

## Pochodne fenotiazyny oraz ich zastosowanie

Przedmiotem wynalazku są pochodne fenotiazyny zawierające w swojej strukturze sprzężony pierścień imidazolu oraz ich zastosowanie jako fluorescencyjnych sond molekularnych do barwienia struktur biologicznych.

Związki zawierające ugrupowanie fenotiazyny są szeroko znane, głównie z uwagi na ich aktywność biologiczną. Spora grupa leków przeciwpsychotycznych, takich jak chlorpromazyna czy flufenazyna oparta jest na fenotiazynie. Ponadto związki z tej grupy często wykazują wartościowe własności fluorescencyjne, ponieważ grupa fenotiazyny jest znanym fluoroforem. Przykładowe barwniki oparte na pierścieniu fenotiazyny to błękit metylenowy czy zieleń metylenowa. Związki te były również wykorzystywane w leczeniu zakażeń układu moczowego czy malarii, a obecnie błękit metylenowy bywa stosowany w leczeniu methemoglobinemii. Właściwości red-ox, które wykorzystuje się w leczeniu oraz zdolność do indukcji światłem w znacznym stopniu ograniczają wykorzystanie tych barwników w zastosowaniach mikroskopowych, zwłaszcza w barwieniu żywych komórek. Przykładowo bisbenzimidowy barwnik Hoechst 33342 wykorzystywany w barwieniu z uwagi na wysoką selektywność względem chromatyny wykazuje fototoksyczność zwłaszcza podczas wielokrotnej ekspozycji (M. Purschke i wsp. Phototoxicity of Hoechst 33342 in time-lapse fluorescence microscopy. Photochem. Photobiol, Sci. **2010**, 12, 1634). Tymczasem połączenie dobrych własności barwiących oraz struktur obecnych w ważnej grupie leków może być korzystne z punktu widzenia zastosowania.

Związki, które mogą być stosowane w takich warunkach powinny charakteryzować się przede wszystkim wysoką intensywnością fluorescencji oraz dużym przesunięciem Stokes'a, które rozumiane jest jako odległość między pasmem absorpcji a pasmem emisji danej substancji. Ponadto, w zastosowaniach analitycznych, ważne jest aby związek był obojętny chemicznie. Pozwala to na stosowanie barwnika w relatywnie szerokim zakresie warunków, takich jak temperatura, pH czy obecność szczególnych reagentów. Znaczenie tego jest szczególne w barwieniu struktur biologicznych a zwłaszcza żywych komórek, gdzie nie ma możliwości wyeliminowania wieloskładnikowego medium. Związki powinny łatwo wiązać się z docelowymi strukturami oraz pozwalać na uzyskanie dobrego stosunku sygnału do tła. Uważa się, że odpowiednia charakterystyka substancji stosowanych do barwienia w układach komórkowych lub detekcji jonów powinna obejmować fluorescencję w zakresie 500-900 nm oraz przesunięcie Stokes'a większe niż 20 nm.

Celem twórców niniejszego wynalazku było opracowanie pochodnych fenotiazyny o właściwościach pożądanых w barwieniu struktur biologicznych.

Istotę wynalazku stanowią pochodne fenotiazyny, które mają postać chemiczną przedstawioną na wzorze 1, gdzie R oznacza grupę alkilową zawierającą od 1 do 20 atomów węgla, również rozgałęzioną.

Korzystnie, grupę alkilową stanowi grupa butylowa lub heksylowa lub decylowa lub dodecylowa lub cetylowa.

Istotę wynalazku stanowi również zastosowanie pochodnych fenotiazyny, które mają postać chemiczną przedstawioną wzorem 1, gdzie R oznacza grupę alkilową zawierającą od 1 do 20 atomów węgla, również rozgałęzioną, do barwienia struktur biologicznych, przy czym korzystnie w pochodnych fenotiazyny grupę alkilową stanowi grupa butylowa lub heksylowa lub decylowa lub dodecylowa lub cetylowa.

Szczególnie korzystnym zastosowaniem wynalazku jest wykorzystanie pochodnych fenotiazyny do barwienia komórek nowotworowych, zwłaszcza nowotworów jelita grubego lub piersi lub trzustki.

Zastosowanie pochodnych fenotiazyny do barwienia struktur biologicznych możliwe jest dzięki dobrym parametrom fotofizycznym oraz możliwości stosowania roztworów w DMSO o niskiej toksyczności wobec żywych komórek. Wysoka fluorescencja pozwala na uzyskanie dobrego stosunku sygnału do tła i pożądanego kontrastu. Preparaty oparte na pochodnych fenotiazyny opisane wynalazkiem mogą być wykorzystywane w badaniach materiałów biologicznych, diagnostyce medycznej czy kryminalistyce. Przykładowo pochodne fenotiazyny opisane wynalazkiem mogą być wykorzystane w badaniach materiałów biopsyjnych w wykrywaniu nowotworów jelit, piersi czy innych guzów litych. Zaletą pochodnych opisanych wynalazkiem jest ich obojętność chemiczna oraz brak toksyczności. Obok zwiększenia bezpieczeństwa pracy, pozwala to na zastosowanie w barwieniu przyżyciowym w przypadku barwienia komórek bakterii, grzybów czy komórek zwierzęcych. W pracy J. Icha i wsp. [Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it. *BioEssays*, **2017**, 39(8), 1700003-15] wykazano, że wiele barwników stosowanych obecnie wpływa na żywotność komórek oraz ich metabolizm jednocześnie zaburzając wynik pomiaru. Pochodne fenotiazyny opisane wynalazkiem dobrze wiążą się ze strukturami białkowymi, a jednocześnie ich rozpuszczalność pozwala w łatwy sposób usunąć z barwionego preparatu niezwiązany barwnik, co dodatkowo wpływa pozytywnie na kontrast.

W związku z powyższym, pochodne opisane wynalazkiem nadają się dobrze do stosowania w barwieniu zwierzęcych komórek nowotworowych w stężeniu pozwalającym osiągnąć wysoki poziom fluorescencji. Jako komórki zwierzęce należy rozumieć komórki eukariotyczne dowolnego typu pobrane od wielokomórkowego organizmu, w tym od człowieka.

Pochodne według wynalazku mogą być otrzymywane z wykorzystaniem metod znanych ze stanu techniki do otrzymywania analogicznych związków [M. Y. Jo, Y. Lim, B. Ahn, G. D. Lee, J. H. Kim, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **2012**, 33, 492-498.; A. M. Al-Solimy, *Journal of Molecular Structure*, **2019**, 1179, 525-531.; Z. Iqbal, W. Wu, H. Zhang, P. Hua, X. Fang, D. Kuang, L. Wang, H. Meier, D. Cao, *Dyes and Pigments*, **2013**, 99, 299-307.; A. Słodek, D. Zych, A. Maroń, R. Gawecki, A. Mrozek-Wilczkiewicz, K. Malarz, R. Musioł, *Journal of Molecular Liquids*, **2019**, 285, 515-525.; J. Cheng, Y. Chu, *Tetrahedron Letters*, **2006**, 47, 1575-1579.; W. He, Y. Ge, C. Tan, *Organic Letters*, **2014**, 16, 3244-3247]. Możliwa strategia otrzymywania pochodnych objętych wynalazkiem została przedstawiona na schemacie reakcji zaprezentowanym na fig. 1 oraz opisana poniżej.

### Potencjalny sposób otrzymywania pochodnych będących przedmiotem wynalazku.

Związki według wynalazku otrzymuje się w wieloetapowej syntezie z 7-(2-trimetylosililoetynylo)-10-oktylo-10H-fenotiazyno-3-karboaldehydu poprzez przyłączenie pochodnych imidazoli, tak jak to przedstawiono na schemacie reakcji zaprezentowanym na fig. 1. Kilkuetapową syntezę półproduktów, to jest właściwego 2-jodo-N-alkiloimidazolu oraz 7-(2-trimetylosililoetynylo)-10-oktylo-10H-fenotiazyno-3-karboaldehydu prowadzi się w oparciu o znane z literatury metody wychodząc z handlowo dostępnego imidazolu i fenotiazyny.

Najpierw wytwarza się 7-(2-trimetylosililoetynylo)-10-oktylo-10H-fenotiazyno-3-karboaldehyd, niezbędny do syntezy finalnych etynylowych pochodnych. Na drodze czteroetapowej syntezы otrzymuje się kolejno: w reakcji alkilowania 10-oktylo-10H-fenotiazynę (**1** – na schemacie fig. 1), w wyniku formylowania Vilsmeiera-Haacka 10-oktylo-10H-fenotiazyno-3-karboaldehyd (**2**), w reakcji bromowania 7-bromo-10-oktylo-10H-fenotiazyno-3-karboaldehyd (**3**). Tak pozyskany związek (**3**) następnie poddaje się reakcji sprzęgania Sonogashiry z trimetylosililoacetylenem (TMSA) w obecności  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]/\text{PPh}_3/\text{CuI}$  jako układu katalitycznego, otrzymując 7-(2-trimetylosililoetynylo)-10-oktylo-10H-fenotiazyno-3-karboaldehyd (**4**).

Natomiast 2-jodo-N-alkiloimidazole o różnych długościach łańcucha alkilowego, konieczne w końcowym etapie mogą być łatwo otrzymane na drodze dwuetapowej ścieżki syntetycznej za pomocą znanych z literatury metod (jak przedstawiono w ramce na fig. 1). Handlowo dostępny imidazol poddaje się reakcji alkilowania wykorzystując odpowiednie bromki alkilowe (**5a-e**), następnie otrzymuje się pożądane jodopochodne (**6a-e**) w wyniku reakcji jodowania.

Finalnym etapem jest sprzęganie Sonogashiry półproduktów (**4**) oraz (**6a-e**) z równoczesnym desililowaniem 7-(2-trimetylosililoetynylo)-10-oktylo-10H-fenotiazyno-3-karboaldehydu. Reakcję prowadzi się wobec układu katalitycznego Pd/Cu. W kolbie okrągłodennej trójszyjnej o pojemności 50 ml zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, bubbler oraz mieszađło magnetyczne umieszcza się 1,8 mmol odpowiedniego 2-jodo-N-alkiloimidazolu i rozpuszcza w 20 ml TEA. Zawartość kolby miesza się i argonuje przez około 10 minut. Następnie do kolby dodaje się 1,8 mmol 7-(2-trimetylosililo-10-oktylo-10H-fenotiazyno-3-karboaldehydu. Miesza w atmosferze gazu obojętnego kolejne 10 minut, do rozpuszczenia zawartości kolby. Kolejno dodaje się katalizatory: 5% mol  $\text{PPh}_3$  (0,09 mmol), 10% mol  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (0,18 mmol) oraz 10% mol CuI (0,18 mmol). Następnie przez septum dodaje się dwukrotny nadmiar 1M roztworu TBAF w THF (3,6 mmol). Następuje zmiana barwy mieszaniny reakcyjnej na brunatną. Całość miesza się w atmosferze gazu obojętnego w temperaturze 90°C przez 24 godziny. Po tym czasie mieszaninę poreakcyjną doprowadza się do temperatury pokojowej, odparowuje TEA. Gotowy produkt oczyszcza się chromatograficznie na żelu krzemionkowym stosując jako eluent heksan oraz octan etylu w stosunku objętościowym 2:1. Oczyszczone produkty mają postać żółtego lub pomarańczowego oleju. W ten sposób otrzymuje się konkretne alkilowe pochodne 10-oktylo-10H-fenotiazyno-3-karboaldehydu z wydajnościami w zakresie 12-64%.

Poniżej przedstawiono przykłady rozwiązania według wynalazku, które obrazują, lecz nie ograniczają jego zakresu. W przykładach 1-5 przedstawiono postać chemiczną otrzymanych pochodnych fenotiazyny. Przykład 6 przedstawia właściwości fotofizyczne pochodnych według wynalazku kluczowe w ich zastosowaniu. W przykładach 7-9 przedstawiono możliwości zastosowania pochodnych w barwieniu struktur biologicznych na przykładzie komórek zwierzęcych.

Opis rozwiązania uzupełniony jest również rysunkiem, na którym fig. 1 przedstawia przykładowy schemat otrzymywania nowych pochodnych fenotiazyny zawierających w swojej strukturze sprzężony pierścień imidazolu, gdzie: (**6a** (R = C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>), **6b** (R = C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>), **6c** (R = C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>), **6d** (R = C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>), **6e** (R = C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>)), (**7a** (R = C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>), **7b** (R = C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>), **7c** (R = C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>), **7d** (R = C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>), **7e** (R = C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>)), fig. 2 - znormalizowane widma absorpcji i emisji przykładowego związku **7a** w roztworze DMSO o stężeniu 10<sup>-5</sup> mol/dm<sup>3</sup>, natomiast w tabeli 1 przedstawiono właściwości fotofizyczne pochodnych fenotiazyny **7a-e**.

### Przykład 1

7-((N-butyloimidaz-3-yl)etynylo)-N-oktylofenotiazyno-3-karboaldehyd (**7a** według fig. 1).

Związek otrzymano zgodnie z przedstawioną powyżej przykładową strategią w wyniku reakcji 2-jodo-N-butyloimidazolu z 7-(2-trimetylosililoetynylo)-10-oktylo-10H-fenotiazyno-3-karboaldehydem, jako żółty olej.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.81 (s, 1H), 7.66 (dd, J = 8.4, 1.8 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.38 (dd, J = 8.4, 1.5 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.96 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 6.91 (t, J = 11.7 Hz, 1H), 6.85 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.10 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.88 (dd, J = 16.1, 8.9 Hz, 2H), 1.83 (dd, J = 9.9, 4.5 Hz, 4H), 1.44 – 1.23 (m, 12H), 0.88 (t, J = 5.8 Hz, 6H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 189.65, 149.62, 143.92, 131.60, 131.26, 131.07, 129.98, 129.93, 129.36, 128.15, 124.15, 123.82, 119.97, 116.72, 115.51, 114.89, 91.61, 78.93, 47.95, 46.54, 32.57, 31.46, 28.93, 28.87, 27.50, 26.66, 26.52, 26.44, 22.37, 19.46, 13.84, 13.35. Analiza elementarna: C<sub>30</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>OS: teoret. C=74,19; H=7,26; N=8,65, prakt. C=73,98; H=7,66; N=8,27.

**Przykład 2.** 7-((N-heksyloimidaz-3-yl)etynylo)-N-oktylofenotiazyno-3-karboaldehyd (**7b** według fig. 1).

Związek otrzymano zgodnie z przedstawioną powyżej przykładową strategią w wyniku reakcji 2-jodo-N-heksyloimidazolu z 7-(2-trimetylosililoetynylo)-10-oktylo-10H-fenotiazyno-3-karboaldehydem, jako żółty olej.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.81 (s, 1H), 7.65 (dd, J = 8.4, 1.7 Hz, 1H), 7.56 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.26 – 7.25 (m, 1H), 7.16 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 6.92 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.84 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 4.10 (s, 2H), 3.93 – 3.84 (m, 2H), 1.87 – 1.75 (m, 4H), 1.42 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.32 – 1.24 (m, 14H), 0.89 – 0.85 (m, 6H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 189.86, 149.79, 144.34, 131.53, 131.43, 130.18, 129.99, 129.92, 129.25, 128.38, 124.38, 124.09, 116.64, 115.74, 115.74, 115.13, 92.76, 78.48, 48.19, 31.67, 31.21, 30.63, 29.68, 29.13, 29.08, 26.73, 26.66, 26.12, 22.57, 22.46, 14.04, 13.95. Analiza

elementarna: C<sub>32</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>OS: teoret. C=74,81; H=7,65; N=8,18, prakt. C=74,84; H=8,00; N=7,74.

**Przykład 3.** 7-((N-decyloimidaz-3-yl)etynylo)-N-oktylofenotiazyno-3-karboaldehyd (**7c** według fig. 1).

Związek otrzymano zgodnie z przedstawioną powyżej przykładową strategią w wyniku reakcji 2-jodo-N-decyloimidazolu z 7-(2-trimetylosililoetynylo)-10-oktylo-10H-fenotiazyno-3-karboaldehydem, jako żółty olej.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.79 (s, 1H), 7.64 (dd, J = 8.4, 1.7 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.34 (dd, J = 8.4, 1.6 Hz, 1H), 7.23 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.07 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.90 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.82 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.11 – 4.02 (m, 2H), 3.86 (dd, J = 15.1, 7.8 Hz, 2H), 1.80 (m, 4H), 1.41 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 1.32 – 1.22 (m, 22H), 0.85 (d, J = 3.6 Hz, 6H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 190.56, 150.55, 144.80, 132.65, 132.20, 131.97, 130.91, 130.85, 130.49, 129.06, 125.09, 124.74, 120.90, 117.74, 116.42, 115.81, 92.31, 80.06, 48.88, 47.71, 32.57, 32.40, 31.48, 30.23, 30.18, 29.98, 29.86, 29.81, 29.80, 27.46, 27.38, 27.18, 23.37, 23.30, 14.81, 14.78. Analiza elementarna: C<sub>36</sub>H<sub>47</sub>N<sub>3</sub>OS: teoret. C=75,88; H=8,31; N=7,37, prakt. C=75,67; H=8,29; N=6,80.

**Przykład 4.** 7-((N-dodecyloimidaz-3-yl)etynylo)-N-oktylofenotiazyno-3-karboaldehyd (**7d** według fig. 1).

Związek otrzymano zgodnie z przedstawioną powyżej przykładową strategią w wyniku reakcji 2-jodo-N-dodecyloimidazolu z 7-(2-trimetylosililoetynylo)-10-oktylo-10H-fenotiazyno-3-karboaldehydem, jako żółty olej.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.83 (s, 1H), 7.70 – 7.64 (m, 1H), 7.58 (dd, J = 11.9, 4.6 Hz, 1H), 7.40 – 7.36 (m, 1H), 7.26 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.16 (s, 1H), 6.99 (s, 1H), 6.92 (t, J = 12.0 Hz, 1H), 6.85 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.10 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.91 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.89 – 1.80 (m, 4H), 1.45 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.29 (dd, J = 16.1, 9.0 Hz, 26H), 0.89 (dd, J = 6.7, 5.9 Hz, 6H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 189.88, 149.88, 144.13, 131.96, 131.54, 131.31, 130.26, 130.19, 129.90, 128.39, 124.42, 124.06, 120.24, 117.06, 115.76, 115.15, 91.69, 79.41, 48.23, 47.06, 31.96, 31.75, 30.82, 29.76, 29.68, 29.67, 29.63, 29.53, 29.39, 29.21, 29.16, 26.80, 26.72, 26.53, 22.74, 22.65, 14.18, 14.13. Analiza elementarna: C<sub>38</sub>H<sub>51</sub>N<sub>3</sub>OS: teoret. C=76,34; H=8,60; N=7,03, prakt. C=76,80; H=8,78; N=6,51.

**Przykład 5.** 7-((N-cetyloimidaz-3-yl)etynylo)-N-oktylofenotiazyno-3-karboaldehyd (**7e** według fig. 1).

Związek otrzymano zgodnie z przedstawioną powyżej przykładową strategią w wyniku reakcji 2-jodo-N-cetyloimidazolu z 7-(2-trimetylosililoetynylo)-10-oktylo-10H-fenotiazyno-3-karboaldehydem, jako żółty olej.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.80 (s, 1H), 7.65 (dd, J = 8.4, 1.8 Hz, 1H), 7.57 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.38 (dd, J = 8.4, 1.5 Hz, 1H), 7.25 – 7.24 (m, 1H), 7.15 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.91 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.83 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.08 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.88 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.81 (dt, J = 15.0, 7.5 Hz, 4H), 1.42 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 1.30 – 1.19 (m,

34H), 0.87 (dd,  $J = 6.2, 2.1$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  189.96, 149.91, 144.42, 131.70, 131.66, 131.55, 130.31, 130.28, 129.08, 128.52, 124.51, 124.20, 120.32, 116.84, 115.84, 115.24, 92.87, 79.14, 48.33, 47.30, 32.04, 31.81, 30.82, 29.82, 29.81, 29.78, 29.74, 29.69, 29.58, 29.48, 29.46, 29.27, 29.22, 29.20, 26.87, 26.80, 26.62, 26.58, 22.80, 22.71, 14.22, 14.17. Analiza elementarna:  $\text{C}_{42}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{OS}$ : teoret. C=77,13; H=9,09; N=6,43, prakt. C=76,62; H=9,35; N=5,92.

**Przykład 6.** Przykładowe widma absorpcji i emisji związków opisanych wynalazkiem.

Widma absorpcji i emisji mierzone były przy użyciu standardowego spektrofotometru w roztworze o stężeniu  $10^{-5}$  M.

W tabeli 1 zebrano najważniejsze parametry spektroskopowe potwierdzające, iż przedstawione pochodne nadają się do obrazowania struktur biologicznych.

Dane przedstawione w tabeli 1 wskazują na możliwość wykorzystania związków jako barwników fluorescencyjnych. Wysokie wartości wydajności kwantowej fluorescencji oraz przesunięcia Stokes'a to pożądane parametry w takich zastosowaniach. Pozwalają na uzyskanie wysokiej jasności punktów, w których barwnik został zaadsorbowany, co pozytywnie wpływa na kontrast obrazu. Jednocześnie przesunięcie Stokes'a pozwala na ograniczenie niepożądanego świecenia tła. Obrazy uzyskane za pomocą pochodnych są wyraźne o dużym kontraście, a związki pozwalają na stosowanie współbarwienia za pomocą innych barwników.

**Przykład 7.** Toksyczność pochodnych fenotiazyny wobec różnych linii adherentnych komórek nowotworowych.

Aktywność antyproliferacyjną testowanych związków oznaczono wobec ludzkich komórek nowotworów: jelita grubego linii HCT 116 +/+ (typu dzikiego) oraz HCT 116 -/- (z delecją genu TP53), piersi linii MCF-7, trzustki linii PANC-1. Komórki wysiewano na 96-dółkową płytkę w ilości 5 tysięcy na dółek (po 100  $\mu\text{L}$ /dółek) i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  i 5%  $\text{CO}_2$ . Po tym czasie przygotowano i podawano roztwory związków (rozpuszczonych w minimalnej ilości DMSO) w stężeniach umożliwiających wyznaczenie wartości  $\text{IC}_{50}$ . Przykładowa aplikacja związku: rozpuszczenie związku w DMSO celem przygotowania roztworów o następujących stężeniach: 25  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$  w pożywce hodowlanej DMEM, końcowa objętość w dółkach wynosiła 200  $\mu\text{L}$ . Następnie roztwory zostały podane komórkom i inkubowane 72 godziny. Po tym czasie przeżywalność komórek została określona za pomocą standardowego testu MTS. Nie zaobserwowano wyraźnych efektów toksyczności. Aktywność przeciwnowotworową w postaci wyliczonych wartości  $\text{IC}_{50}$  określono na poziomie  $>25$   $\mu\text{M}$ . W związku z powyższym pochodne opisane wynalazkiem nadają się dobrze do stosowania w barwieniu zwierzęcych komórek nowotworowych w stężeniu pozwalającym osiągnąć wysoki poziom fluorescencji.

**Przykład 8.** Toksyczność pochodnych wobec linii komórek normalnych.

Cytotoksyczność badanych związków oznaczono wobec komórek prawidłowych ludzkich fibroblastów linii NHDF. Komórki wysiewano na 96-dółkową płytkę w ilości 4 tysięcy na

dołek (po 100  $\mu\text{L}$ /dołek) i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  i 5%  $\text{CO}_2$ . Po tym czasie przygotowano i podawano roztwory związków (rozpuszczonych w minimalnej ilości DMSO) w stężeniach umożliwiających wyznaczenie wartości  $\text{IC}_{50}$ . Przykładowa aplikacja związku: rozpuszczenie związku w DMSO celem przygotowania roztworów o następujących stężeniach: 25  $\mu\text{M}$  oraz 12,5  $\mu\text{M}$  w pożywce hodowlanej DMEM, końcowa objętość w dołkach wynosiła 200  $\mu\text{L}$ . Następnie roztwory zostały podane komórkom i inkubowane 72 godziny. Po tym czasie przeżywalność komórek została określona za pomocą standardowego testu MTS. Toksyczność badanych pochodnych w postaci wyliczonych wartości  $\text{IC}_{50}$  przekracza poziom 25  $\mu\text{M}$ . W związku z powyższym pochodne opisane wynalazkiem nadają się dobrze do stosowania w barwieniu zwierzęcych komórek normalnych w stężeniu pozwalającym osiągnąć wysoki poziom fluorescencji.

**Przykład 9.** Zastosowanie pochodnych fenotiazyny do barwienia struktur biologicznych.

Przykładowa procedura barwienia komórek ludzkiego nowotworu jelita grubego linii HCT116 +/+. Komórki wysiano w ilości 120 tys. (wraz z 0,8 mL DMEM) na wcześniej przygotowane szkiełka podstawowe pokryte poli-L-lizyną i obrysowane markerem hydrofobowym, a następnie inkubowano przez 24 godziny w  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Po tym czasie przygotowano roztwory pochodnych z przykładów 1-5 (rozpuszczalnik DMSO) o stężeniu 25  $\mu\text{M}$  w pożywce hodowlanej DMEM, końcowa objętość na szkiełku wynosiła 0,8 mL. Następnie roztwory zostały podane komórkom i inkubowane przez 2 godziny w  $37^{\circ}\text{C}$ , celem wniknięcia związków przez błonę komórkową. Po inkubacji komórki przemywano dwukrotnie DMEM (bez FBS i czerwieni fenolowej), a następnie obserwowano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego po wzbudzeniu filtrem DAPI. Zastosowanie pochodnych pozwala na osiągnięcie wyraźnego obrazu o dobrym stosunku sygnału przy niskiej fluorescencji tła.