42, 129.16, 129.0, 127.1, 126.1, 126.0, 124.5 (TfO⁻), 121.9 (TfO⁻), 120.83, 120.80, 119.4 (TfO⁻), 116.8 (TfO⁻), 114.3, 56.4. HRMS (ESI): Vypočteno pro C₂₂H₂₀NO₃⁺ [M⁺] 346.1438, nalezeno 346.1440.



2-Bromo-4-(3-hydroxy-4-oxo-4*H*-benzo[*g*]chromen-2-yl)-*N,N,N*-trimethylbenzenamonium trifluoromethansulfonát (46).

Připraveno podle obecného postupu pro metylaci derivátů flavonolu z 2-(4-(dimethylamino)fenyl)-3-hydroxy-4*H*-benzo[*g*]chromen-4-onu **61** (0,15 g; 0,4 mmol) a methyl trifluormethan sulfonátu (0,08 ml; 0,7 mmol). Čištěním surového produktu pomocí kolonové chromatografie (silikagel, DCM : MeOH – 10 : 1 a 5 : 1) byl získán produkt **46** s 64% výtěžkem (0,13 g); žlutý prášek. b.t. 154–156 °C. ¹H NMR (500 MHz, *d*₆-DMSO): 10.27 (s, 1H), 8.81–8.87 (m, 2H), 8.49 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 8.38 (m, 1H), 8.31–8.26 (m, 2H), 8.09 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 7.71 (dd, 1H, *J*₁ = 7.8 Hz, *J*₂ = 7.2 Hz), 7.60 (dd, 1H, *J*₁ = 7.7 Hz, *J*₂ = 7.5 Hz), 3.90 (s, 9H). ¹³C NMR (125 Mhz, *d*₆-DMSO): δ (ppm) 174.4, 150.8, 142.9, 141.9, 135.0, 129.42, 129.02, 128.1, 127.1, 126.0, 125.9, 124.52, 124.36, 121.9, 120.7, 119.4, 116.8, 114.4, 113.8, 55.9. HRMS (ESI): Vypočteno pro C₂₂H₁₉BrNO₃⁺ [M⁺] 426.0525, nalezeno 426.0528.



5 ZÁVĚR

V teoretické části práce jsou shrnuty vlastnosti oxidu uhelnatého a jeho chování v buňkách, včetně lidského těla. Oxid uhelnatý (CO) se v budoucnosti může uplatnit při léčbě nádorů, protože iniciuje oxidativní metabolismus glukózy, který kvůli nefunkčním mitochondriím nádorových buněk způsobí jejich smrt [25]. Byly shrnuty i toxické účinky pro člověka, výskyt a způsoby vzniku CO v těle, jakožto produkt metabolismu. Na druhou stranu jsou zdůrazněny i pozitivní účinky CO a jeho důležitost v lidském těle.

Z navržených derivátů se podařilo připravit celkem pět nových derivátů. Publikovaný postup syntézy byl optimalizován. Do struktury tří nových derivátů (**44**, **46**, **51**) se podařilo zavést trimethylammoniové funkční skupiny, které umožňují velmi dobrou rozpustnost ve vodném prostředí (pufr) a jsou tudíž využitelné pro další biologické experimenty. Dva deriváty (**44** a **46**) byly plně rozpustné ve vodném prostředí bez nutnosti přidavku dalšího rozpouštědla.

Pro fotochemické experimenty (transientní absorpční spektroskopie) za účelem objasnění mechanismu byl připraven derivát **48** nesoucí těžký atom bromu podporující přechod do tripletového excitovaného stavu. Fotolýza tohoto derivátu při ozáření 410 nm světlem probíhala rychleji než u zbylých derivátů. Dále byly připraveny deriváty s elektron akceptorní (**44**) i donorní (**51**) funkční skupinou. Všechny experimenty byly prováděny i s již známým nesubstituovaným flavonolem **29**, který sloužil jako kontrola pro porovnání s literaturou.

Deriváty **44**, **46**, **48**, **51**, **58**, **61**, **67** jsou poprvé připravené molekuly, a proto byla jejich struktura plně analyzována pomocí ^1H NMR a ^{13}C NMR spektroskopie a HRMS. Dále byly změřeny absorpční vlastnosti všech nových derivátů. V prostředí pufru byl pozorován vliv deprotonace hydroxy skupiny na absorpční spektrum v podobě bathochromního posunu absorpčního maxima (λ_{max}) až k ~ 450 nm. Dalším cílem navazující práce bude posunout absorpci až do oblasti fototerapeutického okna, což je nezbytné pro aplikaci *in vivo*.

Schopnost nových derivátů uvolňovat CO po ozáření světlem byla dokázána pomocí plynové chromatografie GC-headspace, přičemž bylo dosaženo velmi dobrých chemických výtěžků u všech derivátů (90 %, 410 nm), které dokonce překročily výtěžek **29** (75 %). Sledováním fotolýzy pomocí UV-Vis spektroskopie se potvrdilo, že průběh fotolýzy vykazuje stejné vlastnosti jako u **29** a že těžký atom bromu fotolýzu významně urychluje. Deriváty rozpustné v PBS s deprotonovanou hydroxylovou skupinou (pH = 7,4) podléhaly fotolýze i po ozáření anionické formy při 470 nm.

Fluorescenční mikroskopie ukázala, že naše deriváty dokáží uvolňovat CO *in vitro* a to velmi rychle v řádu několika minut. Derivát **51** se zřejmě těžko dostává do intracelulárního prostoru, což předpokládáme i pro další deriváty rozpustné v PBS nesoucí kvarterní ammoniovou sůl. Fotoprodukt **51** nevykazuje fluorescenční vlastnosti, analogicky jako fotoprodukt **29**.

Dále byla stanovena *in vitro* toxicita a buněčná viabilita při expozici roztoky těchto derivátů. V budoucnu je nutné provést další měření cytotoxicity i pro fotoprodukty. Poznatky získané o flavonolech budou dále využity ve skupině prof. Klána k dalšímu výzkumu. V současném

období se už pracuje na objasnění mechanismu fotolýzy **29** s využitím zde připravených derivátů. Poté bude možné navrhnout nové molekuly s vylepšenými vlastnostmi jako je absorpce v oblasti fototerapeutického okna.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Von Burg, D. R. Toxicology Update. *J. Appl. Toxicol.* **1999**, 19 (5), 379–386
- [2] Ryter, S. W.; Choi, A. M. K. Carbon Monoxide in Exhaled Breath Testing and Therapeutics. *J. Breath Res.* **2013**, 7 (1), 017111
- [3] Ryter, S. W. Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiol. Rev.* **2006**, 86 (2), 583–650
- [4] König, K. Multiphoton Microscopy in Life Sciences. *J. Microsc.* **2000**, 200 (2), 83–104
- [5] Bleecker, M. L. Carbon Monoxide Intoxication. *Handb. Clin. Neurol.* **2015**, 131, 191–203
- [6] Valnot, I.; von Kleist-Retzow, J.-C.; Barrientos, A.; Gorbatyuk, M.; Taanman, J.-W.; Mehaye, B.; Rustin, P.; Tzagoloff, A.; Munnich, A.; Rötig, A. A Mutation in the Human Heme A:Farnesyltransferase Gene (COX10) Causes Cytochrome c Oxidase Deficiency. *Hum. Mol. Genet.* **2000**, 9 (8), 1245–1249
- [7] Kao, L. W.; Nañagas, K. A. Toxicity Associated with Carbon Monoxide. *Clin. Lab. Med.* **2006**, 26 (1), 99–125
- [8] Murray, R. K. (Robert K.; Matouš, B. *Harperova Ilustrovaná Biochemie*; Galén, 2012
- [9] Chay, T. R.; Brillhart, D. Mechanism of Cooperative Oxygen Binding to Hemoglobin: Kinetic Aspects. *Biochemistry* **1974**, 13 (26), 5311–5317
- [10] Wang, N.; Zhao, X.; Lu, Y. Role of Heme Types in Heme-Copper Oxidases: Effects of Replacing a Heme b with a Heme o Mimic in an Engineered Heme-Copper Center in Myoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (47), 16541–16547
- [11] Guzman, J. A. Carbon Monoxide Poisoning. *Crit. Care Clin.* **2012**, 28 (4), 537–548
- [12] Ling, K.; Men, F.; Wang, W. C.; Zhou, Y. Q.; Zhang, H. W.; Ye, D. W. Carbon Monoxide and Its Controlled Release: Therapeutic Application, Detection, and Development of Carbon Monoxide Releasing Molecules (CORMs). *J. Med. Chem.* **2018**, 61 (7), 2611–2635
- [13] Olas, B. Carbon Monoxide Is Not Always a Poison Gas for Human Organism: Physiological and Pharmacological Features of CO. *Chem. Biol. Interact.* **2014**, 222, 37–43
- [14] Schatzschneider, U. PhotoCORMs: Light-Triggered Release of Carbon Monoxide from the Coordination Sphere of Transition Metal Complexes for Biological Applications. *Inorganica Chim. Acta* **2011**, 374 (1), 19–23
- [15] Durante, W.; Johnson, F. K.; Johnson, R. A. Role of Carbon Monoxide in Cardiovascular Function. *J. Cell. Mol. Med.* **2006**, 10 (3), 672–686
- [16] Rudra, C. B.; Williams, M. A.; Sheppard, L.; Koenig, J. Q.; Schiff, M. A.; Frederick, I. O.; Dills, R. Relation of Whole Blood Carboxyhemoglobin Concentration to Ambient Carbon Monoxide Exposure Estimated Using Regression. *Am. J. Epidemiol.* **2010**, 171 (8), 942–951
- [17] Russell, M. A. H. Blood Carboxyhaemoglobin Changes during Tobacco Smoking. *Postgrad. Med. J.* **1973**, 49 (576), 684–687
- [18] Nakahira, K.; Choi, A. M. K. Carbon Monoxide in the Treatment of Sepsis. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **2015**, 309 (12), L1387–L1393
- [19] Mahan, V. L. Neuroprotective, Neurotherapeutic, and Neurometabolic Effects of Carbon Monoxide. *Med. Gas Res.* **2012**, 2 (1), 32
- [20] Agostinis, P.; Vantieghem, A.; Merlevede, W.; De Witte, P. A. M. Hypericin in Cancer Treatment: More Light on the Way. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2002**, 34 (3), 221–241
- [21] Schwer, C. I.; Stoll, P.; Rospert, S.; Fitzke, E.; Schallner, N.; Bürkle, H.; Schmidt, R.; Humar, M. Carbon Monoxide Releasing Molecule-2 CORM-2 Represses Global

- Protein Synthesis by Inhibition of Eukaryotic Elongation Factor EEF2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45* (2), 201–212
- [22] Vitek, L.; Gbelcová, H.; Muchová, L.; Váňová, K.; Zelenka, J.; Koničková, R.; Šuk, J.; Zadinova, M.; Knejzlík, Z.; Ahmad, S.; et al. Antiproliferative Effects of Carbon Monoxide on Pancreatic Cancer. *Dig. Liver Dis.* **2014**, *46* (4), 369–375
- [23] Valnot, I.; von Kleist-Retzow, J.-C.; Barrientos, A.; Gorbatyuk, M.; Taanman, J.-W.; Mehaye, B.; Rustin, P.; Tzagoloff, A.; Munnich, A.; Rotig, A. A Mutation in the Human Heme A:Farnesyltransferase Gene (COX10) Causes Cytochrome c Oxidase Deficiency. *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9* (8), 1245–1249
- [24] Fadaka, A.; Ajiboye, B.; Ojo, O.; Adewale, O.; Olayide, I.; Emuowhochere, R. Biology of Glucose Metabolization in Cancer Cells. *J. Oncol. Sci.* **2017**, *3* (2), 45–51
- [25] Wegiel, B.; Gallo, D.; Csizmadia, E.; Harris, C.; Belcher, J.; Vercellotti, G. M.; Penacho, N.; Seth, P.; Sukhatme, V.; Ahmed, A.; et al. Carbon Monoxide Expedites Metabolic Exhaustion to Inhibit Tumor Growth. *Cancer Res.* **2013**, *73* (23), 7009–7021
- [26] Slanina, T.; Šebej, P. Visible-Light-Activated PhotoCORMs: Rational Design of CO-Releasing Organic Molecules Absorbing in the Tissue-Transparent Window. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2018**, *17* (6), 692–710
- [27] Romanski, S.; Kraus, B.; Guttentag, M.; Schlundt, W.; Rücker, H.; Adler, A.; Neudörfl, J. M.; Alberto, R.; Amslinger, S.; Schmalz, H. G. Acyloxybutadiene Tricarbonyl Iron Complexes as Enzyme-Triggered CO-Releasing Molecules (ET-CORMs): A Structure-Activity Relationship Study. *Dalt. Trans.* **2012**, *41* (45), 13862–13875
- [28] Popova, M.; Soboleva, T.; Arif, A. M.; Berreau, L. M. Properties of a Flavonol-Based PhotoCORM in Aqueous Buffered Solutions: Influence of Metal Ions, Surfactants and Proteins on Visible Light-Induced CO Release. *RSC Adv.* **2017**, *7* (36), 21997–22007
- [29] Romanski, S.; Stamellou, E.; Jaraba, J. T.; Storz, D.; Krämer, B. K.; Hafner, M.; Amslinger, S.; Schmalz, H. G.; Yard, B. A. Enzyme-Triggered CO-Releasing Molecules (ET-CORMs): Evaluation of Biological Activity in Relation to Their Structure. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *65*, 78–88
- [30] Schatzschneider, U. Novel Lead Structures and Activation Mechanisms for CO-Releasing Molecules (CORMs). *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172* (6), 1638–1650
- [31] Clark, J. E. Cardioprotective Actions by a Water-Soluble Carbon Monoxide-Releasing Molecule. *Circ. Res.* **2003**, *93* (2), 2e–8
- [32] Tonn, H. Fiberoptik in Der Diagnostik. *J. fur Anasth. und Intensivbehandlung* **2006**, *13* (1), 255–256
- [33] Motterlini, R. Carbon Monoxide-Releasing Molecules: Characterization of Biochemical and Vascular Activities. *Circ. Res.* **2002**, *90* (2), 17e–24
- [34] Marhenke, J.; Trevino, K.; Works, C. The Chemistry, Biology and Design of Photochemical CO Releasing Molecules and the Efforts to Detect CO for Biological Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *306*, 533–543
- [35] Dale Rimmer, R.; Richter, H.; Ford, P. C. A Photochemical Precursor for Carbon Monoxide Release in Aerated Aqueous Media. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (3), 1180–1185
- [36] Marques, A. R.; Kromer, L.; Gallo, D. J.; Penacho, N.; Rodrigues, S. S.; Seixas, J. D.; Bernardes, G. J. L.; Reis, P. M.; Otterbein, S. L.; Ruggieri, R. A.; et al. Generation of Carbon Monoxide Releasing Molecules (CO-RMs) as Drug Candidates for the Treatment of Acute Liver Injury: Targeting of CO-RMs to the Liver. *Organometallics* **2012**, *31* (16), 5810–5822
- [37] Carrington, S. J.; Chakraborty, I.; Mascharak, P. K. Rapid CO Release from a Mn(i) Carbonyl Complex Derived from Azopyridine upon Exposure to Visible Light and Its Phototoxicity toward Malignant Cells. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (96), 11254–11256

- [38] Abeyrathna, N.; Washington, K.; Bashur, C.; Liao, Y. Nonmetallic Carbon Monoxide Releasing Molecules (CORMs). *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (41), 8692–8699
- [39] Antony, L. A. P.; Slanina, T.; Šebej, P.; Šolomek, T.; Klán, P. Fluorescein Analogue Xanthene-9-Carboxylic Acid: A Transition-Metal-Free CO Releasing Molecule Activated by Green Light. *Org. Lett.* **2013**, *15* (17), 4552–4555
- [40] Palao, E.; Slanina, T.; Muchová, L.; Šolomek, T.; Vitek, L.; Klán, P. Transition-Metal-Free CO-Releasing BODIPY Derivatives Activatable by Visible to NIR Light as Promising Bioactive Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (1), 126–133
- [41] Klán, P. *Organická Fotochemie*; Masarykova univerzita: Brno, 2001
- [42] Peng, P.; Wang, C.; Shi, Z.; Johns, V. K.; Ma, L.; Oyer, J.; Copik, A.; Igarashi, R.; Liao, Y. Visible-Light Activatable Organic CO-Releasing Molecules (PhotoCORMs) That Simultaneously Generate Fluorophores. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (39), 6671–6674
- [43] Poloukhtine, A.; Popik, V. V. Mechanism of the Cyclopropenone Decarbonylation Reaction. A Density Functional Theory and Transient Spectroscopy Study. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110* (5), 1749–1757
- [44] Anderson, S. N.; Richards, M. J.; Esquer, H. J.; Benninghoff, A. D.; Arif, A. M.; Berreau, L. M. A Structurally-Tunable 3-Hydroxyflavone Motif for Visible Light-Induced Carbon Monoxide-Releasing Molecules (CORMs). *ChemistryOpen* **2015**, *4* (5), 590–594
- [45] Fetzner, S. Ring-Cleaving Dioxygenases with a Cupin Fold. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78* (8), 2505–2514
- [46] Gorman, A. A.; Hamblett, I.; Lambert, C.; Prescott, A. L.; Rodgers, M. A. J.; Spence, H. M. Aromatic Ketone-Naphthalene Systems as Absolute Standards for the Triplet-Sensitized Formation of Singlet Oxygen, 1O_2 , in Organic and Aqueous Media: A Time-Resolved Luminescence Study. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109* (10), 3091–3097
- [47] Matsuura, T.; Takemoto, T.; Nakashima, R. Photoinduced Reactions-LXXI. Photorearrangement of 3-Hydroxyflavones to 3-Aryl-3-Hydroxy-1,2-Indandiones. *Tetrahedron* **1973**, *29* (21), 3337–3340
- [48] Anderson, S. N.; Larson, M. T.; Berreau, L. M. Solution or Solid-It Doesn't Matter: Visible Light-Induced CO Release Reactivity of Zinc Flavonolato Complexes. *Dalt. Trans.* **2016**, *45* (37), 14570–14580
- [49] Popova, M.; Soboleva, T.; Ayad, S.; Benninghoff, A. D.; Berreau, L. M. Visible-Light-Activated Quinolone Carbon-Monoxide-Releasing Molecule: Prodrug and Albumin-Assisted Delivery Enables Anticancer and Potent Anti-Inflammatory Effects. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (30), 9721–9729
- [50] Brown, J. M.; Wilson, W. R. Exploiting Tumour Hypoxia in Cancer Treatment. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4* (6), 437–447
- [51] Danhier, F.; Feron, O.; Préat, V. To Exploit the Tumor Microenvironment: Passive and Active Tumor Targeting of Nanocarriers for Anti-Cancer Drug Delivery. *J. Control. Release* **2010**, *148* (2), 135–146
- [52] Seleem, D.; Pardi, V.; Murata, R. M. Review of Flavonoids: A Diverse Group of Natural Compounds with Anti-Candida Albicans Activity in Vitro. *Arch. Oral Biol.* **2017**, *76*, 76–83
- [53] Panche, A. N.; Diwan, A. D.; Chandra, S. R. Flavonoids: An Overview. *J. Nutr. Sci.* **2016**, *5*, e47
- [54] Perez, L. G.; Kerr, J.; Sallis, J. F.; Slymen, D.; McKenzie, T. L.; Elder, J. P.; Arredondo, E. M. Perceived Neighborhood Environmental Factors That Maximize the Effectiveness of a Multilevel Intervention Promoting Physical Activity Among Latinas. *Am. J. Heal. Promot.* **2018**, *32* (2), 334–343

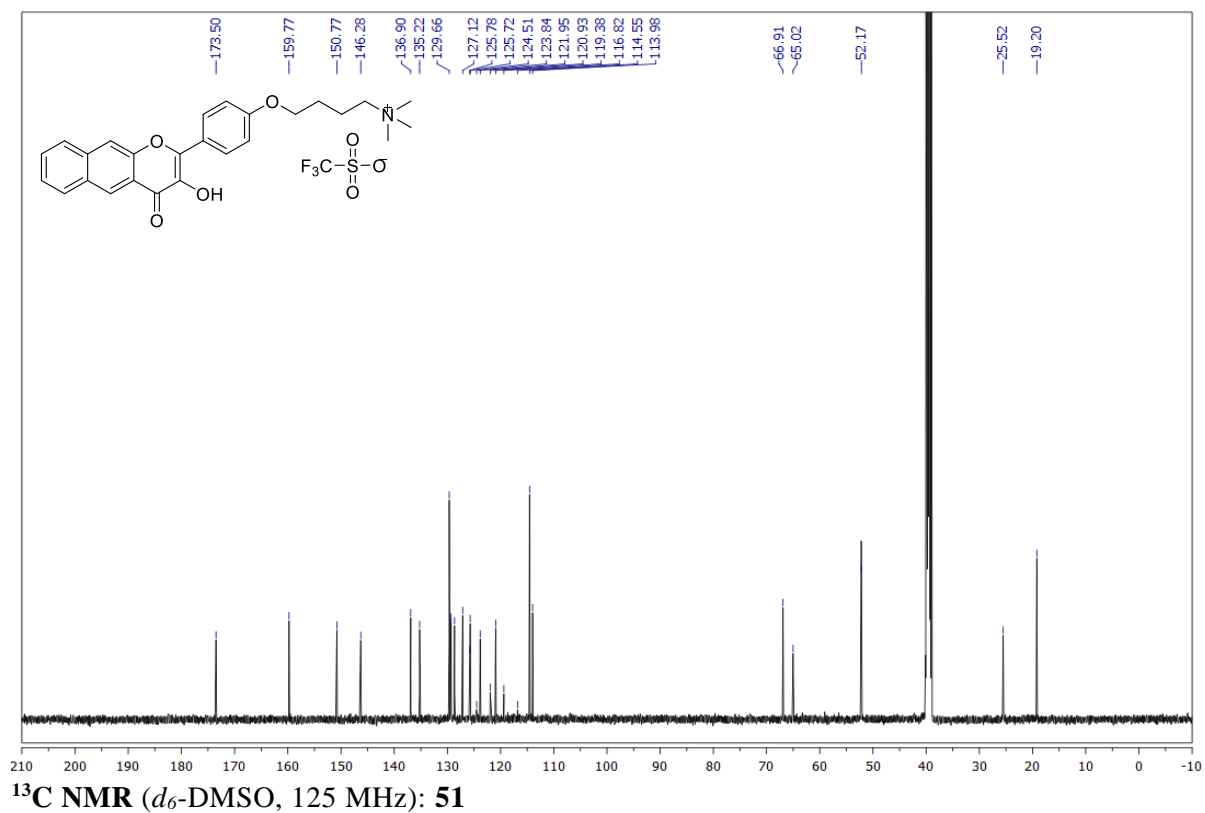
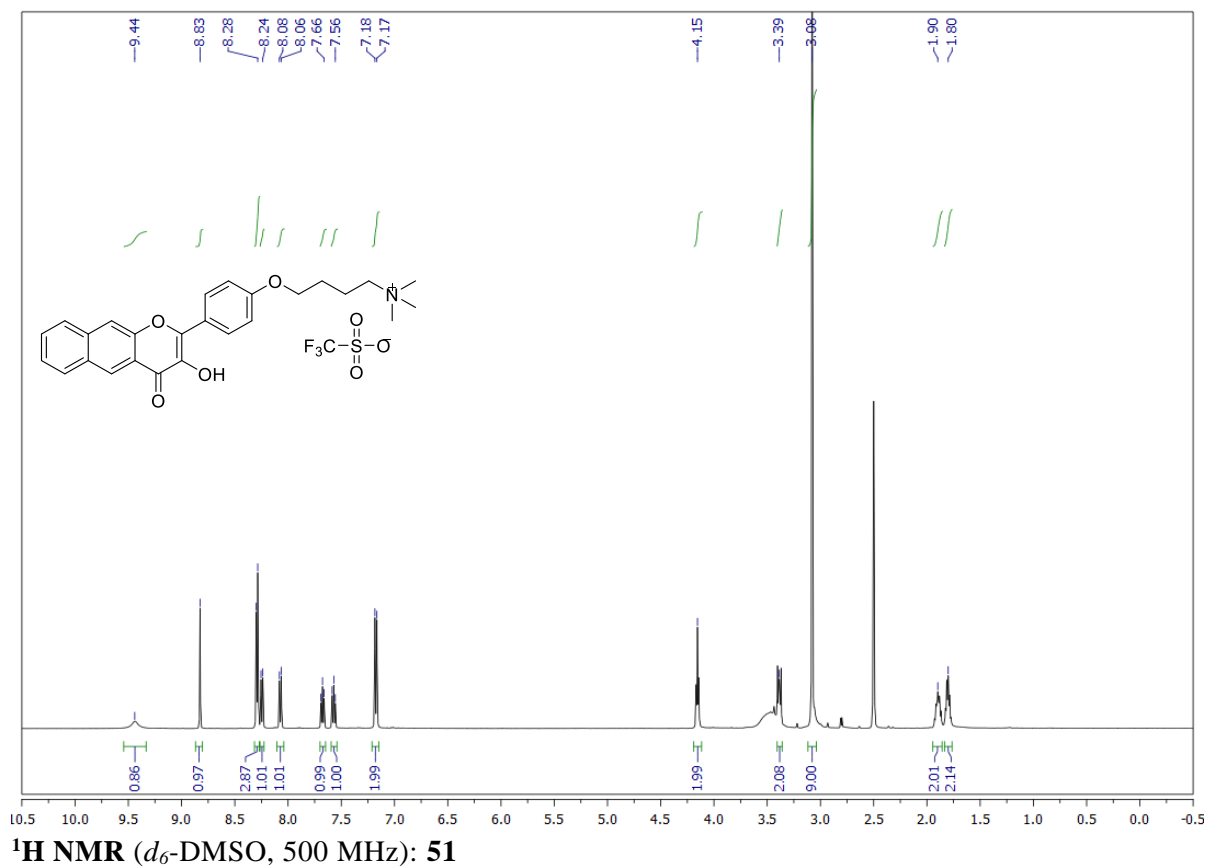
- [55] Brash, D. E.; Rudolph, J. A.; Simon, J. A.; Lin, A.; McKenna, G. J.; Baden, H. P.; Halperin, A. J.; Ponten, J. A Role for Sunlight in Skin Cancer: UV-Induced P53 Mutations in Squamous Cell Carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88* (22), 10124–10128
- [56] Dąbrowski, J. M.; Pucelik, B.; Regiel-Futyra, A.; Brindell, M.; Mazuryk, O.; Kyzioł, A.; Stochel, G.; Macyk, W.; Arnaut, L. G. Engineering of Relevant Photodynamic Processes through Structural Modifications of Metallotetrapyrrolic Photosensitizers. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *325*, 67–101
- [57] Szeimies, R. M.; Karrer, S.; Abels, C.; Landthaler, M.; Elmets, C. A. Photodynamic Therapy in Dermatology. In *Dermatological Phototherapy and Photodiagnostic Methods*; John Wiley & Sons, Ltd, 2009; Vol. 35, pp 241–280
- [58] Gormley, T. R.; O’Sullivan, W. I. Flavanoid Epoxides-XIII. Acid and Base Catalysed Reactions of 2'-Tosyloxychalcone Epoxides. Mechanism of the Algar-Flynn-Oyamada Reaction. *Tetrahedron* **1973**, *29* (2), 369–373
- [59] Bhattacharyya, S.; Hatua, K. Computational Insight of the Mechanism of Algar-Flynn-Oyamada (AFO) Reaction. *RSC Adv.* **2014**, *4* (36), 18702–18709
- [60] Serdiuk, I. E.; Roshal, A. D.; Błazejowski, J. Quantum-Chemical Analysis of the Algar-Flynn-Oyamada Reaction Mechanism. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2014**, *50* (3), 396–403
- [61] Fulmer, G. R.; Miller, A. J. M.; Sherden, N. H.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A.; Stoltz, B. M.; Bercaw, J. E.; Goldberg, K. I. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics* **2010**, *29* (9), 2176–2179
- [62] Martínek, M.; Filipová, L.; Galeta, J.; Ludvíková, L.; Klán, P. Photochemical Formation of Dibenzosilacyclohept-4-Yne for Cu-Free Click Chemistry with Azides and 1,2,4,5-Tetrazines. *Org. Lett.* **2016**, *18* (19), 4892–4895

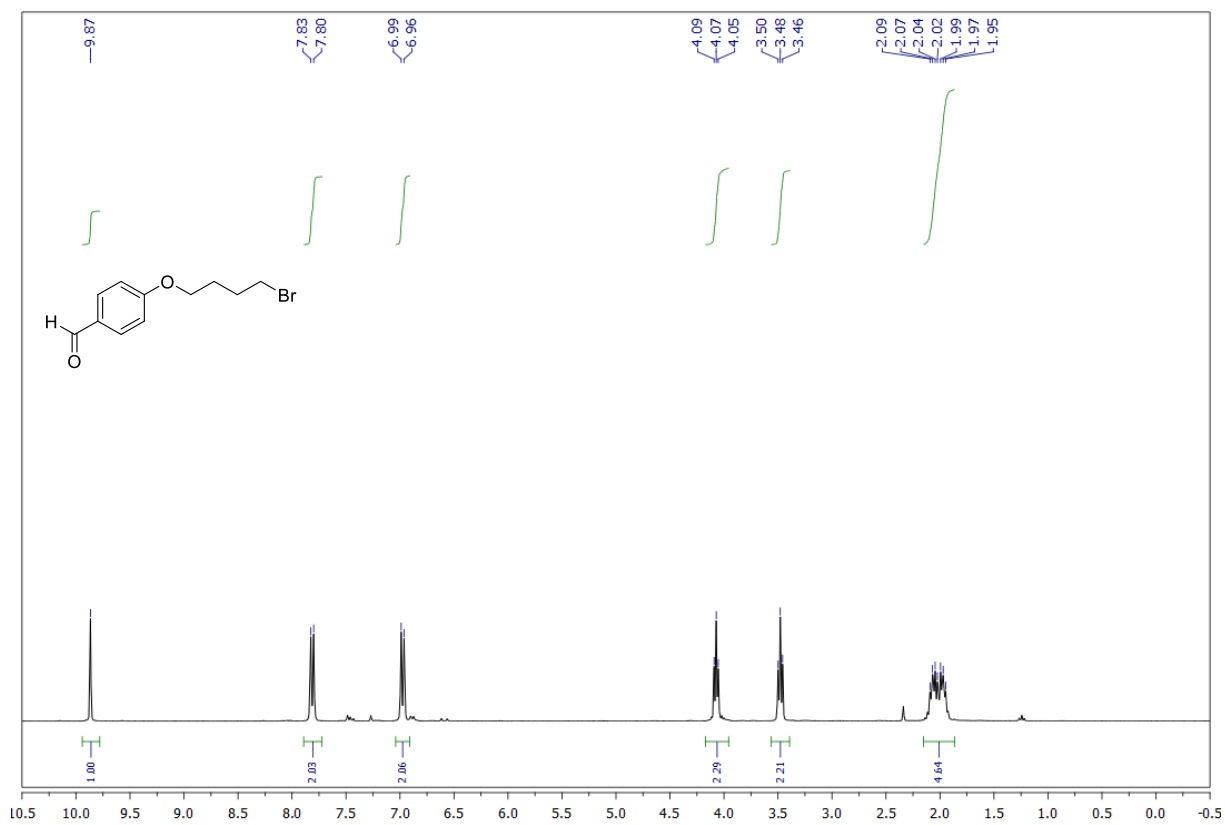
7 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1: Porfínový kruh (1), molekula <i>hemu A</i> (2), <i>hemu B</i> (3).....	9
Obrázek 2: Příklady CORMů uvolňujících CO substitucí ligandů.....	13
Obrázek 3: Přehled enzymaticky řízených CORMů.....	14
Obrázek 4: Pentakarbonyl železa a dekarbonyl dimanganu.....	15
Obrázek 5: Wolfram-pentakarbonylový komplex tris(sulfonatofenyl)fosfinu.....	16
Obrázek 6: <i>Meso</i> -BODIPY karboxylová kyselina 19 a její styrylový derivát 20.....	17
Obrázek 7: Molekula Benzo-DK a 9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracen-11,12-dionu.....	18
Obrázek 8: 3-Hydroxyflavon.....	19
Obrázek 9: 3-Hydroxy-2-fenyl-2,3-dihydro-4 <i>H</i> -benzo[<i>g</i>]chromen-4-on (29).....	20
Obrázek 10: Známé deriváty molekuly 29.....	22
Obrázek 11: Vlevo absorpční spektra derivátů 29, 36, 38, 37 v acetonitrilu a vpravo přehled absorpčních maxim.....	23
Obrázek 12: Molekuly Zn(37) ₂ ·2H ₂ O (42) a [(6-Ph ₂ TPA)Zn(37)]ClO ₄ (43).....	24
Obrázek 13: Schématické zachycení několika významných podskupin flavonoidů.....	25
Obrázek 14: Graf závislosti absorbance na vlnové délce (nm) pro vybrané typy molekul v lidských tkáních.....	27
Obrázek 15: Navržené deriváty molekuly 29 nesoucí různé substituenty na jádře C.....	29
Obrázek 16: Absorpční spektra 29, 48, 51, 44, 46.....	38
Obrázek 17: UV-Vis absorpční spektra: vlevo 29 a vpravo 48.....	39
Obrázek 18: UV-Vis absorpční spektra: 44.....	40
Obrázek 19: UV-Vis absorpční spektra: 46.....	40
Obrázek 20: UV-Vis absorpční spektra: 51.....	41
Obrázek 21: Chemické výtěžky CO po fotolýze syntetizovaných derivátů.....	42
Obrázek 22: Snímky fluorescenční mikroskopie myších hepatoblastomových buněk (Hep1-6) inkubované v médiu s 51 (vlevo) a 44 (vpravo).....	43
Obrázek 23: Snímky fluorescenční mikroskopie myších hepatoblastomových buněk (Hep1-6) inkubované v médiu s 51 (<i>c</i> = 10 mmol/dm ³).....	44
Obrázek 24: Akutní cytotoxicita (LC ₅₀) připravených derivátů flavonolů 44, 46 a 51 na HepG2 buňkách.....	45
Schéma 1: Navázání CO na centrální atom železa 3 za vzniku 3a.....	10
Schéma 2: Rozklad hemoglobinu působením HO.....	11
Schéma 3: Mechanismus uvolnění CO prostřednictvím výměny ligandů.....	13
Schéma 4: Průběh uvolnění CO z molekuly 8a.....	14
Schéma 5: Základní schématický mechanismus fotoindukovaného uvolnění molekuly CO z foto-CORMy.....	15
Schéma 6: Uvolnění CO z 6-hydroxy-3-oxo-3 <i>H</i> -xanthen-9-karboxylové kyseliny.....	17
Schéma 7: Uvolnění CO z 9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracen-11,12-dionu (22) za vzniku anthracenu (23).....	18
Schéma 8: Uvolnění CO z 2,3-di(anthracen-9-yl)cykloprop-2-en-1-onu 24.....	18
Schéma 9: Enzymatický aerobní rozklad quercetinu generující CO.....	19

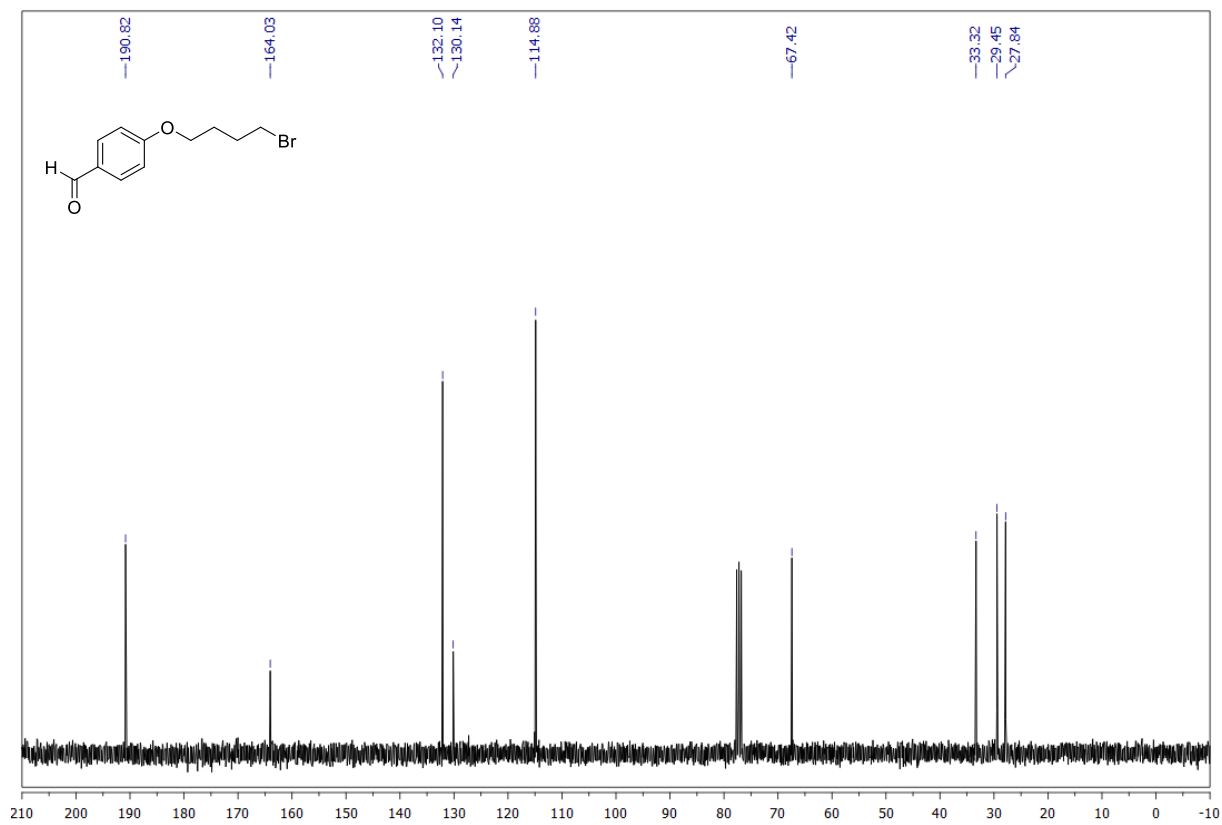
Schéma 10: Anaerobní (bez přístupu O ₂) uvolnění CO z 2-fenyl-4 <i>H</i> -chromen-4-onu (30)....	20
Schéma 11: Mechanismus aerobního fotoindukovaného uvolnění CO z molekuly 29	21
Schéma 12: Deprotonace hydroxy skupiny na uhlíku C2 29	22
Schéma 13: 3-Hydroxy-2-fenylbenzo[<i>g</i>]chinolin-4(1 <i>H</i>)-on (40), jeho oxidovaná forma 2-fenylbenzo[<i>g</i>]chinoline-3,4-dion (39) a fotoprodukt 3-benzamido-2-naftoová kyselina (41)	23
Schéma 14: Retrosyntetická analýza syntézy molekuly 29 a jejích analogů.....	30
Schéma 15: Retrosyntetické schéma formylace derivátů <i>N,N</i> -dimethylanilinu.	30
Schéma 16: Retrosyntetická analýza metylace aminových derivátů 29	31
Schéma 17: Návrh mechanismu kondenzace 29	31
Schéma 18: Syntéza benzaldehydu 58	32
Schéma 19: Syntéza derivátu 50	33
Schéma 20: Syntéza derivátu 46	33
Schéma 21: Syntéza derivátu 48	34
Schéma 22: Syntéza derivátu 44	34
Schéma 23: Syntéza derivátu 51	35
Schéma 24: Syntéza derivátu 69	36
Schéma 25: Syntéza derivátu 50	37
Schéma 26: Syntéza derivátu 49	37
Schéma 27: Fotoindukované uvolnění CO z 29	39
Tabulka 1: Přehled podskupin flavonoidů a výskyt v potravinách	25

8 PŘÍLOHA 1: NMR SPEKTRA PŘIPRAVENÝCH LÁTEK

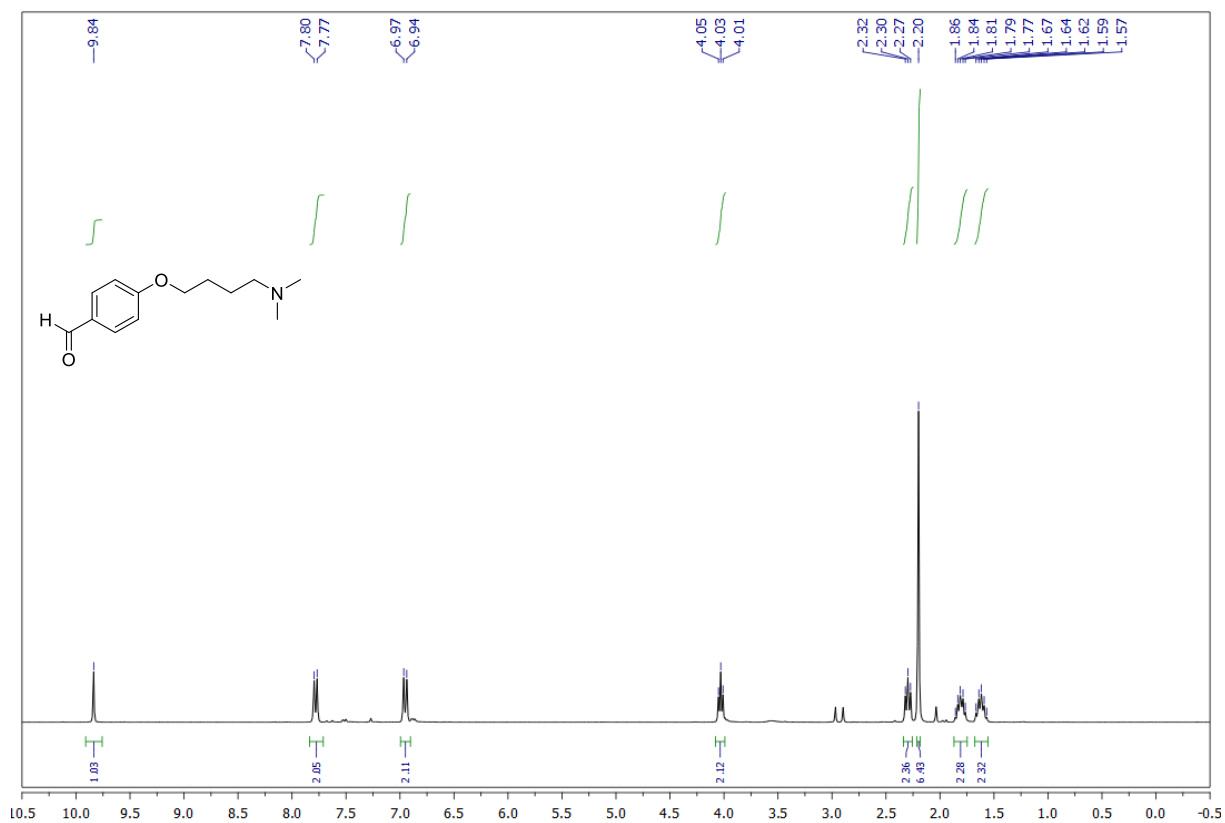




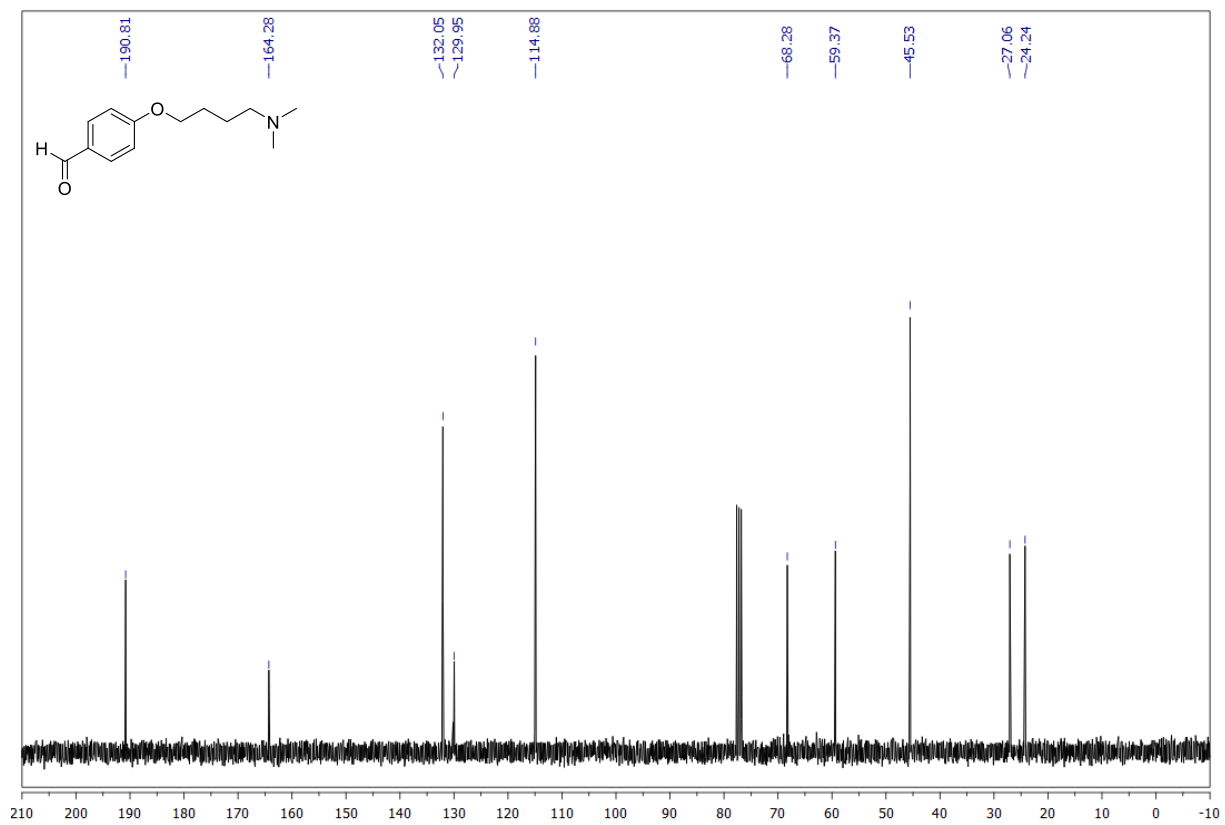
$^1\text{H NMR}$ (d_6 -DMSO, 500 MHz): **65**



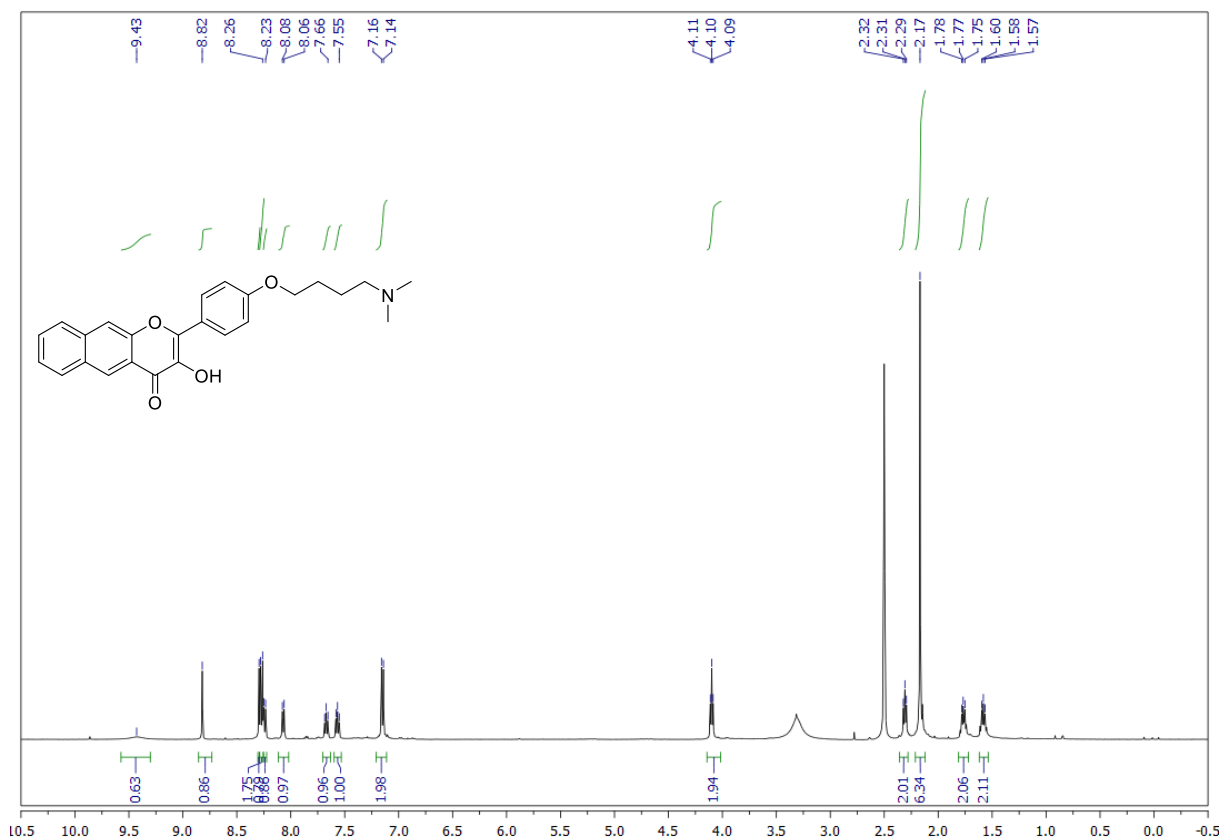
$^{13}\text{C NMR}$ (d_6 -DMSO, 125 MHz): **65**



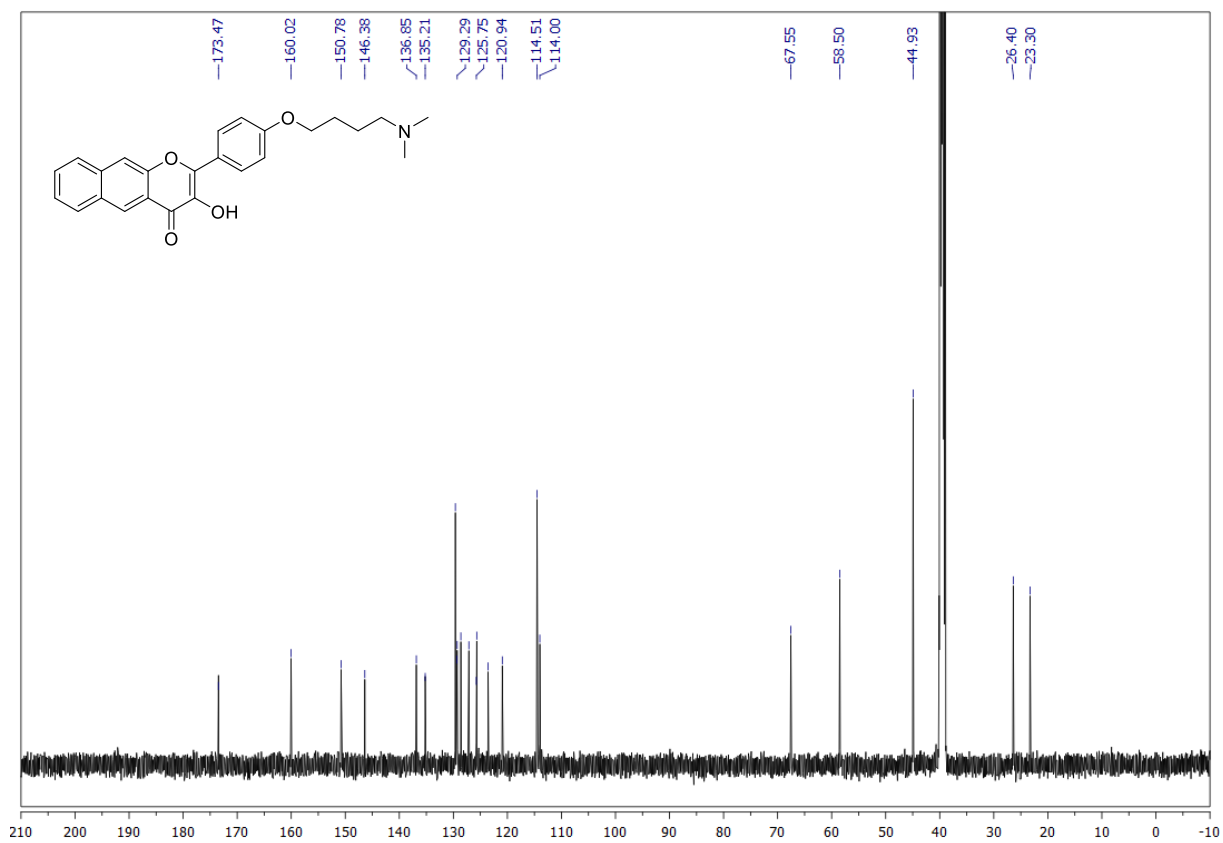
¹H NMR (*d*₆-DMSO, 500 MHz): **66**



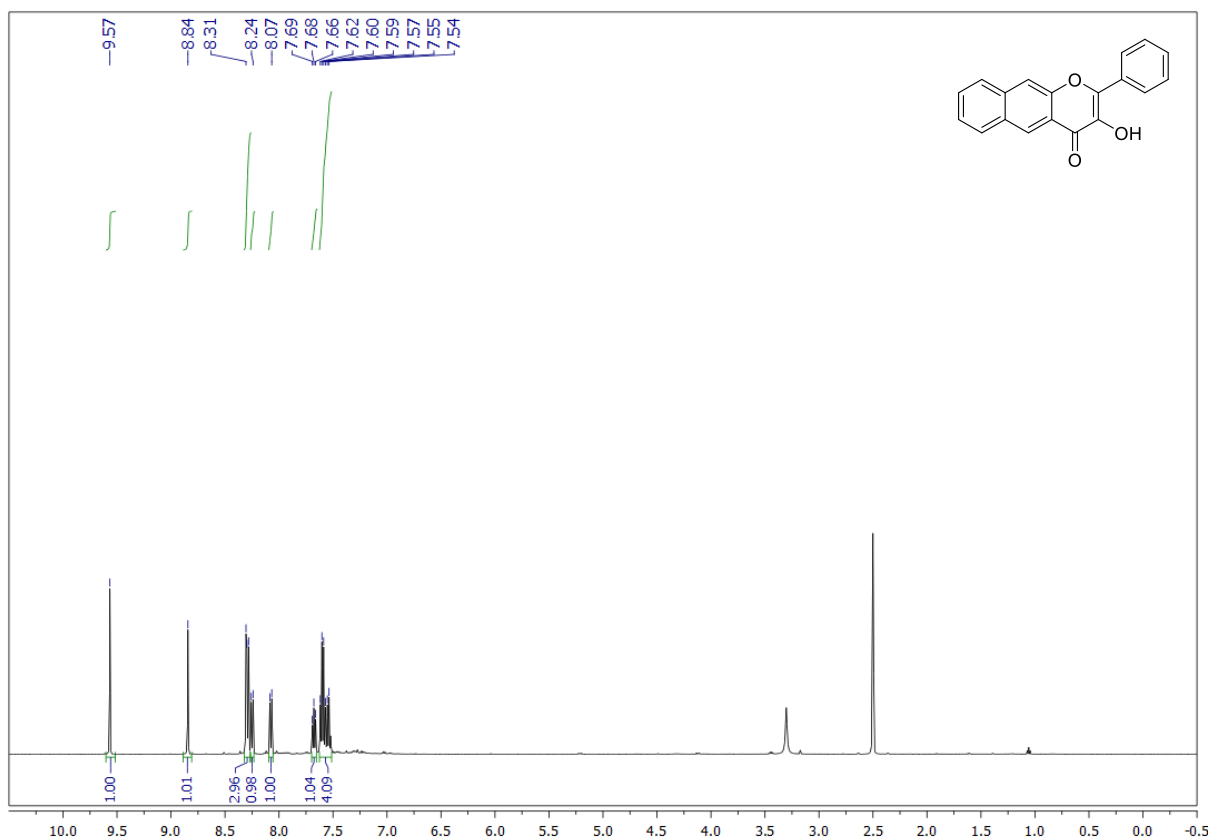
¹³C NMR (*d*₆-DMSO, 125 MHz): **66**



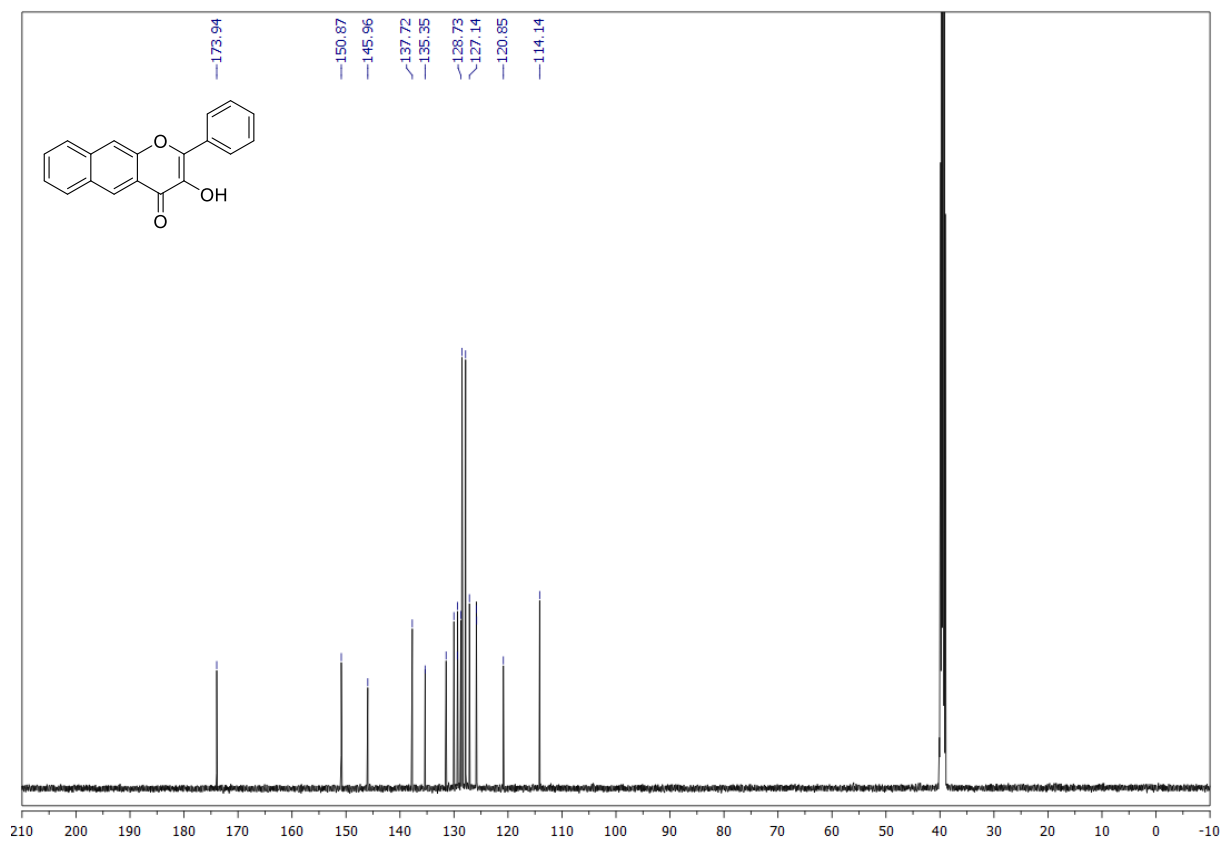
¹H NMR (*d*₆-DMSO, 500 MHz): **67**



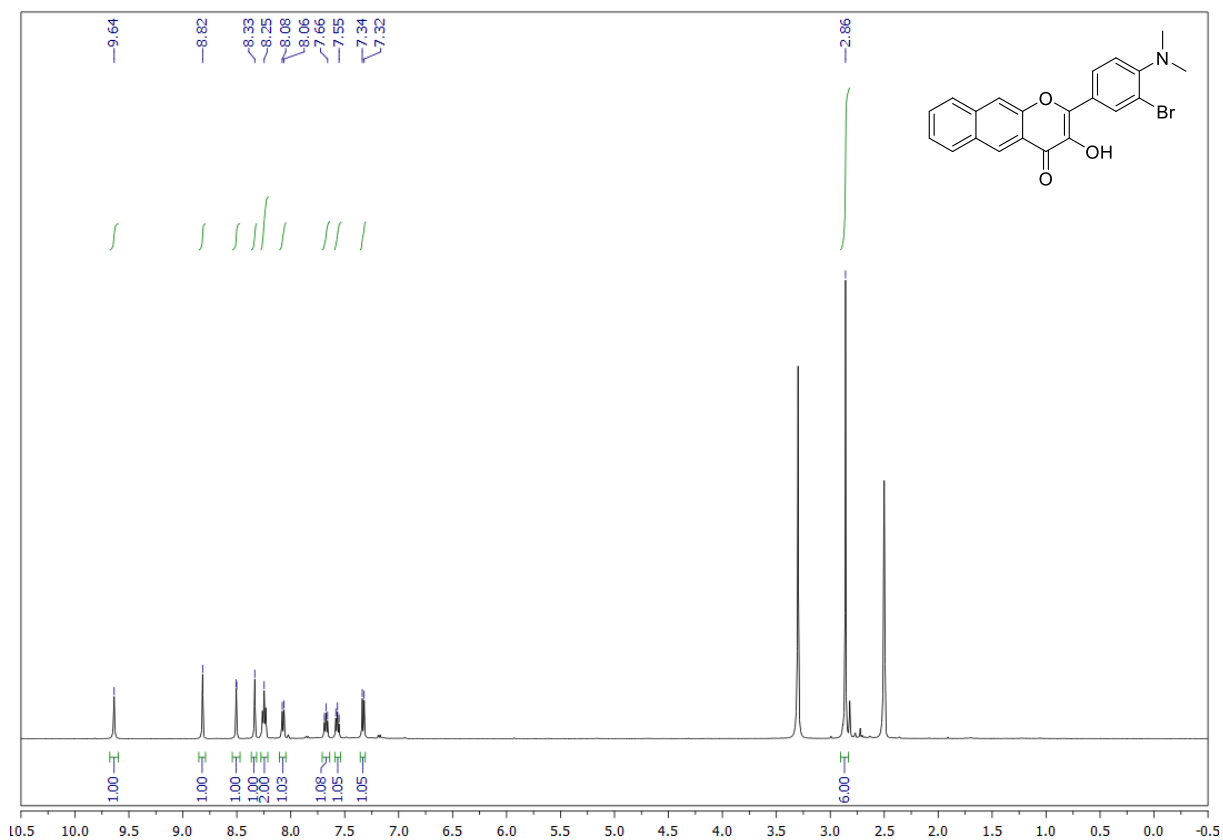
¹³C NMR (*d*₆-DMSO, 125 MHz): **67**



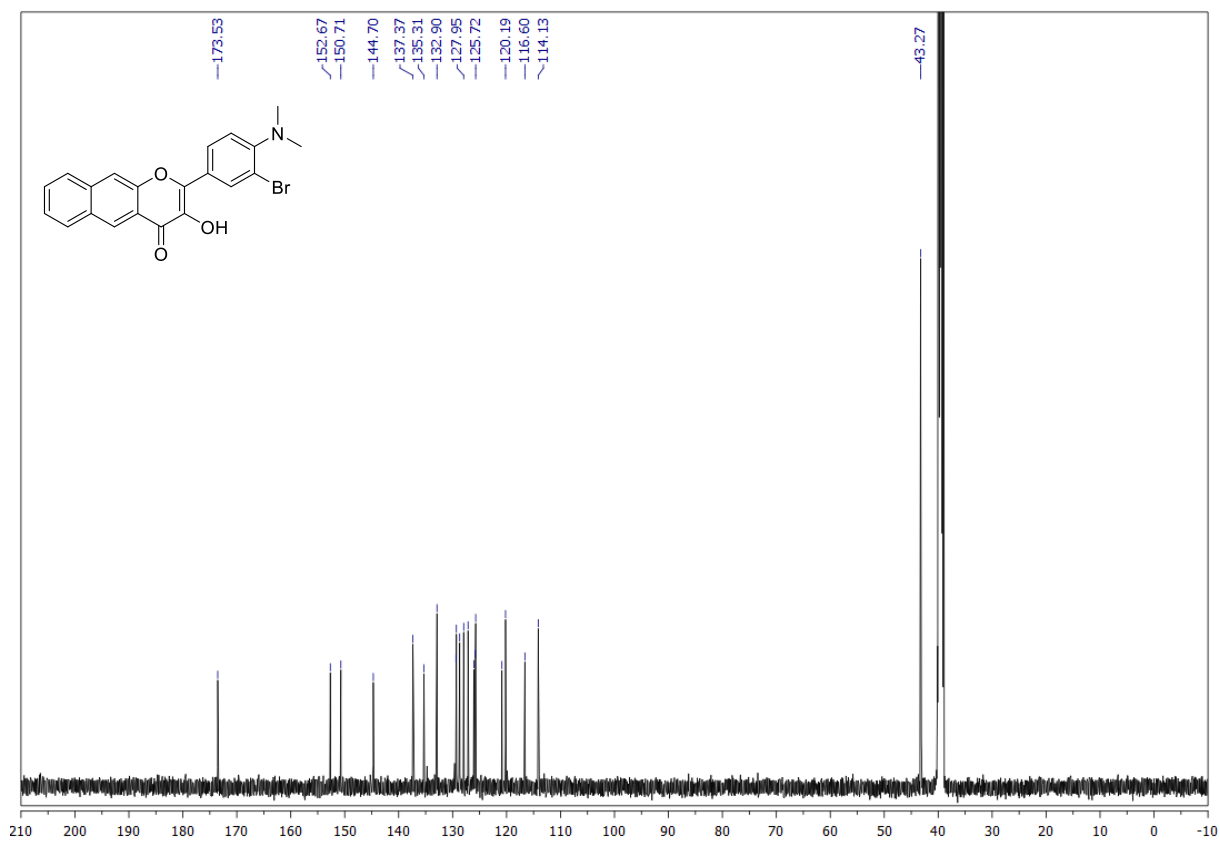
¹H NMR (*d*₆-DMSO, 500 MHz): **29**



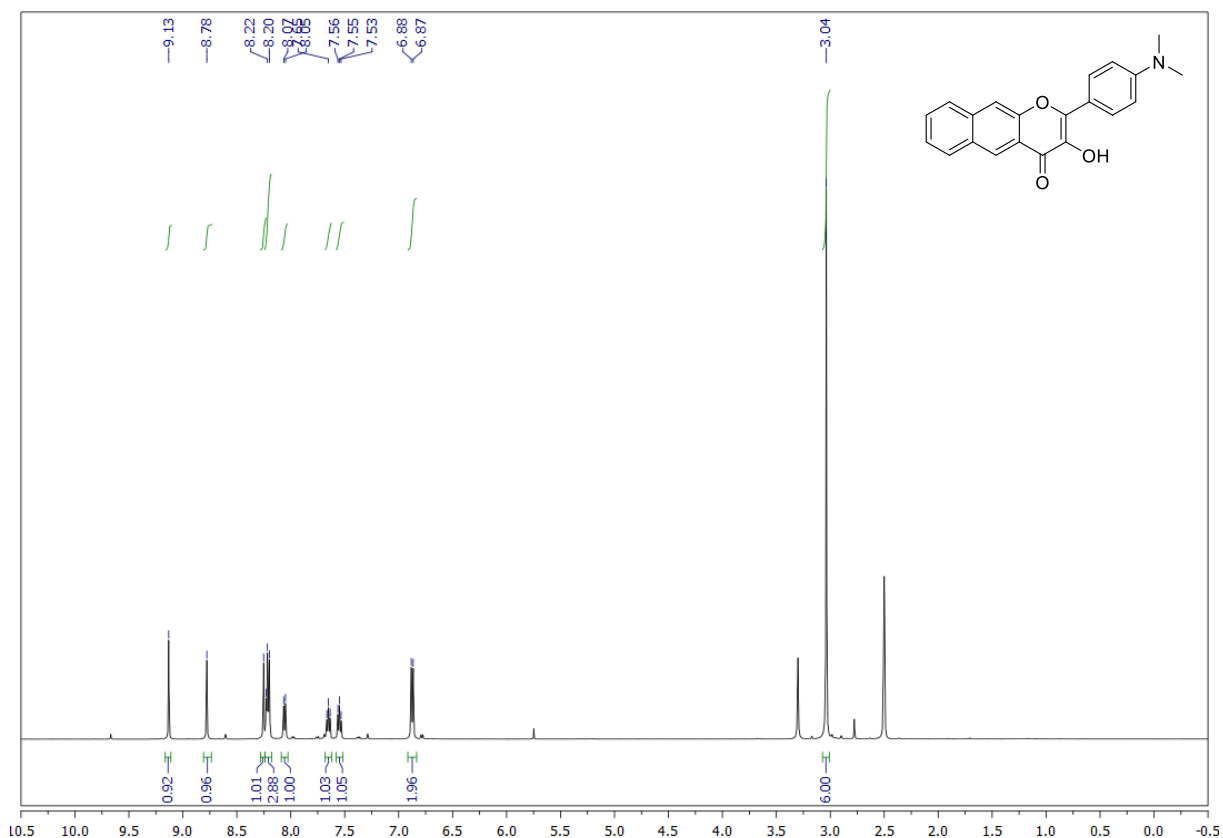
¹³C NMR (*d*₆-DMSO, 125 MHz): **29**



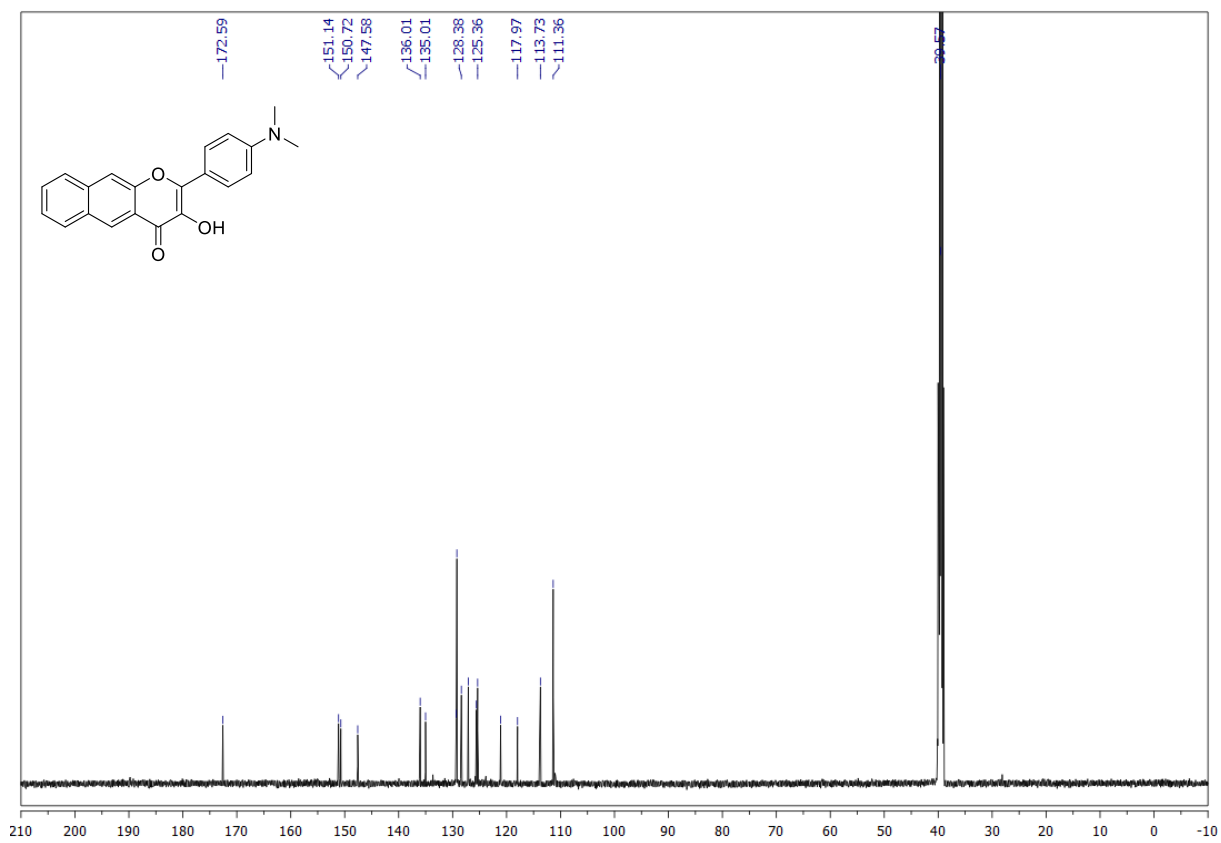
¹H NMR (*d*₆-DMSO, 500 MHz): **61**



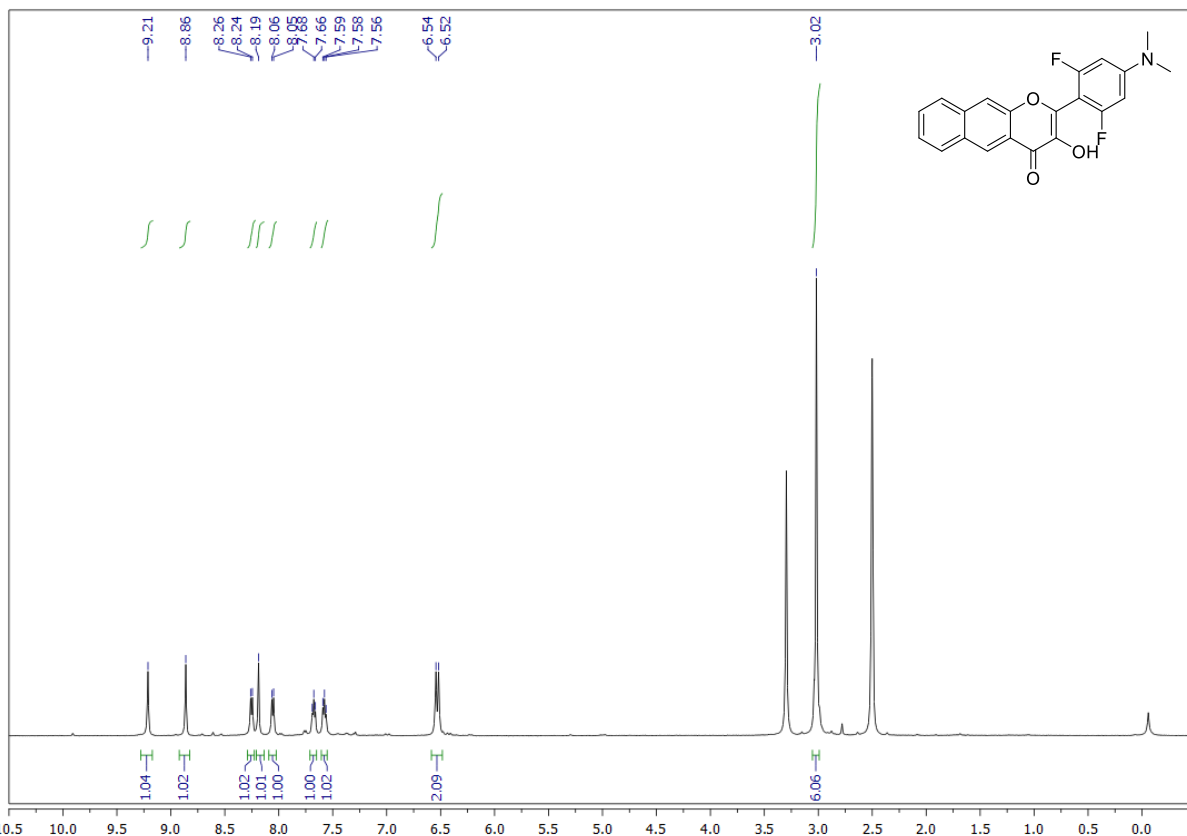
¹³C NMR (*d*₆-DMSO, 125 MHz): **61**



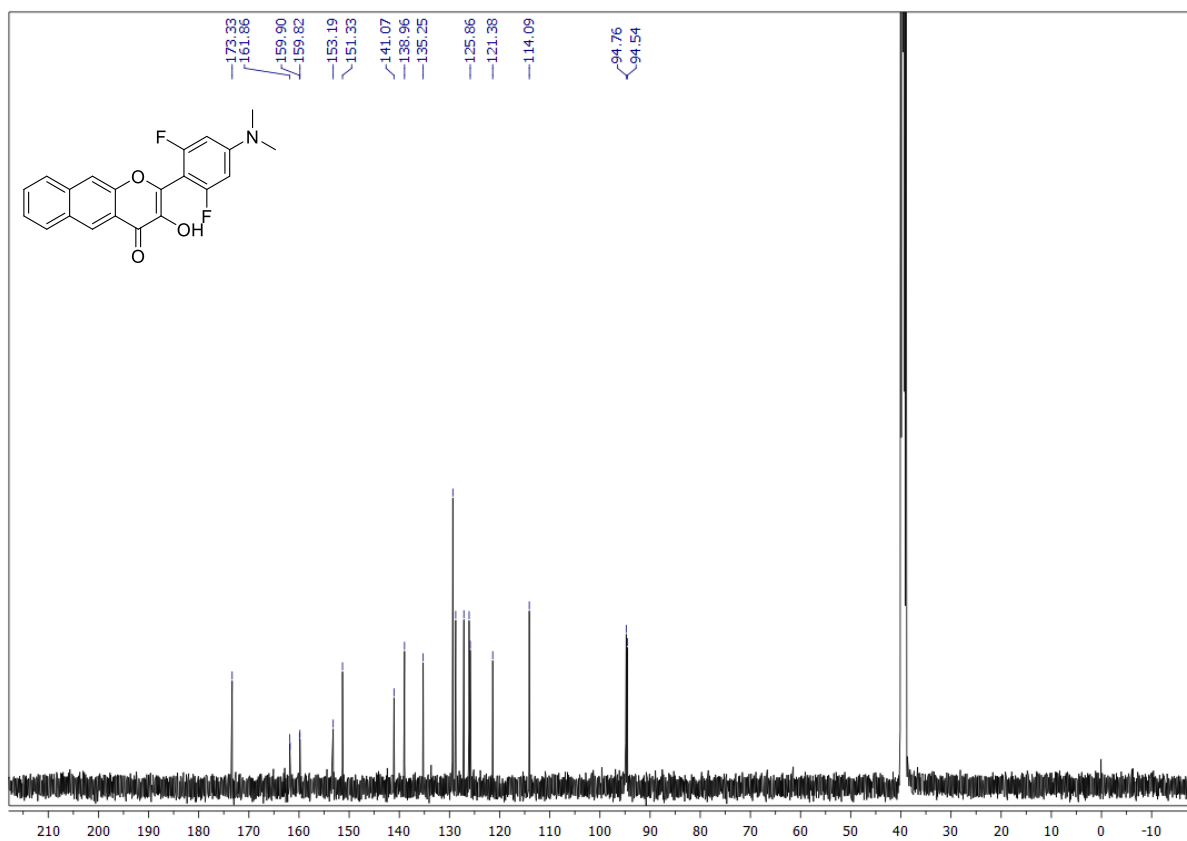
¹H NMR (*d*₆-DMSO, 500 MHz): **63**



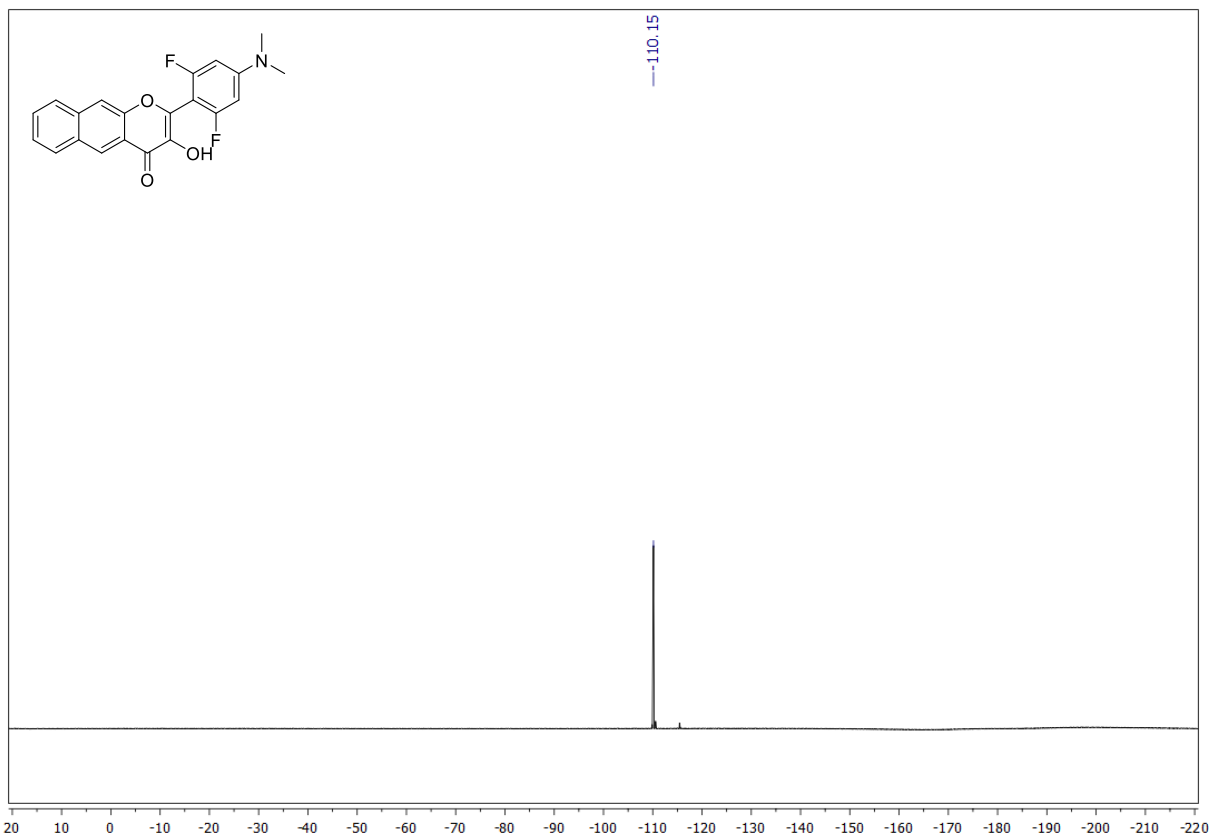
¹³C NMR (*d*₆-DMSO, 125 MHz): **63**



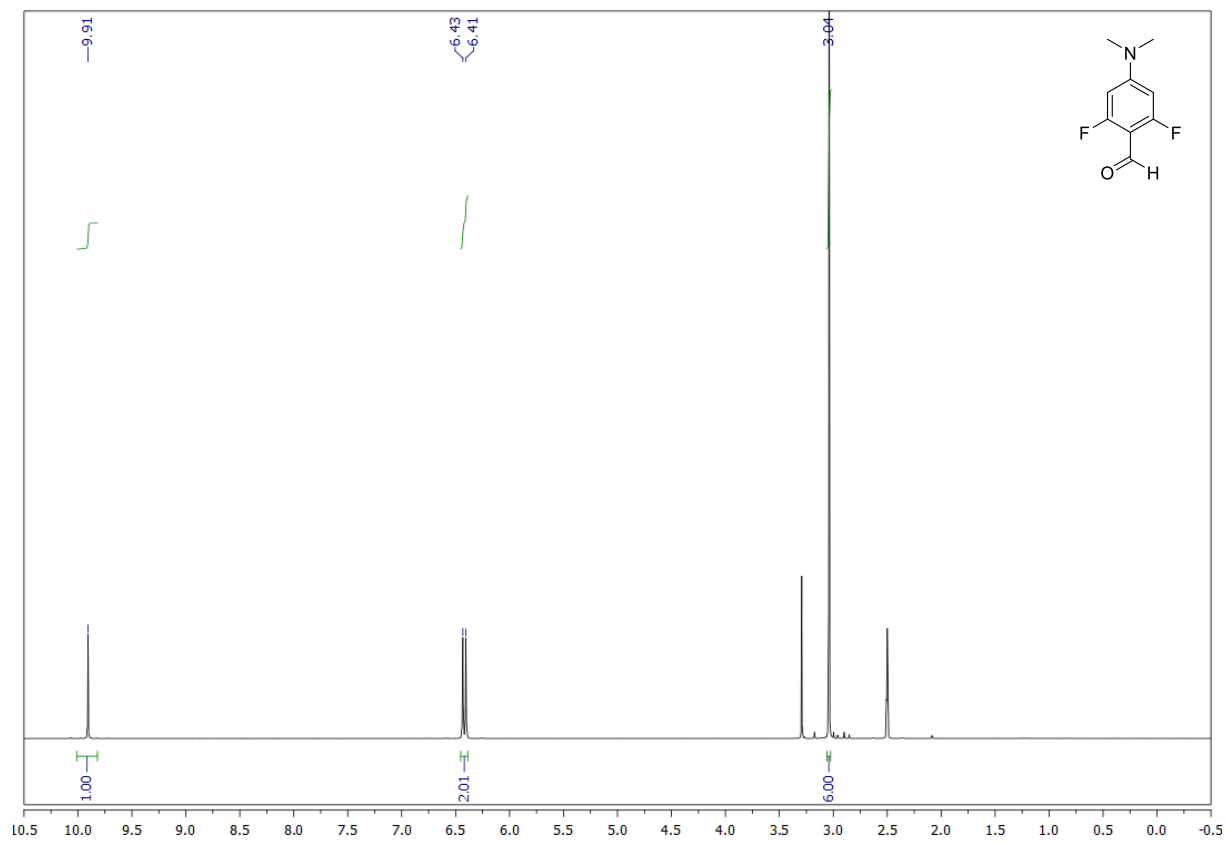
¹H NMR (*d*₆-DMSO, 500 MHz): 59



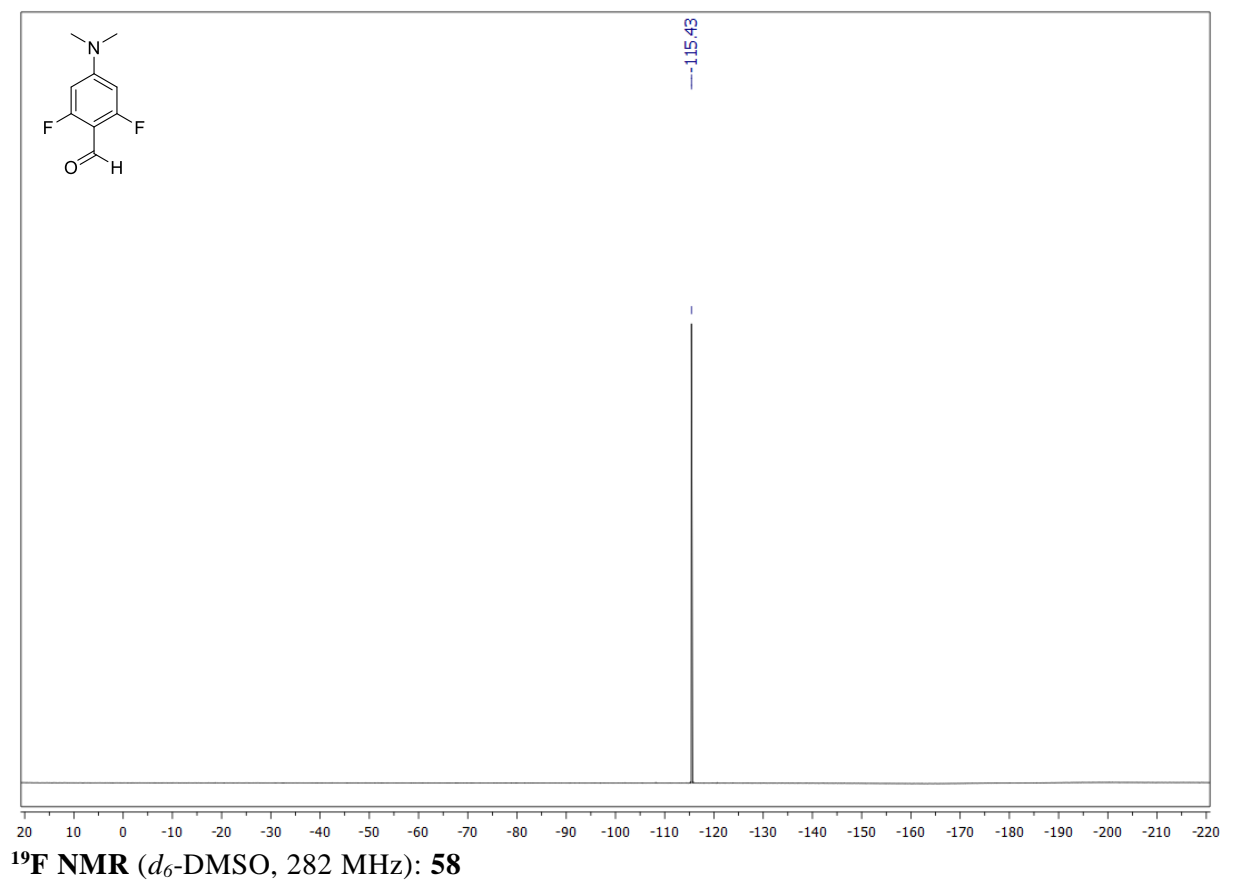
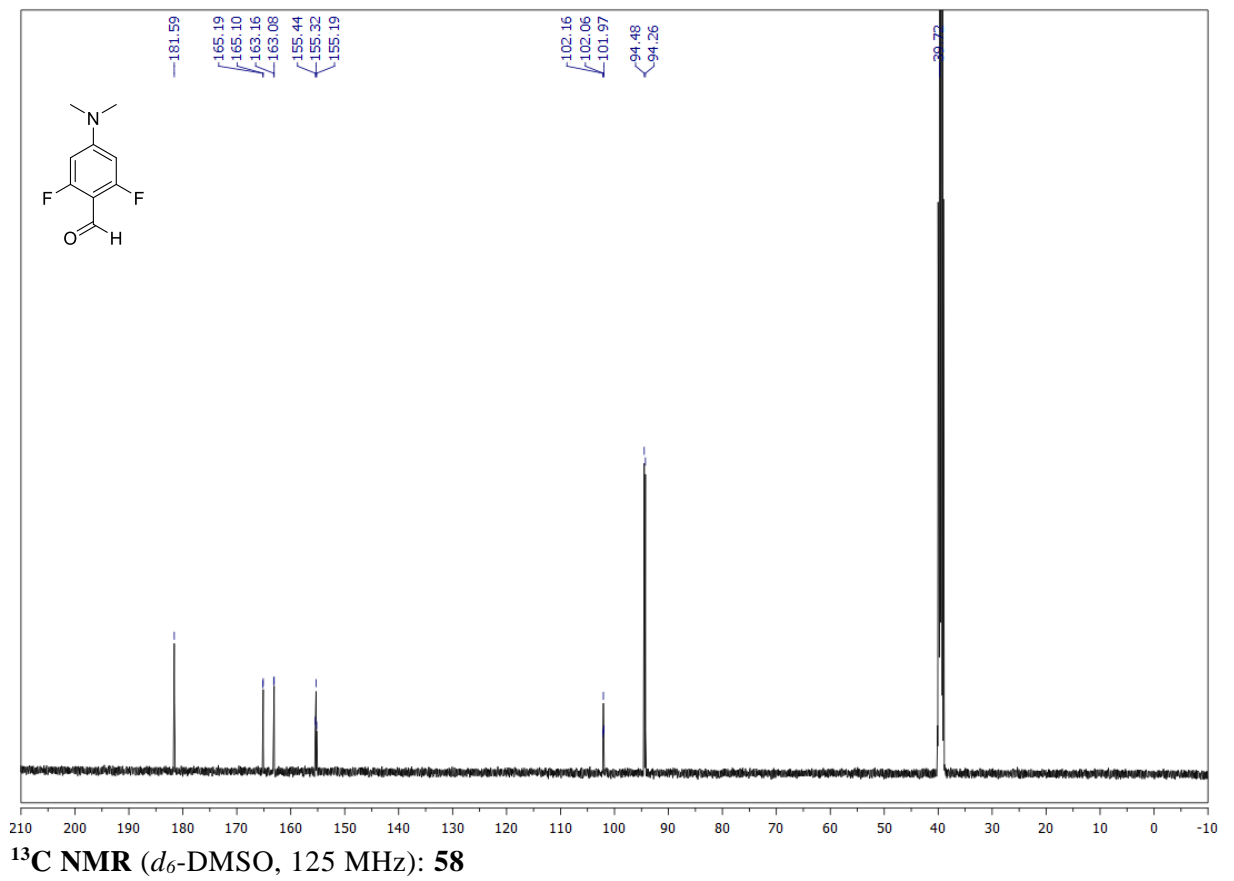
¹³C NMR (*d*₆-DMSO, 125 MHz): 59

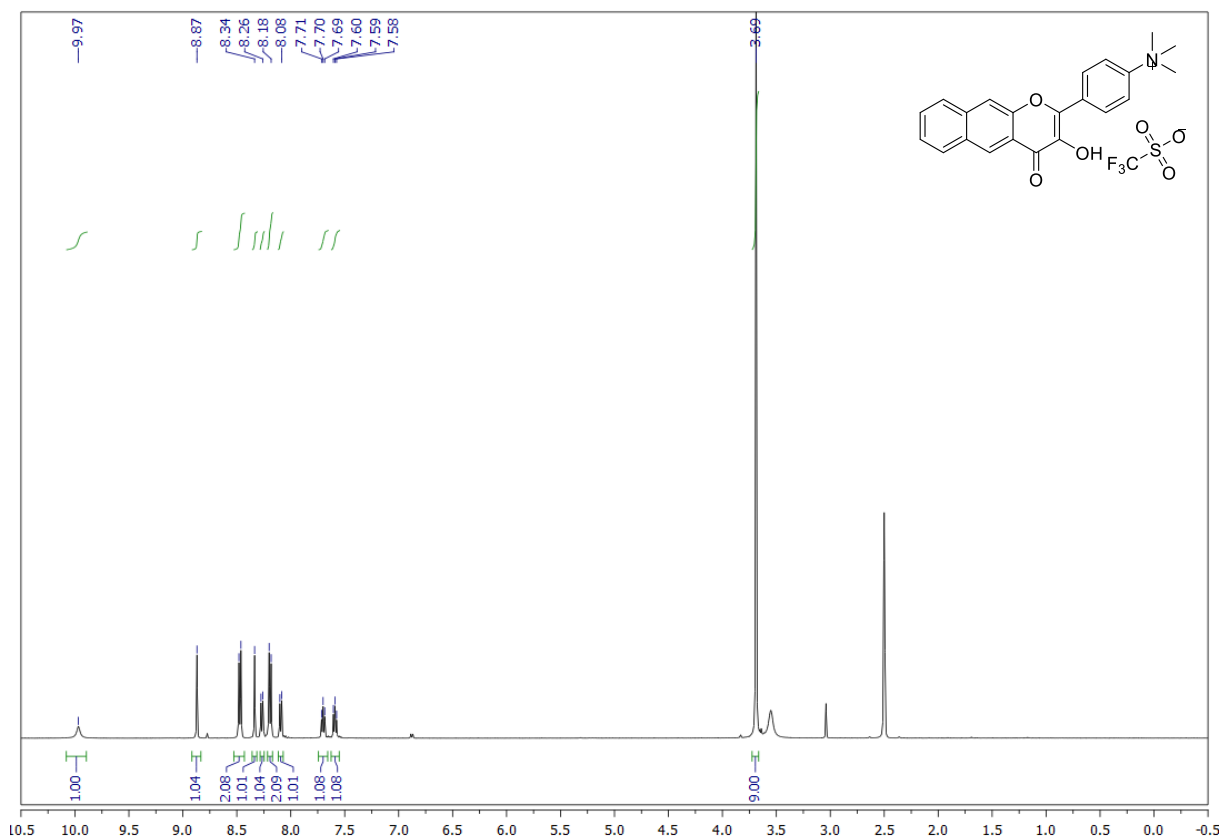


^{19}F NMR (d_6 -DMSO, 282 MHz): 59

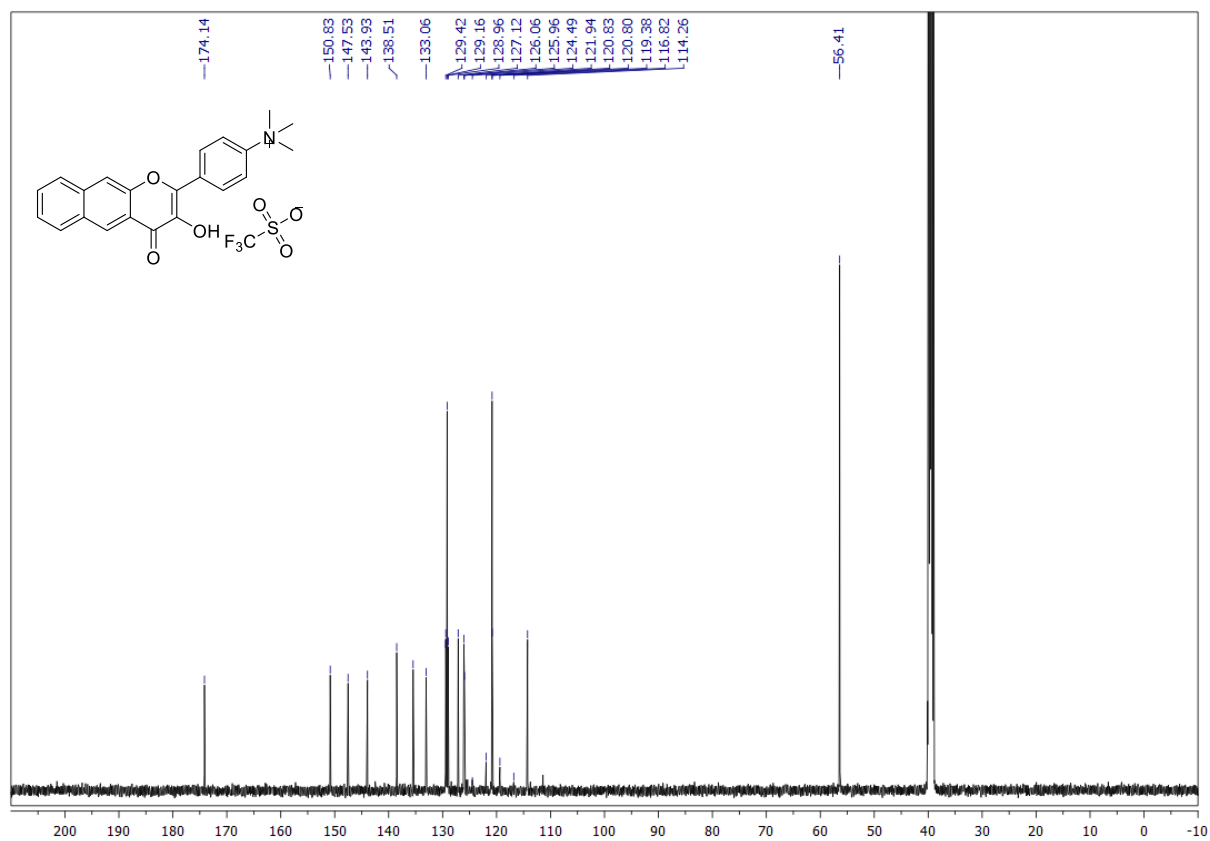


^1H NMR (d_6 -DMSO, 500 MHz): 58

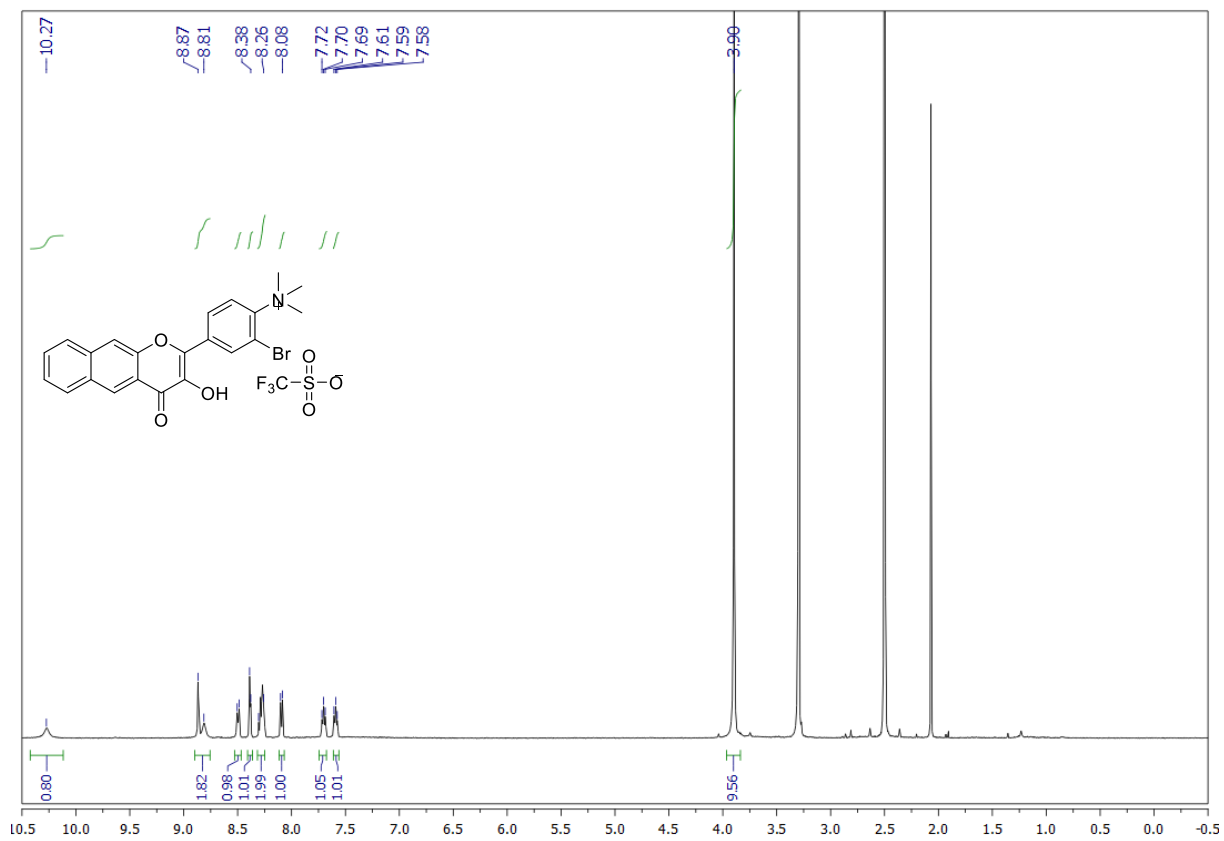
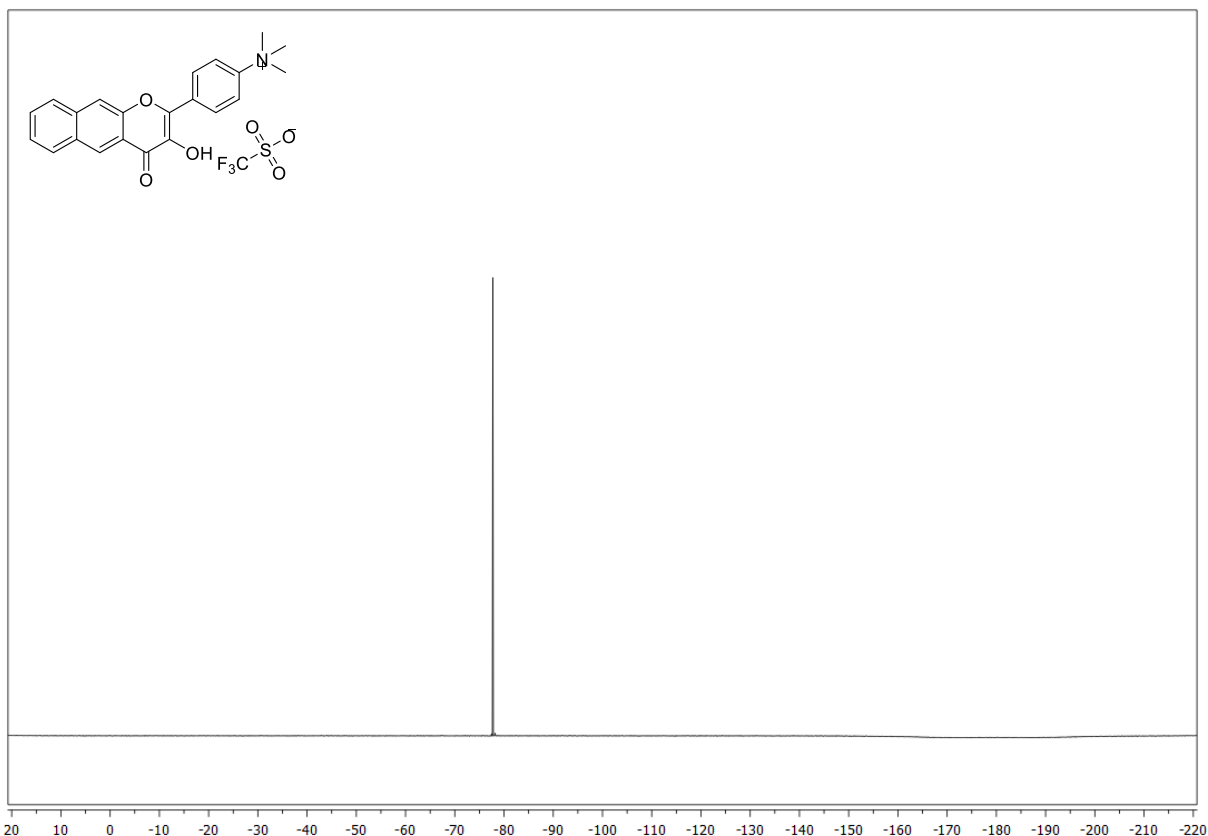


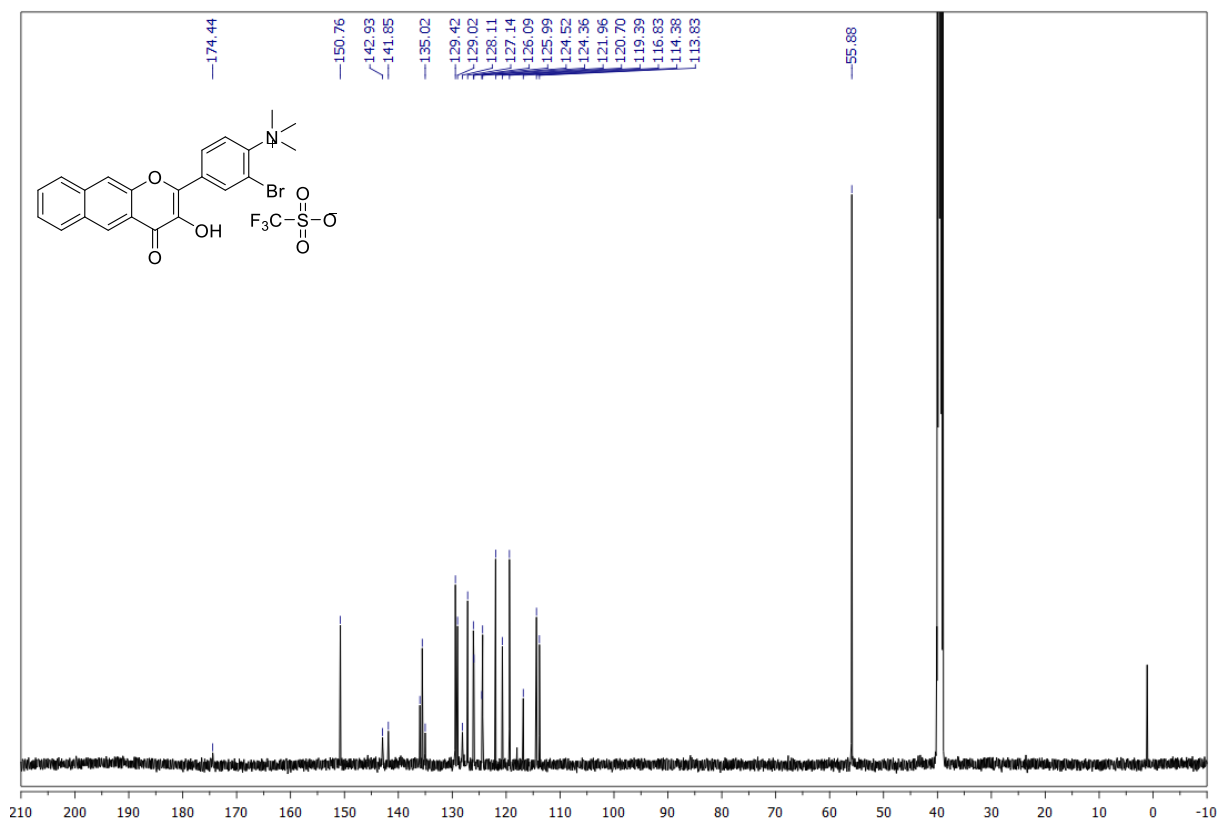


¹H NMR (*d*₆-DMSO, 500 MHz): **44**

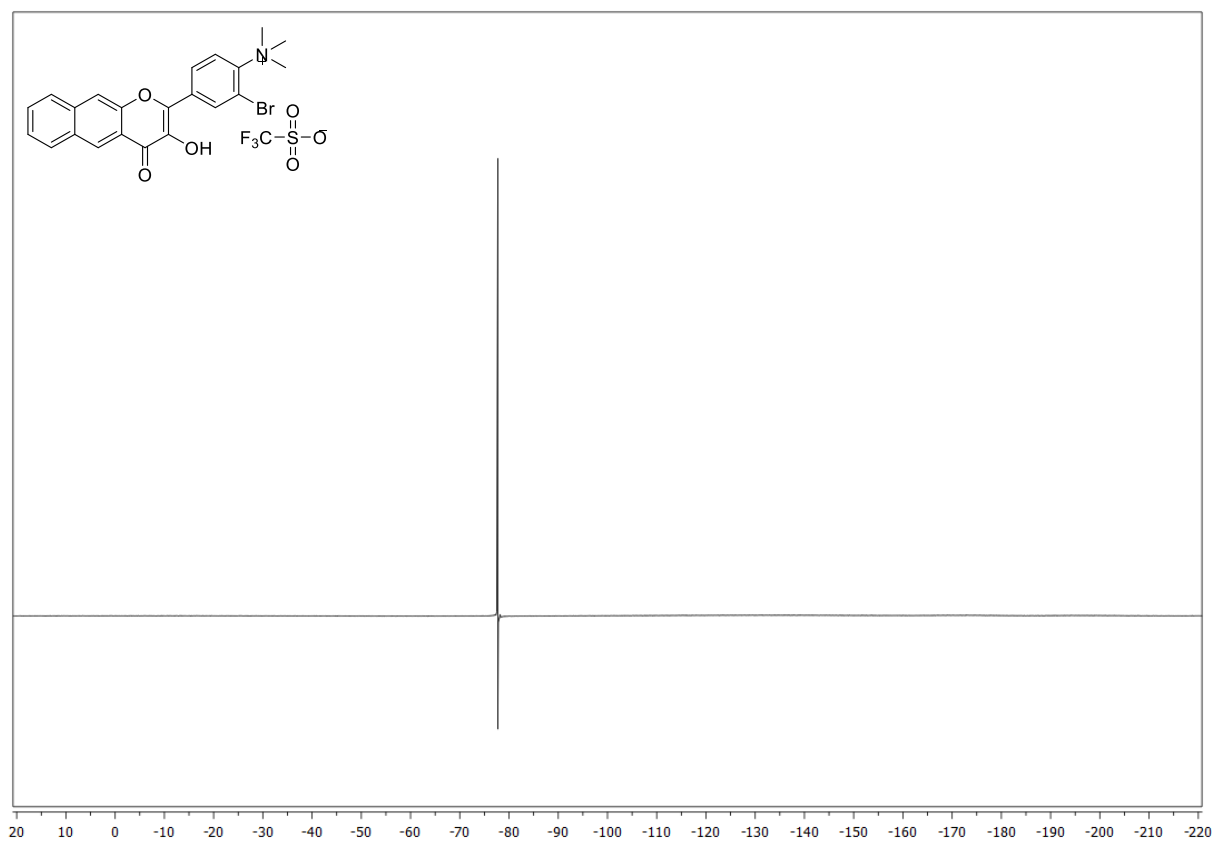


¹³C NMR (*d*₆-DMSO, 125 MHz): **44**

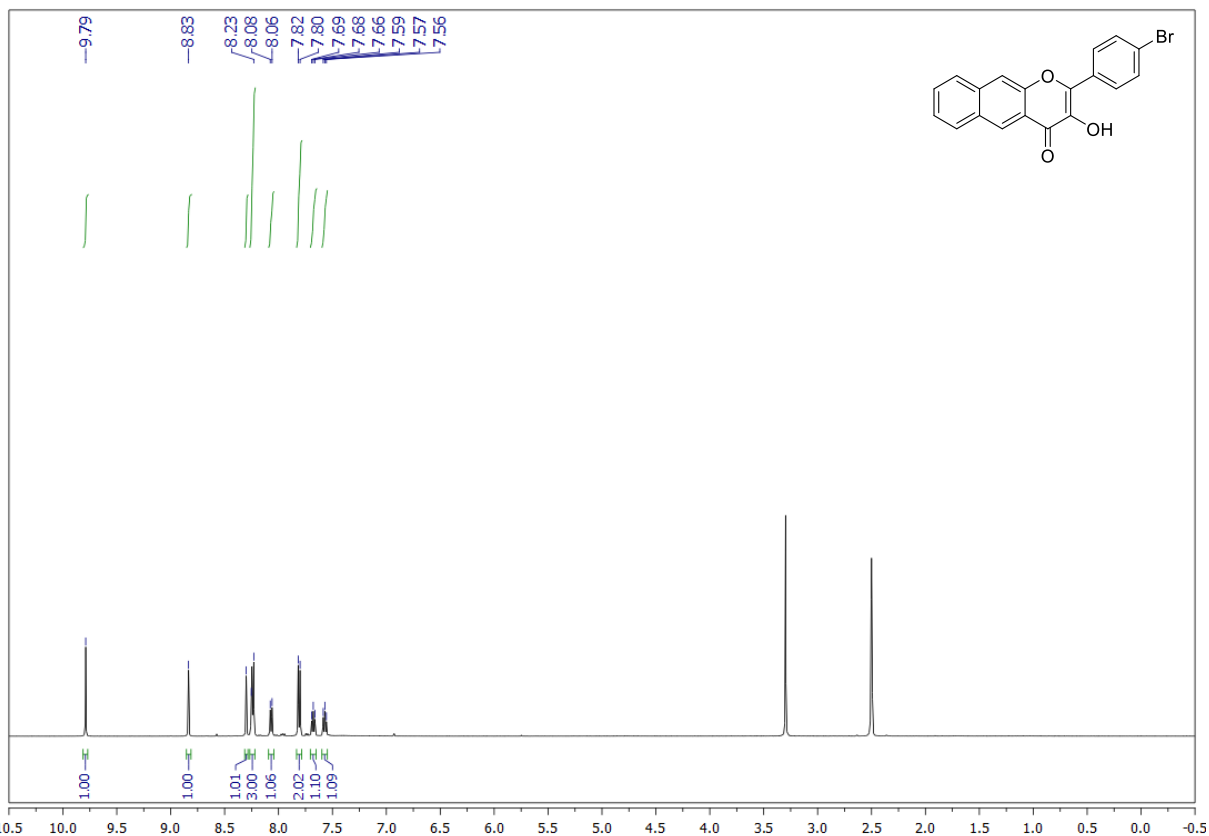




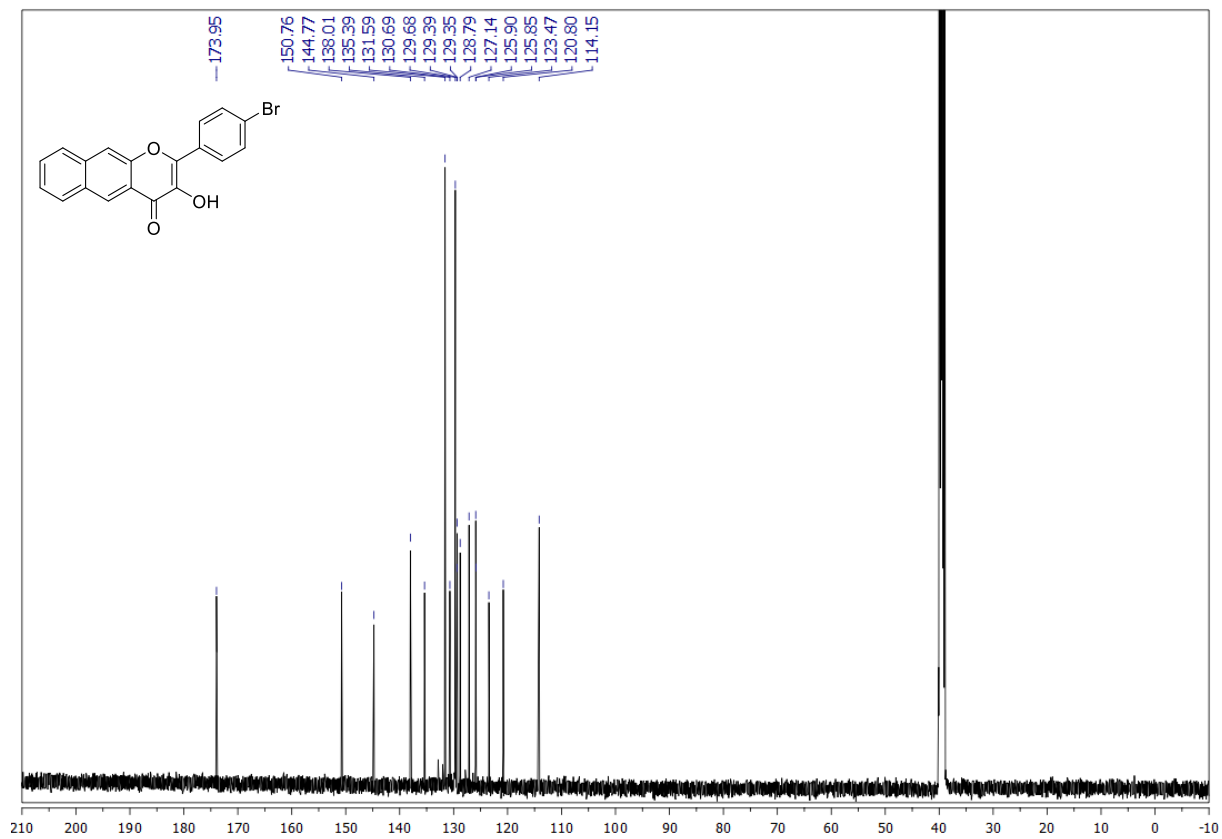
¹³C NMR (d₆-DMSO, 125 MHz): 46



¹⁹F NMR (d₆-DMSO, 282 MHz): 46



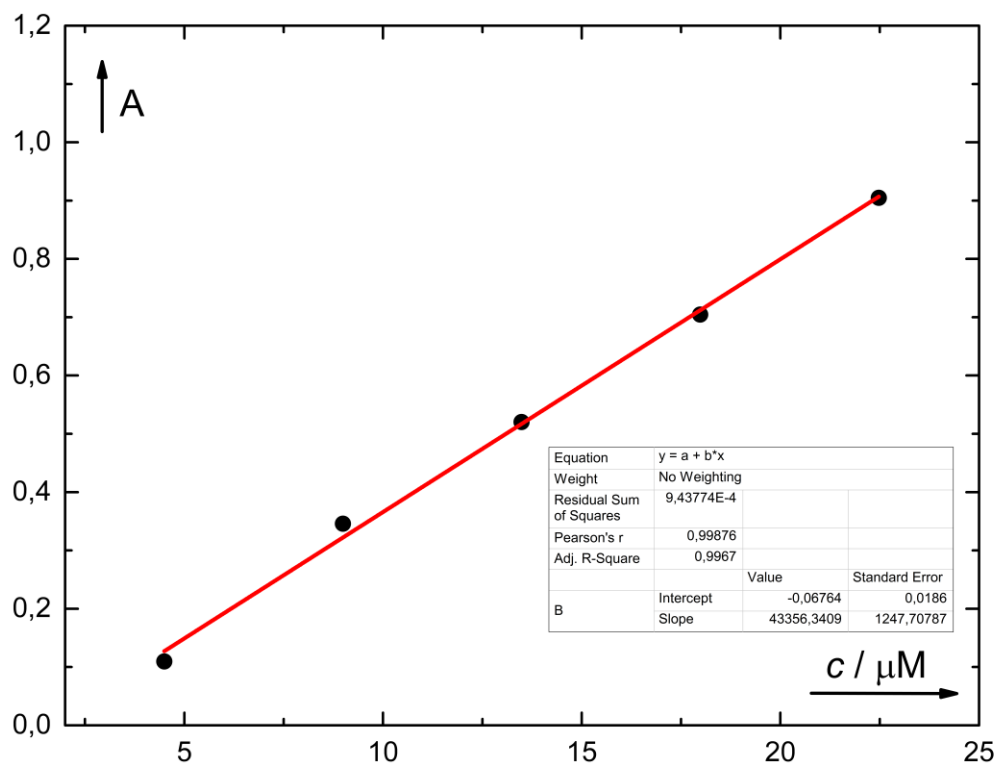
¹H NMR (d₆-DMSO, 500 MHz): 48



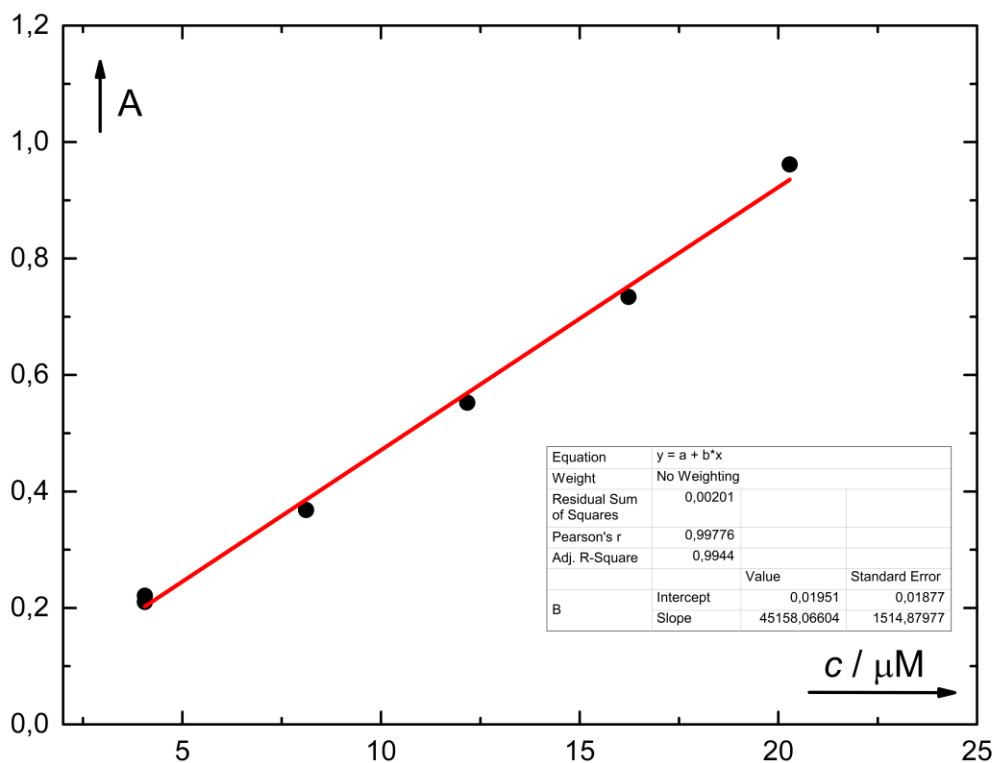
¹³C NMR (d₆-DMSO, 125 MHz): 48

9 PŘÍLOHA 2: VÝPOČET MOLÁRNÍCH ABSORPČNÍCH KOEFICIENTŮ

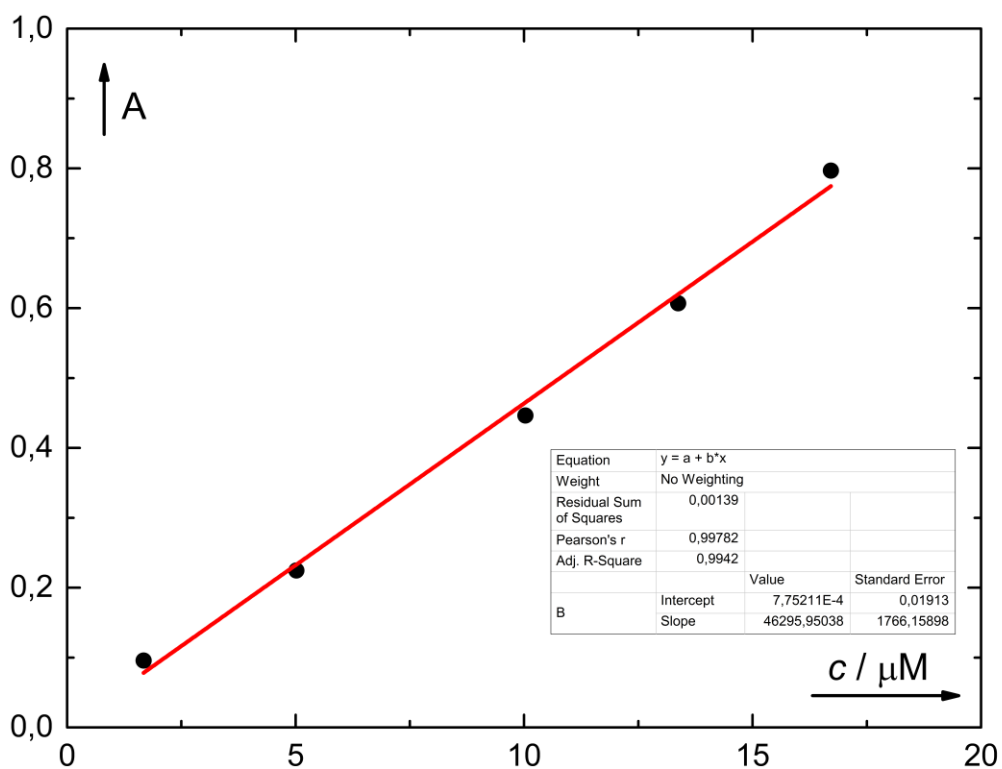
Závislost absorbance na koncentraci (μM) a lineární regrese, pomocí které byly spočítány molární absorpční koeficienty pro každou charakterizovanou látku (směrnice proložené přímkou). U absorbance byl proveden lineární posun hodnot spektra kvůli korekci minima na nulovou hodnotu.



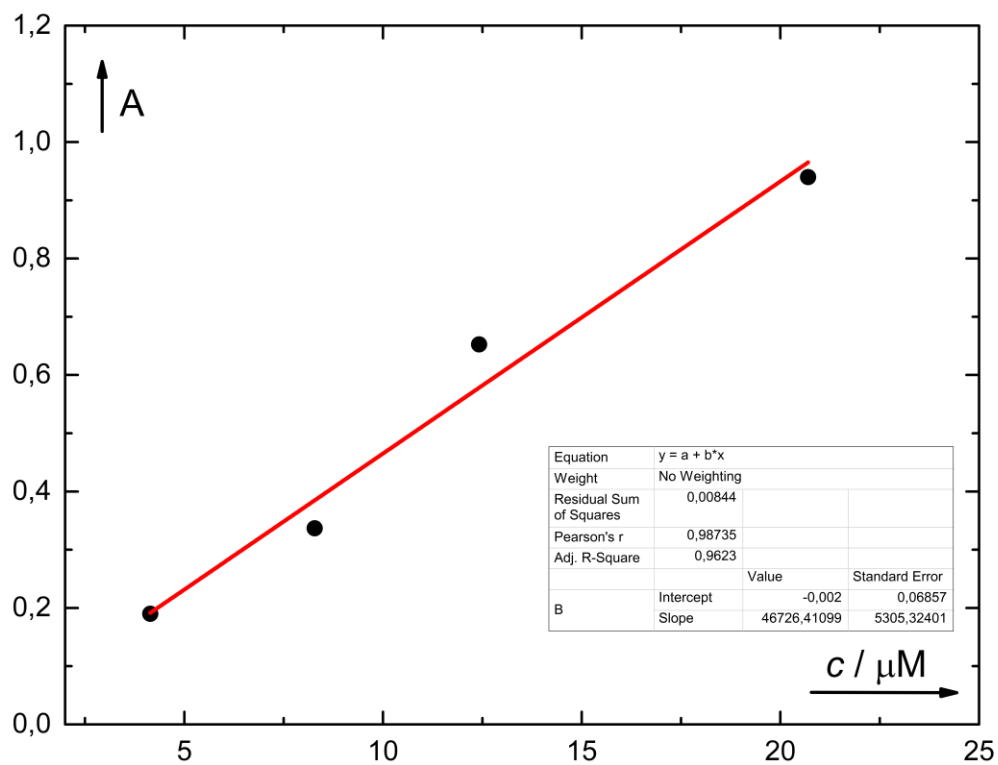
Obrázek 24: Závislost absorbance látky **29** na koncentraci ($\lambda_{\text{max}} = 272 \text{ nm}$, MeOH).



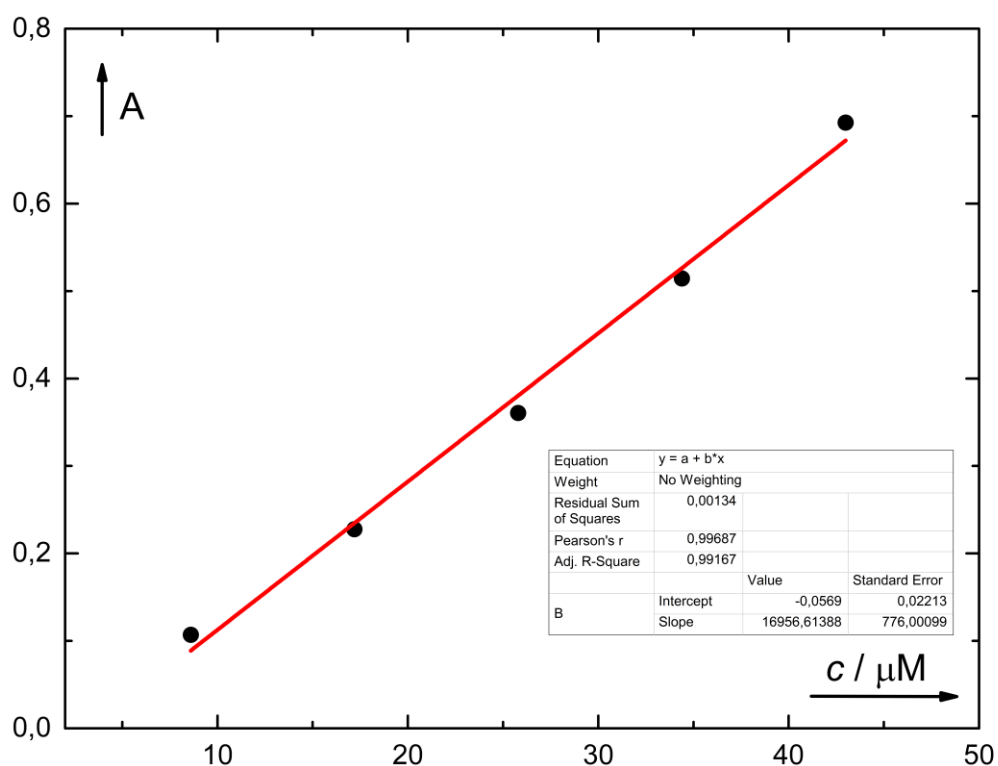
Obrázek 25: Závislost absorbance látky **44** na koncentraci ($\lambda_{\max} = 270$ nm) v PBS (10 mM, pH 7.4, $I = 100$ mM).



Obrázek 26: Závislost absorbance látky **46** na koncentraci ($\lambda_{\max} = 274$ nm) v PBS (10 mM, pH 7.4, $I = 100$ mM).



Obrázek 27: Závislost absorbance látky **48** na koncentraci ($\lambda_{\max} = 274 \text{ nm}$, MeOH).



Obrázek 28: Závislost absorbance látky **51** na koncentraci ($\lambda_{\max} = 356 \text{ nm}$) v PBS (10 mM, pH 7.4, $I = 100 \text{ mM}$).

