

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**FTALOCYANINY JAKO FOTOSENZITIZÉRY VE FOTODYNAMICKÉ
TERAPII NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Miloslav Macháček, PhD.

Hradec Králové 2017

Anna Flegrová

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé práce panu Mgr. Miloslavu Macháčkovi, PhD. za ochotu, trpělivost a cenné rady, které mi velmi pomohly. Také jsem velmi vděčná mé rodině a blízkým za neochvějnou podporu nejen při psaní této práce, ale i v průběhu celého studia.

Hradec Králové 2017

Anna Flegrová

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

Podpis

1. OBSAH

1.	Obsah.....	4
2.	Úvod	5
3.	Seznam zkratk.....	6
4.	Teoretická část.....	7
4.1.	Fotodynamická terapie	7
4.1.1.	Historie	8
4.1.2.	Mechanismus fotodynamické terapie.....	8
4.2.	Fotosenzitizéry	11
4.2.1.	Skupiny fotosenzitizérů.....	12
4.2.2.	Vlastnosti ideálního fotosenzitizéru	12
4.2.3.	Rozdělení fotosenzitizérů do generací	13
4.3.	Ftalocyaniny.....	17
4.3.1.	Hydrofobní ftalocyaniny	19
4.3.2.	Hydrofilní ftalocyaniny	21
4.3.3.	Experimentálně testované ftalocyaniny	23
5.	Závěr.....	29
6.	Seznam použité literatury	30

2. ÚVOD

Má práce na téma *Ftalocyaniny jako fotosenzitizéry ve fotodynamické terapii nádorových onemocnění* se bude zabývat tematikou fotodynamické terapie, její historie a mechanismem, dále pak fotosenzitizéry a jejich vlastnostmi, ale především však jednou skupinou látek, kterými jsou ftalocyaniny.

Ftalocyaniny jsou syntetické analogy porfyrinů, které mají díky své struktuře jedinečné fyzikální a optické vlastnosti. Mají široké využití např. jako barviva, fotovodivá činidla ve fotokopírovacích zařízeních, v záznamových médiích, atd. Při využití ve fotodynamické terapii jsou považovány za fotosenzitizéry druhé generace. Jsou důležité pro jejich výjimečnou stabilitu a absorpci světla o vlnových délkách v červené nebo blízké infračervené oblasti spektra. Mají však i svá omezení, kterým je např. jejich nízká rozpustnost ve vodném prostředí. Zavedením nabitých skupin na periferii makrocyklu nebo substituce axiálním ligandem s vysokou polaritou může být dosaženo jejich rozpuštění ve vodě.

V této práci jsem se pokusila popsat ftalocyaniny jako fotosenzitizéry používané, v klinických studiích, ale také vybrané látky, které byly zatím studovány experimentálně pouze v *in vivo* a *in vitro* podmínkách.

3. SEZNAM ZKRATEK

•O ₂ ⁻	- superoxidový radikál
•OH	- hydroxylový radikál
¹ O ₂	- kyslík v singletovém stavu
³ O ₂	- kyslík v tripletovém stavu
EC ₅₀	- střední účinná koncentrace
FDA	- Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
H ₂ O ₂	- peroxid vodíku
HpD	- derivát hematoporfyrinu
i.p.	- intraperitoneálně
i.v.	- intravenózně
IC ₅₀	- koncentrace, která způsobí 50 % inhibici růstu
Pc	- ftalocyanin
Pc4	- křemičitý ftalocyanin
Photosens	- sulfonovaný hlinitý ftalocyanin
PS	- fotosenzitizér
ROS	- reaktivní formy kyslíku
S1	- první excitovaný elektronový stav
T1	- excitovaný tripletový stav
TC ₅₀	- střední toxická koncentrace
ΦΔ	- kvantový výtěžek kyslíku

4. TEORETICKÁ ČÁST

4.1. Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie (PDT) je klinicky ověřená, minimálně invazivní terapeutická metoda, která dokáže vyvinout selektivní cytotoxickou aktivitu vůči maligním buňkám. Tato procedura představuje podání fotosenzitizéru (PS) pacientovi a jeho následné ozáření vlnovou délkou odpovídající absorpčnímu pásu PS. Přítomnost reaktivních forem kyslíku (ROS) vytvořených fotodynamickým působením PS spustí sérii reakcí vedoucích k přímému usmrcení nádorových buněk, poškození mikrocirkulace a navození lokální zánětlivé reakce, popřípadě i systémové imunitní odpovědi schopné působit i na metastatická ložiska mimo místo ozáření. Klinické studie prokázaly, že nejvyšší účinnost PDT bylo dosaženo u malignit v rané fázi. PDT může prodloužit život pacientům s neoperabilními nádory a podstatně zlepšit kvalitu jejich života. Minimální toxicita pro normální tkáň, nepatrný systematický efekt, dobře redukovatelná dlouhotrvající chorobnost, absence vnitřních nebo získaných mechanismů rezistence a výborná šetrnost z hlediska kosmetiky i orgánových funkcí tvoří účinky této léčby jako cenné terapeutické stanovisko kombinované terapie (Agostinis et al., 2011).

Hlavními výhodami PDT oproti běžně využívané léčbě nádorových onemocnění je minimální systematická toxicita (protože fotosenzitizéry jsou aktivované pouze v přítomnosti světla), jejich schopnost selektivně ničit maligní buňky a to, že PDT může být použita samostatně, a nebo v kombinaci s dalšími léčebnými způsoby, jako jsou chemoterapie, chirurgické vyjmutí, radioterapie nebo imunoterapie. Krom toho může být PS podáván nejen systémově, ale také lokálně v závislosti na typu tumoru a/nebo jeho lokalizaci (Juarranz et al., 2008).

PDT bývá využívána k léčbě endoskopicky přístupných nádorů, jako jsou např. neoplazie plic, močového měchýře, gastrointestinálního traktu či gynekologické nádory. Tato metoda se také využívá v dermatologii k léčbě nemelanomových novotvarů kůže (např. bazocelulární karcinom) a prekancerózní onemocnění (např. aktinická keratóza) (Juarranz et al., 2008).

4.1.1. Historie

Terapeutický potenciál světla je využíván už po tisíce let. Před 3000 lety starověké egyptské, čínské a indické civilizace využívaly světlo v kombinaci popř. s reaktivními chemikáliemi např. k léčbě vitiliga a lupénky (Shazib & Malini, 2006).

Základy moderní PDT byly položeny teprve začátkem minulého století, kdy Oscar Raab pracující v laboratoři Hermanna von Tapienera v Německu zjistil, že osvětlením mikrobiální kultury v přítomnosti akridinu a příbuzných sloučenin způsobuje buněčnou smrt. V roce 1903 pak Tapiener a Jesionek použili eosin a světlo k léčbě kožních nádorů. Tento a příbuzný fenomén byl pak pravidelně znovuobjevován, ale současná éra výzkumu moderní PDT byla zahájena až Lipsonem a Bladesem, kteří v roce 1960 dokázali, že neoplastické tkáně během operace vykazují fluorescence pod ultrafialovým zářením po zavedení směsi porfyrinu připravenou Dr. Samuelem Schwartzem. Schwartz a další pracovníci v tomto oboru pak publikovali souhrn těchto raných studií. Rozhodujícím postřehem bylo to, že nečistoty v komerčním hematoporfyrinu (HP) jsou lepší látky pro detekci nádoru, než celá směs. Upravil hematoporfyrin kyselinou octovou a sírovou a získal tak směs porfyrinů, kterou Schwartz nazval „derivát hematoporfyrinu“ (HpD). HpD byl částečně přečištěn, byly odstraněny méně aktivní porfyrinové monomery až do formy známé jako porfimer sodný, Photofrin®, což byl a stále je nejrozšířenější PS užívaný v klinické PDT. Snaha Doughertyho a jeho spolupracovníků v 70. letech vydláždila cestu PDT tak, jak ji známe dnes. (Kessel, 2004). Nejprve byla u myši kompletně eradikována rakovina mléčné žlázy použitím HpD v kombinaci s červeným světlem. Druhá studie využila 25 pacientů s nádory kůže, u nichž kompletní odezvu ukázalo 98 ze 113 nádorů, částečnou 13 a pouze 2 se jevily vůči PDT rezistentní. Tyto objevy byly rozhodující pro první klinické schválení PDT pro léčbu nádorů močového měchýře roku 1993 v Kanadě (Van Straten et al., 2017).

4.1.2. Mechanismus fotodynamické terapie

PDT se skládá ze tří základních komponent: PS, světlo a molekulární kyslík ve svém základním, tripletovém stavu ($^3\text{O}_2$). Žádná z těchto složek není samostatně toxická, ale dohromady podněcují fotochemickou reakci, která je zakončena produkcí především vysoce reaktivního produktu zvaného singletový kyslík ($^1\text{O}_2$). Ten může rychle způsobit

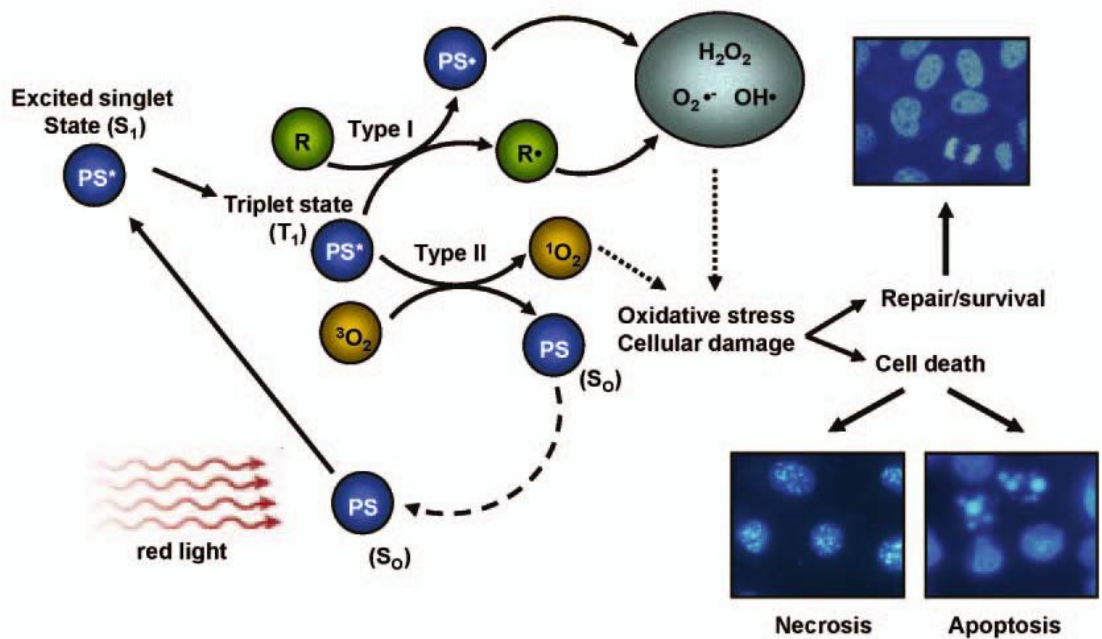
toxicitu vedoucí k smrti buňky nejčastěji prostřednictvím apoptózy nebo nekrózy. Protinádorový efekt PDT vychází ze tří vzájemně propojených mechanismů: přímý cytotoxický účinek na nádorové buňky, poškození cév nádoru a navození masivní zánětlivé reakce, která může vést k rozvoji systémové imunity. Relativní podíl těchto mechanismů závisí do značné míry na typu a dávce použitého PS, době mezi podáním PS a vystavení záření, celkové dávce světla a jeho dávce, koncentraci kyslíku v nádoru a možná další stále těžko rozeznatelné proměnné (Agostinis et al., 2011).

V PDT je složka s fotosenzitizujícími účinky nahromaděna v maligní tkáni. Následuje její aktivace viditelným světlem, přednostně v červené oblasti viditelného světla ($\lambda \geq 600$ nm), kde je tkáň nejvíce propustná pro světlo. PS v neexcitovaném stavu umí absorbovat viditelné světlo (fotony) a následuje posun do prvního excitovaného elektronového stavu (S1) a pak dále přes mezisystémové přechody do excitovaného tripletového stavu (T1), což je relativně dlouhotrvající excitovaný stav. Energie excitovaného PS může být vyloučena ve formě tepla, fluorescence (z S1) nebo fosforescence (z T1). Excitovaný tripletový stav může také převést vodíkový atom nebo elektron do biomolekul (lipidy, proteiny, nukleové kyseliny, atd.) nebo generovat radikály, které interagují s kyslíkem za vzniku ROS, jako jsou např. superoxidový anion radikál ($\bullet\text{O}_2^-$), hydroxylový radikál ($\bullet\text{OH}$) nebo peroxid vodíku (H_2O_2 , tzv. reakce typu I). Krom toho T1 stav umí převést energii přímo na $^3\text{O}_2$, ze kterého potom vzniká neradikálový, ale vysoce reaktivní $^1\text{O}_2$ (tzv. reakce typu II) (Juarranz et al., 2008).

Reakce $^1\text{O}_2$ s membránovými lipidy vede k jejich peroxidaci a může tak vést k narušení buněčných membrán. Může také reagovat s aminokyselinami, které mohou narušit funkčnost vitálních proteinů (Van Straten et al., 2017). Zbytky aminokyselin v proteinech jsou důležitými cíli a zahrnují především cystein, methionin, tyrosin, histidin a tryptofan. Vzhledem k jejich reaktivitě jsou tyto aminokyseliny primárním cílem oxidačního působení na proteiny. Reakční mechanismy jsou poměrně složité a zpravidla vedou k řadě produktů. Cystein a methionin jsou oxidovány hlavně na sulfoxidy, histidin produkuje termálně nestabilní endoperoxid, tryptofan reaguje komplikovaným mechanismem, čímž se získá N-formylkynurenin a tyrosin může procházet fenolickou oxidativní vazbou (Ormond & Freeman, 2013).

Přestože mechanismus PDT není doteď plně pochopen, je obecně uznáváno, že $^1\text{O}_2$ produkovaný reakcí typu II je primárně zodpovědný za buněčnou smrt. Příspěvek obou

typů reakcí k buněčné smrti závisí na mnoha faktorech jako je typ a koncentrace PS, jeho lokalizace uvnitř buněk a přítomnost O_2 . Za hypoxických podmínek vznikají radikály z fotoreakce typu I z PS primárně zodpovědných za zvýšení citlivosti. V okysličeném médiu 1O_2 do značné míry zprostředkovává fotosenzitizaci, ale dodatečná role H_2O_2 , $\bullet OH$ a $\bullet O_2^-$ je také důležitá. Je známo, že ROS jsou vysoce reaktivní a mají velmi krátký poločas. Z tohoto důvodu pouze substráty, které jsou umístěné velmi blízko místům, kde jsou ROS generovány, jsou přímo poškozovány fotodynamickým působením PS (doba života 1O_2 v biologickém systému je pod $0,04 \mu s$ a jeho akční rádius je kratší než $0,02 \mu m$.) (Juarranz et al., 2008).



Obr. 1 – Schéma mechanismu PDT (Juarranz et al., 2008)

4.2. Fotosenzitizéry

Velmi málo PS je v současné době v klinických studiích a ještě méně jich je komerčně dostupných pro použití v klinické praxi (viz. tabulka 1).

Sloučenina	Obchodní název	Použití
Porfimer sodný	Photofrin	Kanada (1993) - karcinom močového měchýře; USA – karcinom jícnu (1995), plic (1998), Barrettův jícen (2003); Japonsko – karcinom děložního čípku; Evropa, Kanada Japonsko, USA, UK – endobronchiální karcinom
Kyselina 5-aminolevulová	Levulan	USA (1999) – aktinická keratóza
Methylester ALA	Metvixia	USA (2004) – aktinická keratóza
Hexylester ALA	Cystiview	USA (2010) – diagnóza nádoru močového měchýře
Verteporfin	Visudine	USA (1999) - AMD
Temoporfin	Foscan	Evropa – nádory hlavy a krku
Talaporfin	Laserphyrin	Japonsko (2003) – rakovina plic
Hlinitý ftalocyanin tetrasulfonát (AlPcS4)	Photosens	Rusko (2001) – karcinom žaludku, kůže, rtů, dutiny ústní, jazyka a prsu

Tabulka 1 – Dostupné fotosenzitizéry (Ormond & Freeman, 2013), upraveno

4.2.1. Skupiny fotosenzitizérů

PS lze rozdělit dle chemické struktury do několika širokých skupin.

Skupiny PS:

1. Látky odvozené od porfyrinů
 - 1.1. HpD (hematoporfyrinové deriváty)
 - 1.2. Na bázi HpD
 - 1.3. BPD (benzoporfyrinové deriváty)
 - 1.4. ALA (5-aminolevulová kyselina, proléčivo)
 - 1.5. Texafyriny
2. Látky odvozené od chlorofylů
 - 2.1. Chloriny
 - 2.2. Purpuriny
 - 2.3. Bakteriochloriny
3. Barviva
 - 3.1. Ftalocyaniny
 - 3.2. Naftalocyaniny

(Allison et al., 2004)

4.2.2. Vlastnosti ideálního fotosenzitizéru

Ideální PS by se měl vyznačovat těmito vlastnostmi:

- Mít silnou absorpci a vysoký excitační koeficient v červené/ blízké infračervené oblasti elektromagnetického spektra (600 – 850 nm), což umožňuje hlubší průnik světla tkáněmi.
- Efektivně generovat $^1\text{O}_2$ a další ROS.
- Mít vhodné fotofyzikální vlastnosti, jako jsou vysoký kvantový výtěžek $^1\text{O}_2$ ($\Phi_{\Delta} \geq 0,5$), relativně dlouhá doba života PS (τ_T , v mikrosekundách) a vysoká energie tripletového stavu ($\geq 94 \text{ kJ mol}^{-1}$).
- Mít minimální toxicitu bez přítomnosti světla.

- Vykazuje větší retenci v nemocné (cílové) tkáni nad zdravou tkání.
- Rychle se vylučuje z těla.
- Jednotná a dobře charakterizovaná sloučenina se známým a konstantním složením.
- Mít krátkou a výnosnou syntetickou cestu.
- Jednoduchá a stabilní forma léčiva.
- Být rozpustný v biologických médiích, umožňující přímé intravenózní podání a transport do žádaného cíle. V opačném případě by měl být vyhledáván systém hydrofilního podání, který by umožnil efektivní a účinnou přepravu PS přes krevní oběh do cílového místa (Josefsen & Boyle, 2008).

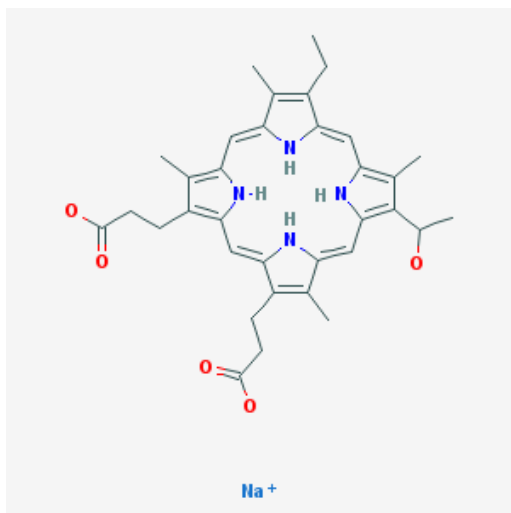
4.2.3. Rozdělení fotosenzitizérů do generací

4.2.3.1. Fotosenzitizéry první generace

4.2.3.1.1. *Porfimer sodný, Photofrin®*

Nejpoužívanější PS a jediné léčivo schválené americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro léčbu povrchových nádorů močového měchýře v Kanadě a ranného karcinomu plic a pokročilého karcinomu jícnu v Holandsku a Japonsku. Navzdory efektivitě má sodná sůl porfimeru několik nevýhod. Léčivo indukuje dlouhotrvající fotosenzibilizaci kůže na světlo a počáteční selektivita pro nádorové tkáně je malá (Taquet et al. 2007).

HpD patří mezi PS první generace, a je nejvíce klinicky využíváný. Získávají se zpracováním hematoporfyrinu s 5% H₂SO₄ v octové kyselině za pokojové teploty. Pro přípravu injekčního roztoku se nechá HpD zreagovat s vodnou bází a pak se neutralizuje. HpD se skládá ze směsi několika monomerních a oligomerních složek. Monomerní frakce je odstraněna pomocí HPLC nebo GPC. HpD a jeho komerční varianty vykazují jisté nevýhody jako například fakt, že absorpční maximum připadá do UV oblasti a další maximum při 630 nm (použitelné v PDT) má nízký absorpční koeficient (Wohrle et al, 1998).



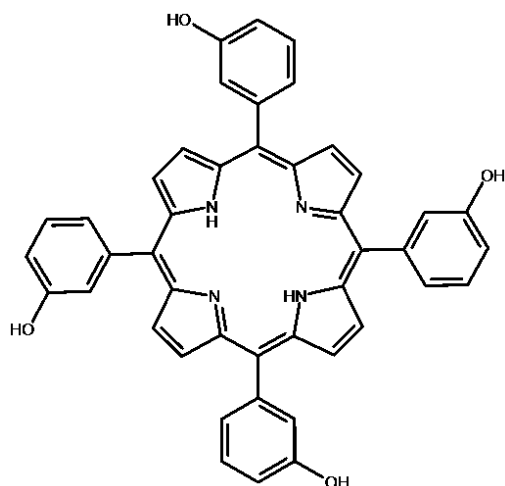
Obr. 2 – Struktura fotosenzitizéru Photofrin®

4.2.3.2. Fotosenzitizéry druhé generace

PS druhé generace, které jsou v některých případech ve fázi klinických studií, mají absorpci hlavně v oblastech od 675 do 800 nm. Světlo s touto vlnovou délkou proniká do tkáně do hloubky více než 2-3 cm. Výklad vztahu „dávka-odezva“ je jednodušší protože se nejedná o směsi látek. Patří sem především ftalocyaniny, naftalocyaniny, benzoporfyriny, chloriny, purpuriny, texafyriny a porfyceny. Za účelem získání dobrých fotofyzikálních vlastností by tyto PS měly být s centrálně koordinovaným kovovým iontem s konfigurací uzavřeného d-elektronového obalu (Zn^{II} , Al^{III} , Si^{VI} , Ge^{IV}), nebo tento kov neobsahující (Wohrle et al, 1998).

4.2.3.2.1. Temoporfin (*meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin, m-THPC, Foscan®*)

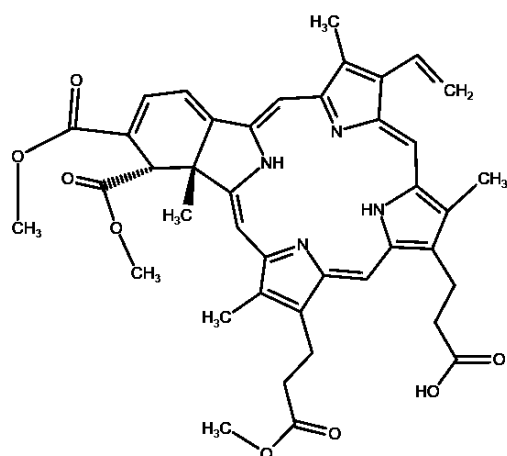
Jeden z nejsilnějších PS druhé generace v současné době schválený k systémovému použití k léčbě nádorových onemocnění. Je účinný pro paliativní léčbu rakoviny hlavy a krku a pro tuto indikaci byl v Evropě schválen v roce 2001. Stejně jako v případě Photofrinu® je léčba temoporfinem spojena s citlivostí kůže na světlo a nízkou selektivitou vůči nádorovým tkáním (Taquet et al., 2007).



Obr. 3 – Struktura temoporfinu

3.2.1.1.1. Verteporfin (Visudyne®)

Jedná se o derivát benzoporphyrinu, který byl také nedávno schválen, byl ale vyvinut pouze pro léčbu věkem podmíněné makulární degenerace (AMD), ne k léčbě nádorových onemocnění (Taquet et al., 2007). Toto léčivo je ve formě směsi dvou regioisomerů (BPD-MA_C a BPD-MA_D) - každá se skládá z racemické směsi dvou enantiomerů. BPD-MA ukázal potenciál nejen jako antivirový prostředek nebo na léčbu lupénky, ale také jako PS v PDT nemelanomové rakovině kůže. V roce 1999 Brusetta tímto benzoporphyrinovým derivátem inhiboval B16 pigmentovaný melanom u myši (Urbanska, 2006).



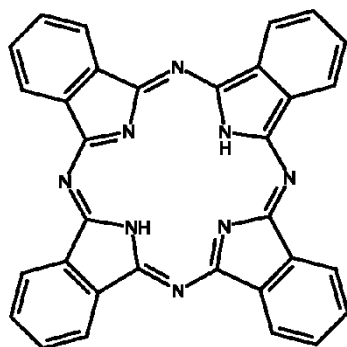
Obr. 4 – Struktura verteporfinu (jeden z enantiomerů)

4.2.3.3. Fotosenzitizéry třetí generace

Oproti charakteristickým rysům PS druhé generace by měly mít vlastnosti, které poskytují selektivní dodání PS do nádorové tkáně konjugací s biomolekulami, jako jsou např. monoklonální protilátky. Maligní nádorové buňky mají na povrchu antigeny, které jsou odlišné od normálních buněk. (Wohrle et al,1998). Slibným přístupem je také konjugace PS s biologicky aktivním prvkem, jako je peptid, kyselina listová a cukry (Yano et al., 2011).

4.3. Ftalocyaniny

Ftalocyaniny (Pc) jsou syntetické analogy porfyrinů (tetrabenzo[5,10,15,20]tetraazaporfyrin) využívané jako PS v nádorové terapii. Jedná se o planární aromatické makrocykly skládající se ze čtyř indolových jednotek spojených dusíkovými atomy. Díky dvourozměrné delokalizaci jejich 18 π -elektronů mají Pc jedinečné fyzikální a optické vlastnosti (Moussaron et al., 2013).



Obr. 5 – Struktura ftalocyaninového jádra

Pc byly poprvé syntetizovány v roce 1907 během studia vlastností 1,2-kyanobenzamidu. Linstead syntetizoval obrovskou řadu Pc ve 30. letech 20. století a o pár let později byly provedeny Robertsonem rentgenové analýzy. Metaloftalocyaninové komplexy, zejména Cu Pc, jsou průmyslově vyráběny ve velkém množství (přibližně 50 000 t ročně). Tyto komplexy byly po dlouhou dobu využívány jako modrozelená barviva a pigmenty. Využití metaloftalocyaninových komplexů sahá také do oblastí využití jako PS pro PDT, fotovodivá činidla ve fotokopírovacích zařízeních, v elektroanalýze, v záznamových médiích apod. (Moreira et al., 2008).

Pc jsou široce využívány jako barviva. Téměř čtvrtina všech barviv organického původu jsou sloučeniny příbuzné s Pc. Tato barviva silně absorbují v červené a v blízké infračervené oblasti viditelného světla poskytující jim jejich charakteristickou modrou nebo zelenou barvou. Specifičnost v jejich použití může být ovlivňována modifikací Pc kruhu nebo změnami v centrálně koordinovaném kovu nebo v axiálních ligandech (Nyokong et al., 2013).

Nicméně v posledních letech studie o aplikaci těchto složek PDT získali větší důraz. Chlorohlinitý Pc je příklad metaloftalocyaninu s dobrými předběžnými výsledky

týkajících se použití v PDT. Některé nové Pc byly také využity jako fotodynamická činidla pro deaktivaci mikrobiálních patogenů jako jsou *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Candida albicans* (Moreira et al., 2008).

Pc jsou jedním z hlavních typů tetrapyrrolových derivátů ukazující široký rozsah využití v nejrůznějších materiálech, medicíně a katalýze. V posledních dvou desetiletích byly Pc značně studovány jako důležitá třída nelineárních optických materiálů z důvodu jejich rozsáhle delokalizaovaných dvoudimensionálních 18 π -elektronových systémů, jejich strukturální flexibilitě, výjimečně vysoké teplotní a chemické odolnosti a jejich potenciálu pro fotodynamické využití. Byly využity v mnoha oblastech fotoniky, jako je např. optická paměť, omezení optického výkonu, optické přepojování a fotomedicína (Moreira et al., 2008).

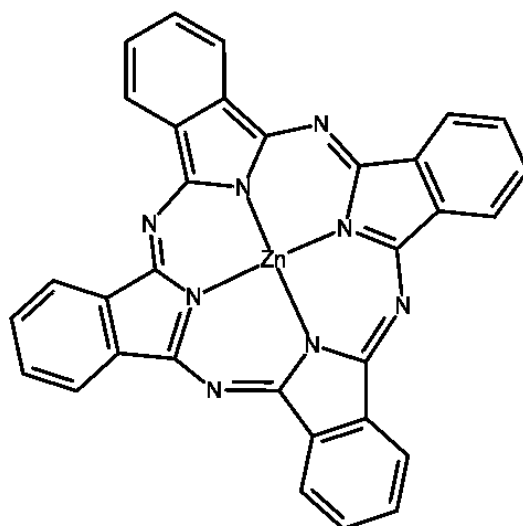
Pokud jde o využití v PDT jsou Pc považovány za PS druhé generace. Pc jsou důležitou skupinou sloučenin podobných porfyrinům, známé pro jejich výjimečnou stabilitu a světelnou absorpci v červené nebo blízké červené oblasti spektra (absorpční koeficient je vyšší než $10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pro nejdelší vlnovou délku absorpčního pásu obvykle umístěné mezi 650 a 700 nm). Podstupují po sobě jdoucí elektronové oxidace a redukce, což naznačuje možnost aplikace jako fotoredoxní činidla. Hlavním omezením Pc jako PS je jejich nízká rozpustnost ve vodném prostředí. Rozpuštění ve vodě může být dosaženo zavedením nabitých skupin na periferii makrocyklu, což bylo dobře ukázáno na sulfonovaném Pc. Druhou alternativou pro zvýšení hydrofility, možnou pouze u některých centrálně koordinovaných atomů, je substituce axiálním ligandem s vysokou polaritou (Moreira et al., 2008).

Pc mohou být jednoduše syntetizovány s celou řadou různých vedlejších skupin, které změní jejich náboj a rozpustnost a vedou k úpravě míry vychytávání nádorovými buňkami. Vnesením sulfonovaných periferních substituentů se zvyšuje jejich rozpustnost ve vodě, což znamená, že kinetika vstřebávání a buněčná retence jsou poměrně rozdílné pro hydrofilní a hydrofobní Pc (Moreira et al., 2008).

4.3.1. Hydrofobní ftalocyaniny

4.3.1.1. CGP557847 (ZnPc)

CGP557847 je nesubstituovaný zinečnatý Pc (ZnPc) podávaný v liposomech složených z 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholinu (POPC) a di-oleoyl fosfatidylserinu (OOPS) v poměru ZnPc:POPC:OOPS 1:90:10 byl vyvinutý v QLT Phototherapeutics (Vancouver, Kanada). Jde o první Pc, který dosáhl klinických studií pro PDT pro využití u časného nádoru horních cest dýchacích. Klinické studie však byly z neznámých důvodů přerušeny (Jiang et al., 2014).



Obr. 6 – Struktura ZnPc

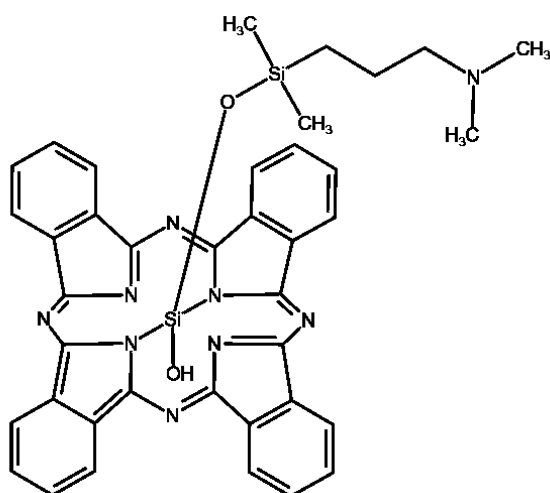
4.3.1.2. Pc4

Pc4 je křemičitý Pc s axiálními substituenty (HOSiPcOSi(CH₃)₂-(CH₂)₃N(CH₃)₂) byl vyvinut pro využití v PDT. Stejně jako ZnPc nemá žádné izomery – má tedy jednotné složení (Jiang et al., 2014).

Byl vyvinutý v Case Western Reserve University (Ohio, USA). Při experimentálním testování jako PS pro PDT způsobil úplnou remisi nebo významné snížení nádorů tlustého střeva a vaječníků u zvířecích modelů s dávkou 1 mg/kg. Avšak vzhledem k jeho nerozpustnosti v biologickém prostředí je pro zvýšení jeho terapeutické účinnosti vyžadováno jeho vhodné formulace (Li et al., 2017).

Pc4 podstoupil dvě fáze I. klinických studií schválené FDA. První klinická studie I. fáze zahájená v roce 2001 byla zaměřena na systémové doručení tohoto PS pro PDT kožních malignit. Injekční přípravek byl připraven rozpuštěním 1mg Pc4 a 5 mg Povidonu v 1ml Cremophor EL:etanol (1:1) a následným zředěním 9 díly normálního fyziologického roztoku. Studie byly ukončeny v roce 2006. (Jiang et al., 2014).

Druhá klinická studie I. fáze byla provedena v roce 2004 pro topickou aplikaci Pc4. Pc 4 byl po přípravě dávkován ve vehikulu propylenglykolu a ethanolu (70/30 obj %). Topická aplikace je vhodnou a bezpečnou metodou specifického směřování Ps do přístupné léze, přičemž se zabrání rozsáhlé distribuci, ke které dochází po i.v. podání. Zkoušky byly dokončeny v roce 2010 a prokázaly potenciál pro lokální podání Pc4 k léčbě kožních novotvarů s dobrou snášenlivostí a bez nežádoucích účinků (Jiang et al., 2014).



Obr. 7 – Struktura Pc4

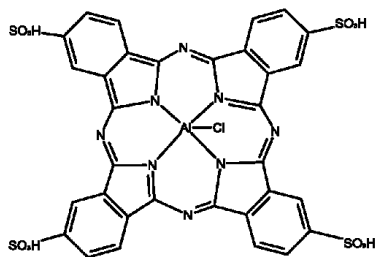
4.3.2. Hydrofilní ftalocyaniny

4.3.2.1. Photosens®

Photosens® je vodný roztok sodné soli do různé míry sulfonovaného hlinitého Pc (AlPcS), který vykazuje absorpční maximum při 675 nm. Tato ve vodě rozpustná směs je získávána přímou sulfonací AlPcS. Míra sulfonace je $n \approx 3$ (Jiang et al., 2014).

Photosens® byl aplikován v klinické studii, která zahrnovala 47 pacientů, z toho se skládala z 35 žen, které měly prekancerózní léze děložního čípku a 12 žen s neinvazivními cervikálními lézemi. 24 hodin po podání přípravku byly léze ozařovány světelnou dávkou mezi 150 a 200 J/cm² při 675 nm. Nebyla zjištěna žádná bolest spojená s PDT. Z těchto dvou podskupin odpovídalo na léčbu úplnou nádorovou regresí celkem 94,2% a 83,4% žen a s významnou regresí u 2,9 a 8,3% žen. Navíc stejné procento žen vykazovalo stabilizovaný stav onemocnění. Zbývající procenta pacientů odpovídají těm, kteří reagovali na léčbu pouze částečně. Dnes je Photosens® komerčně dostupný v Rusku společností NIOPIK (Organic Intermediates and Dyes Institute, Moskva) (Sekkat et al., 2012).

Tento PS je vysoce efektivní v léčbě nádorových onemocnění o různém histologickém typu a v různých stádiích, jako jsou nádory kůže z dlaždicových buněk, rakovina prsu, orofaryngeální nádory, rakovina plic, nádory očí a očních víček, rakovina močového měchýře a děložního čípku atd. Používá se také k léčbě těžkých hnisavých ran, trofických vředů a některých dalších nemaligních chorob. Dávkování se pohybuje od 0,5 do 2,0 mg na kg tělesné hmotnosti pacienta. Zavedení askorbátu sodného v dávkách 20-50 mg / kg tělesné hmotnosti navíc k přípravku Photosens® má za následek zlepšení terapeutického účinku a umožňuje dvojnásobné snížení dávky přípravku Photosens®. Závažným problémem s užitím tohoto léku je fotosenzitivita kůže. Pacient by se měl vyvarovat slunečnímu svitu po dobu 6 až 10 týdnů po léčbě (Jiang et al., 2014).



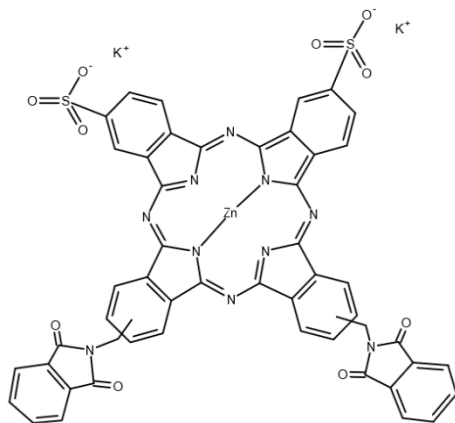
Obr. 8 – Struktura fotosenzitizéru Photosens®

4.3.2.2. Photocyanin (ZnPcS₂P₂)

Photocyanin je PS vyvinutý univerzitou v Číně (College of Chemistry and Chemical Engineering, Fuzhou University, China). Jedná se o izomerickou směs di-(sulfonát draselný)-di-ftalimidomethyl ftalocyaninu zinečnatého (Jiang et al., 2014).

Photocyanin výhodné vlastnosti, včetně vysoké stability, nízké toxicity bez ozáření a vysokého terapeutického účinku. Mezi členy ze série Pc bylo prokázáno, že má nejvyšší PDT aktivitu při léčbě různých rakovinných buněčných linií. Dávka léku 2 mg/kg v dávkovacím systému založeném na Cremophoru vykazovala nejvyšší inhibici solidních nádorů U14 a S180 u myši. Nicméně po 10 opakovaných léčbách se 4 mg/kg tohoto přípravku bylo hlášeno poškození jater a sleziny u zdravých potkanů Wistar (Li et al., 2017).

Je injekčně podáván s 2% Cremophor EL, 20% 1,2-propylenglykolem a 0,9% chloridem sodným. I. fáze klinických studií byla započata v roce 2008 se schválením Státního úřadu pro potraviny a léčiva (State food and drug administration) v Číně. V současné době se používá Photocyanin pro klinické studie fáze II (Jiang et al., 2014).

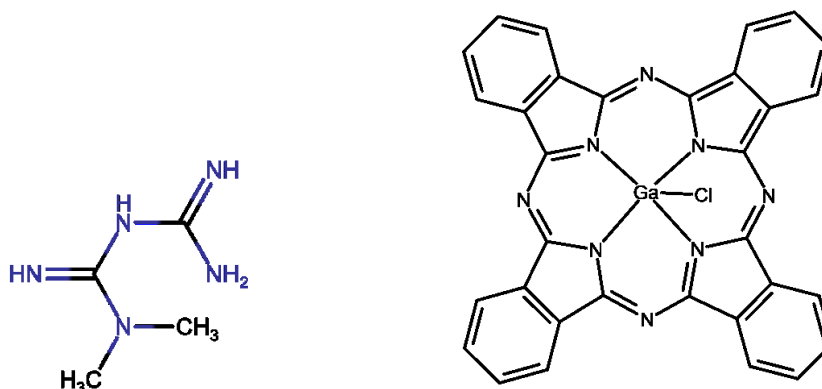


Obr. 9 – Struktura fotosenzitizéru Photocyanin

4.3.3. Experimentálně testované ftalocyaniny

4.3.3.1. Chlorid ftalocyaninu obsahujícího galium (GaPc)

GaPc byl podroben experimentálnímu výzkumu *in vitro* jako PS pro léčbu melanomu, kde se ukázal jako účinný PS. V tomto experimentu byly použity dvě lidské mírně pigmentované buněčné linie – WM35 a M1/15, které byly podrobeny předchozí expozici metforminu a následně léčeny pomocí GaPc-PDT. Přídavek metforminu zlepšil usmrcení buněk mechanismy závislémi na buněčné linii, a to apoptózou u metastatické M1/15 a nekrózou u buněk ve fázi radiálního růstu – WM35 (Tudor et al., 2017).



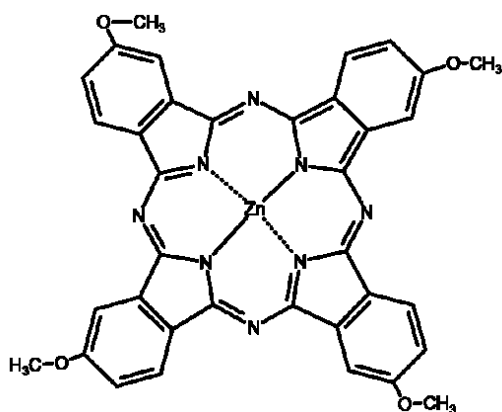
Obr. 10 – Struktura metforminu (vlevo) a GaPc (vpravo)

GaPc se ukázal jako účinný PS v PDT proti nízkce pigmentovaným buněčným liniím melanomu. Příznivé antimelanomové účinky po přidavku metforminu na PDT spočívaly hlavně ve zvýšeném usmrcování nádorových buněk zvýšením oxidativního poškození a indukci proapoptotických mechanismů, zatímco inhibice angiogeneze nádorů podporovaná PDT byla u Metforminu snížena (Tudor et al., 2017).

4.3.3.2. 2,9,16,23-tetrakis (methoxy) ftalocyanin zinečnatý (ZnPc(OCH₃)₄)

ZnPc(OCH₃)₄ byl podroben *in vitro* experimentálnímu výzkumu jako potenciální PS pro PDT na lidské nádorové larygeální buněčné linii (Hep-2). ZnPc(OCH₃)₄ je hydrofobní látka schopná účinně pronikat do cytoplazmy kultivovaných maligních buněk a je částečně lokalizován v lyzosomech. Výsledky ukazují, že ZnPc(OCH₃)₄-PDT indukuje apoptózu cestou závislou na kaspásách.

Φ_{Δ} dosáhl v tetrahydrofuranu (THF) hodnot 0,56, což je pro ftalocyaninové deriváty v tomto rozpouštědle dobrá hodnota. Toxicita bez ozáření se neprojevila při koncentraci 0,1 μ M a 0,5 μ M ZnPc(OCH₃)₄, ale koncentrace 1 μ M již způsobila významný pokles přežití buněk. Po 3 a 24 hodinové inkubaci Hep-2 buněk s 0,5 μ M ZnPc(OCH₃)₄ došlo k jejich ozáření a při ozařovací dávce 29 J/cm² po 24 h post-PDT byla snížena životaschopnost buněk o ~ 80%. ZnPc(OCH₃)₄ ukázal dobrou fotosenzitizující účinnost *in vitro* na Hep-2 buňkách (Yslas et al., 2007).



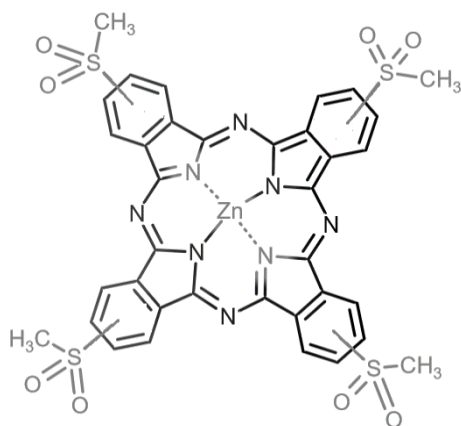
Obr. 11 – Struktura ZnPc(OCH₃)₄

In vivo testování bylo provedeno na BALB/c myších nesoucích myší buněčnou linií adenokarcinomu prsu (LM2), kde byly účinky toho PS porovnávány s myšmi zdravými. Po inkorporaci PS do liposomu byl injekčně intraperitoneálně (*i.p.*) a intravenózně (*i.v.*) podán myši v dávce 0,2 mg/kg tělesné hmotnosti. Nejlepších terapeutických výsledků bylo dosaženo za použití této dávky a o 24 hodin později došlo k ozáření světlem o 210 J/cm². V 10. dni po PDT byla pozorována úplná remise nádoru, která se neopakovala ani po 90 dnech po léčbě. Inhibice růstu nádoru byla pozorována se zpožděním 5-8 dní po

zahájení léčby. Bylo zjištěno, že hladina akumulace tkáně PS se významně zvýšila po i.p. podání ve srovnání s i.v. Nebyla prokázána toxicita v nepřítomnosti aktivujícího záření. *In vivo* protinádorová aktivita ukázala, že se jedná o nadějný potenciální PS pro klinické použití při PDT. Dobré fotofyzikální a fotobiologické vlastnosti činí $ZnPc(OCH_3)_4$ vhodným kandidátem pro PDT metastatických onemocnění (Yslas et al., 2009).

4.3.3.3. Zinečnatý methylsulfonylftalocyanin

Zinečnatý methylsulfonylftalocyanin byl experimentálně použit jako PS v PDT proti lidským buňkám epidermoidního karcinomu A431 *in vitro*. Vykazuje silnou absorpenci při 681 nm, což umožňuje léčbu silnějších malignit v důsledku zvýšené penetrace aktivačního světla skrz tkáň. Φ_{Δ} je 0,71, což je vysoká hodnota v kombinaci s poměrně nízkou fotodegradací. Ve tmě neprokával toxicitu vůči buňkám A431 až do 20 μ M. Inkorporace do nádorových buněk byla zvýšena, pokud bylo v médiu přítomno 5% sérum. Úplného usmrcení buněk A431 (zbývající životaschopnost <10 %) bylo dosaženo s 5 μ M methylsulfonyl ftalocyaninu zinečnatého inkubovaným po 24 hodin a působením 50 J/cm² červeného světla o 600-700 nm (Íšci et al., 2016).

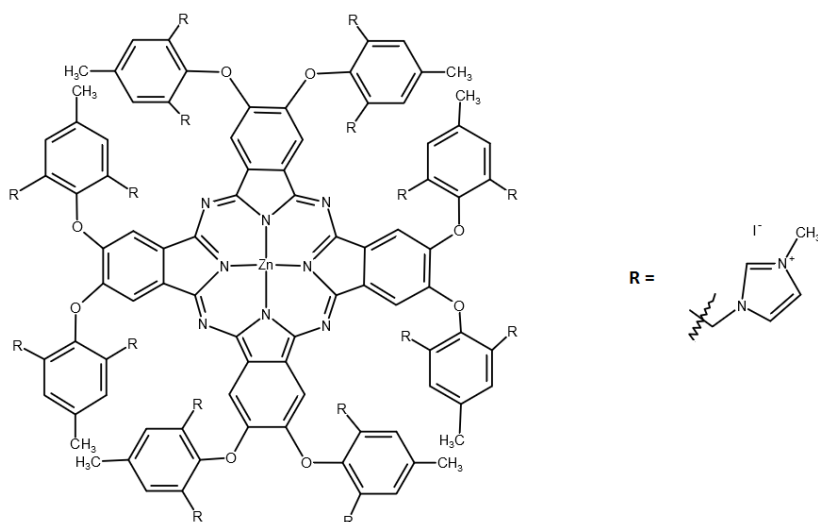


Obr. 12 – Struktura zinečnatého methylsulfonylftalocyaninu

4.3.3.4. Ve vodě rozpustný, neagregující ftalocyanin

Zinečnatý Pc nesoucí na periférii šestnáct imidazolových skupin funkcionalizovaných fenoxyskupinami (PcIm₁₆) se vyznačuje nízkou schopností agregace, vysokou rozpustností ve vodě a organických rozpouštědlech (*N,N*-dimethylformamid, etanol a metanol) s rozdělovacím koeficientem $P \sim 0$. Nese dva pozitivně nabitě prstence, jeden nad a jeden pod jádrem makrocyklu. Toto jedinečné prostorové uspořádání, které pokrývá hydrofobní Pc, zcela zabraňuje agregaci a vede k vysoké produkci ¹O₂ ($\phi\Delta > 0,33$) ve vodném prostředí.

Byl připraven kovových iontem zprostředkovanou cyklotetramerizační reakcí příslušného ftalonitrilového prekursoru (4,5-bis(2,6-bis((1H-imidazol-1-yl)methyl)-4-methylfenoxys)fthalonitril) a následnou kvaternizační reakcí s CH₃I.



Obr. 13 – Struktura ve vodě rozpustného, neagregujícího ftalocyaninu

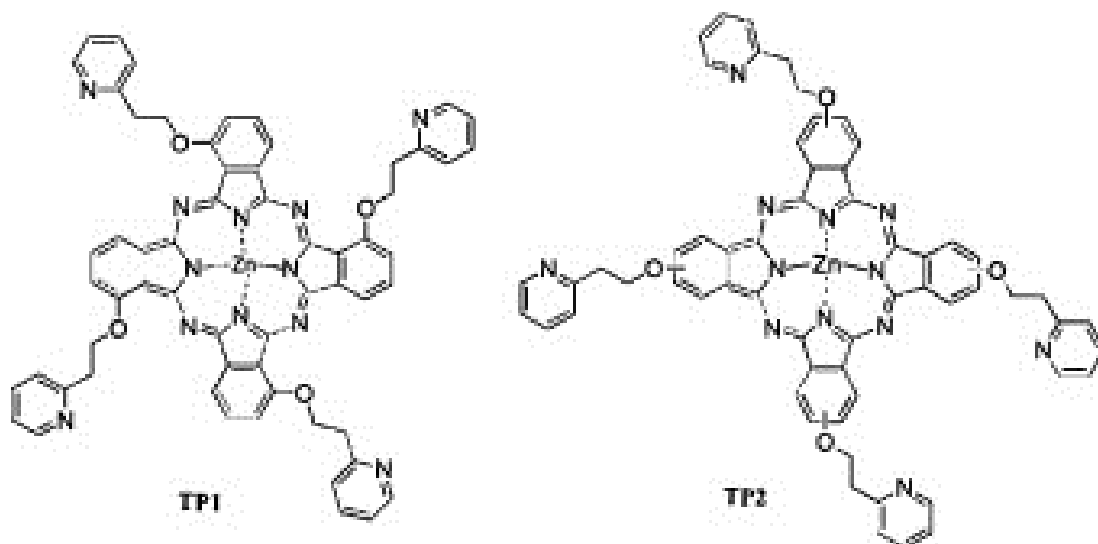
In vitro testy byly provedeny na nemaligní myší fibroblastové buněčné linii (3T3 buňky), u kterých vyšla vlastní toxicita (TC₅₀, toxicita bez ozáření) s hodnotou 395 μ M, což značí velmi nízkou toxicitu pro normální buňky. Podobně nízká hodnota (TC₅₀ = 628 μ M) byla zjištěna pro lidskou buněčnou linii cervikálního karcinomu (HeLa). Ozáření HeLa buněk červeným světlem ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW.cm⁻², 11,2 J.cm⁻²) indukovalo silnou fotodynamickou aktivitu (EC₅₀) s hodnotou 36,7 nM. Terapeutické poměry (TC₅₀ /EC₅₀) dosáhly velmi vysokých hodnot (nad 10000), což je výborný předpoklad pro úspěšné léčivo (Makhseed et al., 2013).

4.3.3.5. Zinečnatý ftalocyanin tetra-substituovaný pyridinovými skupinami

Pyridinové deriváty jsou důležité farmaceutické meziproducty. Mají vynikající biokompatibilitu, protože mohou díky základnímu atomu dusíku ve své struktuře vytvářet vodíkové vazby s biologickými makromolekulami. Byly zde porovnány biologické aktivity dvou Zn Pc periferně substituovaných pyridinovými skupinami v α (TP1) a β (TP2) polohách. *In vitro* experimenty proběhly na buňkách lidského hepatokarcinomu (HepG2) a na lidských melanomových buňkách (A375).

TP1 vykázal nízkou tendenci agregace v biologickém prostředí a vysokou úroveň buněčného vychytávání a produkci intracelulárních ROS, což dokazuje vysokou fotodynamickou aktivitu. Až do 5 μM nevykázaly TP1 a TP2 vlastní toxicitu. Při ozáření 670 nm prokázal TP1 značnou cytotoxicitu (nízké hodnoty IC_{50} 0.15 a 0.07 μM vůči HepG2 a A375 buňkám) a oproti tomu TP2 až do 5 μM žádnou fotocytotoxicitu nevykázal.

Při porovnání účinnosti těchto dvou látek bylo zjištěno, že TP1 vykazuje vyšší fotocytotoxicitu, která může být přičítána jeho nižší tendenci agregace a vyšší buněčné absorpci a generaci ROS. Ukázalo se tedy, že TP1 je velmi slibným protinádorovým činidlem pro PDT (Liu et al., 2016).



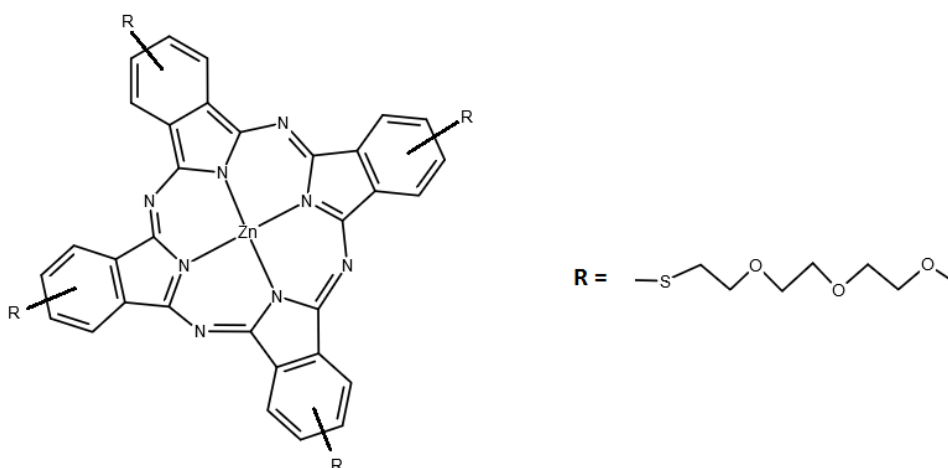
Obr. 14 – Struktura tetra- α -substituovaného ZnPc (TP1) a tetra- β -substituovaného ZnPc (TP2) (Liu et al., 2016)

4.3.3.6. Tetra-triethyleneoxysulfonyl zinečnatý ftalocyanin

Inhibiční potenciál tohoto slibného PS byl proveden na řadě lidských rakovinných buněčných modelů různého původu. Jednalo se o buňky lidského pankreatického karcinoidu BON, kolorektálního karcinomu HCT-116, skvamózního esofageálního karcinomu Kyse-70 a Kyse-140 a buňky esofageálního adenokarcinomu OE-33. Hodnoty IC_{50} se pohybovaly v nízkém mikromolárním rozsahu. Do dávky $10 \mu\text{M}$ neprojevil toxicitu bez ozáření.

Je nutné provést další zkoušky pro prozkoumání vhodnosti a účinnosti tohoto Pc jako PS u různých nádorových entit samostatně *in vitro* a *in vivo* nebo v kombinaci s již zavedenými chemoterapeutiky nebo antiangiogenní léčbou.

Tento ZnPc vykázal dobré výsledky, proto je nadějným novým potenciálním PS pro inovativní léčbu PDT (Kuzyniak et al., 2015).



Obr. 15 – Struktura tetra-triethyleneoxysulfonyl Zn Pc

5. ZÁVĚR

Z této práce je zřejmé, že ftalocyaniny si získaly důležité místo v oblasti stávající a budoucí PDT. Mají velmi výhodné vlastnosti pro toto využití, jako jsou např. jejich výjimečná stabilita nebo vysoká absorpce záření ve vhodné oblasti vyšších vlnových délek, kde je tkáň nejvíce propustná pro světlo. Mohou být také jednoduše syntetizovány s celou řadou vedlejších skupin pro úpravu jejich náboje a rozpustnosti, což má za následek úpravu míry vychytávání nádorovými buňkami.

Dnes je jediným komerčně dostupným ftalocyaninem Photosens®, a to v Rusku. Klinické studie II. fáze podstoupil Photocyanin vyvinutý v Číně. Nesubstituovaný ZnPc vyvinutý v Kanadě podstoupil klinické studie k využití u časného nádoru horních cest dýchacích a u Pc4 vyvinutého v USA byly klinické testy I. fáze dokončeny v roce 2010 a prokázaly potenciál pro místní podání k léčbě kožních novotvarů.

Experimentálně testovaných ftalocyaninů je mnoho s více či méně dobrými výsledky. Důležitými údaji při *in vitro* a *in vivo* testování, které dělají tyto PS potenciálně vhodnými pro využití v PDT, jsou např. vysoká produkce ROS, a tudíž vysoká fotocytotoxicita vůči cílovým buňkám, projev nízké/žádné toxicity bez aktivace PS a vysoký Φ_{Δ} .

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AGOSTINIS, P, K BERG, KA CENGEL, et al. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA-A CANCER JOURNAL FOR CLINICIANS* [online]. 2011, 61(4), 250-281 [cit. 2017-03-17]. ISSN 00079235.

JUARRANZ A, JAÉN P, SANZ-RODRÍGUEZ F, CUEVAS J a GONZÁLEZ S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clinical* [online]. 2008, 10(3), 148-54 [cit. 2017-03-27]. ISSN 1699048X.

SHAZIB, Pervaiz a Olivo MALINI. ART AND SCIENCE OF PHOTODYNAMIC THERAPY. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* [online]. 2006, 33(56), 551-552 [cit. 2017-08-23]. ISSN 03051870.

KESSEL, D. Photodynamic therapy: from the beginning. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. [online] 2004, 1(1), [cit. 2017-03-27]. 3-7. ISSN 15721000

VAN STRATEN, Demian, Vida MASHAYEKHI, Sabrina OLIVEIRA, Henriette S. DE BRUIJN a Dominic J. ROBINSON. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers* [online]. 2017, 9(2), 1-70 [cit. 2017-03-27]. ISSN 20726694.

ALLISON, Ron R, Gordon H DOWNIE, Rosa CUENCA, Xin-Hua HU, Carter JH CHILDS a Claudio H SIBATA. Photosensitizers in clinical PDT: from the beginning. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. [online] 2004, 1(1), 27-42 [cit. 2017-03-27]. ISSN 15721000.

TAQUET JP, FROCHOT C, MANNEVILLE V a BARBERI-HEYOB M. Phthalocyanines covalently bound to biomolecules for a targeted photodynamic therapy. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2007, 14(15), 1673-87 [cit. 2017-03-27]. ISSN 09298673.

NYOKONG, Tebello a Igle GLEDHILL. The use of phthalocyanines in cancer therapy. *AIP Conference Proceedings* [online]. 2013, 1517(1), 49-52 [cit. 2017-03-27], ISSN 0094243X.

Moreira, L. M., dos Santos, F. V., Lyon, J. P., Maftoum-Costa, M., Pacheco-Soares, C., & da Silva, N. S. (2008). Photodynamic therapy: porphyrins and phthalocyanines as photosensitizers. *Australian journal of chemistry*, 61(10), 741-754 [cit. 2017-03-27].

WOHRLE, D, A HIRTH, T BOGDAHN-RAI, G SCHNURPFEIL a M SHOPOVA. Photodynamic therapy of cancer: second and third generations of photosensitizers. *RUSSIAN CHEMICAL BULLETIN* [online]. 1998, 47(5), 807-816 [cit. 2017-04-05]. ISSN 10665285.

URBANSKA, Krystyna. Verteporfin, photofrin II, and merocyanine 540 as PDT photosensitizers against melanoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2006, 349(2) [cit. 2017-04-05]. ISSN 0006291X.

JIANG, Z., J. SHAO, T. YANG, J. WANG a L. JIA. Pharmaceutical development, composition and quantitative analysis of phthalocyanine as the photosensitizer for cancer photodynamic therapy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2014, 87, 98 - 104 [cit. 2017-04-8]. ISSN 1873264X.

Moussaron, Albert, et al. "Lipophilic phthalocyanines for their potential interest in photodynamic therapy: synthesis and photo-physical properties." *Tetrahedron* 69.47 (2013): 10116-10122.

TUDOR, Diana, et al. Combined regimen of photodynamic therapy mediated by Gallium phthalocyanine chloride and Metformin enhances anti-melanoma efficacy. *PloS one*, 2017, 12.3: e0173241.

YSLAS, Edith I., Edgardo N. DURANTINI a Viviana A. RIVAROLA. Zinc-(II) 2,9,16,23-tetrakis (methoxy) phthalocyanine: Potential photosensitizer for use in photodynamic therapy in vitro. *Bioorganic* [online]. 2007, 15(13), 4651-4660 [cit. 2017-08-03]. DOI: 10.1016/j.bmc.2007.03.079. ISSN 09680896.

İŞCI, Ümit, Marlena BEYREIS, Nicole TORTIK, et al. Methylsulfonyl Zn phthalocyanine: A polyvalent and powerful hydrophobic photosensitizer with a wide spectrum of photodynamic applications. *Photodiagnosis* [online]. 2016, 13, 40-47 [cit. 2017-08-03]. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2015.10.010. ISSN 15721000.

MAKHSEED, S., W. ALFADLY, A. TUHL, et al. Water-soluble non-aggregating zinc phthalocyanine and in vitro studies for photodynamic therapy. *Chemical*

Communications [online]. 2013, **49**(95), 11149 - 11151 [cit. 2017-08-9]. DOI: 10.1039/c3cc44609c. ISSN 13597345.

JOSEFSEN, L.B. a R.W. BOYLE. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Metal-Based Drugs* [online]. 2008, **2008** [cit. 2017-08-17]. DOI: 10.1155/2008/276109. ISSN 07930291.

KUZYNIAK, W., E.A. ERMILOV, B. NITZSCHE, et al. Tetra-triethyleneoxysulfonyl substituted zinc phthalocyanine for photodynamic cancer therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* [online]. 2015 [cit. 2017-08-23]. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2015.07.001. ISSN 18731597.

SEKKAT, N, H VAN DEN BERGH, T NYOKONG a N LANGE. Like a Bolt from the Blue: Phthalocyanines in Biomedical Optics. *MOLECULES* [online]. 2012, **17**(1), 98-144 [cit. 2017-08-22]. ISSN 14203049.

LI, Xingshu, Bing-De ZHENG, Xiao-Hui PENG, Song-Zi LI, Jia-Wen YING, Yuanyuan ZHAO, Jian-Dong HUANG a Juyoung YOON. Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: developments in the last five years. *Coordination Chemistry Reviews* [online]. 2017 [cit. 2017-08-22]. DOI: 10.1016/j.ccr.2017.08.003. ISSN 00108545.

YSLAS, E. Inés, César PRUCCA, Silvia ROMANINI, Edgardo N. DURANTINI, Mabel BERTUZZI a Viviana RIVAROLA. Biodistribution and phototherapeutic properties of Zinc (II) 2,9,16,23-tetrakis (methoxy) phthalocyanine in vivo. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* [online]. 2009, **6**(1), 62-70 [cit. 2017-08-23]. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2009.03.001. ISSN 15721000.

LIU, J.-Y., J. LI, X. YUAN, J.-P. XUE a W.-M. WANG. In vitro photodynamic activities of zinc(II) phthalocyanines substituted with pyridine moieties. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* [online]. 2016, **13**, 341 - 343 [cit. 2017-08-23]. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2015.07.003. ISSN 18731597.2.3

YANO, S, S HIROHARA, M OBATA, et al. Current states and future views in photodynamic therapy. *JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY C-PHOTOCHEMISTRY REVIEWS* [online]. 2011, **12**(1), 46-67 [cit. 2017-08-23]. ISSN 13895567.

ORMOND, Alexandra B. a Harold S. FREEMAN. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials (1996-1944)* [online]. 2013, **6**(3), 817-840 [cit. 2017-08-29]. DOI: 10.3390/ma6030817. ISSN 19961944.