

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv



SYNTÉZA A STUDIUM VZTAHŮ MEZI STRUKTUROU
A ÚČINKEM FOTOLENITIZÉRŮ ZE SKUPINY
AZAFTALOCYANINŮ

Disertační práce

Mgr. Zbyněk Musil

Hradec Králové 2008

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému neúnavnému a trpělivému školiteli – specialistovi PharmDr. Petru Zimčíkovi, Ph.D. za neocenitelnou podporu během vypracování této práce. Dodnes si hluboce vážím jeho neuvěřitelné obětavosti a odhodlání, které mi pomohly nejen na poli vědeckém, ale i osobním.

Dále mé poděkování patří mému školiteli doc. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D. a odbornému konzultantovi PharmDr. Miroslavu Miletínovi, Ph.D. za jejich odborné připomínky a užitečné rady.

Za spolupráci na některých bodech mé práce bych také rád poděkoval svým kolegům Mgr. Kamilu Kopeckému, Mgr. Janě Stříbné, Mgr. Veronice Loukotové, Mgr. Pavlu Petrikovi a Mgr. Janu Doleželovi, kteří mi kolegiálně pomáhali se všemi technickými problémy během laboratorních operací.

Za změření NMR spekter a pomoc při interpretaci některých složitějších výsledků bych chtěl poděkovat doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. Dále děkuji paní Věnceslavě Hronové za ochotu při měření CHN analýz a paní Ivě Venclovské za měření IČ spekter. Za provedení a vyhodnocení MS spekter patří můj dík Mgr. Juraji Lenčovi.

Závěrem chci poděkovat všem svým přátelům, kteří mi byli psychickou oporou v situacích, kdy zdaleka ne vše probíhalo podle mých představ.

Zbyněk Musil

02.02.2008

OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK	5
2. TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1. Úvod	6
2.2. Princip PDT	10
2.2.1. Fotochemie	10
2.2.2. Světelná dostupnost	14
2.3. Fotosenzitizéry	16
2.3.1. Obecné vlastnosti.....	16
2.3.2. První generace	18
2.3.3. Druhá generace	20
2.4. Targeting fotosenzitizérů	27
2.4.1. Pasivní targeting	28
2.4.2. Aktivní targeting.....	29
2.5. Distribuce fotosenzitizérů	32
2.5.1. Subcelulární lokalizace.....	32
2.5.2. Orgánová distribuce.....	35
2.5.3. Nádorová lokalizace	36
2.6. Biologická odpověď'	38
2.6.1. Přímý efekt	38
2.6.2. Změny v cévním zásobení	39
2.6.3. Imunitní systém	40
3. CÍL PRÁCE	43
4. METODICKÁ ČÁST	44
4.1. Syntéza symetrických azaanalogů a princip cyklizace.....	44
4.2. Syntéza nesymetrických ftalocyaninů a jejich azaanalogů.....	47
5. DOSAŽENÉ VÝSLEDKY	54
5.1. Komentář k dosaženým výsledkům	54
5.2. Seznam publikovaných prací.....	61
6. PŘÍLOHY	64
6.1. Zimcik P. et al. (J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 2004).....	65
6.2. Kostka M. et al. (J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 2006)	73
6.3. Zimcik P. et al. (J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 2006).....	83
6.4. Zimcik P. et al. (Photochem. Photobiol., 2007)	94

6.5.	Musil Z. et al. (J. Porphyrins Phthalocyanines, 2006)	102
6.6.	Zimcik P. et al. (Dyes Pigment., 2008)	112
6.7.	Musil Z. et al. (J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 2007).....	119
6.8.	Petrik P. et al. (J. Porphyrins Phthalocyanines, 2007).....	126
6.9.	Musil Z. et al. (Eur. J. Org. Chem, 2007)	135
7.	SOUHRN	143
8.	SUMMARY	145
9.	LITERATURA	146

1. SEZNAM ZKRATEK

ALA	kyselina 5-aminolevulinová
AMD	„age-related macular degeneration“, senilní makulární degenerace
AzaPc	azaftalocyanin
BPD	benzoporphyrine derivatives, benzoporfyrinové deriváty
DBU	1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-en
DMF	N,N-dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DPBF	1,3-difenylisobenzofuran
HpD	„hematoporphyrine derivatives“, hematoporfyrinové deriváty
ISC	„intersystem crossing“
LDL	„low-density lipoproteins“, LDL proteiny
MAb	„monoclonal antibody“, monoklonální protilátka
Pc	ftalocyanin
PDT	„photodynamic therapy“, fotodynamická terapie
PpIX	protoporfyrin IX
PS	fotosenzitizér
ROS	„reactive oxygen species“
TMS	tetramethylsilan
TPyPor	tetrapyrazinoporfyrazin

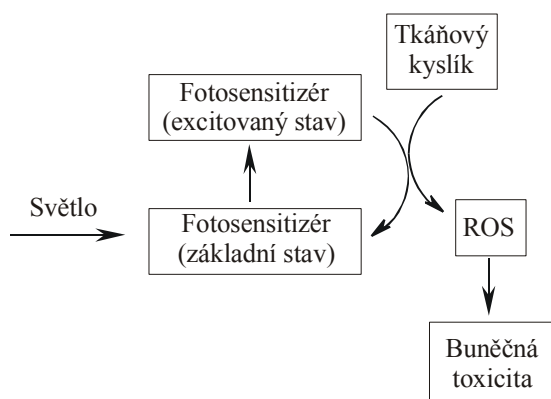
2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Úvod

Fotodynamická terapie (angl. photodynamic therapy, PDT) může být definována jako podání netoxického léčiva nebo barviva (angl. photosensitizer, PS) systémově, lokálně nebo topicky nemocnému pacientovi následované ozářením poškozeného místa světlem vhodné vlnové délky, které v přítomnosti tkáňového kyslíku vede k produkci cytotoxických agens a následně k buněčné smrti a tkáňové destrukci. PDT pracuje na principu předání energie absorbované PS molekulárnímu kyslíku, z něhož vytváří reaktivní formy kyslíku (angl. reactive oxygen species, ROS) jako např. volné radikály a singletový kyslík (obr. 1)¹. ROS následně napadají okolní biomolekuly, dochází k jejich oxidaci a porušení životních funkcí buňky, což vede k smrti takto zasažených buněk. Tento relativně nový postup je již zaveden do klinické praxe - kombinuje vysokou účinnost na nádorové buňky se selektivním zásahem na postižené místo. V současnosti se tato terapie používá zejména pro léčbu nádorových onemocnění, v oftalmologii (AMD)² a dalších indikacích (viz dále).

Počátky používání této léčebné metody se vztahují už na začátek 20. století, kdy někteří badatelé léčili rakovinu kůže pomocí barviva (v té době nejčastěji eosin) a světelného záření³. Ačkoliv se již v této době začaly používat ve stejné aplikaci i hematoporfyrinové deriváty⁴ (HpD), až do šedesátých let minulého století bylo jen málo záznamů⁵ o selektivní lokalizaci těchto sloučenin v nádorech a regresi onemocnění po ozáření světlem.

HpD po svém objevení Schwartzem v roce 1955 vyvolaly intenzivní zájem o oblast



PDT a tento zájem byl výrazně podpořen průkopnickými studiemi jak v základním výzkumu Lipsonem a Baldesem⁶, tak i v klinické aplikaci Doughertym a kol⁷⁻⁹. Částečně čištěný preparát HpD byl pod názvem Photofrin[®] regulérně schválen v roce 1993 jako první PS pro léčbu různých druhů rakoviny v mnoha státech, včetně USA. Tento preparát má však poměrně dost nevhodných vlastností,

Obr. 1 Zjednodušený princip PDT

včetně dlouhodobé kožní fotosenzitivity trvající i několik týdnů¹⁰, nízkou nádorovou selektivitu¹¹, slabou světelnou penetraci do nádoru díky nutnosti použití světla relativně krátké vlnové délce (630 nm)¹² a navíc vše komplikuje skutečnost, že se jedná o směs neurčitých struktur¹³.

V posledním desetiletí bylo provedeno mnoho práce ve vývoji nových PS^{14, 15} a v současnosti je zde široká škála potenciálních PS vhodných pro PDT. Některé PS se připravují jednoduchou parciální syntézou vycházející z přírodních předlohových struktur, jako jsou např. hem, chlorofyl, bakteriochlorofyl atd. Tento způsob přípravy je často ekonomicky výhodnější a také šetrnější k životnímu prostředí ve srovnání se složitou totální chemickou syntézou¹⁶.

Souběžně s chemickou přípravou nových PS je věnováno velké úsilí i vývoji nových světelných zdrojů. Nejčastěji se používá laser (polovodičový nebo laditelný ve viditelné oblasti spektra) anebo se používají xenonové výbojky v kombinaci s filtry pro příslušné vlnové délky¹⁷. Pokrok ve znalostech tkáňové optiky nám umožnil výrazné zlepšení v plánování léčby a předvídání okolností, za kterých se světlo šíří cílenou tkání nebo orgánem, což samozřejmě vede k optimalizaci klinického přístupu. Rozlišení různých druhů tkání z hlediska odlišných optických vlastností nám umožňuje pochopit mechanismy a situace, při kterých výrazně kolísá množství absorbovaného a rozptýleného světla.

Skutečnost, že většina PS je fotochemicky aktivní a zároveň má schopnost fluorescence, nám poskytuje další strategie v PDT. Tyto techniky se někdy označují jako foto(dynamické) detekce nebo diagnosy. Ty nám umožňují detekovat jinak neviditelné onemocnění jako dysplazie, mohou zvýraznit ohraničení nádoru, nebo jiných onemocnění v oblastech dosažitelných endoskopicky (např. jícen, bronchy, tlusté střevo atd.). Další výhodou fluorescence představuje možnost její kvantifikace a tím pádem i zkvalitnění terapeutického zásahu. Například fluorescenční měření nám pomáhá zjistit aktuální množství PS ve tkáni, díky čemuž můžeme zvolit vhodné ozařovací parametry. Měření fluorescence nám také vypovídá o tzv. „photobleachingu“ (viz str. 13) PS ve tkáni, což může být za určitých okolností ukazatel optimálního završení léčby.

Při racionálním výběru z nesčetné řady dostupných PS a světelných zdrojů musíme brát také v potaz další aspekty, např. chování PS při ozáření nebo vlastní interakce mezi PS a savčími buňkami ve tkáňové kultuře. V posledních letech došlo k ohromnému rozvoji a získání vědomostí na poli buněčné biologie zejména v oblastech signálních transdukčních mechanismů, transkripčních faktorů, regulace buněčného cyklu, zánětu a buněčné smrti. Celý mechanismus, jak PDT ovlivňuje buněčné pochody, je silně určován lokalizací PS v buňce.

Subcelulární lokalizace je řízena chemickou strukturou PS (molekulární hmotnost, lipofilita, amfifilita, náboj, vazba na proteiny), koncentrací PS, inkubační dobou, koncentrací séra a fenotypem cílových buněk.

V klinické praxi je v současnosti fotodynamická léčba především používána pro paliativní řešení maligních endobronchiálních a ezofageálních obstrukcí, v terapii karcinomů močového měchýře, kožních a mozkových nádorů. Dále je PDT doporučována jako adjuvantní intraoperační postup při chirurgickém řešení rozsáhlých tumorů různých systémů. Nejčastěji je PDT používána v terapii nádorů a premaligních lézí oblastí hlavy a krku, protože se jedná o metodu, která je méně agresivní než chirurgický zákrok a radioterapie. V případě časných stadií nádorového onemocnění se úspěšnost terapie pohybuje mezi 70 - 80 % případů. V orofaciální oblasti jsou tímto způsobem léčeny např. karcinomy dutiny ústní, nasofaryngu, orofaryngu, laryngu, glanduly parotis, ale např. i oční tumory. V dermatologii se PDT používá například u spinocelulárního karcinomu, Kaposiho sarkomu, kožních metastáz karcinomu prsu. Pomocí PDT byla také úspěšně léčena primární stadia karcinomu plic, žaludku, tumory genitálií, kolorektální tumory, karcinomy močového měchýře i nádory hrdla děložního. Jinou oblastí aplikace je léčba senilní makulární degenerace, která má primární postavení v příčinách ztráty zraku u lidí západní civilizace starších 50-ti let. V České republice se tato metoda s úspěchem používá již několik let.

Další terapeutický směr, ve kterém je PDT využívána, souvisí s tzv. čištěním (tzv. „purging“) kostní dřeně. Jako fotosenzitizéry jsou nejčastěji používány Photofrin[®], benzoporfyrinové deriváty (BPD) a Merocyanin 540 (MC 540). Pomocí PDT jsou tak odstraňovány leukemické buňky z autologních štěpů kostní dřeně. Další výhodou této metody je, že PS se odstraní z kostní dřeně před reinfuzí, takže nedochází k systémové fotosenzitizaci.

PDT se začíná využívat i u některých nemaligních onemocnění, například u kardio-vaskulárních aterosklerotických změn a revmatoidní artritidě. Ve stadiu preklinického výzkumu je využití antivirového efektu PDT, proti HIV - I viru, herpes simplex viru – typ I a II (HSV - 1, HSV - 2) a cytomegaloviru (CMV). V této oblasti se fotodynamický efekt s úspěchem využívá také při eradikaci bakteriálních infekcí, zejména různých rezistentních kmenů¹⁸⁻²⁰.

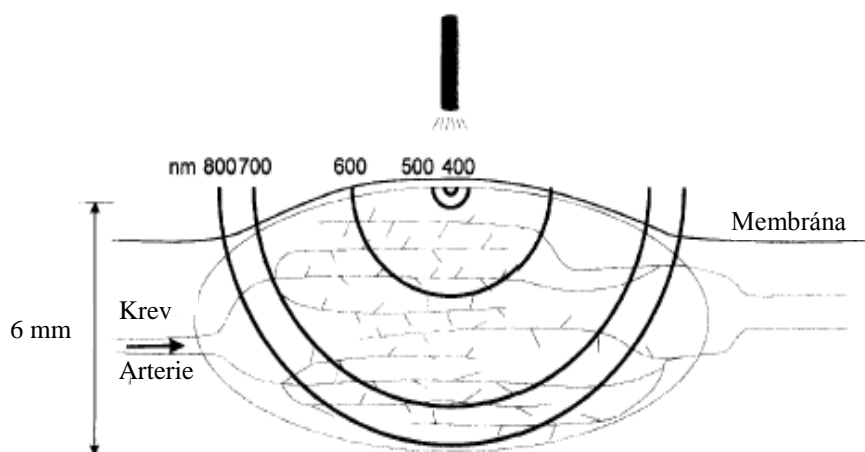
Karcinogenní ani mutagenní účinky PDT nebyly zaznamenány, což je považováno za hlavní přednost ve srovnání s chemoterapeutickými a radioterapeutickými postupy v onkologii. Vzhledem k malé systémové toxicitě celkově podávaných fotoaktivních látek lze PDT bezpečně opakovat, je-li to nezbytné. Při zákroku není nutná anestézie, nedochází ke ztrátám krve, také pooperační bolestivost ozářeného místa je přijatelná. Hlavním vedlejším

účinkem PDT je kožní fotosenzitivita. Běžné fotoprotektivní prostředky zde nejsou účinné, poněvadž akční spektrum této fototoxicity je ve viditelné oblasti spektra. Vývoj tedy směřuje k syntéze nových fotoaktivních derivátů s omezenou systémovou fototoxicitou při zachování vysoké terapeutické účinnosti.

2.2. Princip PDT

2.2.1. Fotochemie

Fyzikálním základem PDT je aktivace fotosenzitizéru světlem vhodné vlnové délky. Vlnová délka světla aktivujícího PS je pro použití PDT velice limitující. Světlo o nižších vlnových délkách proniká živými tkáněmi pouze do hloubky několika milimetrů (obr. 2) a zasažená oblast je velice malá²¹. Při nižších vlnových délkách dochází k pohlcování světla endogenními chromofory, jako je např. hemoglobin. I toto je jeden z důvodů, proč se připravují nové PS. Původně do terapie zavedená sodná sůl porfimeru (Photofrin®) totiž kromě jiných nežádoucích vlastností má také velice nízkou maximální vlnovou délku vhodnou pro aktivaci – 630 nm. Optimální rozpětí vlnových délek se pohybuje v oblasti 680–800 nm (obr. 2). Další zvyšování nad 800 nm pak již není příliš účelné z hlediska nízké energie záření, jež nemusí dostačovat k účinné aktivaci PS.



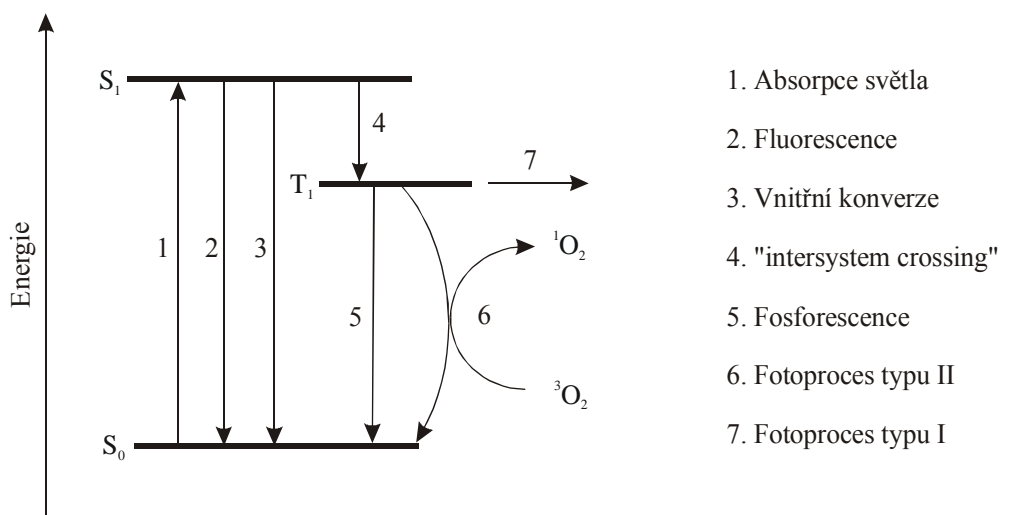
Obr. 2 Prostupnost světla živými tkáněmi. Při nižších vlnových délkách světlo proniká pouze do hloubky několika milimetrů, což omezuje šíři terapeutického zásahu. Z hlediska PDT jsou optimální vlnové délky v oblasti asi 680-800 nm

Po absorpci světelného kvanta se PS transformuje ze základního singletového stavu (S_0) do velice krátce trvajícího (v jednotkách nanosekund) excitovaného singletového stavu (S_1)¹ (obr. 3 – modifikovaný Jablonského diagram). Tento stav trvá velice krátce na to, aby umožnil efektivní interakci s okolním prostředím a vzhledem k tomu se předpokládá, že zanedbatelně ovlivňuje fotodynamickou aktivitu PS. Z této energetické hladiny se PS může uvolnit několika způsoby²² zahrnující procesy jak radiační (**fluorescence**), tak neradiační (vnitřní konverze a tzv. „intersystem crossing“).

Při **vnitřní konverzi** dochází ke srážkám s molekulami rozpouštědla a k uvolnění energie ve formě tepla. Někteří autoři považují tento proces také za jeden z důležitých při

vlastním účinku na buňky²³. Dokonce se v této souvislosti hovoří o novém typu léčby tumorů, tzv. fototermální terapii (PTT - photothermal therapy)²⁴. Fototermální proces vyjadřuje tendenci absorbujícího PS uvolnit svojí excitační energii přes rychlou kaskádu vibračních stavů, jejichž výsledkem je zvýšená kinetická energie okolní matrice, tj. dochází k silnému lokálnímu zahřívání. Teplota exponovaného místa může dosáhnout až 130 °C²⁵. Za těchto podmínek dochází k vypařování molekul vody, což způsobuje rázovou vlnu, která se šíří přes biologické médium a způsobuje mechanické a chemické změny v biologickém systému²⁶. Použití silných laserových pulsů umožňuje absorpci dalších fotonů, dříve než teplotní maximum klesne zpět na teplotu okolní tkáně. Tyto podmínky vytvářejí intenzivnější rázovou vlnu a vedou k postupnému zničení buněčných a tkáňových komponent. Tyto efekty mohou být ještě více zvýrazněny při vyšších koncentracích kvalitního chromoforu lokalizovaného ve vhodných buněčných kompartmentech. V polovině devadesátých let byly již zveřejněny první úspěšné pokusy při léčbě rakovinných lézí pomocí indocyaninové zeleně aktivované laserem emitující blízké infračervené záření^{27, 28}.

Procesem „**intersystem crossing**“ (ISC) se PS dostává do svého tripletového stavu (T_1). Vzhledem k tomu, že při ISC dochází k inverzi spinu jednoho elektronu (čili je to proces „spinem-zakázaný“) je daleko méně preferovaný než tzv. „povolené“ procesy. Ovšem dobrý PS prochází tímto procesem s vysokou pravděpodobností, což je podstatné pro vlastní fotodynamickou aktivitu. Tento stav je poměrně dlouho trvající (mikro až milisekundy) vzhledem k tomu, že přechod $T_1 \rightarrow S_0$ je také proces „spinem-zakázaný“ a poskytuje tím dostatek času k interakci s okolím. Důležitou vlastností PS jsou tím pádem tzv. „triplet state quantum yield“ (Φ_T) (kvantový výtěžek tripletového stavu) a „triplet state lifetime“ (τ_T) (doba, po kterou je schopen PS se udržet ve stavu T_1), které charakterizují účinnost daného

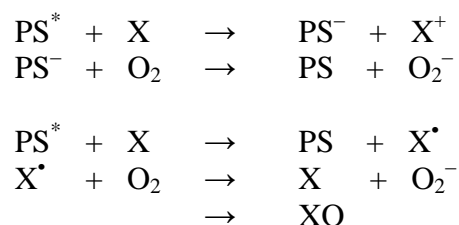


Obr. 3 Modifikovaný Jablonského diagram

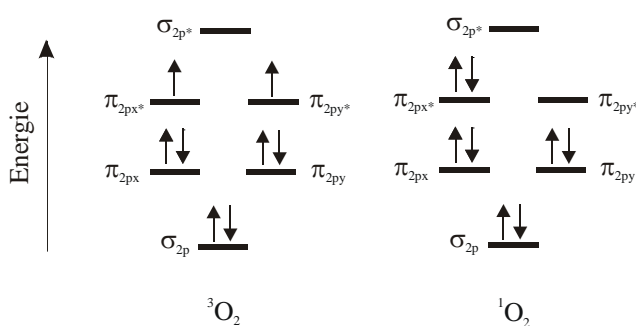
PS. Z předchozího samozřejmě vyplývá, že čím jsou tyto hodnoty vyšší, tím je PS kvalitnější. Typické PS, jež se zkoumají v PDT mají hodnoty $\Phi_T = 0,2-0,7^{29}$ a $\tau_T > 500 \text{ ns}^{30}$.

Ze stavu T_1 se PS může uvolnit opět několika cestami. První cestou je vyzáření fotonu ve formě fosforescence (obr. 3). Další dva procesy jsou již vlastním základem PDT. Můžeme je rozdělit na tzv. fotoproces typu I a II. Oba fotoprocesy se objevují současně a poměr mezi nimi je silně ovlivněn použitým PS, substrátem a koncentrací kyslíku. Všeobecně se přijímá, že fotoproces typu II, při němž vzniká singletový kyslík, je zejména odpovědný za vlastní fotodynamický účinek^{22, 31}.

K **fotoprocesu typu I** dochází hlavně za podmínek snížené koncentrace kyslíku. Při úplné anoxii reaguje excitovaný fotosenzitizér (PS^*) přímo s okolním biologickým substrátem (X), dochází k přenosu elektronu za vzniku oxidovaného substrátu (X^+) a redukovaného fotosenzitizéru (PS^-) (obr. 4). Za hypoxie může PS^- reagovat dále s kyslíkem za produkce superoxidového aniontu (O_2^-) (obr. 4), který poskytuje reaktivní hydroxidový radikál (OH^\bullet), jež se dále výrazně účastní na oxidaci biomolekul³². Případně dochází přenosem elektronu již v prvním kroku k tvorbě radikálů (X^\bullet) z biologického substrátu (X) nebo okolního rozpouštědla. Tyto pak mohou reagovat přímo s kyslíkem a poskytovat např. superoxidový anion nebo zafixovat změnu v biologické molekule její oxidací (XO)²².



Obr. 4 Reakce probíhající při fotoprocesu typu I



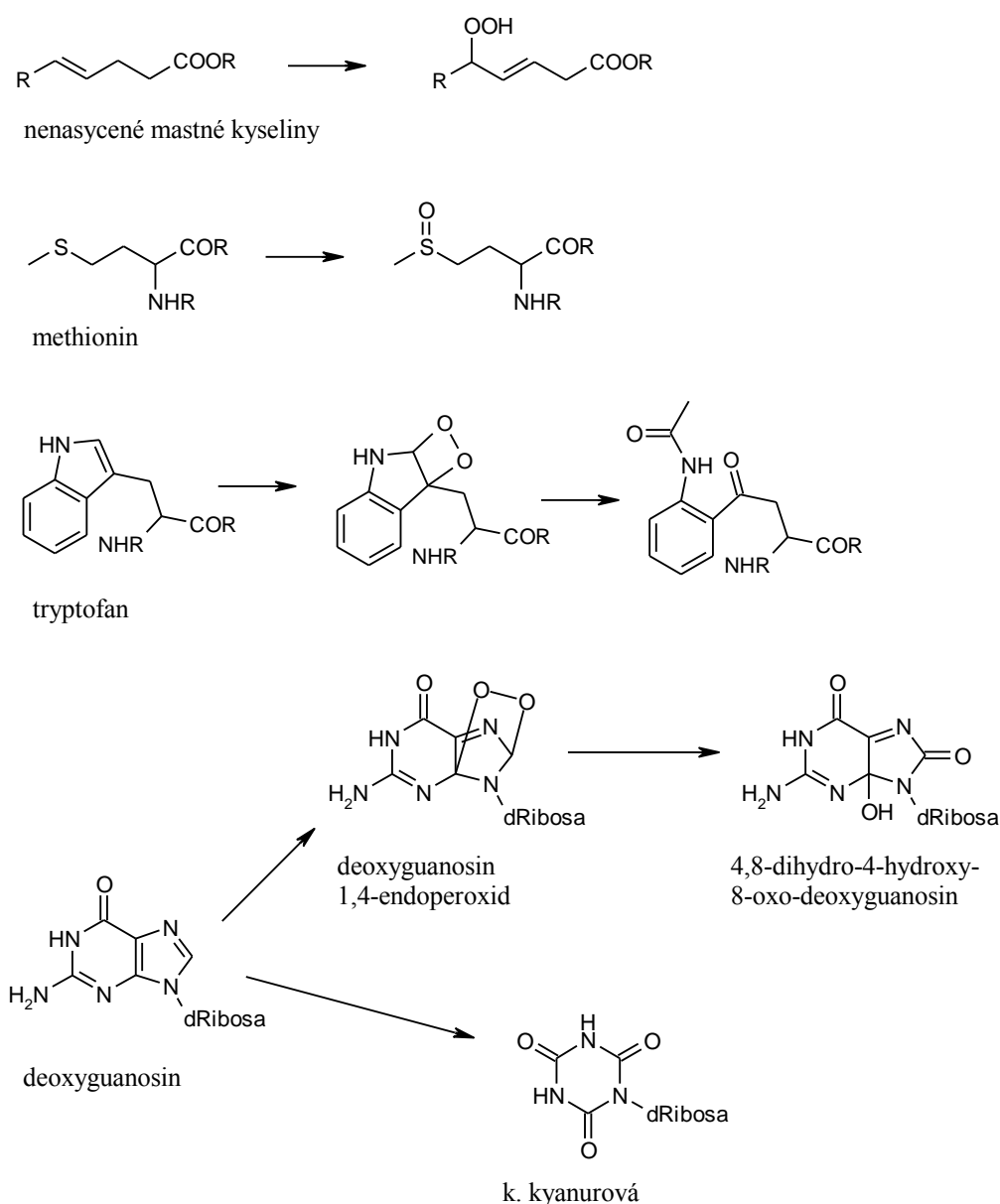
Obr. 5 Modely molekulových orbitalů tripletového a singletového kyslíku

Při vyšších koncentracích kyslíku převažuje přenos energie na základní (tripletový) stav molekulárního kyslíku (3O_2) (**fotoproces typu II**). U něho pak dochází opět k inverzi spinu jednoho z vnějších elektronů a tvorbě silně reaktivní formy singletového kyslíku (1O_2) (obr. 5). Doba života 1O_2 je různá a liší se v závislosti na prostředí, ve kterém se nachází (voda 2–4 $\mu\text{s}^{22, 32}$, lipidy 50–

100 μs^1 , organická rozpouštědla 10–100 μs^{32} a okolo 0,6–0,04 μs v biologickém prostředí^{1, 33}). I když se hodnoty doby existence 1O_2 získané z biologického prostředí silně liší vzhledem k velice špatné detekci, autoři se shodují, že 1O_2 není schopný penetrovat hlouběji než je přibližně šířka lipidové buněčné membrány, maximálně do vzdálenosti velikosti

subcelulárních organel. Tím je prakticky zaručeno, že přímým účinkem PDT budou usmrceny pouze buňky obsahující PS. Společně s určitou selektivitou kumulace v nádorové tkáni a ozářením pouze specifikovaného místa toto umožňuje velice přesně lokalizovaný zásah.

Reaktivní singletový kyslík napadá okolní biomolekuly³⁴ (zejména molekuly obsažené v membránách, cholesterol, nenasycené mastné kyseliny, dále DNA a aminokyseliny tryptofan, methionin a histidin) buď oxidací nebo cykloadicí (obr. 6). Takto modifikované pak přestávají plnit svou biologickou funkci a dochází k poškození buňky, případně až k její smrti. U DNA dochází při fotoreakci typu II k napadení cykloadicí selektivně pouze guaninové báze za vzniku dvou převažujících produktů³⁵ (obr. 6), na rozdíl od fotoreakce typu I, kdy hydroxylový radikál napadá bez selektivity všechny báze³⁶.



Obr. 6 Oxidace biomolekul singletovým kyslíkem

2.2.2. Světelná dostupnost

Předvídání prostorové distribuce světla do cílových tkání je důležitá podmínka pro správné fungování PDT. Světlo je při průchodu tkání rozptylováno nebo absorbováno a rozsah těchto jevů závisí na vlnové délce použitého světla a typu tkáně. Tkáňová optika zahrnuje měření prostorové distribuce v závislosti na čase a velikost distribuce do jednotlivých tkáňových struktur a jejich absorpční a rozptylovací schopnosti. Tomuto přístupu se dává přednost, jelikož biologická tkáň není homogenní (makromolekuly, buněčné organely, intersticiální vrstvy atd.) a tyto nehomogenity mohou způsobit zmatenost výsledků. Mnohonásobný rozptyl v zakaleném médiu vede k rozprostření světelného paprsku a ztrátě směrovosti. Naopak absorpci tkáně způsobují nejvíce endogenní tkáňové chromofory jako hemoglobin, myoglobin nebo cytochromy. Kompletní charakterizace světelného transportu ve tkáni je nelehká otázka – přesto bylo navrženo několik přístupů s různým stupněm aproximace. Snaha o vytvoření modelu světelného transportu vyžaduje přesné hodnoty optických vlastností tkáně. Rozptyl je považován za nejdůležitější faktor limitující penetraci do většiny tkání a měří se v μ_s (pro měkké tkáně se pohybuje v rozmezí 100 – 1000 cm^{-1}). Absorpce je spíše méně důležitá a měří se v μ_a (rozmezí 0,1 – 5 cm^{-1} pro vlnové délky zeleného a vzdálenějšího spektra). Třetí parametr nezbytný pro definování optických vlastností tkáně je anisotropický faktor, který udává směr rozptylu světla a pro jehož výpočet se používají různé matematické modely. Kombinace absorpce při nižších vlnových délkách důležitými tkáňovými chromofory (oxy a deoxyhemoglobin a melanin) spolu s rozptylem světla při vyšších vlnových délkách a výskytem absorpce vody při vlnových délkách přesahujících 1300 nm vedla k zavedení tzv. „optického okna“ ve tkáni (obr. 7). Ve PDT to znamená, že průměrná efektivní hloubka penetrace (intenzita je zredukována na cca 37 %) se pohybuje mezi 1 – 3 mm při 630 nm (vlnová délka použitá při klinickém použití Photofrinu[®]), zatímco pro vlnovou délku 700 – 850 nm je tato penetrace přibližně dvojnásobná.

Tato skutečnost vede k vývoji PS absorbujících při delších vlnových délkách, jako jsou např. naftalocaniny³⁷ nebo bakteriochloriny³⁸. Absorpce světla vlastním PS může také limitovat světelnou penetraci do tkáně. Tento fenomén se označuje jako samostínění (z angl. „self-shielding“) a je typická zvláště pro silně absorbující PS³⁹.

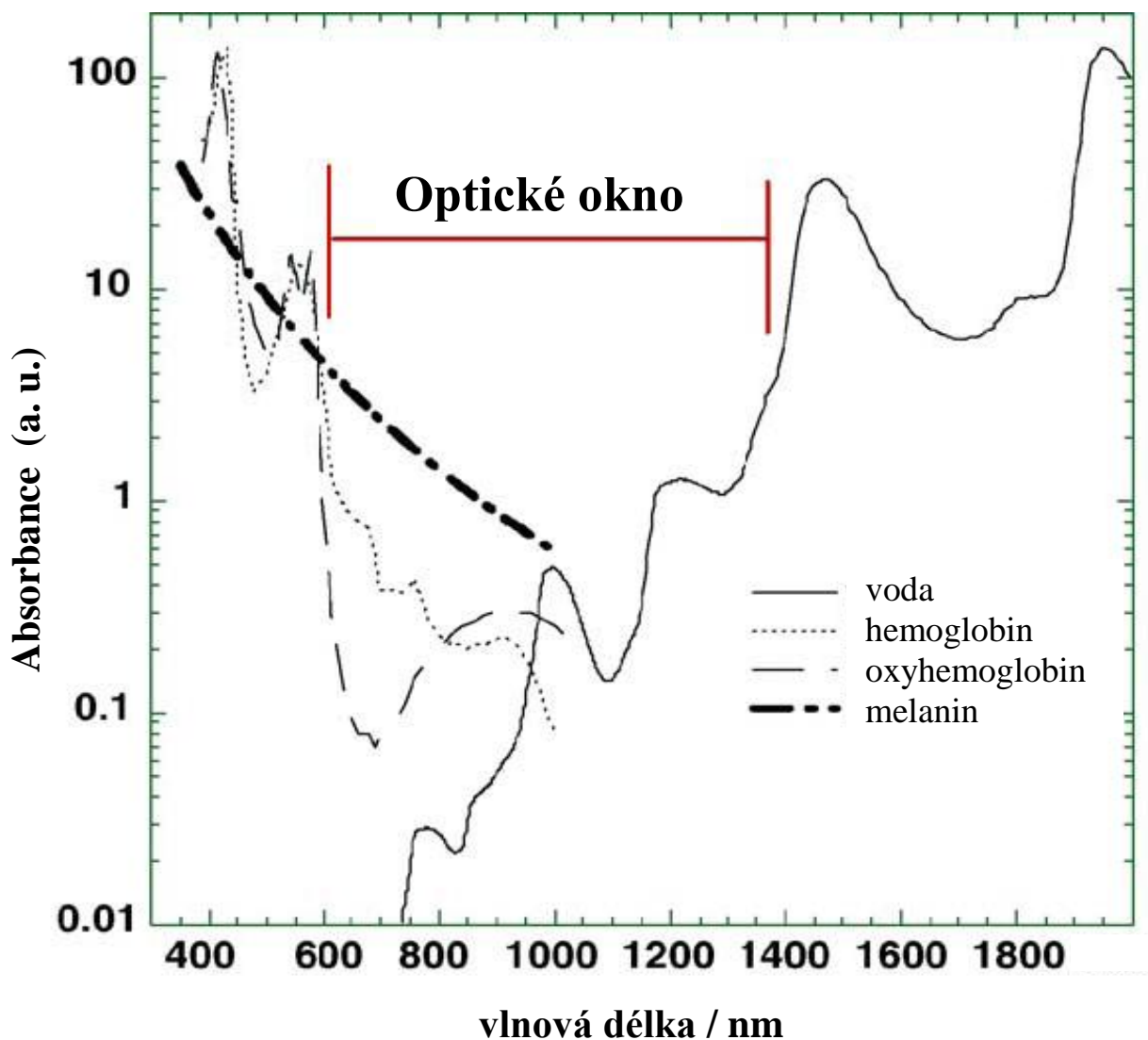
Většina PS je náchylná k fotodestrukci během světelné expozice a tento proces se nazývá „photobleaching“⁴⁰ neboli vyblednutí. Ve fotobiologii a fotochemii je photobleaching definován jako ztráta intenzity absorpce či emise způsobená světlem. U barviv dochází působením světla k chemickým změnám (ať už fotoadici, fotocyklicací, ireverzibilní

fotoredukcí nebo nejčastěji oxidací)⁴¹, v jejichž důsledku dochází k narušení chromoforu. Jsou známy dva typy ireverzibilních chemických změn, fotomodifikace a tzv. "pravý photobleaching".

Při *fotomodifikaci* dochází ke ztrátě absorpce nebo fluorescence při určité vlnové délce, avšak chromofor zůstává zachován v modifikované formě.

Při *pravém photobleachingu* je chemický zásah hluboký a chromofor se rozpadá na malé fragmenty, jež nemají významnější absorpci ve viditelné oblasti.

Důsledkem pro PDT (dochází většinou k pravému photobleachingu) je to, že PS už poté neabsorbuje světlo, kterému je tak umožněno proniknout do hlubších vrstev. Na druhou stranu ovšem rozložený PS je již neaktivní a nemůže vykazovat žádné cytotoxické vlastnosti²¹. Photobleaching se může také podílet na rychlejšímu vylučování PS z těla díky jeho rozkladu v kůži (obr. 7)⁴².



Obr. 7 Optické okno

2.3. Fotosenzitizéry

2.3.1. Obecné vlastnosti

Fotosenzitizéry (PS) jsou látky schopné absorbovat světlo specifické vlnové délky a transformovat jej na užitečnou energii. V případě PDT toto zahrnuje v konečné fázi produkci letálních cytotoxických agens. Existují stovky přírodních i syntetických barviv, jež mohou fungovat jako PS v PDT. Klíčovou charakteristikou kteréhokoliv PS je jeho schopnost preferenční kumulace v nemocné tkáni s následnou produkcí cytotoxických produktů a indukci požadovaných biologických efektů⁴³, i když v poslední době lze problém cílené distribuce PS do požadovaných tkání obejít několika způsoby (lipozomy, konjugace s biomolekulami, aj.).

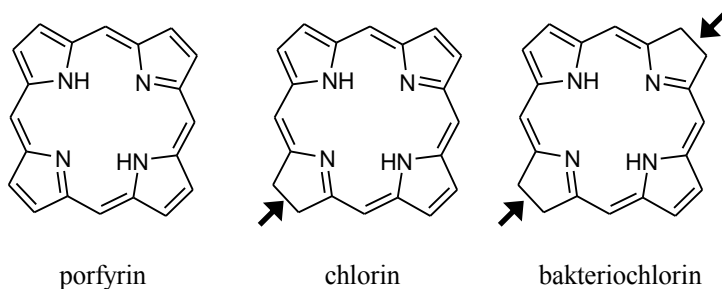
Obecně se dá říct, že naprostá většina PS momentálně používaných nebo testovaných v PDT je založena na porfyrinovém cyklu (látky podobné chlorofylu nebo barevné části hemoglobinu). Vzhledem k tomu, že doposud nejrozšířenější a nejpoužívanější PS – sodná sůl porfimeru - má značný počet vedlejších účinků a pro PDT nežádoucích vlastností, byl výzkum zaměřen na nové typy PS. Byly formulovány určité vlastnosti ideálního PS, a i když je naprosto zřejmé, že žádná z látek se nemůže za ideální považovat, lze u novějších látek hovořit alespoň o určitém přiblížení se onomu ideálnímu PS.

Vlastnosti ideálního fotosenzitizéru:

- Minimální toxicita ve tmě a jiné nežádoucí účinky během podání (např. hypotenze nebo alergické reakce). PS by měl být toxický pouze po ozáření světlem vlnové délky vhodné pro jeho aktivaci.
- Kvalitní spektrální vlastnosti – absorpce při delších vlnových délkách, kdy je penetrační schopnost světla do živé tkáně maximální (650 – 800 nm). Při kratších vlnových délkách (< 650 nm) je tato hloubka penetrace příliš nízká, při delších vlnových délkách (> 800 nm) nemají fotony dostatečnou energii, aby aktivovaly PS k produkci singletového kyslíku. Vhodný je také vysoký molární absorpční koeficient (> 30 000 M⁻¹cm⁻¹) - díky němu se snižuje dávka PS nutná k dosažení požadovaného efektu.
- Selektivní kumulace – PS by měl vykazovat výrazně zvýšenou kumulaci v nádorové tkáni oproti jiným tkáním.

- PS by měl být chemicky čistá sloučenina konstantního složení s dostatečnou dobou uchovatelnosti.
- Rozpustnost ve vodě nebo v jiných neškodných s vodou mísitelných systémech. Nevhodná je nadměrná agregace v biologických systémech, která redukuje fotochemickou účinnost PS.
- Farmakokinetická eliminace by měla být dostatečně rychlá, v optimálním případě méně než jeden den, abychom se vyhnuli prodloužené kožní fotosenzitivitě a tím pádem i nezbytné protisluneční ochraně pacienta. Šetrný k pacientovi a také značně levnější je minimální interval mezi podáním PS a ozářením.
- Kvalitní fotochemické vlastnosti a dostatečná produkce singletového kyslíku. Na druhou stranu jsou nevhodné nepřiměřeně silně aktivní PS, jelikož můžeme snadno překročit léčebnou dávku a tím pádem neúměrně poškodit léčenou tkáň.

Většina klinicky i experimentálně používaných PS je odvozena od tetrapyrrolického aromatického jádra, které se běžně nachází v přirozených pigmentech jako je hem, chlorofyl nebo bakteriochlorofyl. Tato tetrapyrrolická jádra běžně absorbují v širokém pásmu okolo 400 nm (někdy se též označuje jako Sorretův pás) a v užším vzdálenějším pásmu nazývaném jako Q pás. Přirozeně se vyskytující porfyriny jsou plně konjugované a liší se v počtu a typu periferních substituentů, zejména karboxylových skupin (uroporfyrin má 8 karboxylových skupin, koproporfyrin 5 a protoporfyrin 2). U porfyrinů se Q pás pohybuje v oblasti okolo 630 nm a bývá poměrně malý. Redukcí dvojně vazby v pyrrolickém jádře porfyrinů vznikají chloriny (obr. 8). Redukcí jedné dvojně vazby dochází paradoxně k posunu absorpčního maxima Q pásu k delším vlnovým délkám (650 - 690 nm) a jeho několikanásobnému zvýšení – oba tyto faktory jsou velmi výhodné pro PDT. Redukcí další dvojně vazby získáme bakteriochloriny, což vede k dalšímu posunu Q pásu do červené oblasti spektra a opět ke zvýšení tohoto pásu. Bakteriochloriny se ukázaly jako efektivnější PS než chloriny,



Obr. 8 Základní skelety fotosenzitizérů s různým počtem dvojných vazeb

ale vzhledem k malému počtu zástupců této skupiny a zejména vzhledem k problematické stabilitě při uchovávání, se až na výjimky nepředpokládá jejich praktické využití. Tyto základní makrocykly slouží i jako předlohy jiných odvozených struktur, např. purpurinů, feoforbidů, pyrofeoforbidů, feofytinů a forbinů, které jsou také zkoumány z hlediska využití v PDT⁴⁴.

Typy fotosenzitizerů

V současné době známé PS lze rozdělit zhruba do tří generací. První generaci tvoří pouze HpD a vyznačuje se některými nevýhodnými vlastnostmi, kvůli nimž byly připraveny látky generace druhé. Kromě látek odvozených od porfyrinů sem patří i látky jiných chemických struktur. Třetí generaci tvoří PS generace druhé spojené s některými biomolekulami, umožňujícími tak cílenější biodistribuci v těle.

2.3.2. První generace

porfimer sodný (HpD, Photofrin[®], Photogem[®], Photosan[®], Photocarcinorin[®], Haematodrex[®], PhotoBarr[®])

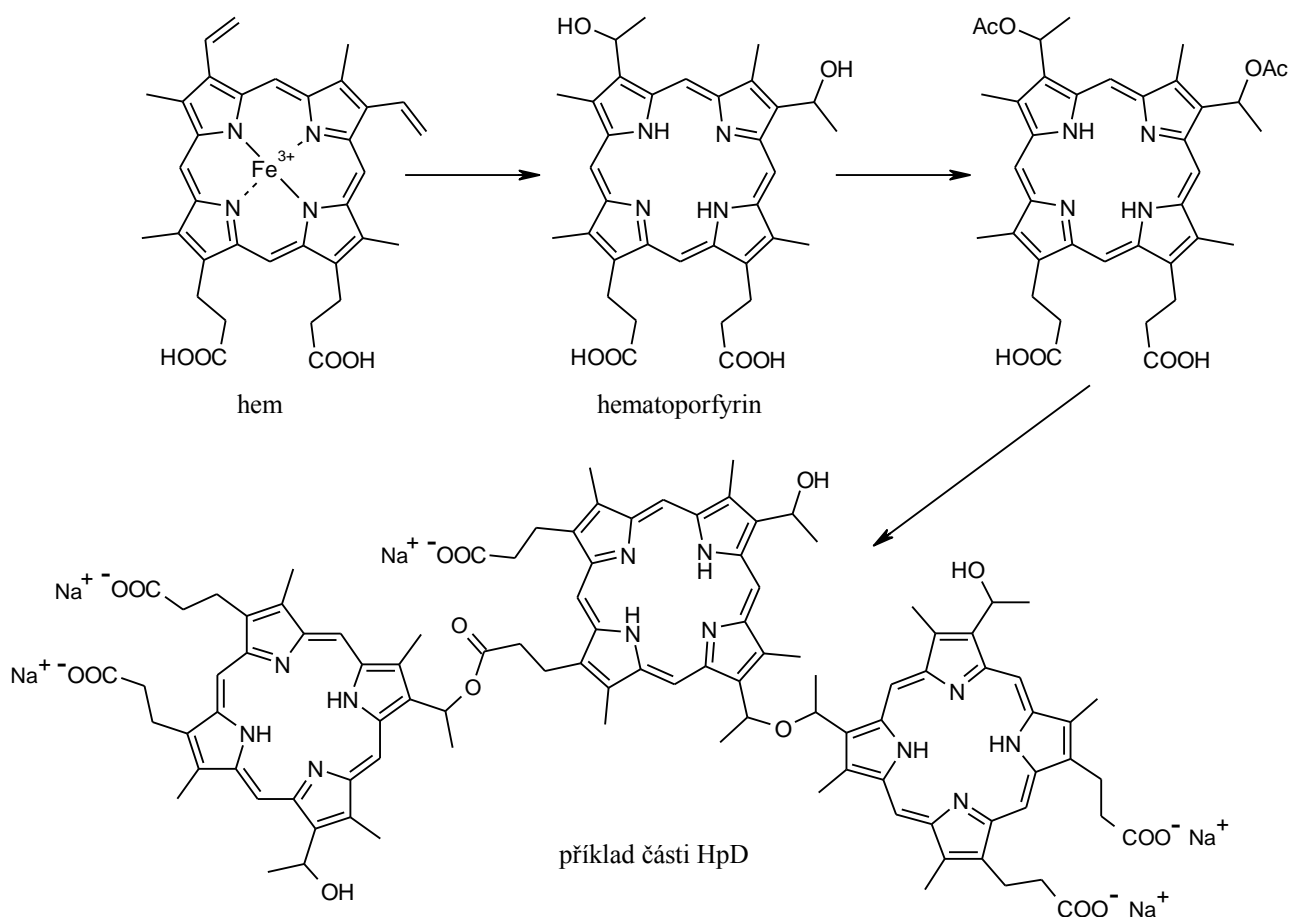
HpD je směs produktů vzniklých přípravou z hematoporfyrinu izolovaného nejprve z hemu (barevné části hemoglobinu). Hem se zbavuje centrálního atomu železa působením HBr v kyselině octové. Během tohoto procesu dochází k adici HBr na periferní dvojně vazby, avšak během dalšího kroku dochází ve vodném prostředí k odštěpení atomu bromu za vzniku vlastního hematoporfyrinu (obr. 9). Ten se ze začátku používal také jako PS, avšak později bylo zjištěno, že ne samotný hematoporfyrin je odpovědný za vlastní PDT efekt, nýbrž že to jsou oligomerní frakce, které vznikají při izolaci z krve⁴⁵. Tyto frakce byly Schwartzem později obohaceny na úkor monomerů⁴⁶ působením kyseliny sírové v prostředí kyseliny octové a následnou neutralizací hydroxidem sodným. Toto vede ke složité směsi dimerů a oligomerů, jejichž jednotky jsou pospojovány buď esterovými nebo éterovými vazbami. Tato směs byla dále částečně vyčištěna pomocí gelové chromatografie a stala se základem porfimeru, jež je ve formě sodné soli obsažen v přípravku Photofrin[®]. Ten byl vyvinut firmou QLT PhotoTherapeutics (Vancouver, Kanada) a poprvé zaveden k léčbě rakoviny močového měchýře v roce 1993 v Kanadě jako první látka v PDT.

Porfimer má ovšem několik nevýhodných vlastností. Za prvé je to velice nízká vlnová délka vhodná pro aktivaci – 630 nm – a velice nízký extinkční koeficient při tomto maximu ($1170 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), a proto je potřeba vysokých dávek jak PS, tak světla. Dále i po vyčištění se

stále sestává ze směsi asi 60 látek a tudíž je velice složité reprodukovat přesně jeho složení⁴⁷. Také vychytávání v nádorech není příliš selektivní a jeho vysoké koncentrace lze nalézt v játrech, ledvinách, slezině a zejména kůži⁴³. V kůži pak přetrvává až 6 týdnů, což způsobuje dlouhodobou fotosenzitivitu a pacienti nesmí přijít do kontaktu s ostrým světlem.

V současné době jsou HpD používány v klinických studiích pod firemními názvy - Photofrin[®] (USA), Photocarcinorin[®] (Čína), Photosan[®] (Německo), Photogem[®] (Rusko), Haematodrex[®] (Bulharsko). V České republice se používá pod názvy Photofrin[®] a PhotoBarr[®].

Porfimer i přes veškeré výše uvedené nežádoucí vlastnosti přesto stále zůstává nejrozšířenějším PS a byl už zaveden v mnoha zemích k léčbě prekancerózních stavů (Barrettův jícen, cervikální dysplazie) i vlastních kanceróz (karcinom cervixu, jícnu, močového měchýře, žaludku a bronchiální karcinom)^{43, 48}. Momentálně se nachází přípravek Photosan[®] ve druhé fázi klinického zkoušení pro léčbu maligních intrakraniálních nádorů a neuroektodermálních nádorů vzniklých z glií (astrocytom, oligodendrogliom, glioblastoma multiforme)⁴⁹ a stejná účinná látka se testuje ve třetí fázi klinického zkoušení léčby rakoviny žlučníku a žlučovodu⁴⁹.



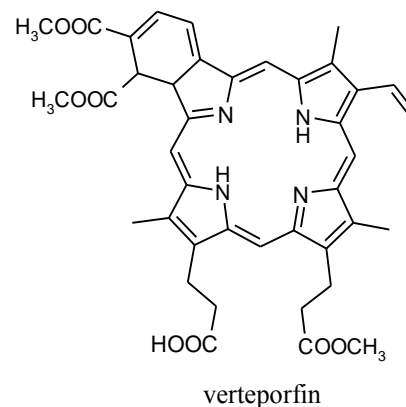
Obr. 9 Parciální syntéza hematoporphyrinových derivátů

2.3.3. Druhá generace

Látky druhé generace jsou již chemicky jednotné a snadno charakterizovatelné. Také velice nízká vlnová délka posledního maxima HpD je zde již často zvýšena a tudíž lze tyto PS aktivovat světlem pronikajícím hlouběji do tkání. Používané látky patří jak do skupiny porfyrinů nebo např. ftalocyaninů, texafyrinů, porfycenů a dalších.

Verteoporfin (BPD-MA, Visudyne™)

Základní skelet verteoporfinu je blízký porfyrinům (zkratka BPD-MA pochází z angl. benzoporphyrin-derivative monoacid ring A). Z několika studovaných derivátů benzoporfyrinu se jako nejúčinnější ukázala molekula s ortho-kondenzovaným benzenovým jádrem a jednou esterovou a jednou karboxylovou funkcí na vlastním porfyrinovém cyklu (účinnější než diester i než dikarboxylový derivát). Jeho absorpční maximum je posunuto až k vlnové délce 690 nm, při níž proniká světlo přibližně dvakrát hlouběji než při 630 nm. Verteoporfin je velice rychle absorbován nádorovou tkání, avšak také velice rychle vylučován jak z těchto tkání, tak z těla (kožní fotosenzitivita tudíž přetrvává pouze pár dní). Nejlepší poměr mezi nádorovými a ostatními tkáněmi je dosažen přibližně po 15 minutách a pak koncentrace v tumorech opět velice rychle klesá⁵⁰. I když lze adekvátní terapeutickou odpověď získat přibližně po 2–3 hodinách po injekční aplikaci, selektivita není ideální vzhledem ke stále velkému množství cirkulující látky v krevním oběhu.



Největších úspěchů ovšem firma QLT PhotoTherapeutics (společně s CIBA Vision Corporation, Duluth, GA, USA) dosáhla s tímto PS v oftalmologii. Evropská komise udělila rozhodnutí o registraci přípravku Visudyne™ platné v celé Evropské unii společnosti Novartis Europharm Limited dne 27. července 2000.

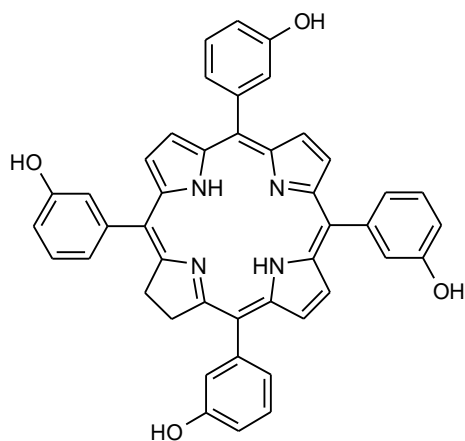
Používá se k terapii vlhké formy senilní makulární degenerace (angl. age-related macular degeneration, AMD), mimochodem i v ČR. AMD má primární postavení v příčinách ztráty zraku u lidí západní civilizace strašících 50-ti let. Při vlhké formě dochází k rychlému růstu abnormálních cév pod retinou centrální oblasti. Prosakování z těchto abnormálních cév poškozuje retinu a urychluje ztrátu zraku. Takřka u 80–90% pacientů nezabírá žádná léčba⁴³. Vzhledem k tomu, že PDT indukuje uzávěry cév, jsou látky jako verteoporfin ideální pro léčbu této nemoci.

Momentálně se testuje (druhá fáze klinického zkoušení)⁴⁹ tato látka v kombinaci s monoklonálními protilátkami (bevacizumab a ranibizumab) pro kvalitnější terapii AMD. Tyto protilátky se váží na VEGF (cévní endoteliální růstový faktor), který produkuje nádor. VEGF působí na buňky cév, které pod jejím vlivem vytvářejí nové cévy směrem k nádoru. Působením těchto protilátek se nejprve cévní síť nádoru "normalizuje", což mimo jiné umožňuje lepší průnik protinádorových léků do nádoru. V dalším období znemožňuje vytváření nových cév, bez kterých se nádorovému ložisku nedostávají živiny a kyslík a růst nádoru je tak znemožněn. Dále se verteporfin v současné době testuje k léčbě maligního pleurálního mezoteliomu⁵¹.

Temoporfin (*m*THPC, Foscan[®])

Temoporfin (tetra(*meta*-hydroxyfenyl)chlorin, *m*THPC), zástupce skupiny chlorinů, byl syntetizován již v roce 1989 jako součást série porfyrinů, ze které se později ukázal být nejúčinnější⁵². Jeho absorpční maximum sice není příliš posunuté k červené oblasti (652 nm), avšak extinkční koeficient je při tomto maximu asi 10 krát vyšší než u HpD

($\epsilon_{652} = 22400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)⁴³. Pro dostatečný účinek jsou potřebné velice malé dávky jak PS (cca $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$) tak i světla, což ho činí přibližně 100 krát účinnějším než HpD. Tato vlastnost se dá vysvětlit pravděpodobně vysokým extinkčním koeficientem a dobrou produkcí singletového kyslíku.



temoporfin

Farmakokinetické parametry ovšem již nejsou tak pozitivní. Selektivita vychytávání mezi nádorovou a zdravou tkáň je poměrně malá (poměr nádorová/zdravá tkáň asi 1,3–2,9)⁵³ a jako optimální čas mezi injekčním podáním a ozářením se udává 4

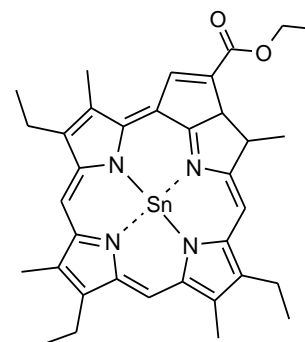
dny. Navíc jsou pacienti vystaveni poměrně dlouhé kožní fotosenzitivitě (cca 15 dní)⁵⁴.

I přes nepříznivé farmakokinetické parametry byl temoporfin jako přípravek Foscan[®] (Biolitec Pharma, Edinburgh, Velká Británie) v Evropě (EU, Norsko, Island) v říjnu roku 2001 zaveden k léčbě premaligních lézí oblastí hlavy a krku. Jiné indikace, v kterých se testuje temoporfin, jsou léčba vulvální intraepiteliální neoplazie⁵⁵, rakoviny slinivky⁵⁶, bazoluminálního karcinomu⁵⁷ a maligního pleurálního mezoteliomu⁵¹.

Rostaporfin (Photrex[®], Tin etiopurpurin, SnET2, Purlytin[®])

Také tato látka patřící do skupiny metalochlorinů (má uprostřed jádra chelatovaný kation cínu) má silné absorpční maximum (při 660 nm), avšak i přesto pro účinnou terapii jsou potřebné vysoké dávky světla (srovnatelné s HpD). Také kožní fotosenzitivita není oproti HpD výrazně snížena (přetrvává po dobu asi 10–14 dní po podání)³².

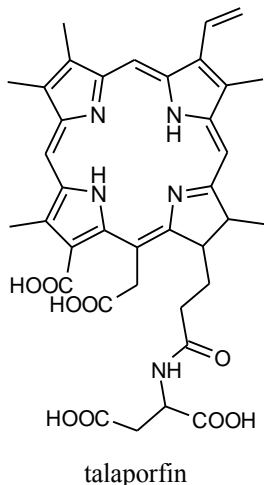
Zmíněný komplex rostaporfinu je pod obchodním názvem Photrex[®] testován firmou Miravant Medical Technologies (Santa Barbara, CA, USA) jako prostředek k léčbě AMD. V roce 2002 se nacházel ve druhé fázi klinických zkoušek pro léčbu Kaposiho sarkomu u pacientů s AIDS, ale tyto studie byly následně přerušeny pravděpodobně z finančních důvodů⁴⁹.



SnET2

Talaporfin (NPe6, MACE talaporfin sodium, Laserphyrin[®])

Talaporfin (mono N-aspartyl chlorin e6) je další ze syntetických chlorinů a také má silnou absorpci při vyšších vlnových délkách (664 nm, $\epsilon_{664} = 38000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Podobně jako verteporfin se z tkání rychle vylučuje a tak k ozáření dochází po 4 hodinách po intravenózní aplikaci¹⁴. V nízkých dávkách (jak světla, tak PS) se regrese nádoru projevila pouze krátkodobě, při vyšších dávkách byla regrese dlouhodobá, ovšem za cenu ztráty selektivity⁵⁸. Kožní fotosenzitivita byla označena jako „dočasná“⁵⁸.



V Japonsku (Meiji Seika Kaisha, Tokyo, Japonsko) je talaporfin pod názvem Laserphyrin[®] používán pro léčbu časného stadia rakoviny plic. V USA (Lightsciences, Snoqualmie, WA, USA) se tato látka nachází ve třetím stádiu klinických zkoušek pro léčbu hepatocelulárního a kolorektálního karcinomu a karcinomu mozkových gliomů⁵⁹.

Motexafin lutecium (Lutex, Optrin[®], Antrin[®], Lutrin[®])

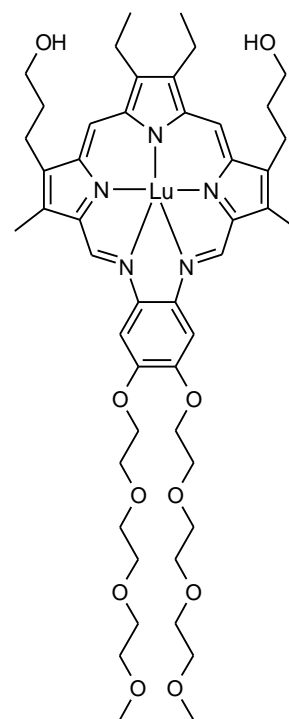
Motexafin lutecium patří již do jiné chemické skupiny než předchozí látky příbuzné porfyrinům. Jedná se o derivát texafyrinu (s charakteristickým pětidusíkatým makrocyclickým jádrem) s centrálně chelatovaným atomem lutecia. Mezi jeho velké výhody patří silná absorpce při dlouhé vlnové délce 732 nm a dobrá selektivita pro maligní tkáň. Je také rychle vylučován z krevní plasmy, k ozáření dochází po 3 hodinách po aplikaci a vyvíjí

se pouze slabá fotosenzitivita⁶⁰. Velice rychlá clearance tohoto PS z krevní plasmy umožňuje opakovanou PDT aplikaci, jež při pokusech na zvířatech vykazuje lepší odezvu než pouze jediná aplikace.

Vzhledem k dlouhé vlnové délce lze motexafin lutecium používat i u silně pigmentovaných nádorů (maligní melanom)⁶¹, skrze něž by světlo nižších vlnových délek (používaných k aktivaci předchozích PS) nepronikalo.

Mnohem více zájmu se však momentálně věnuje motexafin gadoliniu. Ten je pod názvem Xcytrin[®] testován na nejrůznější nádory mozku, ne Hodgkinovský lymfom, adenokarcinom a rakovinu plic⁴⁹. V těchto indikacích se kombinuje s dalšími cytostatiky, např. temozolomid, docetaxel, pemetrexed nebo ibritumomab tiuxetan. Atom gadolinia však dává molekule motexafinu poněkud jiné

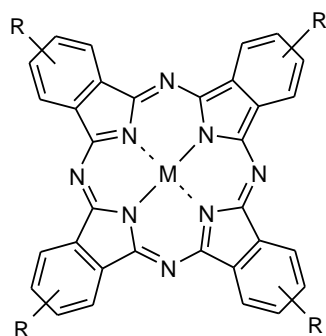
vlastnosti, takže se v tomto případě již nedá mluvit o klasickém fotosenzitizéru, ale o radiosenzitizéru, který je aktivován vysoko-energetickým rentgenovým zářením (radioterapie). Předpokládá se, že tento radiosenzitizér indukuje apoptózu a inhibuje enzym thioredoxin reduktázu, který je promotorem nádorového bujení. Proto se tato látka kombinuje s jinými cytostatiky – dochází k vzájemné potenciaci léčiv. Navíc je gadolinium paramagnetický kov, který je detekovatelný pomocí magnetické rezonance (MRI), což umožňuje jednoduchou vizualizaci léčiva v nádoru⁶².



motexafin lutecium

Ftalocyaniny

Ftalocyaniny (Pc) jsou další velice nadějnou skupinou PS. Jsou stejně jako porfyriny založeny na čtyřech pyrrolových jádrech, ovšem s tím rozdílem, že pyrrolové jednotky jsou spojeny přes dusík místo methinových můstků. Navíc jsou ke všem pyrrolovým jádrům přikondenzovány benzenové kruhy, což jednak posunuje maximální vlnovou délku absorpce



ftalocyaniny

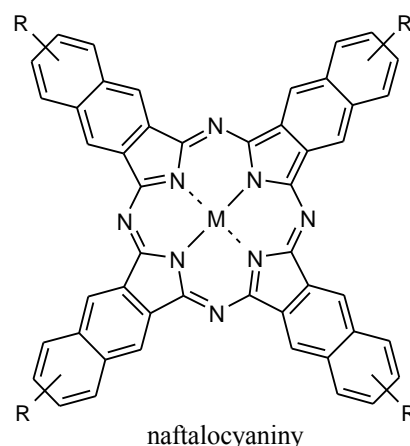
směrem k červené části spektra (670–700 nm) a jednak zesiluje absorpci při této vlnové délce (ϵ až $300000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). To je spolu s nepříliš obtížnou syntézou činí velice perspektivními PS do budoucnosti. Důležité pro vlastní PDT účinek je přítomnost chelátovaných centrálních kovů a polokovů, z nichž některé (diamagnetické) prodlužují trvání tripletového stavu PS a tím i zvyšují jeho účinnost v PDT (např. Zn, Al, Si).

Nevýhodou některých ftalocyaninů je jejich velice špatná rozpustnost nejen ve vodě, ale i v organických rozpouštědlech a z toho poté vyplývající problémy s aplikací. Příčinou této nevhodné vlastnosti je planární uspořádání benzenových jader v makrocyklu, které vede ke tvorbě agregátů, které se vyznačují velmi slabým fotodynamickým efektem. Toto lze ovšem překlenout např. modifikací na periferii nebo inkorporací do lipozómů.

Rozpustnosti ve vodě se daří dosáhnout například sulfonací, vzniká ovšem velice špatně separovatelná směs sulfonovaných produktů. Po získání jednotlivých frakcí u hlinitého komplexu ($M = Al-Cl$, $R = SO_3H$) ftalocyaninu byl sledován vliv počtu sulfonových skupin na jeho aktivitu. Bylo zjištěno, že disulfonované deriváty jsou nejúčinnější⁶³. Ovšem i směs derivátů se klinicky využívá – v Rusku se přípravkem Photosense[®] léčí rakovina prsu a premaligních lézí oblastí hlavy a krku^{64, 65} a momentálně se zkouší i v léčbě rakovinných lézí dutiny ústní⁶⁶.

Pc4 je zkratka pro křemičitý komplex ftalocyaninu ($R = H$, $M = Si(OH)-Si(CH_3)_2(CH_2)_3N(CH_3)_2$), jenž je zkoušen k léčbě kutánních a subkutánních lézí způsobených různými solidními nádory^{67, 68}.

Přidáním dalšího benzenového jádra na periferii ftalocyaninů vede k látkám typu naftalocyaninů. Tyto látky absorbují při velice dlouhých vlnových délkách (až 800 nm), čímž je zvýšena terapeutická hloubka, které může být dosaženo a lze tyto látky používat i pro vysoce pigmentované nádory jako např. melanom.

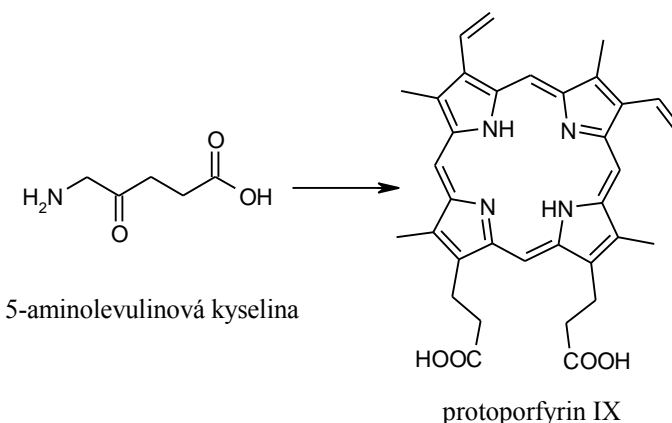


5-aminolevulinová kyselina (ALA, Levulan[®], Metvix[®], Hexvix[®], Benzvix[®])

Poněkud jiným přístupem v PDT je použití ALA. Jedná se o endogenní látku, která je součástí biosyntetické cesty hemu. Tato cesta je kontrolována negativní zpětnou vazbou, při které vyšší koncentrace hemu inhibuje konverzi glycinu a sukcinylkoenzymu A na ALA. Exogenní dodání ALA umožňuje obejít tento kontrolní mechanismus a dochází k syntéze protoporfyrinu IX (PpIX, obr. 10), který poté funguje jako účinný PS. Inkorporací atomu železa enzymem ferrochelatase vzniká přirozenou cestou z PpIX fotodynamicky neaktivní hem. Selektivita k nádorové tkáni a účinnost ALA je dána mnoha faktory, jež zahrnují např. zvýšenou permeabilitu abnormálního keratinu, zvýšené hladiny porfobilinogendeaminasy, snížené koncentrace železa a sníženou aktivitu ferrochelatasy (to zaručuje, že se PpIX nemění dále na neaktivní hem). Tyto faktory poté vedou ke kumulaci PpIX v postižené tkáni.

Na konci roku 2000 získala firma DUSA Pharmaceuticals (Toronto, Kanada) od FDA povolení k použití ALA k léčbě prekancerózy kůže – aktinoidní keratózy⁶⁹. Další aplikací, jež tato firma rozvíjí, je léčba akné (přípravek Levulan[®] Kerastick[®]).

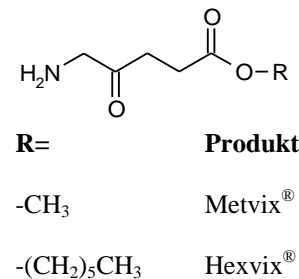
Vzhledem k nízké lipofilitě ALA se v terapii momentálně používají spíše její estery (firma PhotoCure, Oslo, Norsko), které lépe pronikají do tkání (zejména při aplikaci na kůži) a po hydrolýze uvolňují volnou ALA⁷⁰.



Obr. 10 Syntéza PpIX z kyseliny 5-aminolevulinové

Methyl ester kyseliny 5-aminolevulinové byl jako Metvix[®] zaveden v roce 2001 k léčbě aktinoidní keratózy a později také k léčbě karcinomu bazálních buněk kůže⁷¹. V této indikaci je k dispozici i v České republice ve formě krému. Další možné oblasti aplikace jsou léčba kontaktní dermatitidy⁷², akné⁷³⁻⁷⁵ a hojení ran⁷⁶. Momentálně probíhá druhá fáze klinického testování pro léčbu cervikální dysplazie⁴⁹.

Homologický hexyl ester kyseliny 5-aminolevulinové se jako Hexvix[®] používá pro fotodetekci rakoviny močového měchýře⁷⁰. Do močového měchýře se přibližně 60 minut před vyprázdněním aplikuje katetrem roztok Hexvixu[®], který se po hydrolýze na ALA kumuluje v rakovinových ložiscích. Po syntéze PpIX se močový měchýř ozáří modrým světlem, ložiska poté červeně fluoreskují. Tento zákrok se označuje jako Hexvix cystoskopie a zatím není licenčně schválen v mimoevropských zemích. Tato látka je také ve vývoji nejen pro detekci rakoviny močového měchýře, ale i k její léčbě⁷⁷.



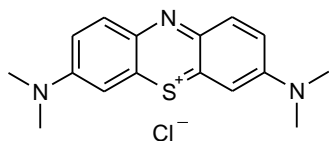
Další fotosenzitizéry

Výše zmíněné látky patří mezi hlavní, ovšem ne jediné PS, jež se používají nebo jsou ve stadiu klinických zkoušek. Ve výzkumu je řada dalších látek, ať již přírodního charakteru nebo syntetických, jež se vědci pokoušejí testovat na PDT a případně modifikovat některé jejich vlastnosti, aby odpovídaly nebo se alespoň blížily požadavkům na ideální PS. Patří sem mimo jiné i následující látky.

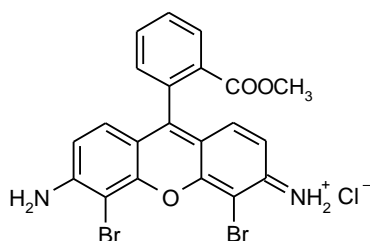
Methylénová modř – tento derivát fenothiazinu ($\lambda_{\max} = 668 \text{ nm}$, $\epsilon_{668} = 95000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) účinně inaktivuje extracelulárně přítomné viry a je prakticky netoxický pro člověka^{43, 78}. Její použití *in vivo* je ovšem limitováno redukcí enzymy přítomnými v buňkách na leukoformu, jež je fotodynamicky neaktivní. V Brazílii je tato látka dokonce testována pro léčbu Kaposiho sarkomu⁷⁹ a zkouší se i pro léčbu zánětu vedlejších dutin nosních⁸⁰.

Rhodaminy – Rhodaminy jsou v buňkách specificky vychytávány mitochondriemi a jsou vzhledem k vysoké produkci fluorescence využívány jako fluorescenční barviva, zejména deriváty tetramethylrhodaminu (obecně označovány jako TAMRA). Toho se využívá mimo jiné i k detekci účinnosti jiných PS^{81, 82}. Příliš intenzivní fluorescence je ovšem z hlediska PDT nevýhodná, protože PS poté nepřechází účinně ze svého S_1 do T_1 stavu, který je základem pro vlastní fotodynamický účinek. Tento problém lze alespoň z části vyřešit substitucí těžkými atomy (např. bromem), které zvyšují účinnost přechodu $S_1 \rightarrow T_1$ a také posouvají absorpční maximum mírně směrem k červené oblasti. Tento posun je pro rhodaminy, mající bez substituce maximum při asi 500 nm, velice důležitý. I přes tyto nevýhody se bromovaný analog TH 9402 používá v autotransplantační léčbě chronické myeloidní leukémie (technologie TheraluxTM)⁸³. Při tomto procesu, který probíhá *ex vivo*, dochází ke zničení nemocných buněk kostní dřeně, normální zdravé buňky přežívají a jsou poté použity k autotransplantaci.

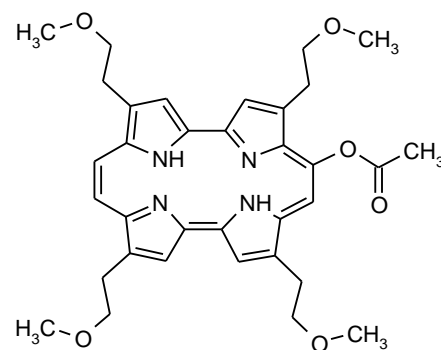
Porfyceny – jejich absorpční maximum se pohybuje v oblasti 600–650 nm. Modifikací na periferii lze dosáhnout velice dobrých farmakokinetických vlastností a derivát se čtyřmi β -methoxyethylovými skupinami, jež urychlují vstup do buňky, a jednou acetoxy skupinou zvyšující hydrofilitu (9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(β -methoxyethyl)-porfycen, ATMPn ($\lambda_{\max} = 630 \text{ nm}$, $\epsilon_{630} = 52000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)) patří mezi nejrychleji vychytávané PS v *in vitro* studiích vůbec. Látka se aplikuje pouze topicky pro terapii některých kožních onemocnění (psoriáza, nemelanotický karcinom kůže)^{84, 85}.



methylénová modř



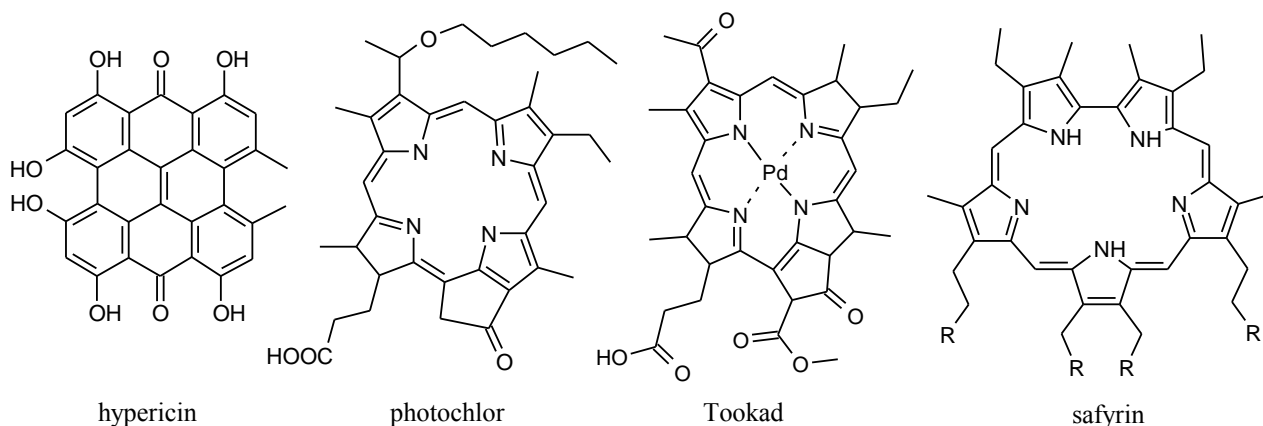
TH 9402



porfycen (ATMPn)

Hypericin – o této přírodní látce ($\lambda_{\max} = 590 \text{ nm}$, $\epsilon_{590} = 44000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) se ví, že funguje jako účinný PS, poněvadž způsobuje hypericismus (vede ke kožnímu dráždění a zvýšeným teplotám po ozáření) u zvířat konzumujících větší množství rostlin s obsahem této látky. Používá se ke sterilizaci krevních preparátů, jako diagnostikum při fluorescenční detekci nádorových tkání a k léčbě povrchových nádorů⁸⁶.

Photochlor – patří opět do skupiny chlorinů, přesněji se jedná o derivát feoforbidu-a. Analogy feoforbidu-a jsou obecně aktivnější než podobné látky ze skupiny chlorinů-e₆ (např. talaporfin)⁸⁷. Photochlor je hexylether feoforbidu-a (HPPH) ($\lambda_{\max} = 665 \text{ nm}$, $\epsilon_{665} = 50000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a je vysoce selektivní k nádorové tkáni se současně nižší kožní fototoxicitou než HpD^{88, 89}. Zkouší se k léčbě maligních gliomů⁹⁰ a karcinomu skvamózních buněk kůže⁹¹. Odvozenou strukturou je Pd-bakteriofeoforbid (WST09), který se pod označením **Tookad**[®] (hebrejské slovo znamenající „vroucnost světla“) nachází ve třetím stádiu klinického testování pro léčbu rakoviny prostaty⁹².



Safyryny – patří do skupiny expandovaných porfyrinů (podobně jako texafyryny). Jejich základní makrocyklus na rozdíl od porfyrinů obsahuje pět pyrrolických jader, přičemž dvě z nich jsou spojena přímo. Absorbují světlo v oblastech okolo 675 nm. Při pokusech na myších vykazovaly některé látky vysoký poměr rozdělení PS mezi nádorovou a okolní svalovou tkání (nejlepší látka měla tento poměr až 280), ovšem hodnoty maximální koncentrace v tumorózní tkáni byly naměřeny až po 3–6 dnech po aplikaci⁹³.

2.4. Targeting fotosenzitizérů

Jak již bylo zmíněno výše, PS jsou schopné se do určité míry selektivně hromadit v cílových místech (většinou nádorová tkáň). Avšak tato selektivita bývá velice nízká a poměr mezi koncentrací PS v nádorových a zdravých tkáních je často velice nízký. Zvýšením tohoto

oměru lze dosáhnout nejen snížení toxicity, nýbrž i zlepšení odpovědi na terapii vzhledem k tomu, že je poté PS v cílových strukturách obsažen ve vyšších koncentracích.

Jedním z přístupů k řešení tohoto problému je syntéza nových PS, u nichž by zvýšená selektivita byla již vlastností samotné molekuly PS. Takové látky se ovšem logicky hledají poměrně špatně a nemusejí být vždy výhodné i z ostatních hledisek potřebných pro PDT (např. produkce singletového kyslíku, absorpční spektrum, ...).

Mnohem výhodnější je použití již vyzkoušených a osvědčených PS a snaha zlepšit různými způsoby jejich farmakokinetické vlastnosti. A proto se některé PS aplikují v různých aplikačních formách zlepšujících jejich farmakokinetiku (lipozómy, olejové disperze, a další) nebo se připravují tzv. „fotosenzitizéry třetí generace“ (viz dále). V tomto případě se nejedná o nové struktury PS, ale látky generace druhé se kovalentně váží k menším biologicky aktivním molekulám (např. steroidy, monoklonální protilátky, atd.) nebo syntetickým polymerům (polyethylenglykol) a můžeme zde poté již hovořit o cílené biodistribuci.

2.4.1. Pasivní targeting

Vzhledem k tomu, že lipozómy, olejové disperze, biodegradabilní polymerní částice a konjugáty PS s hydrofilními polymery využívají k cílení přirozené distribuční mechanismy (pasivní difúze, fagocytóza), lze u nich hovořit o „pasivně cílené biodistribuci“. Existují studie⁹⁴ ukazující, že za selektivnější distribuce těchto „přenašečů“ do cílových nádorových tkání je zodpovědná nejspíše zvýšená cévní permeabilita, nekompletní endoteliální bariéra a snížená lymfatická drenáž způsobená nižším rozvinutím lymfatického systému a jeho obstrukcí. Dochází tím pádem k jednoduchému fyzikálnímu procesu zvýšené filtrace těchto velkých částic skrz cévní stěnu v poškozených oblastech. K efektu přispívá i snížené množství lymfatických cév za normálních okolností odstraňujících zvýšenou exsudaci tekutiny mimo cévy.

Mnoho účinných PS je příliš hydrofobních a nerozpustných ve vodném médiu. Pro jejich aplikaci je nezbytné použití nosičových systémů, aby se zabránilo agregaci PS v krevním systému a aby byla možná extravazace účinné látky. Také již bylo uvedeno, že výběr nosiče může ovlivnit nádorovou selektivitu PS⁹⁵. Woodburn a kol. objasnili, že deriváty ricinového oleje (Cremophor EL), které byly použity jako rozpouštědlo, mění profil lipoproteinů⁹⁶ a mohou ovlivňovat biodistribuci PS a účinnost nádorové terapie⁹⁷. Jinou metodou je enkapsulace do lipozomů. Lipozomální PS se po podání účinněji přenáší na LDL lipoproteiny než po aplikaci ve vodném médiu⁹⁸ a v *in vivo* testech ukázaly výhody jak v

biodistribuci tak v destrukci nádorové tkáně oproti ne-lipozomálním nosičům⁹⁹⁻¹⁰¹.

Pro enkapsulaci PS se používají nejrůznější druhy lipozomů¹⁰², např. ultradeformační lipozomy (UDL)¹⁰³, pH senzitivní lipozomy¹⁰⁴ nebo magnetické lipozomy¹⁰⁵ a další. V případě magnetických lipozomů se však již jedná spíše o aktivní targeting (viz níže). Pro enkapsulaci se používají také různé druhy polymerů, zejména Pluronic[®] (kopolymer ethylenoxidu a propylenoxidu), polyethylenglykol (PEG), poly N-isopropylacrylamid nebo polyionické micely¹⁰⁶. V jiných testech se jako nosiče PS používaly PEGem potahované nanočástice¹⁰⁷, multifunkční nanočástice¹⁰⁸ albuminové mikrosféry¹⁰⁹ nebo nanoemulze¹¹⁰.

Jiným postupem je pre-komplexace s různými sérovými proteiny, nejčastěji však s LDL. A to ze dvou důvodů. Za prvé funguje hydrofobní jádro LDL částic jako solubilizační medium pro hydrofobní PS podobně jako lipozomy nebo Cremophor a za druhé má vyšší nádorovou kumulaci.

2.4.2. Aktivní targeting

Pro selektivní distribuci do nádorové tkáně se připravují konjugáty obsahující PS a část zasahující cíleně některé receptory. Tyto konjugáty se obecně nazývají fotosenzitizéry třetí generace. Teoreticky má tento přístup několik výhod:

- Vysokou afinitu k receptoru nebo antigenu na povrchu cílových struktur.
- Přímou a specifitější lokalizaci se zvýšenou účinností a selektivitou.
- Nižší efektivní dávku PS.

Monoklonální protilátky

Je známo, že existují charakteristické rozdíly mezi zdravými a nádorovými buňkami v expresi některých antigenů nebo onkoproteinů. Konjugáty PS s monoklonálními protilátkami (angl. monoclonal antibody, MAb) jsou velmi perspektivními nástroji vysoce specifické distribuce PS¹¹¹. Vzhledem ke své cílené biodistribuci, vykazují v některých studiích kvalitní fotodynamické efekty již v koncentracích, při kterých vodné roztoky nebo suspenze PS nevykazují žádnou aktivitu¹¹². Problémem u konjugátů, kde je PS vázaný na MAb přímo¹¹², je postupná ztráta aktivity a afinity k antigenu při zvyšujícím se počtu jednotek PS vázaných na jednu MAb. Molekula PS totiž způsobuje změny ve fyzikálně chemických vlastnostech MAb, což se při větším počtu PS již výrazně odrazí na aktivitě. Dalším problémem je, že často při přípravě dochází k vazbě PS spíše nekovalentně do hydrofobních kapes proteinu MAb než kovalentně²¹, což se pak projeví uvolněním léčiva po

aplikaci do živého organismu. Možností jak tyto problémy (spíše s množstvím PS než se syntézou) obejít je navázat PS na MAb přes polymerní nosič¹¹³ (dextran, polyglutamová kyselina, polyvinylalkohol, poly-L-lysin), který poté umožňuje nést velké množství molekul PS bez ztráty výhodných vlastností MAb. Jinou metodou je použití micelárních nosičových systémů¹¹⁴ nebo nanočástic¹¹⁵, na něž se naváže MAb (často větší počet). Mezi nejčastější proteiny a protilátky, které se váží buď přímo kovalentně na PS nebo na povrch lipozómů, patří epidermální růstový faktor¹¹⁶, VEGF (cévní endoteliální růstový faktor)¹¹⁷, interleukiny¹¹⁸ a mnoho dalších specifických markerů¹¹⁹ a oligopeptidů¹²⁰. V tomto směru se již mluví o fotoimunoterapii (PIT), tedy o transportu PS pomocí monoklonálních protilátek přímo na místo určení¹²¹ a tyto látky se označují jako fotoimunokonjugáty¹²². V některých experimentech se dokonce používají při konjugaci pouze fragmenty rekombinantních protilátek (single chain variable fragments, scFv)¹²³.

Další ligandy

Zvýšení fotodynamické aktivity a snížení dávky PS potřebné pro úspěšnou terapii lze dosáhnout vazbou i na jiné ligandy než jsou MAb. Mezi studované látky patří např. insulin¹²⁴, transferrin¹²⁵ nebo kyseliny listová^{126, 127}. V některých případech se PS konjugují s alifatickými aminy (spermidin, spermin)^{128, 129} nebo se PS přímo glukosylují¹³⁰, případně se na ně váží jiné cukerné zbytky¹³¹.

Mezi další ligandy lze zařadit steroidy. Výzkum těchto ligandů se ubíral dvěma směry. Zprvce to jsou konjugáty s cholesterolem¹³², jež by měly následně vysokou afinitu k LDL, ukládaly by se do nich a vychytávaly v místech zvýšené exprimace LDL receptorů. Druhý přístup vychází z předpokladu, že konjugáty PS s pohlavními steroidními hormony (estradiol, estron, progesteron) budou mít vyšší afinitu k buňkám exprimujícím ve zvýšené míře steroidní receptory, jako např. buňky rakoviny prsu^{21, 133}. Obsáhlý souhrn aktuálně připravených kovalentních konjugátů ftalocyaninů s biomolekulami je podrobně zpracován v práci Taqueta a kol¹³⁴.

PS se mohou stát také vhodným doplňkem k „antisense“ nebo „antigene“ terapii. Při těchto metodách genové terapie se jedná o použití oligonukleotidů, jež po vazbě na RNA (antisense) nebo DNA (antigene) vytvářejí s nativní nukleovou kyselinou špatně rozpojitelné duplexy (s RNA) nebo triplexy (s DNA) a brání expresi vybraných cílových genů¹³⁵. Napojení PS na dané oligonukleotidy poté výrazně zvyšuje selektivitu zásahu PDT a přináší nové možnosti genové terapie¹³⁶.

Jako aktivně cílenou distribuci lze považovat i tzv. magnetický targeting. Molekula

léčiva, v našem případě PS, se naváže na magnetický nosič a aplikuje se do těla. Na cílovou oblast se přiloží permanentní magnet a tyto nosiče se vlivem magnetické síly v tomto místě kumulují^{137, 138}.

PS jako nosiče nuklidů

Zvýšenou akumulaci tetrapyrrolických PS v nádoru je možné využít jako transportní mechanismus specifických nuklidů. Tato strategie zahrnuje kovalentní vázání izotopu na PS (radioizotopový chelátor). Tento komplex následně slouží jak k detekci, tak k terapii nádoru. Způsob zobrazování nádoru a metastází, kdy se používají radionuklidy emitující gama záření, využívá například metoda SPECT (single photon emission computed tomography)¹³⁹. Je zřejmé, že použití nosiče chelatujícího radionuklid (v našem případě PS), který se selektivně kumuluje v nádorové tkáni, může výrazně zlepšit kvalitu této metody.

Na podobném principu se mohou PS využívat jako transportéry boru (zvláště do mozkových tumorů). Akumulovaný bor se ozáří paprskem neutronů, následnou reakcí vznikají reaktivní alfa částice (jádra atomů helia) a lithiové atomy s vysokou energií, které způsobí destrukci nádoru¹⁴⁰. V principu ta samá sloučenina (PS s chelatovaným atomem boru) může reagovat jak s viditelným zářením, tak i s neutronovými paprsky a způsobovat smrt buňky.

2.5. Distribuce fotosenzitizérů

2.5.1. Subcelulární lokalizace

Vychytávání PS nádorovou tkání a dalšími tkáněmi má rozhodující význam pro výsledný efekt PDT. ROS mají velmi krátkou životnost a působí tedy jen v bezprostřední oblasti svého vzniku. Proto spolehlivá fotodestrukce buněk závisí na přesné subcelulární lokalizaci PS v buněčných kompartmentech. Správné pochopení mechanismu této lokalizace je značně důležité při výběru nejvhodnějšího PS při každé aplikaci. Použití konfokálního laserového řádkovacího fluorescenčního mikroskopu podstatně zjednodušilo intracelulární lokalizaci PS a výrazně zvýšilo citlivost a prostorové rozlišení než dříve používané nekofokální metody. Distribuce specifických subcelulárních sond s různými fluorescenčními maximy konkrétních PS může výrazně konkretizovat místo výskytu¹⁴¹ a tyto sondy mohou navíc sloužit i jako detekce poškozených míst vzniklých ozářeními PS¹⁴².

Intracelulární distribuce byla zkoumána na velkém množství PS s velmi rozdílnými strukturálními parametry. Distribuci nejvýznamněji ovlivňují tyto strukturální znaky:

- Celkový náboj PS, který se pohybuje v rozmezí od -IV (aniont) do +IV(kationt)
- Stupeň hydrofobicity, nejčastěji vyjádřený logaritmem rozdělovacího koeficientu v soustavě oktanol/voda
- Stupeň asymetrie v molekule PS

Hydrofobní PS, které mají méně než dva záporné náboje, mohou procházet plazmatickou membránou a tak se přemísťovat do jiných intracelulárních membrán. Tyto PS jsou nejvíce vychytávány buňkami *in vitro*, zvláště když jsou přítomny v médiu v relativně nízkých koncentracích (< 1 μ M). Méně hydrofobní PS, které mají více jak dva negativní náboje jsou příliš polární a jsou vychytávány endocytózou. Některé PS se intenzivně distribuují do různých intracelulárních membrán. Příkladem může být pyrofeoforbid – methyl ester, který byl lokalizován v endoplazmatickém retikulu, Golgiho aparátu, v lysozomech a mitochondriích¹⁴³.

Lysozomy

Do roku 1993 se obecně předpokládalo, že lysozomy jsou nejdůležitější intracelulární oblastí pro vychytávání PS¹⁴⁴. Nicméně následující studie¹⁴⁵ prokázaly, že ačkoliv

lysozomálně vázaný PS může způsobit po ozáření smrt buňky, relativní účinnost je signifikantně nižší než u PS lokalizovaných v mitochondriích nebo jiných organelách¹⁴⁶. Jako vysvětlení se používá fakt, že v lysozomech se hromadí zejména PS s vyšším stupněm agregace (a tedy i výrazně nižší fotodynamickou účinností).

Woodburn a kol.¹⁴⁷ studovali intracelulární lokalizaci u série porfyrinů odvozených od HpD a Protoporfyrinu IX s modifikovanými postranními řetězci (hydrofobní, anionické a kationické) při fyziologickém pH. Experiment provedli na buňkách čínské křečka – na plicních fibroblastech a buňkách gliomu. Testované sloučeniny byly vybrány tak, aby reprezentovaly všechny možné kombinace výše zmíněných modifikací. Bylo zjištěno, že kationické PS se kumulovaly zejména v mitochondriích, anionické (s nábojem -2 a více) naopak v lysozomech.

Na tomto principu funguje metoda nazývaná fotochemická internalizace (PCI), kterou poprvé použil Berg a kol.¹⁴⁸. Mechanismus spočívá v ko-inkubaci buněk s makromolekulou, kterou chceme transportovat do buněčné cytoplazmy, a s PS (např. disulfonovaný ftalocyanin). Testovaná makromolekula se inkorporuje klasicky do lysozomů, použitý PS se naopak kumuluje zejména v lysozomální membráně. V závislosti na vhodné dávce ozáření dochází k prasknutí lysozomální membrány vlivem fotochemického efektu kumulovaného PS a k uvolnění testované látky z lysozomů do cytoplazmy. Tato technika se používá pro zvýšení intracelulárního transportu genů¹⁴⁹, virů¹⁵⁰, nukleových kyselin¹⁵¹ a ribozom-inaktivujících enzymů¹⁵².

Počáteční množství PS v lysozomech se však může následně redistribuovat díky minimální světelné expozici. Bylo zjištěno, že v buňkách preinkubovaných s anionickým porfyrinem po ozáření, které inaktivovalo zhruba 20 % buněk, došlo k relokaci PS z lysozomu do cytoplazmy a zejména do jádra^{153, 154}.

Jiným postupem je dodávání PS kovalentně vázaného na nosič, který specificky interaguje s buněčnými receptory. Touto metodou je možno získat maximálně specifickou fluorescenci lysozomů¹⁵⁵.

Mitochondrie

Mitochondrie se ukázaly jako velmi důležité subcelulární cíle pro velké množství PS¹⁵⁶. Je to spojeno zejména s tendencí těchto PS způsobovat po ozáření apoptózu pomocí destrukce mitochondrií. Benzoporfyrinové deriváty (BPD) jsou jedny z nejlépe prostudovaných PS, které se intenzivně kumulují právě v těchto organelách, nicméně nesmíme zapomenout na to, že tato kumulace záleží nejen na typu buňky, ale i na formulaci

BPD (volné BPD nebo inkorporované do lipozómů, popř. do polykationicky enkapsulovaných lipozómů). Některé endoteliální buňky akumulují BPD preferenčně v perinukleárních oblastech, jiné typy buněk spíše v cytoplazmě. BPD uzavřené v polykationických lipozómech se koncentrují zejména v mitochondriích, naopak volné BPD byly nalezeny zejména v perinukleárních oblastech^{157, 158}.

Na důležitost symetrie PS poukázal Kessel a kol.¹⁵⁹. Pro experiment použil izomerní porfyrinové PS se 2 kationickými skupinami. U prvního izomeru byly tyto skupiny v molekule v protilehlém postavení (tzv. „opposite“), u druhého izomeru v sousedním postavení (tzv. „adjacent“). Sloučenina s kationickými substituenty v sousedním postavení se kumulovala v mitochondriích, izomerní látka se substituenty v protilehlém postavení naopak v lysozomech.

Obecně tedy platí, že PS s kladným nábojem, které jsou zároveň částečně hydrofobní, jsou nejvíce lokalizovány v mitochondriích¹⁶⁰. Předpokládá se, že tato lokalizace je způsobena mitochondriálním membránovým potenciálem a přítomností lipidové dvouvrstvy¹⁶¹. Po ozáření dochází k narušení mitochondriálních přepážek (krist), inhibici buněčného dýchání a blokování metabolismu.

Plazmatická membrána

Fotodynamicky aktivní látky vyskytující se v plazmatické membráně jsou v PDT poměrně vzácné. Aveline a kol.¹⁶² za použití konfokálního fluorescenčního mikroskopu potvrdili zvýšenou kumulaci monobrom a dibrom derivátů deuteroporfyrinu IX v plazmatické membráně. Zajímavých výsledků bylo dosaženo i s Photofrinem[®], který vykazuje podobnou dynamickou distribuci do lidských rakovinných buněk. Po krátké inkubaci (3 h) se kumuloval hlavně v plazmatické membráně, po delším čase (24 h) byla jeho koncentrace největší v Golgiho aparátu¹⁶³. V plazmatické membráně lokalizovaný Photofrinem[®] způsoboval v nižších dávkách (7 µg/ml) přerušování proliferace, ve vyšších (28 µg/ml) praskání membrány a bobtnání buněk. Ale typické charakteristiky apoptózy, jako externalizace fosfatidylserinu a fragmentace DNA nebyly pozorovány.

Golgiho aparát a endoplazmatické retikulum

Teiten a kol.¹⁶⁴ zkoumali subcelulární lokalizaci Foscanu[®] v buňkách lidského adenokarcinomu za použití konfokálního mikroskopu a mikrospektrofluorometrie. Tato látka vykazovala slabou kumulaci v lysozomech a mitochondriích na rozdíl od Golgiho aparátu a endoplazmatického retikula, kde intenzivní fluorescence potvrdila dominantní lokalizaci.

Enzymatická aktivita v těchto organelách bezprostředně po ozáření potvrdila, že primární poškození těchto kompartmentů je hlavním mechanismem účinku Foscanu[®].

2.5.2. Orgánová distribuce

Na experimentálních zvířatech byl vytvořen model orgánové distribuce PS po intravenózním podání. Ve studii¹⁶⁵ za použití radioizotopem značeného Photofrinu[®] aplikovaném na myších s podkožním fibrosarkomem se ukázalo, že po 24-ti hodinách byly nejvyšší koncentrace v játrech, nadledvinách a močovém měchýři, o něco menší koncentrace byla ve slinivce, ledvinách a slezině, ještě menší množství bylo nalezeno v kostech, svalech, žaludku, srdci a plicích a vůbec nejmenší koncentraci vykazoval mozek. Pouze kosterní svalstvo, mozek a kůže obsahovaly nižší koncentraci PS v porovnání s nádorovou tkání – obal nádoru vykazoval podobné koncentrace jako vlastní nádorová tkáň. Játra a slezina zadržovaly výše molekulární komponenty Photofrinu[®] po dobu až 75-ti dní po injekční aplikaci. Ve většině experimentů, které byly provedeny na malých zvířatech, zejména myších a potkanech, se ukázalo, že nejvyšší koncentrace dosahují PS v játrech¹⁶⁶. Chan a kol.¹⁶⁷ prokázali na sérii sulfonovaných ftalocyaninů, že jejich kumulace v játrech je nepřímě úměrná jejich stupni sulfonace a tedy lipofilitě molekuly PS. Játra jsou známy svým propustným fenestrovaným endoteliem, jehož póry dovolují snadno procházet molekulám z krevního řečiště. Tento mechanismus je nezbytný pro detoxifikaci těla a odstraňování cizích látek (zejména organických sloučenin jako např. PS). Tyto látky jsou vylučovány do žluče přes žlučový měchýř a vedeny do duodena, kde se mohou jako nezměněné substance buď vracet enterohepatálním oběhem zpět do organismu, nebo se vylučovat z těla ve formě stolice.

Je známo, že bezprostředně po injekčním podání se velké množství PS kumuluje v plicích. Studie na myších¹⁶⁸ ukázaly, že překročení určitého množství PS (dávku limitující toxicita) způsobuje krvácení a akutní intersticiální pneumonii. Předpokládá se, že větší množství PS může v krevním řečišti vytvářet agregáty, které se následně hromadí v jemném kapilárním systému plic. Naopak kumulace PS ve slezině je silně závislá na struktuře PS (náboj a lipofilita). Woodburn a kol.¹⁶⁹ testovali množství porfyrinů s různými rozdělovacími koeficienty (oktanol/voda) a zjistili, že kumulace těchto sloučenin ve slezině kolísá mnohem více než v ostatních orgánech. Ledviny a močový měchýř akumulují vysoká množství PS navzdory tomu, že odstraňování PS probíhá téměř výhradně přes játra a žluč⁵⁰. Trávicí orgány (žaludek, tenké a tlusté střevo) obsahují zhruba průměrné množství PS (tj. méně než játra, ale více než například kosterní svalstvo)¹⁷⁰. Navzdory kožní fotosenzitivitě, která je považována

za jeden z nejdůležitějších vedlejších účinků PDT, obsahuje pokožka poměrně nízké množství PS. Nejméně se PS koncentrují v srdci, kosterním svalstvu, kostech, očích a mozku, tj. v orgánech, které jsou obecně považovány za méně prokrvené. Hematoencefalická bariéra brání proniknutí PS do mozkové parenchymatické tkáně, nicméně při jejím porušení, např. růstem nádoru, dochází k výrazné kumulaci PS v nádorové tkáni (často více než 100 násobek oproti zdravé mozkové tkáni)¹⁴.

2.5.3. Nádorová lokalizace

Ačkoliv je to již více než padesát let, kdy byla poprvé zkoumána lokalizace PS v nádorové tkáni po injekční aplikaci⁵, kompletní mechanismus ještě stále není zcela vysvětlen¹⁷¹. Na složitosti celého problému se podílejí zejména rozdílné struktury PS, odlišné nádorové modely a také variabilita podaného množství PS a intervalu detekce po aplikaci¹⁴.

Struktura PS

Jak již bylo zmíněno výše, různé PS mají odlišnou farmakokinetiku a biodistribuci. Až na malé výjimky (např. uroporfyrin) se všechny tetrapyrrolické PS pevně váží na sérové proteiny. Podle tohoto kritéria je můžeme rozdělit do třech skupin:

1. Relativně hydrofilní sloučeniny, které jsou primárně vázány na albumin.
2. Amfifilní, nesymetrické sloučeniny, které se ukládají do vnější fosfolipidové a apoproteinové vrstvy lipoproteinových částic.
3. Hydrofobní sloučeniny, které vyžadují solubilizační média jako např. lipozomy, Tween 80 nebo Cremophor, se ukládají do vnitřního lipidového jádra lipoproteinů, zejména do LDL.

Nádor lokalizující fotosenzitizéry

Od doby, kdy byla poprvé objevena schopnost HpD kumulovat se v nádorech, mnoho badatelů zkoumalo mechanismy, podle kterých se PS přednostně kumulují v nádorové tkáni a jiných specifických orgánech^{14, 171-174}. Nicméně přesné parametry chemické struktury PS, které jsou příčinou jejich odlišné koncentrace v různých tkáních, jsou stále předmětem mnoha debat. Celý problém je navíc komplikován tím, že farmakokinetika vlastních PS může extrémně kolísat. Například jeden PS může dosáhnout nejlepší poměr v nádoru vůči zdravé tkáni za několik hodin, zatímco jiný PS může tento poměr dosáhnout třeba až za týden po injekční aplikaci. Jedna z důležitých vlastností tetrapyrrolických PS určující rychlost dosažení

tohoto poměru, je jejich tendence se silně vázat na sérové proteiny nebo vytvářet agregáty mezi sebou. To znamená, že PS se v krevním řečišti chovají jako velké makromolekuly buď z důvodu více či méně pevné vazby k velkým proteinovým molekulám nebo z důvodu vytvoření agregátů podobné velikosti. Nejčastěji dělíme tyto proteiny do 4 skupin: albumin a ostatní velké bílkoviny, HDL, LDL a VLDL. V tomto směru bylo provedeno mnoho experimentů¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. Tyto výsledky jsou však dost komplikované, jelikož lipofilní PS nerozpustné ve vodném mediu se aplikují v různých směsích rozpouštědel a nosičů, které mohou měnit distribuci PS. Některé studie uvádí, že PS, které se preferenčně váží na LDL, mají lepší lokalizaci v nádorech než jiné¹⁷⁴.

Je užitečné také zmínit, že existuje velký rozdíl mezi selektivní akumulací a selektivní retencí. Při akumulaci PS s rychlou farmakokinetikou se předpokládá, že dochází k selektivní akumulaci v nádoru, zatímco u PS s pomalou farmakokinetikou se předpokládá, že dochází k selektivní retenci, neboli záchytu v nádoru. Selektivní akumulace probíhá při zvýšené vaskulární permeabilitě, která je typická pro nádorovou tkáň a odpovědná za rychlejší extravazaci PS. Tímto mechanismem se distribuují rychle účinkující PS často vázané na albumin, které při optimální velikosti prostupují skrz póry v endotelu nádorových kapilár¹⁷⁸. Jak již bylo zmíněno výše, vazba PS na LDL se považuje za velmi důležitou¹⁷⁴. Příčinou této teorie je předpoklad, že některé druhy nádorů (zvláště rychle bující) obsahují poměrně vysoké množství LDL receptorů, které potřebují pro vyšší přísun cholesterolu, z něhož biosyntézou vytváří lipidy nezbytné pro intenzivní růst buněčných membrán. Nicméně experimenty hovoří nejen pro, ale i proti této teorii¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Selektivní retence je předmětem mnoha spekulací. Jedna z teorií uvádí, že nádory mají špatně vyvinutou lymfatickou drenáž, a proto zde makromolekuly PS zůstávají zadržovány¹⁸¹. Jiná teorie předpokládá, že tato retence je způsobena makrofágy, které kumulují PS a přenášejí je do nádoru¹⁸². U těchto makrofágů byla pozorována až 13-ti násobná kumulace PS v porovnání s rakovinnou tkání. Jako vysvětlení se uvádí buď to, že makrofágy fagocytovaly agregáty PS¹⁸³ nebo fagocytovaly preferenčně lipoproteiny, které byly pozměněny vazbou s PS¹⁷¹. Je známo, že nádorová tkáň má obecně nižší pH. Jak předpokládá další teorie, anionické PS, které jsou při normálním pH ionizované, se stávají v nádoru neutrálními a tedy i lipofilnějšími a jsou zde zadržovány¹⁸⁴.

Některé experimenty dokonce naznačují, že benzodiazepinové receptory lokalizované na vnitřní mitochondriální membráně jsou odpovědné za vazbu porfyrinových PS, které se akumulují v mitochondriích^{185, 186}. Jiné vysvětlení tohoto jevu předpokládá, že některá barviva (např. Rhodamine 123) využívají při mitochondriální kumulaci rozdílných membránových potenciálů ve zdravých a nádorových buňkách^{187, 188}.

Jiná strategie využívající zvýšenou selektivitu PS k nádoru, je zobrazovací metoda, při které PS chelatuje paramagnetický atom, který je detekován magnetickou rezonancí^{189, 190}.

2.6. Biologická odpověď

Na konečném zničení nádoru se nepodílí, jak se zpočátku předpokládalo, pouze destrukce každé jednotlivé buňky, která akumulovala dostatečné množství PS a byla ozářena dostatečným množstvím světla potřebného k produkci ROS. Celkový PDT efekt je výsledkem spolupůsobení několika mechanismů. V současnosti se předpokládají tři hlavní mechanismy, které umožňují krátkodobou i dlouhodobou kontrolu nádoru a podílí se na jeho konečném zničení. PDT pomocí ROS ničí buď přímo maligní buňky v nádoru, způsobuje změny v cévním zásobování nádorové tkáně nebo díky cytokinům a dalším mediátorům zánětu uvolněným z napadených buněk vede k aktivaci imunitního systému. Obecně se dá říct, že hydrofobní PS působí spíše přímým efektem na buňky, naopak hydrofilní PS poškozují spíše cévy a brání tak přísunu živin. Jednotlivé složky ovšem nelze od sebe navzájem oddělovat a výsledek je vždy kombinací všech faktorů, jejichž vliv se mění v závislosti na použitém PS, typu nádoru a způsobu ozáření (obr. 11)¹⁹¹.

2.6.1. Přímý efekt

Přímá cytotoxicita je výsledkem inkorporace PS do buňky a účinků následně produkovaných ROS, přičemž lipofilní PS se vesměs váží na membrány a vykazují svůj efekt přímo fotoperoxidací a poškozením samotné membrány nebo inaktivací enzymů v ní vázaných. Na druhou stranu hydrofilní PS se kumulují v lysozómech, kde poškození těchto organel vede k uvolnění hydrolytických enzymů a kaskádě následných dějů vedoucích ke smrti buňky⁶⁰.

V procesu usmrcení nádorových buněk se kromě nekrózy uplatňuje také apoptóza. Nekróza zahrnuje procesy nevyžadující energii ve formě ATP (např. osmotické bobtnání) a uplatňuje se při rozsáhlejší poškození buňky. Na druhou stranu apoptóza je zprostředkována procesy vyžadujícími ATP (např. aktivace kaspas) a k tomuto způsobu smrti vedou subletální poškození buňky umožňující ještě produkci ATP. Buňka v tomto případě dostává jakýsi signál o tom, že má zemřít. Mechanismus obou procesů je složitý, zahrnující aktivaci velkého množství enzymů a „druhých posílů“ a závisí, jak již bylo naznačeno výše, na použitém PS, typu nádoru a způsobu ozáření^{32, 192}.

Vzhledem k tomu, že kyslík je důležitou součástí fotodynamického efektu, je jednou z limitujících vlastností pro přímé poškození buněk jeho dostatečný přísun do ničených tkání. Lokální nedostatek kyslíku může být způsoben jeho rychlým spotřebováním během fotochemických reakcí nebo se zde může projevit efekt sníženého krevního zásobení po uzavření cév. I když tento druhý efekt výrazně přispívá k dlouhodobé kontrole nádoru, může v první fázi omezovat biologickou odpověď na terapii. Jednou z metod jak tyto problémy odstranit je snížit dávku světla a umožnit tak pomalejší spotřebovávání kyslíku, druhou je použití dávkování světla po frakcích mezi nimiž je umožněno tkáni se opětovně okysličit.

Mezi rozhodující faktory, které určují typ buněčné smrti, tj. apoptózu nebo nekrózu, patří typ buňky, subcelulární lokalizace PS a dávka světla použitá pro lokální aktivaci PS. Obecně se dá říci, že menší dávky PDT vedou spíše k apoptóze, naopak vyšší dávky k nekróze¹⁹³.

Bystandar efekt

Jiný mechanismus buněčné smrti popsal Dahle a kol.¹⁹⁴. Během pokusu *in vitro* zanikly přímým efektem nejen určené buňky, ale i mnoho sousedních buněk. Tento jev, kdy poškozené buňky ovlivňují životaschopnost sousedních zdravých buněk, se nazývá „bystandar efekt“. Toto pozorování potvrdilo, že buňky nejsou poškozovány jen přímým efektem, ale i mezibuněčná komunikace hraje významnou roli při destrukci vyvolané fotodynamickým efektem. Rozsah tohoto efektu je větší při nekróze než při apoptóze. Zpočátku panovaly názory, že tato komunikace probíhá přes buněčné póry („gap junction“) ¹⁹⁵, ¹⁹⁶, ale tato domněnka byla následně zamítnuta, jelikož při dalších pokusech s inhibitory „gap junction“ se celkový „bystandar efekt“ nezměnil. Někteří badatelé¹⁹⁷ však tuto nesrovnalost vysvětlují existencí difuzibilních ROS, které mohou být uvolněny do média a působit na sousední buňky.

2.6.2. Změny v cévním zásobení

Životaschopnost nádorových buněk závisí také na množství živin a kyslíku dodávaných cévami. Zásah do cévního zásobení je tudíž slibnou cestou k léčbě nádoru. Už v roce 1989 zjistili Hendersonová a kol., že PDT indukuje uzavření cév v ozářené oblasti a omezuje tím okysličení nádoru¹⁹⁸. K uzávěru cév dochází téměř okamžitě díky vazokonstrikci jako důsledek porušené rovnováhy mezi vasoaktivními a vazokonstrikčními faktory³². Po několika hodinách dochází k druhé fázi cévního uzávěru charakterizované tvorbou trombu¹⁹⁹.

Tyto efekty jsou však silně závislé na použitém PS. Například použití Photofrinu[®] v PDT vede k cévní konstrikcí, adhezi leukocytů, tvorbě trombů a k zvýšené propustnosti cévní stěny pro různé makromolekuly. Patrně jsou tyto jevy spojeny s aktivací krevních destiček a s uvolňováním tromboxanu²⁰⁰. Jiným příkladem je použití ftalocyaninů, což častěji vede zejména k zvýšené propustnosti kapilár²⁰¹. Naopak použití některých chlorinů vede primárně k městnání krevního toku, které je způsobeno intenzivní agregací krevních destiček²⁰². PDT vede ke konstrikcí kapilár, která je způsobená inhibicí produkce a uvolňování NO endotelem²⁰³. V preklinických studiích se však podařilo tyto jevy částečně nebo kompletně potlačit podáním látek (např. indometacin), které ovlivňují produkci eikosanoidů. Výsledkem byla markantně slabší reakce nádoru na léčbu²⁰⁴.

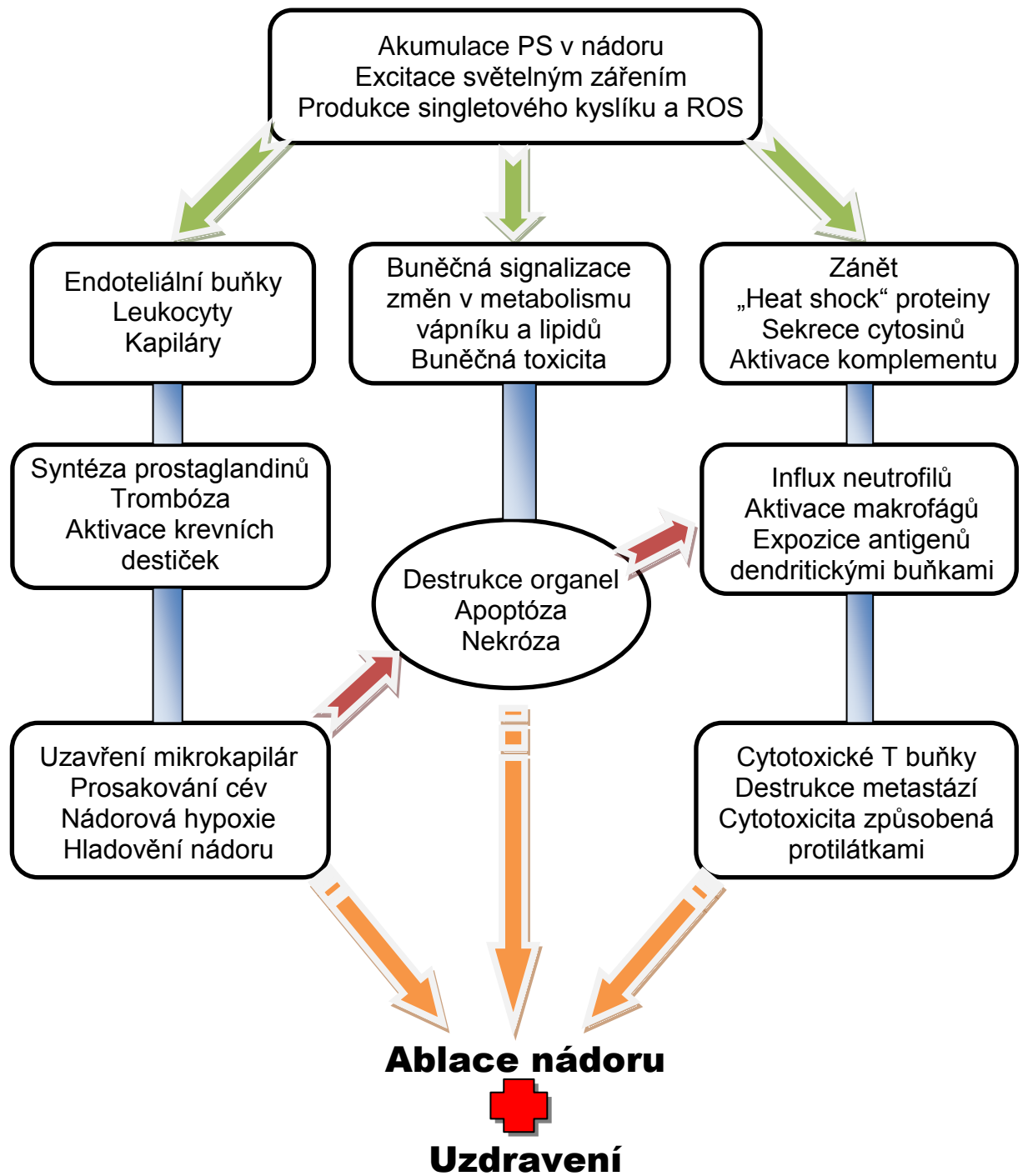
2.6.3. Imunitní systém

PDT ovlivňuje výrazným způsobem imunitní systém. A ačkoliv se to zdá být v protikladu, byly pozorovány jak aktivace, tak suprese²⁰⁵ imunitního systému. Suprese imunitního systému se dá využít v léčbě některých autoimunitních onemocnění (např. arthritis)²⁰⁶, ale na druhou stranu může omezovat efekt specifické imunitní odpovědi na PDT. Velice často ovšem byla v místech aplikace PDT pozorována aktivace imunitního systému a indukce silně zánětlivého procesu, jež se považují také za jeden z efektů vedoucích ke konečnému zničení nádorové tkáně^{48, 207}.

Předpokládaný mechanismus, kterým PDT indukuje specifickou imunitní odpověď, byl předložen v roce 1996 Korbélikem²⁰⁸. Napadená tkáň uvolňuje velké množství buněčných zbytků ze zničených buněk, cytokinů a dalších prozánětlivých signálů. Po několika minutách po ozáření lze pozorovat velké množství neutrofilů vnikajících do poškozeného místa. Ty vylučují lysozomální enzymy a ROS, které ničí endothelové a nádorové buňky a dále zesilují zánětlivý proces. Po smrti neutrofilů se uvolní jejich buněčný obsah, který dále působí jako chemotaktický signál pro další vlny zánětlivých buněk. Jak postupně invaze neutrofilů mizí, do poškozené tkáně se dostávají žírné buňky a uvolňují granule obsahující vasoaktivní složky a cytokiny. Také monocyty a makrofágy pronikají do těchto míst, proliferují, sbírají zbytky buněk a ničí kapsy přeživších tumorózních buněk.

V tomto směru došlo k velkému pokroku v porozumění mechanismu nádorově specifické imunitní reakce vyvolané PDT. Tento efekt není tak důležitý pro primární nádorovou ablaci, ale je rozhodující pro dosažení dlouhotvající kontroly nad nádorovým bujením. Protinádorová imunita vyvolaná PDT má atributy zánětlivé imunitní reakce²⁰⁸.

Makrofágy fagocytují velké množství nádorových buněk, které byly zabity nebo poškozeny cytotoxickými efekty PDT. Antigen zprostředkující buňky jsou směřovány do nádoru pomocí zánětem vyvolaných signálů a zpracovávají zde specifické nádorové proteiny, které následně vystavují na svých membránách ve smyslu mechanismu histokompatibilního systému II. Toto vystavení nádorových proteinů antigenu je doprovázeno intenzivními průvodními signály, které vytvářejí podmínky pro rozpoznání nádorových antigenů T-lymfocyty, resp. jejich pomocnými CD 4 lymfocyty. Tyto lymfocyty se aktivují a zvyšují cytotoxickou citlivost CD 8 T-lymfocytů k nádorově specifickým epitopům (epitop - prostorové uspořádání určitého místa na molekule antigenu, které je určující pro specifickou tvorbu a reakci protilátek). Aktivita nádorově specifických lymfocytů není limitována aktuálním fotodynamickým efektem, ale zahrnuje také léčbu disseminovaných a metastatických lézí. Ačkoliv je tedy PDT primárně lokalizována pouze na místo nádoru, sekundárně nabývá vlastnosti systémové léčby díky indukci imunitní reakce. Nádorově senzitivní lymfocyty vytvořené při PDT se mohou vyplavovat z lymfoidních tkání (slezina, lymfatické uzliny) v prodloužených časových intervalech i po vlastním fotodynamickém efektu²⁰⁹.



Obr. 11 Schéma možných mechanismů nádorové ablace při PDT

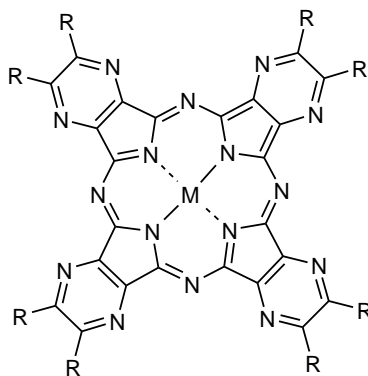
3. CÍL PRÁCE

Fotodynamická terapie, ačkoliv se velice rychle a úspěšně rozvíjí, musí neustále překonávat určitá omezení, jež vznikají zejména díky principu, na němž je tato metoda založena (např. omezení terapeutické hloubky zásahu) a nebo kvůli některým nevhodným vlastnostem PS (např. nedostatečná selektivita k zásahu pouze cílové nádorové tkáni). Proto se neustále hledají nové PS, jež by svými vlastnostmi překonaly ty předcházející a staly se ideálním nástrojem fotodynamické terapie.

Ve své práci jsem se zaměřil na přípravu látek typu tetrapyrazinoporfyrinů ze skupiny azaftalocyaninů (AzaPc), které jsou vlastně dusíkatými analogy ftalocyaninů (Pc).

Náhrada periferních benzenových kruhů (Pc) za pyrazinové kruhy (AzaPc) má své výhody i nevýhody. Pyrazinové uskupení dovoluje jednoduchou nukleofilní substituci periferními řetězci, čímž se dají snadno modifikovat vlastnosti výsledného makrocyklu. Na druhou stranu atomy dusíku způsobují, že AzaPc mají absorpci při nižší vlnové délce než Pc.

Cílem práce bylo připravit fotodynamicky účinné látky, jež by byly schopné použití jako fotosenzitizéry ve fotodynamické terapii. Nejdříve bylo nutné odhalit základní spojitosti ve vztahu struktura - fotodynamické vlastnosti připravených makrocyklů. Na základě zjištěných informací následně formulovat a připravit perspektivní PS, které by byly použitelné jako PS druhé generace (tj. rozpustné ve vodě nebo v jiném vehikulu, popř. inkorporované do lipozomů) nebo lépe jako PS třetí generace (tj. konjugáty s biomolekulami nebo s jinými nosiči).



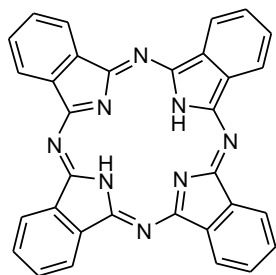
Obecný vzorec připravovaných látek.

4. METODICKÁ ČÁST

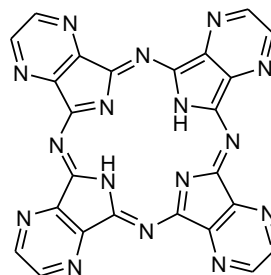
4.1. Syntéza symetrických azaanalogů a princip cyklizace

Ftalocyaniny (phthalocyanines, Pc) jsou aromatické makrocykly. Ve své molekule obsahují čtyři isoindolinové jednotky spojené v polohách 1 a 3 dusíkovými můstky. Právě delokalizované π elektrony dávají těmto látkám jejich jedinečné fyzikální vlastnosti využitelné v mnoha oblastech.

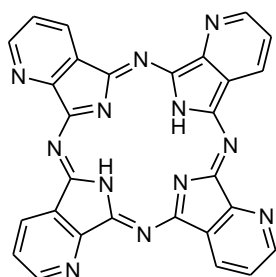
Struktura azaanalogů ftalocyaninů (azaphthalocyanines, AzaPc) je odvozena od Pcs izosterní náhradou methinové skupiny (-CH=) v benzenových podjednotkách dusíkovými atomy. Díky této příbuznosti vycházejí jejich syntézy z již prozkoumané skupiny ftalocyaninů. Vychází se většinou z různě 5,6-disubstituovaných derivátů pyrazin-2,3-dikarbonitrilu. Ty za použití různých postupů tetramerizují za vzniku makrocyclického systému AzaPc. AzaPc jsou tedy po chemické stránce různě substituované tetrapyrazinoporfyraziny, popř. tetrapyridinoporfyraziny apod²¹⁰.



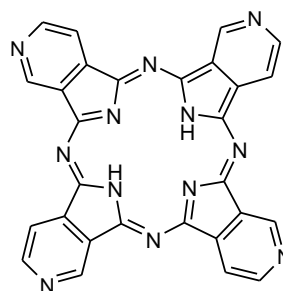
ftalocyanin



tetrapyrazinoporfyrazin



α -tetrapyridinoporfyrazin



β -tetrapyridinoporfyrazin

Vzhledem k tomu, že AzaPc jsou blízce příbuzné Pc, také jejich syntézy vycházejí z obdobných reakcí jako u dobře prozkoumané skupiny Pc. Základem jsou ve většině případů

různě 5,6-disubstituované deriváty pyrazin-2,3-dikarbonitrilu, pyridin-2,3-dikarbonitrilu (vzniká α -tetrapyridoporfyrazin) nebo pyridin-3,4-dikarbonitrilu (vzniká β -tetrapyridoporfyrazin), jež poté za použití různých postupů tetramerizují za vzniku makrocyclického systému AzaPc. Další možností přípravy jiných derivátů je poté provádět obměny na připraveném makrocyklu ať již záměnou centrálních kovů nebo modifikací na periférii.

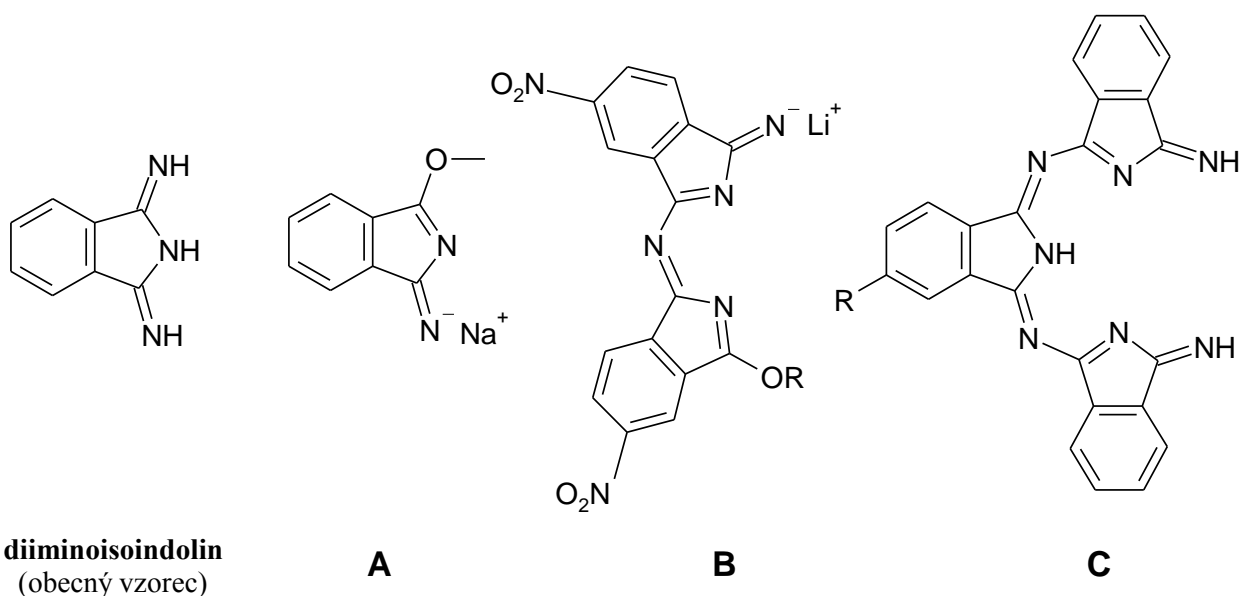
Mechanismus tetramerizace je poměrně složitý a je závislý na podmínkách reakce a také na vlastnostech reaktantů. Dle mechanismu můžeme cyklizaci rozdělit na dvě skupiny, i když toto rozdělení je spíše umělé a v praxi se tyto mechanismy často navzájem prolínají.

- cyklizace bez přítomnosti centrálního atomu
- přímá cyklizace s centrálním atomem

Cyklizace bez přítomnosti centrálního atomu

Při tomto druhu cyklizace dochází k tetramerizaci vlivem silných bazí. Jako silné baze se nejčastěji používají lithné nebo hořečnaté²¹¹ alkoholáty (etanol²¹² až oktanol^{213, 214}, popř. amylalkohol²¹⁵) nebo je alkoholát vytvořen pomocí silné baze 1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-en (DBU)²¹²⁻²¹⁴. Tyto baze napadají nitrilové skupiny reaktantů a dochází k polymeraci. Důkazem postupné tetramerizace jsou identifikované intermediáty **A**²¹⁶, **B**²¹⁷ a **C**²¹⁸ (obr. 12). Výsledkem je buď bezkovový Pc (při použití DBU) nebo makrocyklus se slabě chelátovaným atomem lithia. Ten je tak slabě vázán, že stačí pouhá přítomnost vody (slabá kyselina) k jeho uvolnění z makrocyklu²¹⁹.

Tato metoda se používá buď pro přípravu bezkovových nebo častěji pro přípravu



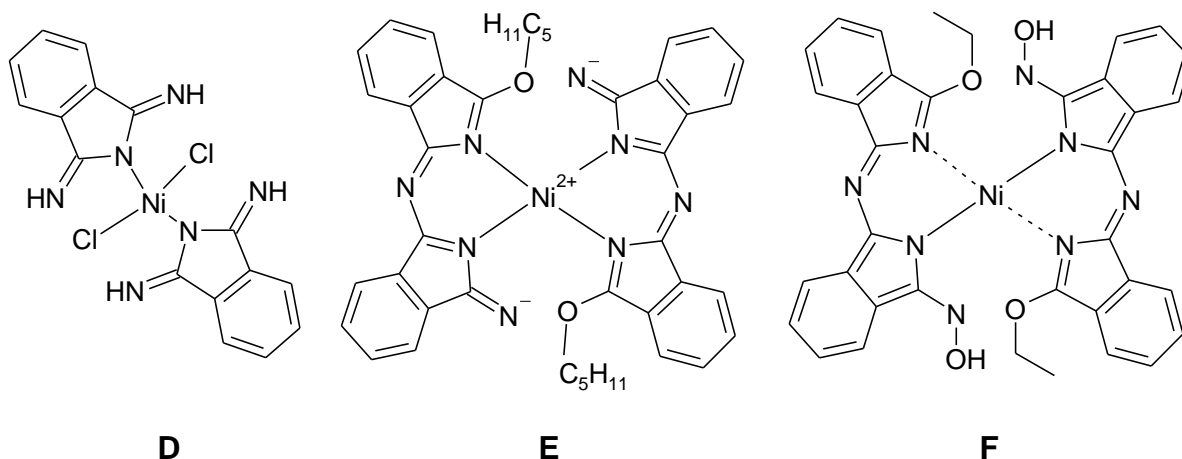
Obr. 12 Intermediáty cyklizačních reakcí bez použití templátu

kovových makrocyclů, které by za podmínek přímé cyklizace nevznikaly. Stačí dodat do reakce atom žádaného kovu (nejčastěji ve formě octanu nebo chloridu) a ten se následně za přítomnosti silné baze chelatuje do již vytvořeného makrocyclu²¹³. V některých případech se však ani tímto způsobem nepodaří cheltovat zvolený centrální atom. V takových situacích se do reakce používají reaktivnější prekurzory - diiminoisoindoliny²²⁰ (obr. 12). Vznikají reakcí dikarbonitrilů s amoniakem, často v přítomnosti silné baze (metoxid nebo hydrid sodný). Tyto sloučeniny jsou snadno izolovatelné a v následné reakci se díky své vysoké reaktivitě používají k přímé cyklizaci s centrálním kovem.

Přímá cyklizace s centrálním atomem

Mechanismus této cyklizace je založen na koordinaci výchozí látky kolem centrálního atomu (např. Ni, Co, Cu), který zde slouží jako templát. Následně dochází ke spojování a tetramerizaci. Jako důkaz tohoto mechanismu opět slouží identifikované intermediáty **D**²²¹, **E**²²¹ a **F**²²² (obr. 13). Tento druh cyklizace však probíhá za drastičtějších podmínek, např. za varu ve výševroucích rozpouštědlech jako je dimethylformamid (DMF), 2-dimethylaminoethanol (DMAE), chinolin²²³ anebo se výchozí látky taví přímo v trubici za přítomnosti katalyzátorů (močovina, molybdenan amonný). Jako výchozí látky se opět používají dikarbonitrily, nebo častěji reaktivnější diiminoisoindoliny.

Oba typy cyklizace jsou výrazně ovlivňovány použitými výchozími prekurzory, resp. jejich substituenty. Substituenty mohou na jedné straně zvyšovat reaktivitu reakčních center (nitrilových a iminových skupin) na druhé straně mohou při své objemnosti stéricky bránit tetramerizaci²¹⁴.

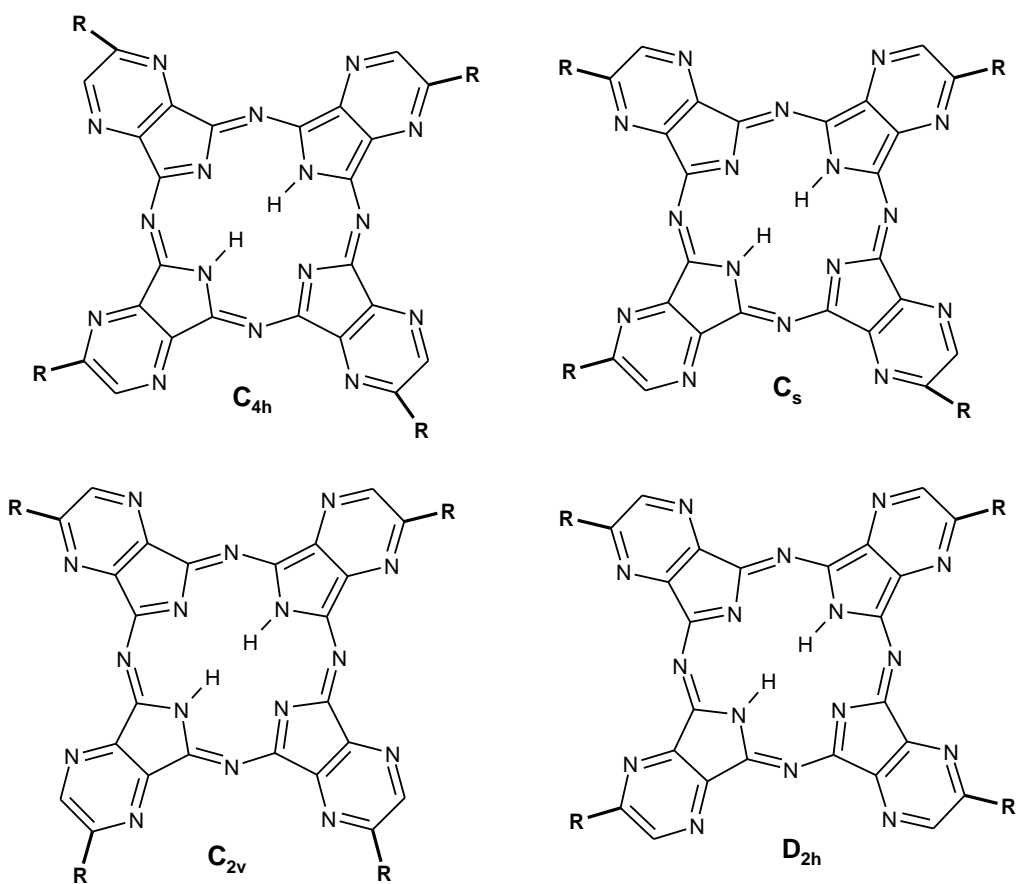


Obr. 13 Intermediáty cyklizačních reakcí s použitím templátu

4.2. Syntéza nesymetrických ftalocyaninů a jejich azaanalogů

Na rozdíl od symetrických syntéz, kdy se pro cyklizaci jako prekurzor používá pouze jedna látka, při nesymetrických syntézách spolu reagují minimálně dva prekurzory. Tyto prekurzory se mohou lišit pouze rozdílnou substitucí v postráním řetězci a základní skelet prekurzoru zůstává shodný, nebo se do molekuly makrocyklu zabudovává jednotka se strukturou zcela odlišnou od ostatních jednotek makrocyklu. Smyslem těchto nesymetrických syntéz bývá nejčastěji zavedení pouze jedné funkční skupiny do makrocyklu nebo sledování vlivu počtu jednotlivých substituentů na výsledné vlastnosti makrocyklu. Za tímto účelem se zavádí do molekuly také definovaný počet substituentů (-COOH, -OH, -NH₂), které dovolují následnou konjugaci s jinými molekulami (PS třetí generace).

Nevýhodou asymetrických syntéz je vznik řady vedlejších produktů, které se při reakci tvoří. Abychom získali požadovaný produkt, musí po cyklizaci většinou následovat separační metody, nejčastěji chromatografické. Problém velkého počtu vedlejších produktů, a tudíž i značné snížení výtěžků, byl částečně odstraněn vyvinutím specifických metod syntéz



Obr. 14 Možné polohové izomery vzniklé cyklizací nesymetrického prekurzoru (R je libovolný postranní řetězec)

asymetrických Pc²²⁴.

Pro úplnost je nutno dodat, že asymetrický makrocykl získáme i při cyklizaci jednoho substituovaného prekurzoru, který není symetricky souměrný. Tato reakce vede ke směsi polohových (konstitučních) izomerů (obr. 14).

Syntéza A₃B ftalocyaninů

Ftalocyaniny složené ze tří jednotek **A** a jedné jednotky **B** lze získat několika postupy, které se výrazně liší jak reakčním schématem, tak specifitou vznikajícího produktu a mírou vzniku vedlejších produktů.

Metoda statistické kondenzace

Tento nejjednodušší mechanismus je odvozen ze syntézy symetrických Pcs, kdy dochází k cyklické tetramerizaci výchozích prekurzorů. Nesymetrické makrocykly vznikají cyklotetramerizací dvou různých prekurzorů podle obecného schématu:

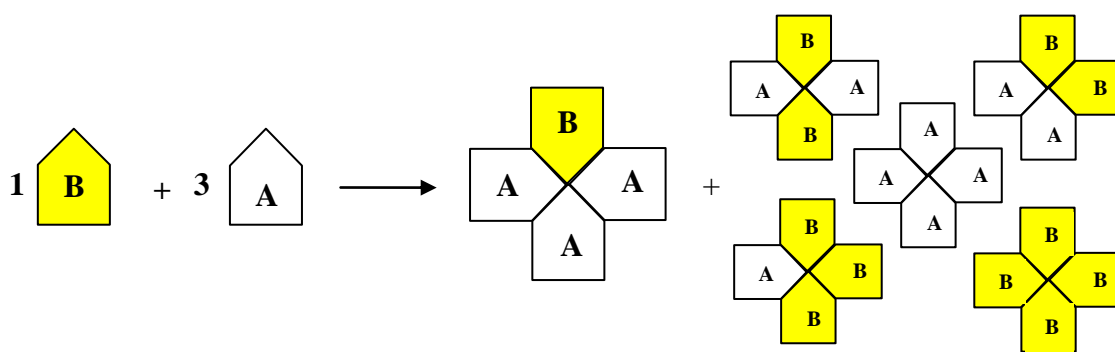


Schéma statistické kondenzace

Z principu tohoto mechanismu vyplývá, že se jedná o neselektivní metodu, která poskytuje směs šesti produktů různě nakombinovaných prekurzorů **A** a **B** (AAAA, AAAB, AABB, ABAB, ABBB, BBBB). Složitost vzniklé směsi dokumentuje i to, že si můžeme navíc představit různé polohové izomery jednotlivých produktů, pokud se jedná o nesouměrný výchozí reaktant. Tuto směs látek je pak nutno rozdělit pomocí chromatografických metod. Separace produktu může být znesnadněna tendencí těchto látek k agregaci. Jedná se totiž o molekuly s planárním uspořádáním, které snadno tvoří dimery. Tento problém lze částečně vyřešit zavedením vhodných (objemných) substituentů na periferii makrocyklu. Pro usnadnění separace výsledného produktu se preferuje použití takových prekurzorů, aby se vzniklý makrocykl A₃B výrazně lišil svojí rozpustností nebo

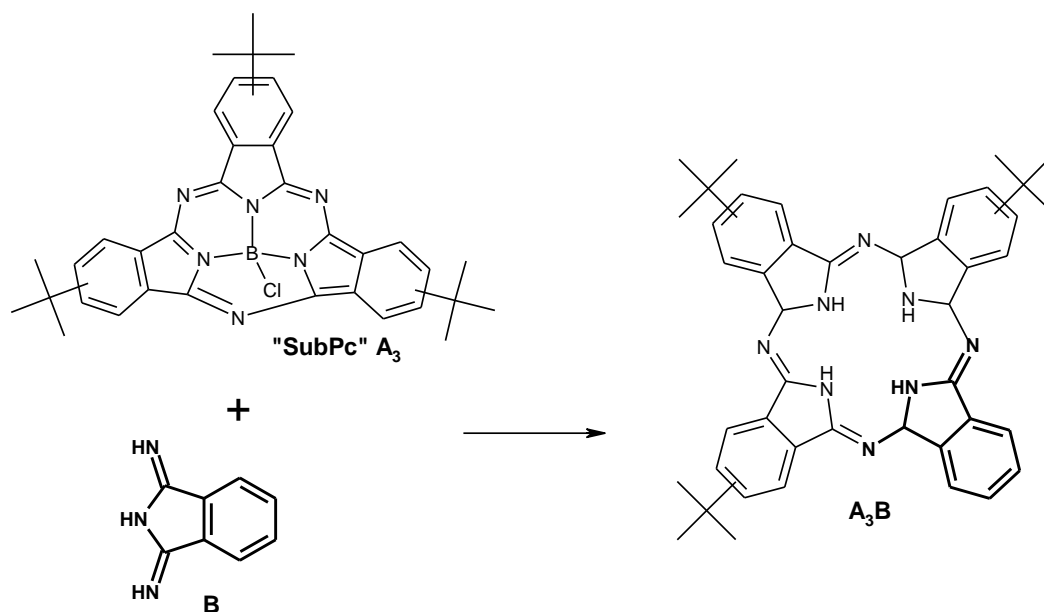
chromatografickým chováním od dalších produktů reakce. Toho může být opět docíleno použitím vhodných periferních substituentů, např. *tert*-butylové skupiny, uhlovodíkových řetězců, dendritických substituentů²²⁵, kombinací alkyl- a oligo(oxyethylen)- substitucí způsobující rozdílnost polarit a tedy i rozpustností²²⁶.

I když se jedná o neselektivní metodu, lze použitím vhodného poměru množství výchozích prekurzorů výrazně posunout reakci ve prospěch požadovaného produktu A_3B . Ze statistických propočtů vyplývá, že pro reakci dvou prekurzorů se shodnou reaktivitou se jeví jako nejvhodnější poměr 3:1. Teoreticky tak vznikne 33% A_4 , 44% A_3B a 23% ostatních možných produktů (A_2B_2 , AB_3 , B_4)²²⁴.

Použijeme-li např. poměr 9:1, dojde sice ke zvýšení množství A_4 a snížení zisku A_3B , ale nevznikají téměř žádné jiné produkty a požadovaný produkt lze poměrně snadno izolovat²²⁷. V případě, že jsou k cyklizační reakci použity prekurzory s výrazně rozdílnou reaktivitou, je nutno tomu přizpůsobit poměr jejich množství použitých pro cyklizaci²²⁸.

Subftalocyaninová metoda

Tato metoda přípravy Pcs typu A_3B , kterou vyvinul Kobayashi a kol., je založena na rozšíření kruhu subftalocyaninu (SubPc) jeho reakcí se sukcinimidem nebo derivátem diiminoisoindolinu (obr. 15)²²⁹.



Obr. 15 Subftalocyaninová metoda

V jádru SubPc dochází ke geometrickému pnutí, z toho důvodu se v přítomnosti diiminoisoindolinu snadno rozštěpí a diiminoisoindolin je následně včleněn do struktury

makrocyklu. Vzniká tak Pcs jehož struktura odpovídá typu A_3B . Tato reakce je na rozdíl od předchozí metody vysoce selektivní a umožnila přípravu Pcs, které byly dříve nedosažitelné²²⁹.

Tento mechanismus důkladně prozkoumali i T. Torres a kol. Zjistili, že výsledek tohoto postupu je značně ovlivněn podmínkami reakce. Expanze kruhu probíhá nejlépe, reaguje-li derivát diiminoisoindolinu v 6 – 9-ti násobném nadbytku oproti roztoku SubPcs ve směsi DMSO/1-chlornaftalen nebo dichlorbenzenu (1:4 až 4:1) nebo (dimethylamino)ethanolu, kdy se reakční směs míchá při teplotě 80 – 100°C po dobu 5 – 12 hodin. Výtěžek se pak pohybuje mezi 3 – 90%²²⁴.

I když se jedná o selektivní metodu, i zde vznikají vedlejší produkty, protože může dojít k částečné nebo úplné fragmentaci²³⁰ kruhu SubPc a následné statistické kondenzaci jednotlivých fragmentů poskytující směs všech šesti možných derivátů podle obecného schématu:

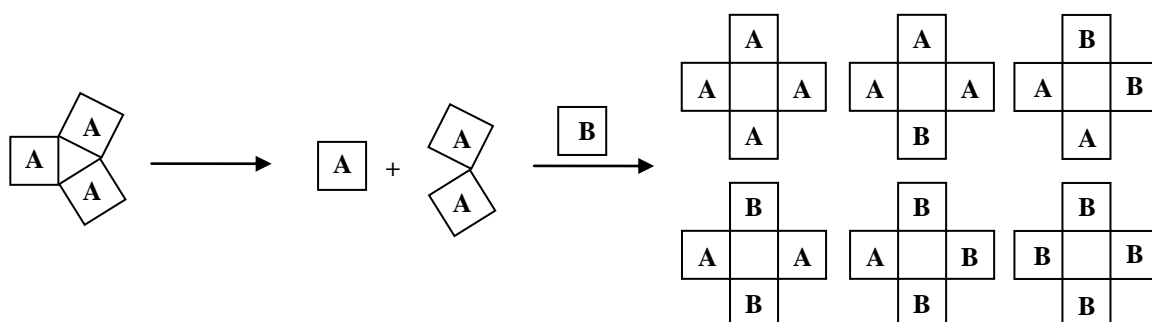
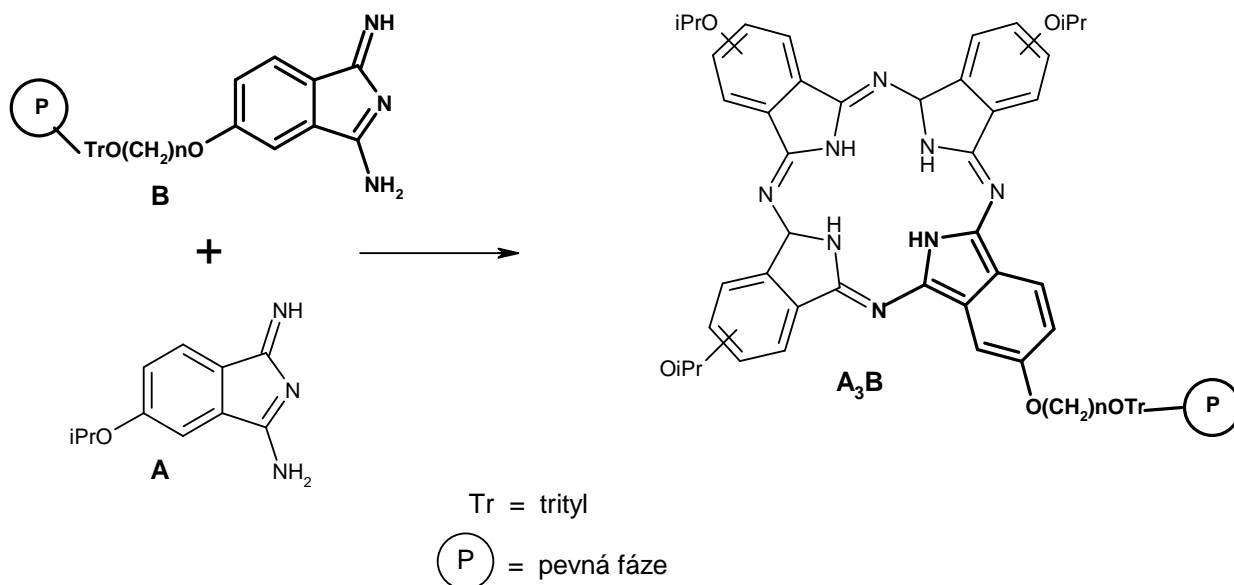


Schéma fragmentace SubPc a statistická kondenzace fragmentů

Výtěžek reakce může být zvýšen, pokud na SubPc navážeme substituenty odtahující elektrony a na diiminoisoindolin substituenty poskytující elektrony²²⁴.

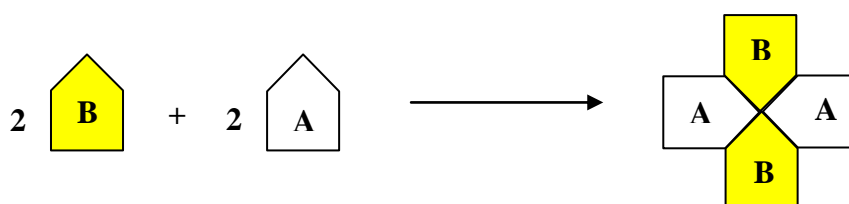
Metoda s využitím pevné fáze

Další selektivní metodu přípravy asymetrických Pcs vyvinul Leznoff²³¹. Vhodně substituovaný ftalonitril (B) navázal na polymerní pevnou fázi. K tomuto nerozpustnému prekursoru přidal odlišně substituovaný volný ftalonitril, čímž získal A_3B ftalocyanin navázaný na pevnou fázi (obr. 16). V reakční směsi současně vzniklý A_4 lze snadno oddělit promýváním pevné fáze vhodným rozpouštědlem. Požadovaný A_3B Pcs následně odštěpil z polymerní fáze. Podmínkou této metody je přítomnost vhodné funkční skupiny k navázání na pevnou fázi a následné snadné odštěpení z pevné fáze.



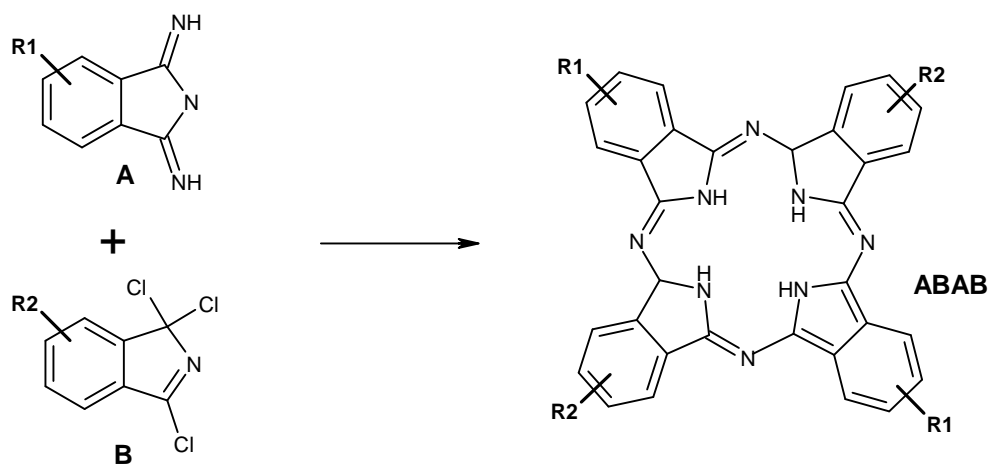
Obr. 16 Metoda s využitím pevné fáze

Syntéza ABAB ftalocyaninů



„Schéma přípravy ABAB ftalocyaninů

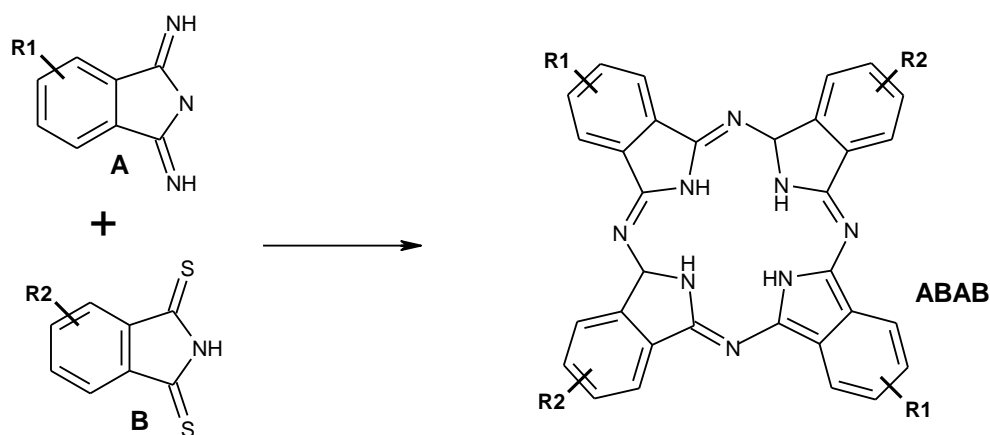
Jak již bylo zmíněno výše, i tyto deriváty mohou být získány *statistickou kondenzací* a následně odseparovány ze směsi. Chromatografickou separaci těchto látek však znesnadňuje přítomnost jejich polohových izomerů AABB s velice podobnými, často naprosto shodnými chromatografickými vlastnostmi.



Obr. 17 Příprava ABAB ftalocyaninu

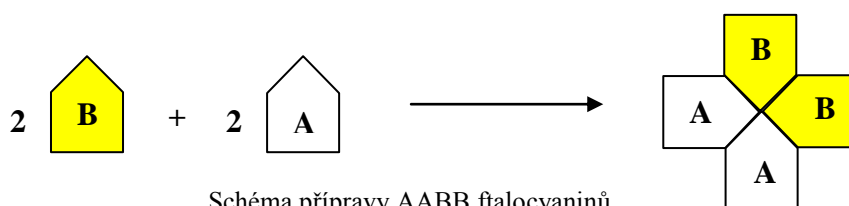
Byly proto vyvinuty specifické metody přípravy těchto látek. Touto problematikou se ve své práci zabývali např. Young a kol.²³² (obr. 17). K reakci použili ekvivalentní množství prekurzorů 1,3-diiminoisindolinu (A) a 1,3,3-trichloroisindolinu (B), reakce probíhala za mírných podmínek v přítomnosti base a redukčního činidla.

Jinou metodu uvádí ve své práci Leznoff²¹⁸. Provedl reakci 1,3-diiminoisindolinu (A) s 1H-isindol-1,3(2H)-dithionem (B) v poměru 1:1 (obr. 18). Vznikl ABAB ftalocyanin se stopami dalších možných Pcs.



Obr. 18 Příprava ABAB ftalocyaninu

Syntéza AABB ftalocyaninů

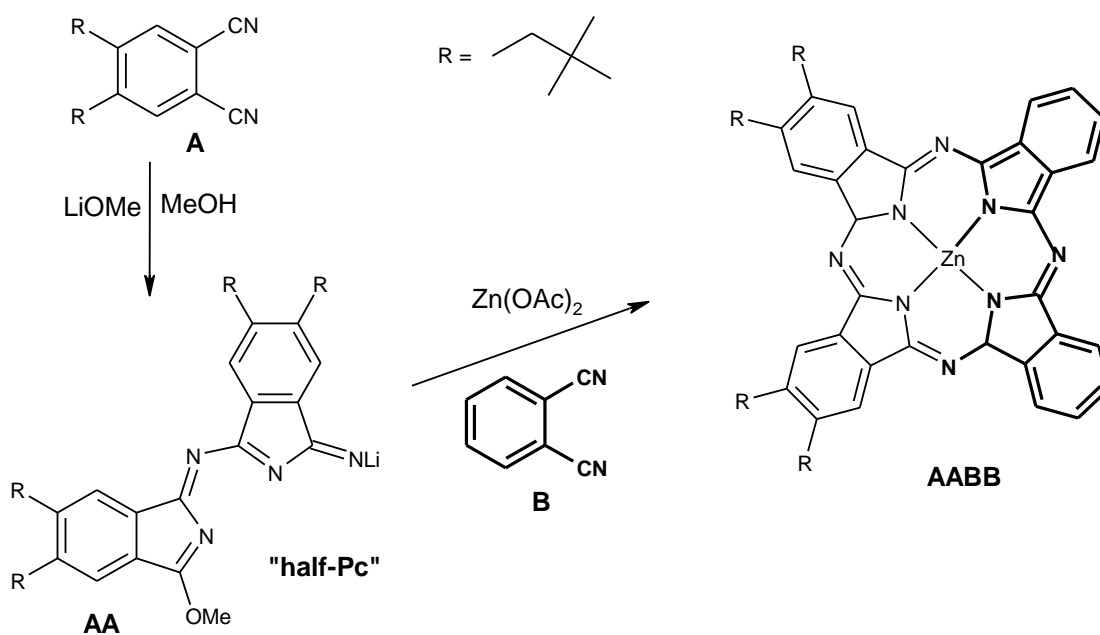


Obdobně jako izomerní látky typu ABAB lze i tyto sloučeniny také získat *statistickou kondenzací*, ale s již výše zmíněnými velice častými problémy se separací těchto izomerů.

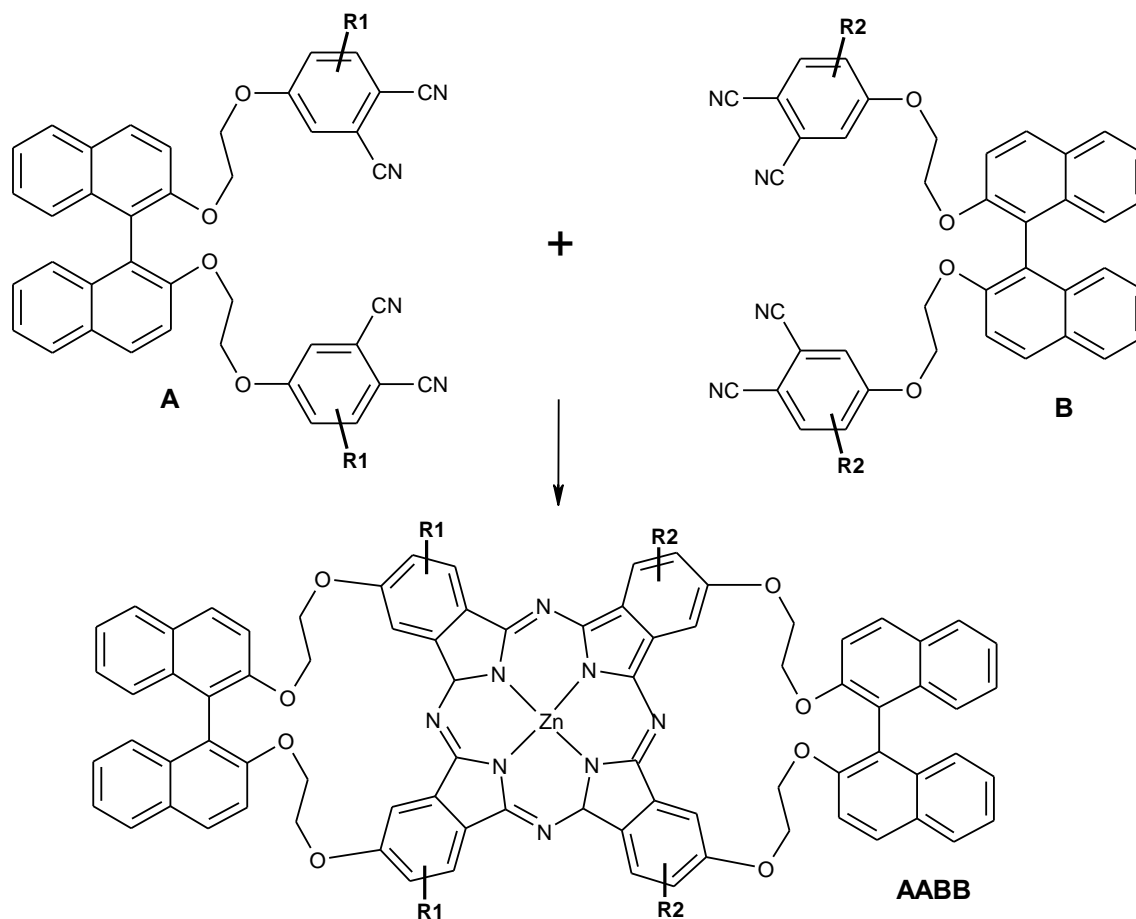
Leznoff a jeho spolupracovníci²³³ se zabývali i přípravou Pcs typu AABB. Pro jejich přípravu použili meziprodukt tzv. polovičního ftalocyninu (AA), který byl následně podroben reakci s jiným ftalonitrilem (B) za velmi mírných podmínek (obr. 19). Příprava stabilního meziproduktu vyžaduje použití ftalonitrilů se substituenty silně odtahující elektrony. Leznoff použil 4,5-bis(3,3-dimethyl-1-butyl)ftalonitril s LiOMe v prostředí metanolu.

Kobayashi²³⁴ postupoval při syntéze Pcs typu AABB podobně. Vycházel z prekurzoru bis(ftalonitrilu) spojeného přes určitý řetězec (např. 2,2'-dihydroxy-1,1'-binaftyl), aby

docházelo k pnutí v molekule. Tento prekursor nechal reagovat s odlišně substituovaným ftalonitrilem, aby získal Pcs typu AABB ve výtěžku asi 20 – 25% (obr. 20).



Obr. 19 Příprava AABB ftalocyaninu dle Leznoffa



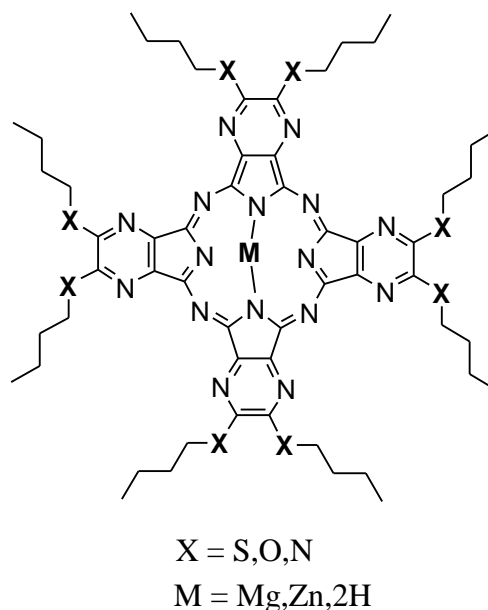
Obr. 20 Příprava AABB ftalocyaninu dle Kobayashiho

5. DOSAŽENÉ VÝSLEDKY

5.1. Komentář k dosaženým výsledkům

Během našeho výzkumu jsme se snažili odhalit vztahy mezi strukturou a fotodynamickým účinkem azaftalocyaninových makrocyklů. V prvním kroku našeho výzkumu jsme chtěli zjistit, jakým způsobem ovlivňují produkci singletového kyslíku heteroatomy, přes které jsou na makrocyklus navázané periferní řetězce (příloha 6.1.). Jako spojovací heteroatomy jsme použili atomy dusíku, kyslíku a síry, přes které byl na makrocyklus navázán alifatický řetězec (obr. 21). Z chemického hlediska jsme tedy substituovali 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril alkylaminem, alkoholátem a thiolátem. U konečných produktů jsme měřili chemickou metodou produkci singletového kyslíku. Principem této metody je spektrofotometrické stanovení rozkladu 1,3-difenyliisobenzofuranu (DPBF), který je scavangerem singletového kyslíku.

Nejslabším producentem singletového kyslíku jsou alkylamino-substituované makrocykly, u nichž je produkce doslova zanedbatelná. Naopak atomy kyslíku a zejména síry se ukázaly jako velmi vhodné spojovací řetězce, jelikož substituce těmito atomy měla za následek výrazně silnější produkci singletového kyslíku. Z těchto dvou atomů se pro další syntézy ukázal jako nejvhodnější spojovací atom síry, neboť kromě nejvyšší produkce singletového kyslíku v porovnání s měřenými atomy jsou alkylsulfanyl substituenty stabilní i při cyklizaci (narozdíl od alkoxy substituentů) a navíc u nich dochází k výraznému posunu absorpčního maxima k delším vlnovým délkám, což je pro použití ve fotodynamické terapii velmi důležité. Všechny komplexy s centrálně chelátovaným atomem zinku vykazovaly vysokou produkci singletového kyslíku, na rozdíl od atomu hořčíku a zejména od bezkovových komplexů, které jsou obecně považovány za velmi slabé producenty singletového kyslíku.

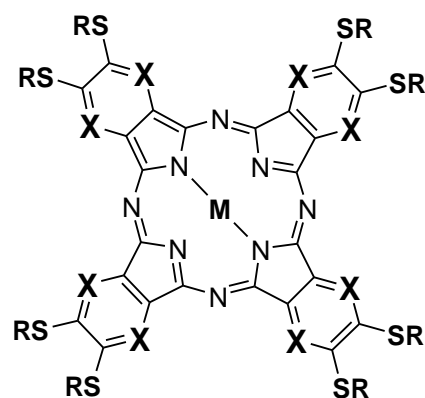


Obr. 21 Obecný vzorec připravovaných látek

V následující práci jsme se zaměřili na porovnání fyzikálních vlastností ftalocyaninů (Pc) a azaftalocyaninů (AzaPc) (příloha 6.2.). Jednalo se zejména o porovnání agregačních vlastností a produkce singletového kyslíku. Pro toto porovnání jsme připravili bezkovové, hořečnaté a zinečnaté komplexy Pc a AzaPc, které byly substituované buď osmi *n*-oktylsulfanylovými skupinami (představují dlouhé alifatické řetězce) nebo osmi *tert*-butylsulfanylovými skupinami (představují krátké ale objemné řetězce) (obr.22). Spojovací atom síry byl vybrán na základě dříve zjištěných vztahů mezi strukturou a účinkem (viz výše).

Měření tvorby agregátů (charakterizované dimerizační konstantou) ukázala, že ftalocyaninové jádro má signifikantně nižší tendenci ke tvorbě agregátů než jádro azaftalocyaninové. Podle předpokladů se potvrdilo, že objemný substituent (v našem případě *tert*-butylsulfanylová skupina) inhibuje agregaci mnohem více než jednoduchý alifatický řetězec. Z pohledu produkce singletové kyslíku vyplývá, že obě jádra jsou víceméně rovnocenná. Již z dřívějších měření se potvrdilo, že zinečnaté komplexy mají vysokou produkci singletového kyslíku na rozdíl od hořečnatých a zejména bezkovových, jejichž produkce je minimální. Výhodou Pc je navíc posun absorpčního pásu k delším vlnovým délkám (o cca 50 nm). Na druhou stranu byl u těchto komplexů pozorován výrazný rozklad na světle („photobleaching“).

Jednou z nevýhod ftalocyaninů a jejich analogů je špatná rozpustnost ve vodném médiu. Proto jsme se pokusili v dalším kroku zavést do makrocyclu skupiny, které by zvýšily jejich rozpustnost ve vodě (příloha 6.3.). Na základě získaných závislostí mezi strukturou a účinkem jsme připravili sérii zinečnatých komplexů AzaPc (příklad obr. 23), které se lišily poměrem objemných *tert*-butylsulfanylových substituentů (inhibice agregace, vysoká produkce singletového kyslíku, posun absorpčního maxima k delším

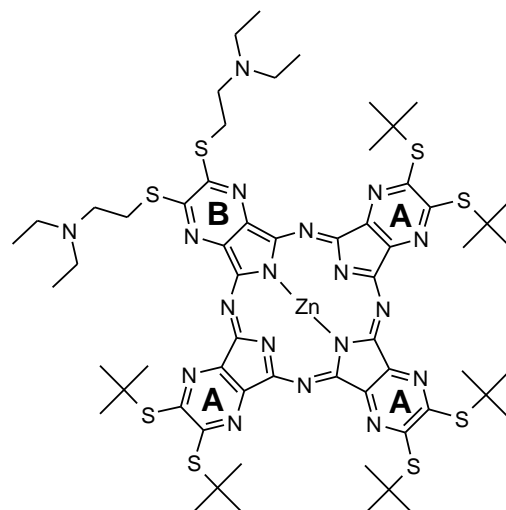


X = N,CH

M = Mg,Zn,2H

R = *n*-oktyl, *tert*-butyl

Obr. 22 Obecný vzorec připravovaných látek



Obr. 23 Struktura separovaného kongeneru typu AAAB

vlnovým délkám) a 2-diethylaminosulfanylových substituentů (možnost zavedení kladného náboje do molekuly ve formě hydrochloridu nebo kvarterní soli). Statistickou kondenzací jsme připravili směs kongenerů (AAAA, AAAB, ABAB, AABB, ABBB, BBBB), které jsme separovali sloupcovou chromatografií, včetně izomerů *cis* (adjacent) a *trans* (opposite) (obr. 23). Obecně tyto látky vykazovaly silnou adsorpci na silikagel, což výrazně stěžovalo průběh separace a z tohoto důvodu se nepodařilo kongener typu ABBB izolovat.

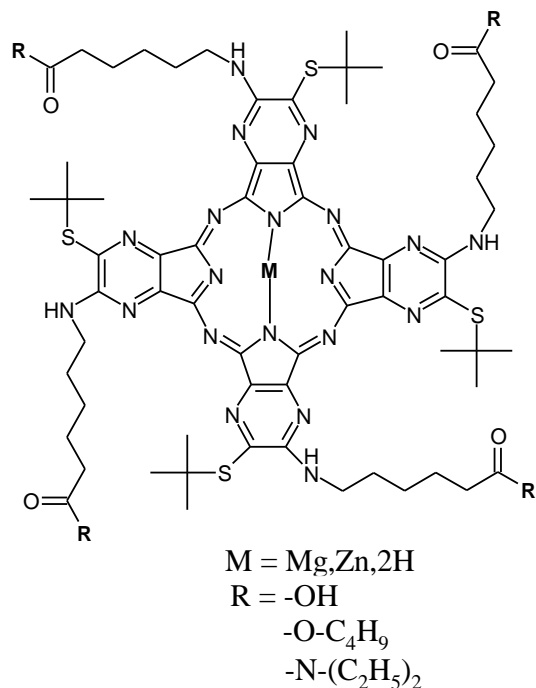
U získaných produktů jsme následně měřili produkci singletového kyslíku a fluorescenční kvantový výtěžek. Pro měření jsme použili látky ve formě volných aminů a hydrochloridů a sledovali závislosti těchto veličin na použitém rozpouštědle (dimethylformamid, voda, HCl, fosfátový pufr). V době hodnocení těchto výsledků jsme se domnívali, že solvatace a protonace periferních terciárních aminoskupin (hodnota pH) silně ovlivňuje agregaci a zvyšuje tak produkci singletové kyslíku a fluorescenční kvantový výtěžek. V současnosti se však domníváme, že tento jev je způsoben mechanismem PET („photoinduced electron transfer“)²³⁵.

Z předchozích výsledků bylo mimo jiné patrné, že pouze kompletně ionizovaný makrocyklus je dostatečně rozpustný ve vodném mediu. Méně hydrofilní AzaPc již nejsou tímto způsobem aplikovatelné – proto jsme se rozhodli lipofilnější struktury inkorporovat do unilamelárních lipozomů (příloha 6.4.). Pro inkorporaci jsme použili různě substituované zinečnaté komplexy AzaPc, které jsme považovali za velmi slibné z pohledu fotodynamických vlastností.

Kromě lipofility použitých struktur je zásadním parametrem ovlivňující vlastní inkorporaci i tvorba agregátů. Makrocykly substituované objemnými skupinami (v našem případě *terc*-butylsulfanylová skupina) se inkorporovaly do lipozomů ve vysokých koncentracích v monomerní formě, což je pro vlastní fotodynamický efekt základní předpoklad. Naopak makrocykly substituované nerozvětvenými alifatickými řetězci (*n*-oktylsulfanylová skupina), které inhibují agregaci podstatně méně, se inkorporovaly do lipozomů pouze ve velmi nízkých koncentracích v monomerní formě.

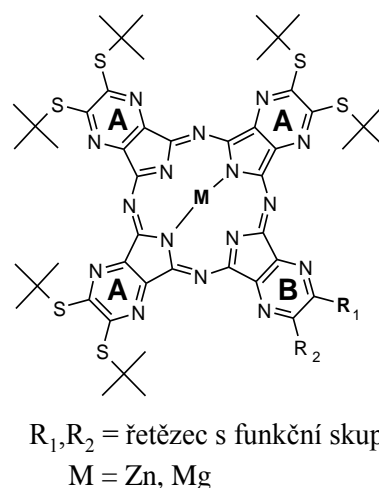
Jednou z metod, jak zlepšit distribuci PS do nádorových tkání, je příprava tzv. fotosenzitizérů třetí generace. Fotosenzitizéry třetí generace jsou fotodynamicky aktivní látky, které se váží na specifické nosiče (např. hormony, cukry, monoklonální protilátky atd.). Pro tyto konjugace se používají různé druhy vazeb, např. esterová, amidická, thiomocovinová, atd.

Pro tento účel jsme připravili sérii AzaPc (hořečnaté, zinečnaté a bezkovové komplexy), které byly substituovány různými funkčními deriváty – volnou karboxylovou skupinou, jejím butylesterem a diethylamidem (příloha 6.5.). Jako druhý substituent jsme použili již osvědčenou *tert*-butylsulfanylovou skupinu - inhibice agregace, vysoká produkce singletového kyslíku, posun absorpčního maxima k delším vlnovým délkám (obr. 24). U všech komplexů jsme změřili produkci singletového kyslíku. Makrocycly s amidickou a esterovou vazbou se vyznačují mírně vyšší produkcí singletového kyslíku na rozdíl od volných karboxylových kyselin. Dá se tedy předpokládat, že kovalentní vazbou PS na nosič se jeho fotodynamická účinnost nezmění.



Obr. 24 Obecný vzorec připravovaných látek

Na základě dříve získaných znalostí mezi strukturou a účinkem ve skupině AzaPc jsme se pokusili připravit kvalitní PS, které by byly použitelné jako fotosenzitizéry 3. generace (příloha 6.6.). Proto jsme připravili zinečnaté a hořečnaté komplexy (vysoká produkce singletového kyslíku) substituované šesti nebo sedmi *tert*-butylsulfanylovými skupinami (inhibice agregace, vysoká produkce singletového kyslíku, posun absorpčního maxima k delším vlnovým délkám) a jedním alifatickým řetězcem zakončeným karboxylovou skupinou, která umožňuje konjugaci fotosenzitizéru s různými nosiči formou esterové nebo amidické vazby (obr. 25). Tyto komplexy jsme připravili statistickou kondenzací a ze vzniklých šesti kongenerů byl separován pouze typ AAAB s jednou funkční skupinou. Nejvíce žádoucí je právě jedna funkční skupina, protože díky ní jsme schopni přesně a konkrétně určit charakter vzniklého konjugátu- na rozdíl od polyfunkčních makrocycloů.



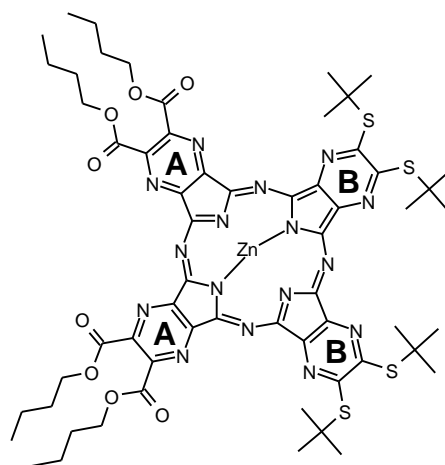
Obr. 25 Obecný vzorec připravovaných látek

U zinečnatých komplexů byla potvrzena vysoká produkce singletového kyslíku, dobrá

rozpustnost ve většině běžných organických rozpouštědel, minimální agregace a dostatečný spektrální posun.

Během našeho výzkumu jsme řešili zákonitosti, které bezprostředně nesouvisely s fotodynamickým efektem připravených látek. Odhalení těchto souvislostí nám ale umožnilo hlubší pochopení chování AzaPc molekul a vztahů mezi strukturou a fyzikálními vlastnostmi zkoumaných sloučenin.

Jedním ze zkoumaných vztahů byl vliv elektron-poskytujících a elektron-odtahujících skupin na produkci singletového kyslíku a fluorescenční kvantový výtěžek. Pro toto testování jsme připravili sérii zinečnatých komplexů AzaPc, které byly substituovány různým počtem *tert*-butylsulfanylových skupin (M⁺ efekt, inhibice agregace, vysoká produkce singletového kyslíku) a butoxykarbonylových skupin (M⁻ efekt) (příloha 6.7.). Statistickou kondenzací jsme tedy připravili a vyizolovali 5 kongenerů (AAAA, AAAB, AABB+ABAB, ABBB, BBBB). Izomerní komplexy typu ABAB a AABB (obr. 26) se nepodařilo oddělit a při testování se používala jejich směs.

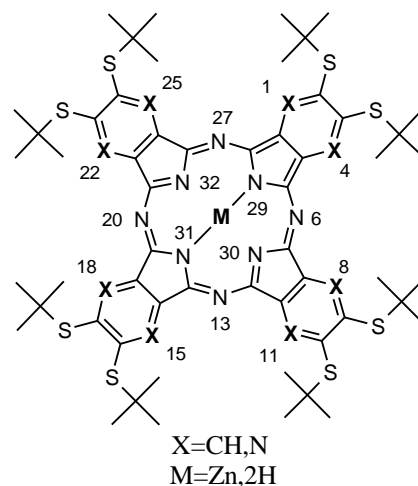


Obr. 26 Struktura kongeneru typu AABB

S přibývajícím počtem elektron-odtahujících skupin klesá produkce singletového kyslíku a fluorescenční kvantový výtěžek. Na druhou stranu dochází díky konjugaci butoxykarbonylové skupiny k mírnému posunu absorpce k delším vlnovým délkám.

Již delší dobu jsou známy acidobazické vlastnosti ftalocyaninového skeletu. Doposud však nikdo nevěnoval pozornost acidobazickým vlastnostem jejich dusíkatých analogů – AzaPc. Je zřejmé, že zavedení dalších dusíkových atomů do makrocyklu povede k jiným acidobazickým vlastnostem a tyto vlastnosti jsme se rozhodli u těchto analogů porovnat pomocí UV-vis spektroskopie (příloha 6.8.).

U obou analogů dochází k protonaci azomethinových můstků za přítomnosti silných kyselin



Obr. 27 Obecný vzorec zkoumaných makrocyklů

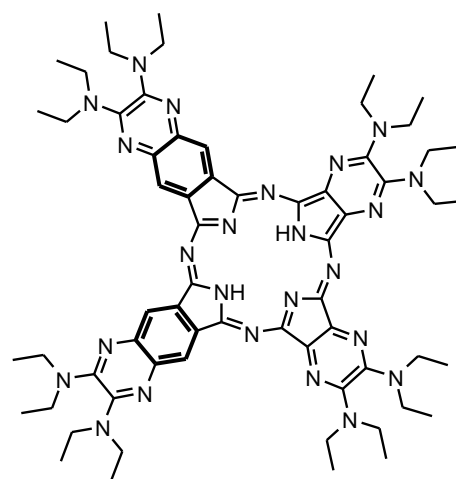
(obr. 27, N^6 , N^{13} , N^{20} , N^{27}). K protonaci do prvního stupně jsme použili buď trifluoroctovou kyselinu (50 % roztok v tetrahydrofuranu (THF)) nebo H_2SO_4 (5 % roztok v THF) - protonace jednoho azomethinového můstku se projevuje snižováním původního absorpčního maxima a vznikáním nového, k delším vlnovým délkám posunutého, absorpčního maxima. K protonaci do dalších stupňů (max. 4 stupně) je zapotřebí již koncentrovanějších roztoků H_2SO_4 a paralelně vede k většímu rozkladu komplexů – poslední stupeň již nebyl dostatečně potvrzen. U AzaPc makrocyclů docházelo navíc v 20 – 30 % roztoku H_2SO_4 v THF k protonaci i pyrazinových dusíků.

Na druhé straně vykazují vodíky na dvou centrálních dusících uvnitř makrocyclu (obr. 27, N^{29} , N^{31}) kyselé vlastnosti (pouze u bezkovových komplexů). Při použití silné organická báze (např. tetrabutylammonium-hydroxid) vzniká di-aniont, což se projevuje změnou spektra - dochází ke změně symetrie a spektrum je podobné kovovému komplexu. Stejnou změnu symetrie lze pozorovat i po rozpuštění bezkovových makrocyclů v pyridinu, kde však dochází při poněkud odlišném mechanismu ke tvorbě komplexů atomů vodíku na vnitřních dusících (N^{29} , N^{31}) s atomem dusíku v pyridinu. Kyselost těchto vodíků je navíc ovlivňována elektronovými efekty substituentů.

Velkým nedostatkem AzaPc je jejich absorpce při nízkých vlnových délkách. Tento nedostatek je možné odstranit rozšířením konjugovaného systému, například přikondenzováním nebo vložením benzenového jádra do tetrapyrazinoporpyrazinového (TPyPor) systému (příloha 6.9.). Pro tento účel jsme připravili nový a snadno substituovatelný prekurzor – 2,3-dichlorchinoxalin-6,7-dikarbonitril. Nukleofilní substitucí diethylaminem jsme připravili stavební jednotku, kterou jsme nechali statistickou kondenzací reagovat s homologickou jednotkou 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilem.

Výsledkem byla směs šesti bezkovových kongenerů, které se lišily počtem vložených benzenových jader do TPyPor systému. Díky objemným diethylamino skupinám, které silně inhibují agregaci i u rozšířených makrocyclů, jsme všechny kongenery oddělili, včetně izomerních cis (adjacent) (obr. 28) a trans (opposite).

S přibývajícím počtem benzenových jader v makrocyclu se posunuje střed absorpčního maxima lineárně zhruba o 22 nm na každé vložené benzenové



Obr. 28 Struktura separovaného kongeneru typu AABB

jádro. U všech bezkovových komplexů jsme pozorovali různé typy štěpení absorpčního maxima vlivem rozdílné symetrie molekuly. Vložením centrálního atomu (v našem případě atom zinku) opět došlo ke změnám symetrie, celkovému tvaru a posunu absorpčních maxim.

5.2. Seznam publikovaných prací

Práce publikované v odborných časopisech:

Zimcik, P., Miletin, M., Kostka, M., Schwarz, J., **Musil, Z.**, Kopecky, K., Synthesis and comparison of photodynamic activity of alkylheteroatom substituted azaphthalocyanines, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **2004**, 163, 21-28.

Kostka, M., Zimcik, P., Miletin, M., Klemra, P., Kopecky, K., **Musil, Z.**, Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **2006**, 178, 16-25.

Zimcik, P., Miletin, M., **Musil, Z.**, Kopecky, K., Kubza, L., Brault, D., Cationic azaphthalocyanines bearing aliphatic tertiary amino substituents-Synthesis, singlet oxygen production and spectroscopic studies, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **2006**, 183, 59-69.

Musil, Z., Zimcik, P., Miletin, M., Kopecky, K., Link, M., Petrik, P., Schwarz, J., Synthesis and singlet oxygen production of azaphthalocyanines bearing functional derivatives of carboxylic acid, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2006**, 10, 122-131.

Musil, Z., Zimcik, P., Miletin, M., Kopecky, K., Petrik, P., Lenco, J., Influence of electron-withdrawing and electron-donating substituents on photophysical properties of azaphthalocyanines, *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.*, **2007**, 186, 316-322.

Zimcik, P., Miletin, M., **Musil, Z.**, Kopecky, K., Slajsova, D., Synthesis and characterization of novel unsymmetrical azaphthalocyanines with one carboxylic group, *Dyes Pigment.*, **2008**, 77, 281-287.

Petrik, P., Zimcik, P., Kopecky, K., **Musil, Z.**, Miletin, M., Loukotova, V., Protonation and deprotonation of nitrogens in tetrapyrazinoporphyrazine macrocycle, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2007**, 11, 487-495.

Musil, Z., Zimcik, P., Miletin, M., Kopecky, K., Lenco, J., Synthesis, separation and UV/vis spectroscopy of pyrazinoquinoxalinoporphyrazine macrocycles, *Eur. J. Org. Chem*, **2007**, 27, 4535-4542.

Zimcik, P., Miletin, M., Kopecky, K., **Musil, Z.**, Berka, P., Horakova, V., Kucerova, H., Zbytovska, J., Brault, D., Influence of aggregation on interaction of lipophilic, water insoluble azaphthalocyanines with DOPC vesicles, *Photochem. Photobiol.*, **2007**, 83, 1497-1504.

Abstrakty z konferencí:

Musil, Z., Zimcik, P., Kopecky, K., Synthesis of azaphthalocyanines with various functional derivatives of carboxylic acids, *11th Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry*, 28.8.-1.9. 2005, Brno, PO-68, ISBN 80-210-3763-6.

Musil, Z., Zimčík, P., Kopecký, K., Vztah mezi strukturou a produkcí singletového kyslíku u derivátů azaftalocyaninů. *Sborník příspěvků 34. Konference Syntéza a analýza léčiv*, 12.9.-14.9. 2005, Brno, P63, str.101, ISBN 80-7305-533-3.

Musil, Z., Zimcik, P., Miletin, M., Synthesis of azaphthalocyanines bearing different amount of anionic charges, ICPP-4, 2.7-7.7. 2006, Řím, Itálie, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2006**, 10 (4-6), 778, ISSN 1088-4246.

Musil, Z., Zimcik, P., Miletin, M., Synthesis and spectral properties of pyrazinoquinoxalinoporphyrazine macrocycles, XXIII. International Conference on Photochemistry, 29.7-3.8.2007, Kolín nad Rýnem, Německo, *Book of abstracts*, str. 406, ISBN 3-936028-465-1.

Kopecký, K., Zimčík, P., **Musil, Z.**, Miletin, M., Deriváty asymetrických ftalocyaninů jako „Dark quencher“, 4.9.-8.9. 2005, Tatranske Matliare, Slovensko, *ChemZi* 1(1), 215(3Po31), ISSN 1336-7242.

Zimčík, P., Kostka, M., Miletin, M., Kopecký, K., **Musil, Z.**, Agregáčnı rozdíly mezi ftalocyaniny a jejich azaanalogy. 4.9.-8.9. 2005, Tatranske Matliare, Slovensko, *ChemZi* 1(1), 248(3Po108), ISSN 1336-7242.

Zimčik, P., **Musil, Z.**, Šlajsová, D., Stříbná, J., Miletín, M., Metoda kvantifikace průběhu alkylace azaftalocyaninů s navázanou terciární aminoskupinou. *Sborník příspěvků 35. Konference Syntéza a analýza léčiv*, 12.9.-15.9. 2006, Velké Karlovice, P82, str.152. ISBN 80-7305-566-X.

Zimcik, P., **Musil, Z.**, Slajsova, D., Stribna, J., Influence of ion solvation on photophysical and photochemical properties of cationic azaphthalocyanines, ICPP-4, 2.7-7.7. 2006, Řím, Itálie, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2006**, 10 (4-6), 930, ISSN 1088-4246.

6. PŘÍLOHY

6.1. Zimcik P. et al. (J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 2004)

6.2. Kostka M. et al. (J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 2006)

6.3. Zimcik P. et al. (J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 2006)

6.4. Zimcik P. et al. (Photochem. Photobiol., 2007)

6.5. Musil Z. et al. (J. Porphyrins Phthalocyanines, 2006)

6.6. Zimcik P. et al. (Dyes Pigment., 2008)

6.7. Musil Z. et al. (J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 2007)

6.8. Petrik P. et al. (J. Porphyrins Phthalocyanines, 2007)

6.9. Musil Z. et al. (Eur. J. Org. Chem, 2007)

7. SOUHRN

Připravili jsme množství různě substituovaných prekurzorů na bázi pyrazin-2,3-dikarbonitrilu, ftalonitrilu a chinoxalin-2,3-dikarbonitrilu, které jsme následně nechali různými postupy cyklizovat za tvorby makrocyclů. Všechny komplexy jsme separovali (pokud to bylo možné), vyčistili a dostatečně charakterizovali. Takto jsme připravili několik sérií látek, na nichž jsme sledovali vliv struktury (resp. strukturních obměn) na fyzikální a fotodynamické vlastnosti. Ze získaných závislostí vyplývá, že nejlepší fotodynamické vlastnosti mají zinečnaté komplexy azaftalocyaninů, které jsou substituovány objemnými skupinami vázanými na makrocyclus přes heteroatom síry. Tyto látky vykazovaly vysokou produkci singletového kyslíku, dostatečnou stabilitu na světle, maximum absorpce při vyšších vlnových délkách a velmi nízkou agregaci, která umožňovala kvalitní inkorporaci do unilamelárních lipozomů. Na základě stejných závislostí jsme připravili fotosenzitizéry obsahující jednu funkční skupinu, které by mohly být použitelné jako fotosenzitizéry třetí generace. Vložením 4 benzenových jader do tetrapyrazinoporfyrazinového makrocyclu jsme posunuli absorpční maximum až do oblasti kolem 750 nm, které je považováno za zcela optimální z hlediska fotodynamického efektu v živých tkáních.

We have prepared a number of variously substituted precursors based on pyrazine-2,3-dicarbonitrile, phthalonitrile and quinoxaline-2,3-dicarbonitrile. These substances formed macrocycles and each of them was separated (if possible), purified and sufficiently characterized. In this way were prepared several series of products which were used to elucidate the influence of structural changes on physical and photodynamical properties. We found out that the zinc complexes of azaphthalocyanines which were substituted with bulky groups binding to the macrocycle core via heteroatom of sulphur were the best from the point of view of photodynamical properties. These substances were characterized by high production of singlet oxygen, sufficient photostability, maximum absorption at longer wavelenght and poor aggregation which provides a high-quality incorporation into unilamellar liposomes. Based on aforementioned results we prepared photosensitisers containing one funtional group which could be possibly used as the third generation photosensitisers. By the incorporation of four benzene cores into tetrapyrazinoporphyrine macrocycle was the absorption maximum shifted to the range of app. 750 nm which is cinsidered as optimal from

the point of view of photodynamical effect in living tissues.

8. SUMMARY

9. LITERATURA

1. Henderson, B. W., Dougherty, T. J., How Does Photodynamic Therapy Work, *Photochem. Photobiol.*, **1992**, 55, 145-157.
2. Mitra, R. A., Singerman, L. J., Recent advances in the management of age-related macular degeneration, *Optom. Vis. Sci.*, **2002**, 79, 218-224.
3. Jesionek, A., von Tappenier, H., Zur behandlung der hautcarcinom mit flourescierenden stoffen, *Muench. Med. Wochenshr.*, **1903**, 47, 2042-2044.
4. Hausman, W., Die sensibilisierende wirkung des hematoporphyrins, *Biochem. Z.*, **1911**, 30, 276-316.
5. Figge, F. H. J., Weiland, G. S., Manganiello, L. O. J., Cancer Detection and Therapy - Affinity of Neoplastic, Embryonic, and Traumatized Tissues for Porphyrins and Metalloporphyrins, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1948**, 68, 640-641.
6. Lipson, R. L., Baldes, E. J., The Photodynamic Properties of a Particular Hematoporphyrin Derivative, *Arch. Dermatol.*, **1960**, 82, 508-516.
7. Dougherty, T. J., Activated Dyes as Antitumor Agents, *J. Natl. Cancer Inst.*, **1974**, 52, 1333-1336.
8. Dougherty, T. J., Kaufman, J. E., Goldfarb, A., Weishaupt, K. R., Boyle, D., Mittleman, A., Photoradiation Therapy for Treatment of Malignant-Tumors, *Cancer Res.*, **1978**, 38, 2628-2635.
9. Dougherty, T. J., Lawrence, G., Kaufman, J. H., Boyle, D., Weishaupt, K. R., Goldfarb, A., Photoradiation in the Treatment of Recurrent Breast Carcinoma, *J. Natl. Cancer Inst.*, **1979**, 62, 231-237.
10. Baas, P., Vanmansom, I., Vantinteren, H., Stewart, F. A., Vanzandwijk, N., Effect of N-Acetylcysteine on Photofrin-Induced Skin Photosensitivity in Patients, *Lasers Surg. Med.*, **1995**, 16, 359-367.
11. Orenstein, A., Kostenich, G., Roitman, L., Shechtman, Y., Kopolovic, Y., Ehrenberg, B., Malik, Z., A comparative study of tissue distribution and photodynamic therapy selectivity of chlorin e(6), Photofrin II and ALA-induced protoporphyrin IX in a colon carcinoma model, *Br. J. Cancer*, **1996**, 73, 937-944.
12. Spikes, J. D., New Trends in Photobiology (Invited Review) - Chlorins as Photosensitizers in Biology and Medicine, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **1990**, 6, 259-274.
13. Kessel, D., Thompson, P., Purification and Analysis of Hematoporphyrin and Hematoporphyrin Derivative by Gel Exclusion and Reverse-Phase Chromatography, *Photochem. Photobiol.*, **1987**, 46, 1023-1025.
14. Boyle, R. W., Dolphin, D., Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers, *Photochem. Photobiol.*, **1996**, 64, 469-485.
15. Gomer, C. J., Preclinical Examination of 1st and 2nd Generation Photosensitizers Used in Photodynamic Therapy, *Photochem. Photobiol.*, **1991**, 54, 1093-1107.
16. Nyman, E. S., Hynninen, P. H., Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **2004**, 73, 1-28.
17. Brancalion, L., Moseley, H., Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy, *Lasers Med. Sci.*, **2002**, 17, 173-186.
18. Maisch, T., Bosl, C., Szeimies, R. M., Lehn, N., Abels, C., Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2005**, 49, 1542-1552.

19. Hamblin, M. R., Hasan, T., Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2004**, 3, 436-450.
20. Komerik, N., Wilson, M., Poole, S., The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria, *Photochem. Photobiol.*, **2000**, 72, 676-680.
21. Sternberg, E. D., Dolphin, D., Bruckner, C., Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy, *Tetrahedron*, **1998**, 54, 4151-4202.
22. Sharman, W. M., Allen, C. M., van Lier, J. E., Role of activated oxygen species in photodynamic therapy, *Meth. Enzymol.*, **2000**, 319, 376-400.
23. Jori, G., Spikes, J. D., Photothermal Sensitizers - Possible Use in Tumor-Therapy, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **1990**, 6, 93-101.
24. Soncin, M., Buseti, A., Fusi, F., Jori, G., Rodgers, M. A. J., Irradiation of amelanotic melanoma cells with 532 nm high peak power pulsed laser radiation in the presence of the photothermal sensitizer Cu(II)-hematoporphyrin: A new approach to cell photoinactivation, *Photochem. Photobiol.*, **1999**, 69, 708-712.
25. Okazaki, T., Hirota, N., Terazima, M., Energy conversion process from the photoexcited electronic states studied by the temperature lens and acoustic peak delay methods in solution, *J. Mol. Liq.*, **2001**, 90, 243-249.
26. Camerin, M., Rello, S., Villanueva, A., Ping, X. Z., Kenney, M. E., Rodgers, M. A. J., Jori, G., Photothermal sensitisation as a novel therapeutic approach for tumours: Studies at the cellular and animal level, *Eur. J. Cancer*, **2005**, 41, 1203-1212.
27. Chen, W. R., Adams, R. L., Heaton, S., Dickey, D. T., Bartels, K. E., Nordquist, R. E., Chromophore-Enhanced Laser-Tumor Tissue Photothermal Interaction Using an 808-Nm Diode-Laser, *Cancer Lett.*, **1995**, 88, 15-19.
28. Chen, W. R., Adams, R. L., Carubelli, R., Nordquist, R. E., Laser-photosensitizer assisted immunotherapy: A novel modality for cancer treatment, *Cancer Lett.*, **1997**, 115, 25-30.
29. Moan, J., Peng, Q., Sorensen, R., Iani, V., Nesland, J. M., The biophysical foundations of photodynamic therapy, *Endoscopy*, **1998**, 30, 387-391.
30. Takemura, T., Ohta, N., Nakajima, S., Sakata, I., Critical Importance of the Triplet Lifetime of Photosensitizer in Photodynamic Therapy of Tumor, *Photochem. Photobiol.*, **1989**, 50, 339-344.
31. Patterson, M. S., Madsen, S. J., Wilson, B. C., Experimental Tests of the Feasibility of Singlet Oxygen Luminescence Monitoring In vivo During Photodynamic Therapy, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **1990**, 5, 69-84.
32. MacDonald, I. J., Dougherty, T. J., Basic principles of photodynamic therapy, *J. Porphyr. Phthalocyanines*, **2001**, 5, 105-129.
33. Moan, J., Berg, K., The Photodegradation of Porphyrins in Cells Can Be Used to Estimate the Lifetime of Singlet Oxygen, *Photochem. Photobiol.*, **1991**, 53, 549-553.
34. Vrouenraets, M. B., Visser, G. W. M., Snow, G. B., van Dongen, G., Basic principles, applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy, *Anticancer Res.*, **2003**, 23, 505-522.
35. Cadet, J., Berger, M., Decarroz, C., Wagner, J. R., Vanlier, J. E., Ginot, Y. M., Vigny, P., Photosensitized Reactions of Nucleic-Acids, *Biochimie*, **1986**, 68, 813-834.
36. Paillous, N., Vicendo, P., Mechanisms of Photosensitized DNA Cleavage, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **1993**, 20, 203-209.
37. Firey, P. A., Rodgers, M. A. J., Photo-Properties of a Silicon Naphthalocyanine - a Potential Photosensitizer for Photodynamic Therapy, *Photochem. Photobiol.*, **1987**, 45, 535-538.
38. Vanleengoed, H., Schuitmaker, J. J., Vanderveen, N., Dubbelman, T., Star, W. M., Fluorescence and Photodynamic Effects of Bacteriochlorin a Observed In vivo in

- Sandwich Observation Chambers, *Br. J. Cancer*, **1993**, 67, 898-903.
39. Dougherty, T. J., Potter, W. R., Of What Value Is a Highly Absorbing Photosensitizer in Pdt, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **1991**, 8, 223-225.
 40. Spikes, J. D., Bommer, J. C., Photobleaching of Mono-L-Aspartyl Chlorin E6 (Npe6) - a Candidate Sensitizer for the Photodynamic Therapy of Tumors, *Photochem. Photobiol.*, **1993**, 58, 346-350.
 41. Bonnett, R., Martinez, G., Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy, *Tetrahedron*, **2001**, 57, 9513-9547.
 42. Boyle, D. G., Potter, W. R., Photobleaching of Photofrin-Ii as a Means of Eliminating Skin Photosensitivity, *Photochem. Photobiol.*, **1987**, 46, 997-1001.
 43. Sharman, W. M., Allen, C. M., van Lier, J. E., Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications, *Drug Discov. Today*, **1999**, 4, 507-517.
 44. Nowakowska, M., Zapotoczny, S., Sterzel, M., Environmentally friendly photosensitizer: starch modified with chlorophyll-type chromophores, *Polym. Int.*, **2007**, 56, 635-640.
 45. Kessel, D., Proposed Structure of the Tumor-Localizing Fraction of Hpd (Hematoporphyrin Derivative), *Photochem. Photobiol.*, **1986**, 44, 193-196.
 46. Schwartz, S., Absolon, K., Vermund, H., Effect of Porphyrins on X-Ray Sensitivity of Tumors, *J. Lab. Clin. Med.*, **1955**, 46, 949-949.
 47. Kessel, D., Components of Hematoporphyrin Derivatives and Their Tumor-Localizing Capacity, *Cancer Res.*, **1982**, 42, 1703-1706.
 48. Dolmans, D., Fukumura, D., Jain, R. K., Photodynamic therapy for cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, 3, 380-387.
 49. A service of the U. S. National Institutes of Health, developed by the National Library of Medicine [online] (2007) [cit. 2007-10-14]. Dostupné z: www.clinicaltrials.gov
 50. Richter, A. M., Cerrutisola, S., Sternberg, E. D., Dolphin, D., Levy, J. G., Biodistribution of Tritiated Benzoporphyrin Derivative (H-3-Bpd-Ma), a New Potent Photosensitizer, in Normal and Tumor-Bearing Mice, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **1990**, 5, 231-244.
 51. Opitz, I., Krueger, T., Pan, Y. M., Altermatt, H. J., Wagnieres, G., Ris, H. B., Preclinical comparison of mTHPC and verteporfin for intracavitary photodynamic therapy of malignant pleural mesothelioma, *Eur. Surg. Res.*, **2006**, 38, 333-339.
 52. Berenbaum, M. C., Bonnett, R., Chevretton, E. B., Akandeadebakin, S. L., Ruston, M., Selectivity of Meso-Tetra(Hydroxyphenyl)Porphyrins and Chlorins and of Photofrin-Ii in Causing Photodamage in Tumor, Skin, Muscle and Bladder - the Concept of Cost-Benefit in Analyzing the Results, *Lasers Med. Sci.*, **1993**, 8, 235-243.
 53. Ronn, A. M., Nouri, M., Lofgren, L. A., Steinberg, B. M., Westerborn, A., Windahl, T., Shikowitz, M. J., Abramson, A. L., Human tissue levels and plasma pharmacokinetics of temoporfin (Foscan(R), mTHPC), *Lasers Med. Sci.*, **1996**, 11, 267-272.
 54. BiolitecPharma, Ltd. [online] (2007) [cit. 2007-10-04]. Dostupné z: www.biolitecpharma.com
 55. Campbell, S. M., Gould, D. J., Salter, L., Clifford, T., Curnow, A., Photodynamic therapy using meta-tetrahydroxyphenylchlorin (Foscan (R)) for the treatment of vulval intraepithelial neoplasia, *Br. J. Dermatol.*, **2004**, 151, 1076-1080.
 56. Fan, B. G., Andren-Sandberg, A., Photodynamic therapy for pancreatic cancer, *Pancreas*, **2007**, 34, 385-389.
 57. Triesscheijn, M., Ruevekamp, M., Antonini, N., Neering, H., Stewart, F. A., Baas, P., Optimizing meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin-mediated photodynamic therapy for basal cell carcinoma, *Photochem. Photobiol.*, **2006**, 82, 1686-1690.
 58. Taber, S. W., Fingar, V. H., Coots, C. T., Wieman, T. J., Photodynamic therapy using

- mono-L-aspartyl chlorin e(6) (Npe6) for the treatment of cutaneous disease: A phase I clinical study, *Clin. Cancer Res.*, **1998**, 4, 2741-2746.
59. Light Sciences Corporation [online] (2007) [cit. 2007-10-14]. Dostupné z: www.lightsciences.com
 60. Stewart, F., Baas, P., Star, W., What does photodynamic therapy have to offer radiation oncologists (or their cancer patients)?, *Radiother. Oncol.*, **1998**, 48, 233-248.
 61. Woodburn, K. W., Fan, Q., Kessel, D., Luo, Y., Young, S. W., Photodynamic therapy of B16F10 murine melanoma with lutetium texaphyrin, *J. Invest. Dermatol.*, **1998**, 110, 746-751.
 62. Pharmacyclics [online] (2007) [cit. 2007-10-14]. Dostupné z: www.pharmacyclics.com
 63. Boyle, R. W., Paquette, B., Vanlier, J. E., Biological-Activities of Phthalocyanines .14. Effect of Hydrophobic Phthalimidomethyl Groups on the In vivo Phototoxicity and Mechanism of Photodynamic-Action of Sulfonated Aluminum Phthalocyanines, *Br. J. Cancer*, **1992**, 65, 813-817.
 64. Vakulovskaya, E. G., Shental, V. V., Kondratjeva, T. T., Photodynamic therapy and fluorescent diagnostics of head and neck tumors with photosense, *Int. J. Cancer*, **2002**, 262-262.
 65. Vakulovskaya, E., Shental, V., Letyagin, V., Oumnova, L., Vorozhcsov, V., Philinov, V., Stranadko, E., Photodynamic therapy and fluorescent diagnostics of breast cancer with photosense, *Int. J. Cancer*, **2002**, 211-211.
 66. Vakulovskaya, E., Lubaev, V., Photodynamic therapy in oral cancer patients with second-generation photosensitizers, *Oral Oncol.*, **2007**, 2, 215-216.
 67. Baron, E. D., Hanneman, K., Scull, H. M., Hsia, A., McCormick, T., Oleinick, N. L., Kenney, M., Cooper, K. D., Silicon phthalocyanine (Pc 4) photodynamic therapy for the treatment of pre-malignant and malignant skin conditions: an update, *J. Invest. Dermatol.*, **2005**, 125, A7-A7.
 68. Miller, J. D., Nancy, O., Scull, H. M., Hsia, A., Cooper, K. D., Baron, E. D., Phase I clinical trial using topical silicon phthalocyanine Pc 4-photodynamic therapy for the treatment of malignant and pre-malignant skin conditions: an update, *J. Invest. Dermatol.*, **2006**, 126, 46-46.
 69. Jeffes, E. W. B., Levulan (R): the first approved topical photosensitizer for the treatment of actinic keratosis, *J. Dermatolog. Treat.*, **2002**, 13, S19-S23.
 70. Photocure ASA [online] (2007) [cit. 2007-10-14]. Dostupné z: www.photocure.com
 71. Calzavara-Pinton, P. G., Venturini, M., Sala, R., Photodynamic therapy: update 2006 - Part 2: Clinical results, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, **2007**, 21, 439-451.
 72. Harries, M. J., Street, G., Gilmour, E., Rhodes, L. E., Beck, M. H., Allergic contact dermatitis to methyl aminolevulinate (Metvix((R))) cream used in photodynamic therapy, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **2007**, 23, 35-36.
 73. Wiegell, S. R., Wulf, H. C., Photodynamic therapy of acne vulgaris using methyl aminolaevulinate: a blinded, randomized, controlled trial, *Br. J. Dermatol.*, **2006**, 154, 969-976.
 74. Horfelt, C., Funk, J., Frohm-Nilsson, M., Edstrom, D. W., Wennberg, A. M., Topical methyl aminolaevulinate photodynamic therapy for treatment of facial acne vulgaris: results of a randomized, controlled study, *Br. J. Dermatol.*, **2006**, 155, 608-613.
 75. Wiegell, S. R., Wulf, H. C., Photodynamic therapy of acne vulgaris using 5-aminolevulinic acid versus methyl aminolevulinate, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **2006**, 54, 647-651.
 76. Zane, C., Capezzera, R., Sala, R., Venturini, M., Calzavara-Pinton, P., Clinical and echographic analysis of photodynamic therapy using methylaminolevulinate as sensitizer in the treatment of photodamaged facial skin, *Lasers Surg. Med.*, **2007**, 39,

- 203-209.
77. Fradet, Y., Grossman, H. B., Gomella, L., Lerner, S., Cookson, M., Albala, D., Droller, M. J., A comparison of hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy and white light cystoscopy for the detection of carcinoma in situ in patients with bladder cancer: A phase III, multicenter study, *J. Urol.*, **2007**, 178, 68-73.
 78. Wainwright, M., Mohr, H., Walker, W. H., Phenothiazinium derivatives for pathogen inactivation in blood products, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **2007**, 86, 45-58.
 79. Tardivo, J. P., Del Giglio, A., Paschoal, L. H., Baptista, M. S., New photodynamic therapy protocol to treat AIDS-related Kaposi's sarcoma, *Photomed. Laser Surg.*, **2006**, 24, 528-531.
 80. Genina, E. A., Bashkatov, A. N., Chikina, E. E., Knyazev, A. B., Mareev, O. V., Tuchin, V. V., Methylene Blue mediated laser therapy of maxillary sinusitis, *Laser Phys.*, **2006**, 16, 1128-1133.
 81. Vaucher, L., Jichlinski, P., Lange, N., Ritter-Schenk, C., van den Bergh, H., Kucera, P., Hexyl-aminolevulinate-mediated photodynamic therapy: How to spare normal urothelium. An in vitro approach, *Lasers Surg. Med.*, **2007**, 39, 67-75.
 82. Xu, C. S., Leung, A. W. N., Photodynamic effects of pyropheophorbide-a methyl ester in nasopharyngeal carcinoma cells, *Med. Sci. Monitor*, **2006**, 12, BR257-BR262.
 83. Kiadis Pharma [online] (2007) [cit. 2007-10-14]. Dostupné z: www.kiadis.com
 84. Szeimies, R. M., Karrer, S., Abels, C., Steinbach, P., Fickweiler, S., Messmann, H., Baumler, W., Landtaler, M., 9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(beta-methoxyethyl)-porphycene (ATMPn) a novel photosensitizer for photodynamic therapy: Uptake kinetics and intracellular localization, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **1996**, 34, 67-72.
 85. Karrer, S., Abels, C., Baumler, W., Ebert, A., Landthaler, M., Szeimies, R. M., Topical photodynamic therapy of psoriasis using a novel porphycene dye, *J. Invest. Dermatol.*, **1996**, 107, 112-112.
 86. Waser, M., Falk, H., Towards second generation hypericin based photosensitizers for photodynamic therapy, *Curr. Org. Chem.*, **2007**, 11, 547-558.
 87. Pandey, R. K., Herman, C. K., Shedding some light on tumours, *Chem. Ind.*, **1998**, 739-743.
 88. Bellnier, D. A., Greco, W. R., Nava, H., Loewen, G. M., Oseroff, A. R., Dougherty, T. J., Mild skin photosensitivity in cancer patients following injection of Photochlor (2-1-hexyloxyethyl -2-devinyl pyropheophorbide-a; HPPH) for photodynamic therapy, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2006**, 57, 40-45.
 89. Bellnier, D. A., Greco, W. R., Loewen, G. M., Nava, H., Oseroff, A. R., Dougherty, T. J., Clinical pharmacokinetics of the PDT photosensitizers porfimer sodium (Photofrin), 2-1-hexyloxyethyl -2-devinyl pyropheophorbide-a (Photochlor) and 5-ALA-induced protoporphyrin IX, *Lasers Surg. Med.*, **2006**, 38, 439-444.
 90. Lobel, J., MacDonald, I. J., Ciesielski, M. J., Barone, T., Potter, W. R., Pollina, J., Plunkett, R. J., Fenstermaker, R. A., Dougherty, T. J., 2-1-hexyloxyethyl -2-devinyl pyropheophorbide-alpha (HPPH) in a nude rat glioma model: Implications for photodynamic therapy, *Lasers Surg. Med.*, **2001**, 29, 397-405.
 91. McCaw, D. L., Pope, E. R., Payne, J. T., West, M. K., Tompson, R. V., Tate, D., Treatment of canine oral squamous cell carcinomas with photodynamic therapy, *Br. J. Cancer*, **2000**, 82, 1297-1299.
 92. Weersink, R. A., Bogaards, A., Gertner, M., Davidson, S. R. H., Zhang, K., Netchev, G., Trachtenberg, J., Wilson, B. C., Techniques for delivery and monitoring of TOOKAD (WST09)-mediated photodynamic therapy of the prostate: Clinical experience and practicalities, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **2005**, 79, 211-222.
 93. Kral, V., Davis, J., Andrievsky, A., Kralova, J., Synytsya, A., Pouckova, P., Sessler, J.

- L., Synthesis and biolocalization of water-soluble sapphyrins, *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 1073-1078.
94. Kao, Y. J., Juliano, R. L., Interactions of Liposomes with the Reticuloendothelial System - Effects of Reticuloendothelial Blockade on the Clearance of Large Unilamellar Vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, **1981**, 677, 453-461.
 95. Reddi, E., Role of delivery vehicles for photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **1997**, 37, 189-195.
 96. Woodburn, K., Sykes, E., Kessel, D., Interactions of Solutol Hs-15 and Cremophor-El with Plasma-Lipoproteins, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **1995**, 27, 693-699.
 97. Woodburn, K., Chang, C. K., Lee, S. W., Henderson, B., Kessel, D., Biodistribution and Pdt Efficacy of a Ketochlorin Photosensitizer as a Function of the Delivery Vehicle, *Photochem. Photobiol.*, **1994**, 60, 154-159.
 98. Ginevra, F., Biffanti, S., Pagnan, A., Biolo, R., Reddi, E., Jori, G., Delivery of the Tumor Photosensitizer Zinc(II)-Phthalocyanine to Serum-Proteins by Different Liposomes - Studies In vitro and In vivo, *Cancer Lett.*, **1990**, 49, 59-65.
 99. Jiang, F., Lilge, L., Logie, B., Li, Y., Chopp, M., Photodynamic therapy of 9L gliosarcoma with liposome-delivered photofrin, *Photochem. Photobiol.*, **1997**, 65, 701-706.
 100. Richter, A. M., Waterfield, E., Jain, A. K., Canaan, A. J., Allison, B. A., Levy, J. G., Liposomal Delivery of a Photosensitizer, Benzoporphyrin Derivative Monoacid Ring-a (Bpd), to Tumor-Tissue in a Mouse-Tumor Model, *Photochem. Photobiol.*, **1993**, 57, 1000-1006.
 101. Polo, L., Segalla, A., Jori, G., Bocchiotti, G., Verna, G., Franceschini, R., Mosca, R., DeFilippi, P. G., Liposome-delivered I-131-labelled Zn(II)-phthalocyanine as a radiodiagnostic agent for tumours, *Cancer Lett.*, **1996**, 109, 57-61.
 102. Derycke, A. S. L., de Witte, P. A. M., Liposomes for photodynamic therapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2004**, 56, 17-30.
 103. Montanari, J., Perez, A. P., Di Salvo, F., Diz, V., Barnadas, R., Dicelio, L., Doctorovich, F., Morilla, M. J., Romero, E. L., Photodynamic ultradeformable liposomes: Design and characterization, *Int. J. Pharm.*, **2007**, 330, 183-194.
 104. Leroux, J. C., Roux, E., Le Garrec, D., Hong, K. L., Drummond, D. C., N-isopropylacrylamide copolymers for the preparation of pH-sensitive liposomes and polymeric micelles, *J. Control. Release*, **2001**, 72, 71-84.
 105. Kuznetsov, A. A., Filippov, V. I., Alyautdin, R. N., Torshina, N. L., Kuznetsov, O. A., Application of magnetic liposomes for magnetically guided transport of muscle relaxants and anti-cancer photodynamic drugs, *J. Magn. Magn. Mater.*, **2001**, 225, 95-100.
 106. van Nostrum, C. F., Polymeric micelles to deliver photosensitizers for photodynamic therapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2004**, 56, 9-16.
 107. Allemann, E., Rousseau, J., Basseur, N., Kudrevich, S. V., Lewis, K., vanLier, J. E., Photodynamic therapy of tumours with hexadecafluoro zinc phthalocyanine formulated in PEG-coated poly(lactic acid) nanoparticles, *Int. J. Cancer*, **1996**, 66, 821-824.
 108. Kopelman, R., Koo, Y. E. L., Philbert, M., Moffat, B. A., Reddy, G. R., McConville, P., Hall, D. E., Chenevert, T. L., Bhojani, M. S., Buck, S. M., Rehemtulla, A., Ross, B. D., Multifunctional nanoparticle platforms for in vivo MRI enhancement and photodynamic therapy of a rat brain cancer, *J. Magn. Magn. Mater.*, **2005**, 293, 404-410.
 109. Jiang, X. J., Huang, J. D., Zhu, Y. J., Tang, F. X., Ng, D. K. P., Sun, J. C., Preparation and in vitro photodynamic activities of novel axially substituted silicon (IV) phthalocyanines and their bovine serum albumin conjugates, *Bioorg. Med. Chem.*

- Lett.*, **2006**, 16, 2450-2453.
110. Primo, F. L., Michieletto, L., Rodrigues, M. A. M., Macaroff, P. P., Morais, P. C., Lacava, Z. G. M., Bentley, M., Tedesco, A. C., Magnetic nanoemulsions as drug delivery system for Foscan (R): Skin permeation and retention in vitro assays for topical application in photodynamic therapy (PDT) of skin cancer, *J. Magn. Magn. Mater.*, **2007**, 311, 354-357.
 111. Chen, B., Pogue, B. W., Hoopes, P. J., Hasan, T., Vascular and cellular targeting for photodynamic therapy, *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **2006**, 16, 279-305.
 112. Mew, D., Wat, C. K., Towers, G. H. N., Levy, J. G., Photoimmunotherapy - Treatment of Animal Tumors with Tumor-Specific Monoclonal Antibody-Hematoporphyrin Conjugates, *J. Immunol.*, **1983**, 130, 1473-1477.
 113. Konan, Y. N., Gurny, R., Allemann, E., State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **2002**, 66, 89-106.
 114. Roby, A., Erdogan, S., Torchilin, V. P., Solubilization of poorly soluble PDT agent, meso-tetraphenylporphin, in plain or immunotargeted PEG-PE micelles results in dramatically improved cancer cell killing in vitro, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2006**, 62, 235-240.
 115. Reddy, G. R., Bhojani, M. S., McConville, P., Moody, J., Moffat, B. A., Hall, D. E., Kim, G., Koo, Y. E. L., Woolliscroft, M. J., Sugai, J. V., Johnson, T. D., Philbert, M. A., Kopelman, R., Rehemtulla, A., Ross, B. D., Vascular targeted nanoparticles for imaging and treatment of brain tumors, *Clin. Cancer Res.*, **2006**, 12, 6677-6686.
 116. Gilyazova, D. G., Rosenkranz, A. A., Gulak, P. V., Lunin, V. G., Sergienko, O. V., Khrantsov, Y. V., Timofeyev, K. N., Grin, M. A., Mironov, A. F., Rubin, A. B., Georgiev, G. P., Sobolev, A. S., Targeting cancer cells by novel engineered modular transporters, *Cancer Res.*, **2006**, 66, 10534-10540.
 117. Tirand, L., Frochot, C., Vanderesse, R., Thornas, N., Trinquet, E., Pinel, S., Viriot, M. L., Guillemain, F., Barberi-Heyob, M., A peptide competing with VEGF(165) binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells, *J. Control. Release*, **2006**, 111, 153-164.
 118. Linares, R., Pacheco, J. R., Good, T. A., Efficacy of different targeting agents in the photolysis of interleukin-2 receptor bearing cells, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **2004**, 77, 17-26.
 119. Elbayoumi, T. A., Pabba, S., Roby, A., Torchilin, V. P., Antinucleosome antibody-modified liposomes and lipid-core micelles for tumor-targeted delivery of therapeutic and diagnostic agents, *J. Liposome Res.*, **2007**, 17, 1-14.
 120. Ichikawa, K., Hikita, T., Maeda, N., Yonezawa, S., Takeuchi, Y., Asai, T., Namba, Y., Oku, N., Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) by using long-circulating liposomes modified with peptide specific to angiogenic vessels, *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.*, **2005**, 1669, 69-74.
 121. van Dongen, G., Visser, G. W., Vrouwenraets, M. B., Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2004**, 56, 31-52.
 122. Huang, L., Zhao, F. Q., Huang, X., Zhang, F. S., Study of photoimmunoconjugates, *Prog. Chem.*, **2007**, 19, 527-534.
 123. Staneloudi, C., Smith, K. A., Hudson, R., Malatesti, N., Savoie, H., Boyle, R. W., Greenman, J., Development and characterization of novel photosensitizer : scFv conjugates for use in photodynamic therapy of cancer, *Immunology*, **2007**, 120, 512-517.
 124. Akhlynnina, T. V., Rosenkranz, A. A., Jans, D. A., Sobolev, A. S., Insulin-Mediated

- Intracellular Targeting Enhances the Photodynamic Activity of Chlorin E(6), *Cancer Res.*, **1995**, 55, 1014-1019.
125. Derycke, A. S. L., Kamuhabwa, A., Gijssens, A., Roskams, T., De Vos, D., Kasran, A., Huwyler, J., Missiaen, L., de Witte, P. A. M., Transferrin-conjugated liposome targeting of photosensitizer ALPcS4 to rat bladder carcinoma cells, *J. Natl. Cancer Inst.*, **2004**, 96, 1620-1630.
 126. Schneider, R. L., Schmitt, F., Frochot, C., Fort, Y., Lourette, N., Guillemain, F., Muller, J. F., Barberi-Heyob, M., Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy, *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, 13, 2799-2808.
 127. Stefflova, K., Li, H., Chen, J., Zheng, G., Peptide-based pharmacomodulation of a cancer-targeted optical imaging and photodynamic therapy agent, *Bioconjug. Chem.*, **2007**, 18, 379-388.
 128. Garcia, G., Sol, V., Lamarche, F., Granet, R., Guilloton, M., Champavier, Y., Krausz, P., Synthesis and photocytotoxic activity of new chlorin-polyamine conjugates, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16, 3188-3192.
 129. Sol, V., Lamarche, F., Enache, M., Garcia, G., Granet, R., Guilloton, M., Blais, J. C., Krausz, P., Polyamine conjugates of meso-tritylporphyrin and protoporphyrin IX: Potential agents for photodynamic therapy of cancers, *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, 14, 1364-1377.
 130. Di Stasio, B., Frochot, C., Dumas, D., Even, P., Zwier, J., Muller, A., Didelon, J., Guillemain, F., Viriot, M. L., Barberi-Heyob, M., The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin, *Eur. J. Med. Chem.*, **2005**, 40, 1111-1122.
 131. Hombrecher, H. K., Ohm, S., Koll, D., Synthesis of galactopyranosyl substituted porphyrins, *Tetrahedron*, **1996**, 52, 5441-5448.
 132. Hombrecher, H. K., Schell, C., Thiem, J., Synthesis and investigation of a galactopyranosyl-cholesteryloxy substituted porphyrin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, 6, 1199-1202.
 133. El-Akra, N., Noirot, A., Faye, J. C., Souchard, J. P., Synthesis of estradiol-pheophorbide a conjugates: evidence of nuclear targeting, DNA damage and improved photodynamic activity in human breast cancer and vascular endothelial cells, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2006**, 5, 996-999.
 134. Taquet, J. P., Frochot, C., Manneville, V., Barberi-Heyob, M., Phthalocyanines covalently bound to biomolecules for a targeted photodynamic therapy, *Curr. Med. Chem.*, **2007**, 14, 1673-1687.
 135. Boutorine, A. S., Brault, D., Takasugi, M., Delgado, O., Helene, C., Chlorin-oligonucleotide conjugates: Synthesis, properties, and red light-induced photochemical sequence-specific DNA cleavage in duplexes and triplexes, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 9469-9476.
 136. Sessler, J. L., Sansom, P. I., Kral, V., Oconnor, D., Iverson, B. L., Sapphyrin-oligonucleotide conjugates. Novel sequence-specific DNA photomodifying agents with increased binding affinity, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 12322-12330.
 137. Babinec, P., Babincova, M., Sourivong, P., Leszczynska, D., Efficient treatment of pigmented B16 melanoma using photosensitized long-circulating magnetofullerenosomes, *J. Magn. Magn. Mater.*, **2005**, 293, 394-397.
 138. Furlani, E. J., Furlani, E. P., A model for predicting magnetic targeting of multifunctional particles in the microvasculature, *J. Magn. Magn. Mater.*, **2007**, 312, 187-193.
 139. Pani, R., Pellegrini, R., Cinti, M. N., Trotta, C., Bennati, P., Betti, M., De Vincentis, G., Cusanno, F., Garibaldi, F., Ridolfi, S., Majewsky, S., Tsui, B. M. W., New devices

- for imaging in nuclear medicine, *Cancer Biother. Radiopharm.*, **2004**, 19, 121-128.
140. Hill, J. S., Kahl, S. B., Kaye, A. H., Stylli, S. S., Koo, M. S., Gonzales, M. F., Vardaxis, N. J., Johnson, C. I., Selective Tumor Uptake of a Boronated Porphyrin in an Animal-Model of Cerebral Glioma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1992**, 89, 1785-1789.
 141. Wilson, B. C., Olivo, M., Singh, G., Subcellular localization of Photofrin(R) and aminolevulinic acid and photodynamic cross-resistance in vitro in radiation-induced fibrosarcoma cells sensitive or resistant to photofrin-mediated photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol.*, **1997**, 65, 166-176.
 142. Kessel, D., Luo, Y., Deng, Y. Q., Chang, C. K., The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol.*, **1997**, 65, 422-426.
 143. Sun, X., Leung, W. N., Photodynamic therapy with pyropheophorbide-a methyl ester in human lung carcinoma cancer cell: Efficacy, localization and apoptosis, *Photochem. Photobiol.*, **2002**, 75, 644-651.
 144. Geze, M., Morliere, P., Maziere, J. C., Smith, K. M., Santus, R., Lysosomes, a Key Target of Hydrophobic Photosensitizers Proposed for Photochemotherapeutic Applications, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **1993**, 20, 23-35.
 145. Berg, K., Moan, J., Lysosomes as Photochemical Targets, *Int. J. Cancer*, **1994**, 59, 814-822.
 146. MacDonald, I. J., Morgan, J., Bellnier, D. A., Paszkiewicz, G. M., Whitaker, J. E., Litchfield, D. J., Dougherty, T. J., Subcellular localization patterns and their relationship to photodynamic activity of pyropheophorbide-a derivatives, *Photochem. Photobiol.*, **1999**, 70, 789-797.
 147. Woodburn, K. W., Vardaxis, N. J., Hill, J. S., Kaye, A. H., Phillips, D. R., Subcellular-Localization of Porphyrins Using Confocal Laser Scanning Microscopy, *Photochem. Photobiol.*, **1991**, 54, 725-732.
 148. Berg, K., Selbo, P. K., Prasmickaite, L., Hogset, A., Photochemical drug and gene delivery, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **2004**, 6, 279-287.
 149. Prasmickaite, L., Hogset, A., Berg, K., Evaluation of different photosensitizers for use in photochemical gene transfection, *Photochem. Photobiol.*, **2001**, 73, 388-395.
 150. Hogset, A., Engesaeter, B. O., Prasmickaite, L., Berg, K., Fodstad, O., Maelandsmo, G. M., Light-induced adenovirus gene transfer, an efficient and specific gene delivery technology for cancer gene therapy, *Cancer Gene Ther.*, **2002**, 9, 365-371.
 151. Folini, M., Berg, K., Millo, E., Villa, R., Prasmickaite, L., Daidone, M. G., Benatti, U., Zaffaroni, N., Photochemical internalization of a peptide nucleic acid targeting the catalytic subunit of human telomerase, *Cancer Res.*, **2003**, 63, 3490-3494.
 152. Selbo, P. K., Sandvig, K., Kirveliene, V., Berg, K., Release of gelonin from endosomes and lysosomes to cytosol by photochemical internalization, *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.*, **2000**, 1475, 307-313.
 153. Berg, K., Madslie, K., Bommer, J. C., Oftebro, R., Winkelman, J. W., Moan, J., Light-Induced Relocalization of Sulfonated Meso-Tetraphenylporphines in Nhik 3025 Cells and Effects of Dose Fractionation, *Photochem. Photobiol.*, **1991**, 53, 203-210.
 154. Peng, Q., Farrants, G. W., Madslie, K., Bommer, J. C., Moan, J., Danielsen, H. E., Nesland, J. M., Subcellular-Localization, Redistribution and Photobleaching of Sulfonated Aluminum Phthalocyanines in a Human-Melanoma Cell-Line, *Int. J. Cancer*, **1991**, 49, 290-295.
 155. Hamblin, M. R., Miller, J. L., Ortel, B., Scavenger-receptor targeted photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol.*, **2000**, 72, 533-540.
 156. Morgan, J., Oseroff, A. R., Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2001**, 49, 71-86.

157. Runnels, J. M., Chen, N., Ortel, B., Kato, D., Hasan, T., BPD-MA-mediated photosensitization in vitro and in vivo: cellular adhesion and beta(1) integrin expression in ovarian cancer cells, *Br. J. Cancer*, **1999**, 80, 946-953.
158. Takeuchi, Y., Kurohane, K., Ichikawa, K., Yonezawa, S., Nango, M., Oku, N., Induction of intensive tumor suppression by antiangiogenic photodynamic therapy using polycation-modified liposomal photosensitizer, *Cancer*, **2003**, 97, 2027-2034.
159. Kessel, D., Luguya, R., Vicente, M. G. H., Localization and photodynamic efficacy of two cationic porphyrins varying in charge distribution, *Photochem. Photobiol.*, **2003**, 78, 431-435.
160. Dummin, H., Cernay, T., Zimmermann, H. W., Selective photosensitization of mitochondria in HeLa cells by cationic Zn(II) phthalocyanines with lipophilic side-chains, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **1997**, 37, 219-229.
161. Rashid, F., Horobin, R. W., Interaction of Molecular Probes with Living Cells and Tissues .2. A Structure-Activity Analysis of Mitochondrial Staining by Cationic Probes, and a Discussion of the Synergistic Nature of Image-Based and Biochemical Approaches, *Histochemistry*, **1990**, 94, 303-308.
162. Aveline, B. M., Redmond, R. W., Can cellular phototoxicity be accurately predicted on the basis of sensitizer photophysics?, *Photochem. Photobiol.*, **1999**, 69, 306-316.
163. Hsieh, Y. J., Wu, C. C., Chang, C. J., Yu, J. S., Subcellular localization of Photofrin (R) determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: When plasma membranes are the main targets, *J. Cell. Physiol.*, **2003**, 194, 363-375.
164. Teiten, M. H., Bezdetnaya, L., Morliere, P., Santus, R., Guillemin, F., Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan((R)) localisation in cultured tumour cells, *Br. J. Cancer*, **2003**, 88, 146-152.
165. Bellnier, D. A., Ho, Y. K., Pandey, R. K., Missert, J. R., Dougherty, T. J., Distribution and Elimination of Photofrin-Ii in Mice, *Photochem. Photobiol.*, **1989**, 50, 221-228.
166. Zuk, M. M., Rihter, B. D., Kenney, M. E., Rodgers, M. A. J., Kreimerbirnbaum, M., Pharmacokinetic and Tissue Distribution Studies of the Photosensitizer Bis(Di-Isobutyl Octadecylsiloxy)Silicon 2,3-Naphthalocyanine (Isobosinc) in Normal and Tumor-Bearing Rats, *Photochem. Photobiol.*, **1994**, 59, 66-72.
167. Chan, W. S., Marshall, J. F., Svensen, R., Bedwell, J., Hart, I. R., Effect of Sulfonation on the Cell and Tissue Distribution of the Photosensitizer Aluminum Phthalocyanine, *Cancer Res.*, **1990**, 50, 4533-4538.
168. Egorin, M. J., Zuhowski, E. G., Sentz, D. L., Dobson, J. M., Callery, P. S., Eiseman, J. L., Plasma pharmacokinetics and tissue distribution in CD2F1 mice of Pc4 NSC 676418 , a silicone phthalocyanine photodynamic sensitizing agent, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1999**, 44, 283-294.
169. Woodburn, K. W., Stylli, S., Hill, J. S., Kaye, A. H., Reiss, J. A., Phillips, D. R., Evaluation of Tumor and Tissue Distribution of Porphyrins for Use in Photodynamic Therapy, *Br. J. Cancer*, **1992**, 65, 321-328.
170. Schuitmaker, J. J., Feitsma, R. I. J., JourneedeKorver, J. G., Dubbelman, T., Pauwels, E. K. J., Tissue Distribution of Bacteriochlorin-a Labeled with Tc-99m-Per technetate in Hamster Greene Melanoma, *Int. J. Radiat. Biol.*, **1993**, 64, 451-458.
171. Hamblin, M. R., Newman, E. L., On the Mechanism of the Tumor-Localizing Effect in Photodynamic Therapy, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **1994**, 23, 3-8.
172. Larroque, C., Pelegrin, A., VanLier, J. E., Serum albumin as a vehicle for zinc phthalocyanine: Photodynamic activities in solid tumour models, *Br. J. Cancer*, **1996**, 74, 1886-1890.
173. Jori, G., In vivo Transport and Pharmacokinetic Behavior of Tumor Photosensitizers, *Ciba Found. Symp.*, **1989**, 146, 78-94.

174. Jori, G., Reddi, E., The Role of Lipoproteins in the Delivery of Tumor-Targeting Photosensitizers, *Int. J. Biochem.*, **1993**, 25, 1369-1375.
175. Kessel, D., Morgan, A., Garbo, G. M., Sites and Efficacy of Photodamage by Tin Etiopurpurin In Vitro Using Different Delivery Systems, *Photochem. Photobiol.*, **1991**, 54, 193-196.
176. Kongshaug, M., Moan, J., Brown, S. B., The Distribution of Porphyrins with Different Tumor Localizing Ability among Human-Plasma Proteins, *Br. J. Cancer*, **1989**, 59, 184-188.
177. Maziere, J. C., Santus, R., Morliere, P., Reyftmann, J. P., Candide, C., Mora, L., Salmon, S., Maziere, C., Gatt, S., Dubertret, L., Cellular Uptake and Photosensitizing Properties of Anticancer Porphyrins in Cell-Membranes and Low and High-Density Lipoproteins, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **1990**, 6, 61-68.
178. Yuan, F., Leunig, M., Berk, D. A., Jain, R. K., Microvascular Permeability of Albumin, Vascular Surface-Area, and Vascular Volume Measured in Human Adenocarcinoma Ls174t Using Dorsal Chamber in Scid Mice, *Microvasc. Res.*, **1993**, 45, 269-289.
179. Korbelik, M., Low-Density-Lipoprotein Receptor Pathway in the Delivery of Photofrin - How Much Is It Relevant for Selective Accumulation of the Photosensitizer in Tumors, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **1992**, 12, 107-109.
180. Allison, B. A., Pritchard, P. H., Levy, J. G., Evidence for Low-Density-Lipoprotein Receptor-Mediated Uptake of Benzoporphyrin Derivative, *Br. J. Cancer*, **1994**, 69, 833-839.
181. Roberts, W. G., Hasan, T., Role of Neovasculature and Vascular-Permeability on the Tumor Retention of Photodynamic Agents, *Cancer Res.*, **1992**, 52, 924-930.
182. Korbelik, M., Krosi, G., Photofrin Accumulation in Malignant and Host-Cell Populations of a Murine Fibrosarcoma, *Photochem. Photobiol.*, **1995**, 62, 162-168.
183. Korbelik, M., Krosi, G., Chaplin, D. J., Photofrin Uptake by Murine Macrophages, *Cancer Res.*, **1991**, 51, 2251-2255.
184. Pottier, R., Kennedy, J. C., New Trends in Photobiology (Invited Review) - the Possible Role of Ionic Species in Selective Biodistribution of Photochemotherapeutic Agents toward Neoplastic Tissue, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **1990**, 8, 1-16.
185. Graham, A., Li, G. T. L., Chen, Y. H., Morgan, J., Oseroff, A., Dougherty, T. J., Pandey, R. K., Structure-activity relationship of new octaethylporphyrin-based benzochlorins as photosensitizers for photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol.*, **2003**, 77, 561-566.
186. Wendler, G., Lindemann, P., Lacapere, J. J., Papadopoulos, V., Protoporphyrin IX binding and transport by recombinant mouse PBR, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2003**, 311, 847-852.
187. Lampidis, T. J., Bernal, S. D., Summerhayes, I. C., Chen, L. B., Selective Toxicity of Rhodamine-123 in Carcinoma-Cells In Vitro, *Cancer Res.*, **1983**, 43, 716-720.
188. Castro, D. J., Saxton, R. E., Rodgerson, D. O., Fu, Y. S., Bhuta, S. M., Fetterman, H. R., Tartell, P. B., Ward, P. H., Rhodamine-123 as a New Laser-Dye - In Vivo Study of Dye Effects on Murine Metabolism, Histology and Ultrastructure, *Laryngoscope*, **1989**, 99, 1057-1062.
189. Wilmes, L. J., Hoehnberlage, M., Els, T., Bockhorst, K., Eis, M., Bonnekoh, P., Hossmann, K. A., In Vivo Relaxometry of 3 Brain-Tumors in the Rat - Effect of Mn-Tpps, a Tumor-Selective Contrast Agent, *J. Magn. Reson. Imaging*, **1993**, 3, 5-12.
190. Ikezaki, K., Nomura, T., Takahashi, M., Fritzzieroth, B., Inamura, T., Fukui, M., Selective and Prolonged Mri Enhancement by Mn-Tpps in an Experimental Rat-Brain Tumor with Peripheral Benzodiazepine Receptors, *Neurol. Res.*, **1994**, 16, 393-397.
191. Castano, A. P., Demidova, T. N., Hamblin, M. R., Mechanisms in photodynamic

- therapy: Part three-Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction, *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2005**, 2, 91-106.
192. Ahmad, N., Mukhtar, H., Mechanism of photodynamic therapy-induced cell death, *Meth. Enzymol.*, **2000**, 319, 342-358.
 193. Plaetzer, K., Kiesslich, T., Krammer, B., Hammerl, P., Characterization of the cell death modes and the associated changes in cellular energy supply in response to AlPcS4-PDT, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2002**, 1, 172-177.
 194. Dahle, J., Kaalhus, O., Moan, J., Steen, H. B., Cooperative effects of photodynamic treatment of cells in microcolonies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1997**, 94, 1773-1778.
 195. Dahle, J., Steen, H. B., Moan, J., The mode of cell death induced by photodynamic treatment depends on cell density, *Photochem. Photobiol.*, **1999**, 70, 363-367.
 196. Dahle, J., Bagdonas, S., Kaalhus, O., Olsen, G., Steen, H. B., Moan, J., The bystander effect in photodynamic inactivation of cells, *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.*, **2000**, 1475, 273-280.
 197. Shao, C. L., Furusawa, Y., Kobayashi, Y., Funayama, T., Wada, S., Bystander effect induced by counted high-LET particles in confluent human fibroblasts: a mechanistic study, *FASEB J.*, **2003**, 17, 1422-1427.
 198. Henderson, B. W., Fingar, V. H., Oxygen Limitation of Direct Tumor-Cell Kill During Photodynamic Treatment of a Murine Tumor-Model, *Photochem. Photobiol.*, **1989**, 49, 299-304.
 199. Dolmans, D., Kadambi, A., Hill, J. S., Waters, C. A., Robinson, B. C., Walker, J. P., Fukumura, D., Jain, R. K., Vascular accumulation of a novel photosensitizer, MV6401, causes selective thrombosis in tumor vessels after photodynamic therapy, *Cancer Res.*, **2002**, 62, 2151-2156.
 200. Fingar, V. H., Siegel, K. A., Wieman, T. J., Doak, K. W., The Effects of Thromboxane Inhibitors on the Microvascular and Tumor Response to Photodynamic Therapy, *Photochem. Photobiol.*, **1993**, 58, 393-399.
 201. Fingar, V. H., Wieman, T. J., Karavolos, P. S., Doak, K. W., Ouellet, R., Vanlier, J. E., The Effects of Photodynamic Therapy Using Differently Substituted Zinc Phthalocyanines on Vessel Constriction, Vessel Leakage and Tumor Response, *Photochem. Photobiol.*, **1993**, 58, 251-258.
 202. McMahan, K. S., Wieman, T. J., Moore, P. H., Fingar, V. H., Effects of Photodynamic Therapy Using Mono-L-Aspartyl Chlorin E(6) on Vessel Constriction, Vessel Leakage, and Tumor Response, *Cancer Res.*, **1994**, 54, 5374-5379.
 203. Gilissen, M. J., Vandembeldewit, L. E. A., Star, W. M., Koster, J. F., Sluiter, W., Effect of Photodynamic Therapy on the Endothelium-Dependent Relaxation of Isolated Rat Aortas, *Cancer Res.*, **1993**, 53, 2548-2552.
 204. Fingar, V. H., Wieman, T. J., Doak, K. W., Role of Thromboxane and Prostacyclin Release on Photodynamic Therapy-Induced Tumor Destruction, *Cancer Res.*, **1990**, 50, 2599-2603.
 205. Reddan, J. C., Anderson, C. Y., Xu, H., Hrabovsky, S., Freye, K., Fairchild, R., Tubesing, K. A., Elmets, C. A., Immunosuppressive effects of silicon phthalocyanine photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol.*, **1999**, 70, 72-77.
 206. Trauner, K. B., Gandour-Edwards, R., Bamberg, M., Shortkroff, S., Sledge, C., Hasan, T., Photodynamic synovectomy using benzoporphyrin derivative in an antigen-induced arthritis model for rheumatoid arthritis, *Photochem. Photobiol.*, **1998**, 67, 133-139.
 207. Krosli, G., Korbelik, M., Dougherty, G. J., Induction of Immune Cell Infiltration into Murine ScceVII Tumor by Photofrin-Based Photodynamic Therapy, *Br. J. Cancer*,

- 1995**, 71, 549-555.
208. Korbely, M., Kroszl, G., Kroszl, J., Dougherty, G. J., The role of host lymphoid populations in the response of mouse EMT6 tumor to photodynamic therapy, *Cancer Res.*, **1996**, 56, 5647-5652.
 209. Korbely, M., Dougherty, G. J., Photodynamic therapy-mediated immune response against subcutaneous mouse tumors, *Cancer Res.*, **1999**, 59, 1941-1946.
 210. Kudrevich, S. V., vanLier, J. E., Azaanalogs of phthalocyanine: Syntheses and properties, *Coord. Chem. Rev.*, **1996**, 156, 163-182.
 211. Mitzel, F., FitzGerald, S., Beeby, A., Faust, R., The synthesis of arylalkyne-substituted tetrapyrizinoporphyrazines and an evaluation of their potential as photosensitisers for photodynamic therapy, *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 1136-1142.
 212. Kobayashi, N., Nevin, W. A., Optically active tetrapyrizinoporphyrazines and their circular dichroism in monomeric and dimeric forms, *Chem. Lett.*, **1998**, 851-852.
 213. Ohta, K., Watanabe, T., Hasebe, H., Morizumi, Y., Fujimoto, T., Yamamoto, I., Lelievre, D., Simon, J., Discotic Liquid-Crystals of Transition-Metal Complexes-9 - Synthesis and Properties of Discotic Liquid-Crystals of Tetrapyrizinoporphyrazine Derivatives, *Mol. Cryst. Liquid Cryst.*, **1991**, 196, 13-26.
 214. RodriguezMorgade, S., Hanack, M., Synthesis, separation and characterization of the structural isomers of octa-tert-butylphthalocyanines and dienophilic phthalocyanine derivatives, *Chem.-Eur. J.*, **1997**, 3, 1042-1051.
 215. Freyer, W., Octa-(4-Tert-Butylphenyl)-Tetrapyrizinoporphyrazine and Its Metal-Complexes, *J. Prakt. Chem./Chem. Ztg.*, **1994**, 336, 690-692.
 216. Baumann, F., Bienert, B., Rosch, G., Vollmann, H., Wolf, W., Isoindolenines as Intermediate Products of the Phthalocyanin Synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1956**, 68, 133-150.
 217. Oliver, S. W., Smith, T. D., Oligomeric Cyclization of Dinitriles in the Synthesis of Phthalocyanines and Related-Compounds - the Role of the Alkoxide Anion, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1987**, 1579-1582.
 218. Leznoff, C. C., Greenberg, S., Khouw, B., Lever, A. B. P., The Syntheses of Monosubstituted and Disubstituted Phthalocyanines Using a Dithioimide, *Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim.*, **1987**, 65, 1705-1713.
 219. Terekhov, D. S., Nolan, K. J. M., McArthur, C. R., Leznoff, C. C., Synthesis of 2,3,9,10,16,17,23,24-octaalkynylphthalocyanines and the effects of concentration and temperature on their H-1 NMR spectra, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 3034-3040.
 220. Kudrevich, S. V., vanLier, J. E., Substituted tetra-2,3-pyrazinoporphyrazines .2. Bis(tri-n-hexylsiloxy)silicon derivatives, *Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim.*, **1996**, 74, 1718-1723.
 221. Hurley, T. J., Robinson, A., Trotz, S. I., Complexes Derived from 1,3-Diiminoisoindoline-Containing Ligands .2. Stepwise Formation of Nickel Phthalocyanine, *Inorg. Chem.*, **1967**, 6, 389-392.
 222. Yang, C. H., Chang, C. T., Complexes Derived from Phthalonitrile - the Intermediates to Nickel Phthalocyaninate, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1982**, 2539-2540.
 223. Kudrevich, S. V., Galpern, M. G., Vanlier, J. E., Synthesis of Octacarboxytetra(2,3-Pyrazino)Porphyrazine - Novel Water-Soluble Photosensitizers for Photodynamic Therapy, *Synthesis-Stuttgart*, **1994**, 779-781.
 224. de la Torre, G., Claessens, C. G., Torres, T., Phthalocyanines: The need for selective synthetic approaches, *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, 2821-2830.
 225. Brewis, M., Clarkson, G. J., Holder, A. M., McKeown, N. B., Phthalocyanines substituted with dendritic wedges: glass-forming columnar mesogens, *Chem. Commun.*, **1998**, 969-970.
 226. Clarkson, G. J., McKeown, N. B., Treacher, K. E., Synthesis and Characterization of

- Some Novel Phthalocyanines Containing Both Oligo(Ethyleneoxy) and Alkyl or Alkoxy Side-Chains - Novel Unsymmetrical Discotic Mesogens, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1995**, 1817-1823.
227. McKeown, N. B., Chambrier, I., Cook, M. J., Synthesis and Characterization of Some 1,4,8,11,15,18,22,25-Octa-Alkyl-22,25-Bis(Carboxypropyl)Phthalocyanines and 1,4,8,11,15,18-Hexa-Alkyl-22,25-Bis(Carboxypropyl)Phthalocyanines, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1990**, 1169-1177.
228. Chambrier, I., Cook, M. J., Cracknell, S. J., McMurdo, J., Synthesis and Characterization of Some Nonuniformly Substituted Mesogenic Phthalocyanines, *J. Mater. Chem.*, **1993**, 3, 841-849.
229. Kobayashi, N., Kondo, R., Nakajima, S., Osa, T., New Route to Unsymmetrical Phthalocyanine Analogs by the Use of Structurally Distorted Subphthalocyanines, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 9640-9641.
230. Sastre, A., Torres, T., Hanack, M., Synthesis of Novel Unsymmetrical Monoaminated Phthalocyanines, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 8501-8504.
231. Leznoff, C. C., Hall, T. W., The Synthesis of a Soluble, Unsymmetrical Phthalocyanine on a Polymer Support, *Tetrahedron Lett.*, **1982**, 23, 3023-3026.
232. Young, J. G., Onyebuagu, W., Synthesis and Characterization of Di-Disubstituted Phthalocyanines, *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 2155-2159.
233. Nolan, K. J. M., Hu, M., Leznoff, C. C., "Adjacent" substituted phthalocyanines, *Synlett*, **1997**, 593-594.
234. Kobayashi, N., Optically active 'adjacent' type non-centrosymmetrically substituted phthalocyanines, *Chem. Commun.*, **1998**, 487-488.
235. Bruseghini, I., Fabbrizzi, L., Licchelli, M., Taglietti, A., Coordinative control of photoinduced electron transfer: bulky carboxylates as molecular curtains, *Chem. Commun.*, **2002**, 1348-1349.