

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Solubilizační systémy pro potenciální fotodynamicky aktivní látky III.



Školitel: PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D.

Hradec Králové, 2009

Milada Grandová

OBSAH

1. TEORETICKÁ ČÁST	5
1.1 ÚVOD.....	5
1.2 HISTORIE A SOUČASNOST PDT.....	7
1.3 PRINCIP PDT.....	9
1.4 FOTOLENIZIZÉR.....	17
1.4.1 vlastnosti PS.....	17
1.4.2 rozdělení PS.....	19
1.4.2.1 1.generace.....	19
1.4.2.2 2.generace.....	20
1.4.2.3 3.generace.....	29
1.5 SOLUBILIZACE.....	29
1.5.1 micely.....	29
1.5.2 solubilizace.....	31
1.5.3 mikroemulze.....	34
1.5.4 nanoemulze.....	35
2. CÍL PRÁCE	36
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
3.1 EMULGÁTORY.....	37
3.2 POUŽITÉ FOTOLENIZIZÉRY.....	41
3.3 PŘÍSTROJE.....	42
3.4 PŘÍPRAVA EMULZÍ.....	42
3.5 PŘÍPRAVA EMULZÍ S BARVIVY.....	47
3.6 MĚŘENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC.....	51
3.7 MĚŘENÍ CYTOTOXICITY.....	52
4. DISKUZE	54
5. ZÁVĚR	55
6. ABSTRAKT	57
7. LITERATURA	58

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány.“

V Hradci Králové

Milada Grandová

Chtěla bych poděkovat svému školiteli PharmDr. Miroslavu Miletínovi, Ph.D. za odborné vedení a trpělivost při vypracovávání úkolů a experimentů k diplomové práci. Taktéž děkuji Doc.RNDr.Pavlu Doležalovi CSc. za poskytnutou pomoc a přístrojové vybavení při měření.

1. Teoretická část

1.1 ÚVOD

Fotodynamická terapie (photodynamic therapy PDT) je diagnostická a léčebná metoda využívaná zejména při léčbě tumorů. Je založená na podání fotosenzitivní látky, jež se po aplikaci hromadí přednostně v nejrychleji proliferujících buňkách a po ozáření světlem určitého spektra způsobí smrt odpovídajících buněk. Díky svému stimulačnímu efektu se metoda používá také v kosmetice.

PDT je založena na spolupůsobení složek, jež samy o sobě nejsou toxické a neprojevují žádné biologické efekty. Jedná se o kombinaci fotodynamicky aktivní sloučeniny, světla a molekulárního kyslíku. Světlocitlivá látka tzv. fotosenzitizér je aplikován v zásadě trojím způsobem. Buďto mastí, obsahující příslušnou látku, nebo je zaveden intravenózně či intralezionálně (přímo do místa novotvaru). Koncentrace fotosenzitizéru v postižených buňkách dosahuje optimální hodnoty v různých časech od 5 minut až po 72 hodin v závislosti na způsobu aplikace a druhu použité látky. Jeho kumulace a koncentrace v tkáních spolu s dávkou ozáření, je hlavním faktorem určujícím účinek PDT. Intracelulární lokalizace PS a jeho následná PD aktivita závisí především na jeho struktuře, lipofilitě, substituentech a jeho náboji.

Účinnost PDT je dána osvětlením tumoru světlem vhodné vlnové délky, kdy molekuly fotosenzitizéru absorbují fotony a přechází do singletového a následně tripletového excitovaného stavu. Dále dochází nejčastěji k přenosu energie z molekuly fotosenzitizéru na molekulu kyslíku. Takováto excitovaná molekula kyslíku je asi 1000 krát reaktivnější než jeho základní molekulární stav. Singletový kyslík (a ostatní formy aktivního kyslíku, např. superoxidový radikál, hydroperoxidový a hydroxylový radikál) pak reaguje s buněčnými membránami za vzniku lipidperoxidového radikálu a následné nekrózy či apoptózy buněk. Na destrukci maligní tkáně a nádorových buněk se podílí také cévní poškození, které znemožňuje zásobení tkáně krví a živinami následující ischemií tumoru, fagocytární imunita a zánět. Fotosenzitizér se během celého fotodynamického procesu ve tkáni zpětně regeneruje, a proto jedna molekula fotosenzitizéru může způsobit vznik většího množství reaktivního singletového kyslíku. Účinek PDT na nádorovou tkáň se díky této regeneraci PS znásobuje. Poměr apoptotické a nekrotické smrti buněk závisí na typu

nádoru, ale především na koncentraci fotosenzitizéru a dávce ozáření. Nižší dávky fotosenzitizéru a záření způsobují apoptózu, vyšší nekrózu, ovšem při každé aplikaci dochází k oběma typům smrti buněk¹.

Výhodou fotodynamické terapie je téměř nulová toxicita použité látky, bez přístupu světla, takže je možno ji (narozdíl například od chemo- či radioterapie) v krátkém čase mnohokrát opakovat. Další výhodou u některých PS je určitá poměrně přesná selekce nádorových buněk, která je založena na rozdílu v koncentraci senzitivizéru mezi normální a cílovou tkání. Metoda tedy zničí především nádorové buňky a okolní zdravé zůstanou neporušeny. Za zmínku také stojí asi nejzřejmější výhoda, a totiž že se řadí mezi neinvazivní metody.

Mezi nevýhody patří omezená možnost použití, neboť světlo používané k aktivaci fotosenzitizéru proniká nejvýše 1cm do tkáně a PDT lze tedy použít pouze na povrchu těla případně na části orgánů dostupné pomocí endoskopů a katetrů. Metoda vpichu optického vlákna s aktivizujícím světlem přímo do tkáně se zatím příliš nepoužívá. Nevýhodou při nitrožilní aplikaci fotosenzitizéru je několik hodin až týdnů trvající fotosenzitivita kůže po léčbě; pacient se tedy musí vyvarovat pobytu na slunci a vystavení silného světelného záření.

Nejvýznamnější uplatnění nalézá fotodynamická terapie při léčbě různých druhů tumorů, a to jak maligních (zhoubných) tak benigních (nezhoubných). Většinou se zatím jedná o léčbu paliativní nebo doplňkovou, nejčastěji chirurgického zásahu. Jak již bylo zmíněno výše, největším omezením fotodynamické terapie je průchod aktivizujícího světla nejvýše 1cm do hloubky tkáně. Přesto byla s úspěchem použita pro léčbu nádorů žaludku, tlustého střeva, hlavy a krku, ústní a nosních dutin, hrtanu, hltanu, jícnu, plic, močového měchýře, jater, prsu, genitálií i mozku. Nejčastěji se ovšem používá pro léčbu nejrůznějších kožních tumorů a lézí; za všechny zmiňme např. aktinickou keratózu, basaliom či T-lymfom. V kožním lékařství se používá také k léčbě lupénky, bradavic, nebo v estetické medicíně k vyhlazení jizev po akné či vrásek, kdy aktivuje fibroblasty k novotvorbě kolagenu. Využití nachází metoda také při léčbě senilní degenerace makuly (AMD). Velmi nadějnou aplikací je čištění kostní dřevě od leukemických buněk, kdy se pacientovi odebere kostní dřevě, vyčistí se metodou fotodynamické terapie a coby autologní štěp vrátí zpět pacientovi¹.

1.2 HISTORIE A SOUČASNOST PDT

Již starověké civilizace, zahrnující Egypt, Indii a Čínu využívaly potenciálu světla k léčbě některých kožních onemocnění, jakým je vitiligo či psoriáza². V době antiky byly tyto znalosti rozšiřovány, např. helioterapie. Již v této době lidé znali pozitivní efekty slunečního záření i jeho škodlivý potenciál.

V průběhu 19. století se objevilo mnoho zajímavých prací, majících význam pro budoucí výzkum PDT: objev struktury, funkce a vlastnosti krevního barviva hemu a strukturní základy budoucích klinicky významných fotosenzitizérů. Dalším krokem německých vědců bylo odstranění železa z hemu a následná modifikace struktury, jejímž výsledkem byl hematoporfyrin.^{3,4} Významným byl také objev fluorescence, byť v dané době zůstal nedoceněn. Zajímavým krokem ve výzkumu PDT byla léčba neštovic použitím červeného světla a kožní tuberkulózy UV zářením popsána v roce 1901 dánským fyzikem Nilem Finsem⁵, který za tento objev získal v roce 1903 Nobelovu cenu.

Milníkem v PDT byla buněčná smrt vyvolaná interakcí chemikálie a světla popsána Oscarem Raabem. V roce 1900 popsal smrtící efekt červeného akridinu a IČ záření aplikovaného na trepce rodu *Infusoria*⁶. Současně s Raabovým objevem ohlásil fotosenzibilizaci sluncem exponovaných míst epileptických pacientů, kteří byli léčeni parenterálním eosinem, francouzský neurolog Prime⁷.

Roku 1903 Jesionek a von Tappeiner provedli na kožní klinice v Mnichově topickou léčbu kožního tumoru eosinem a světlem⁸. Následně von Tappeiner s Jodlbauerem dokázali, že kyslík je základním prvkem ve fotosensitické reakci. Oni také stanovili termín „fotodynamický efekt“(1907)^{9,10}

V průběhu let 1908-1911 Hausmann zjistil, že kombinace hematoporfyrinu a světla zabíjí prvoky rodu *Paramecium* a červené krvinky.

Myšlenka k použití hematoporfyrinu jako fotodynamického agens vyvstala z výkladu onemocnění zv. porfyrie (porucha metabolismu porfyriu-vrozená vada syntézy hemu). Tento typ onemocnění je doprovázen značnou fotosenzitivitou. Pacienti s tímto onemocněním produkovali velké množství různých typů porfyriu, některé se chovaly jako endogenní fotosenzitizéry, kumulující se v tkáních, nejčastěji v kůži.

Možnost použití porfyriu v PDT odhalil Fischer, nebyla však ještě použita pro klinické účely. Tento krok udělal až Meyer-Betz v roce 1913, kdy si záměrně aplikoval potenciálně efektivní dávku hematoporfyrinu a po následném ozáření zkušel účinky PDT reakce¹¹. Bohužel klinický význam tohoto riskantního experimentu nebyl po další desetiletí

oceněný. V práci Fischera a Meyera-Betze pokračovali Schwartz s Lipsou. Jejich úspěchem byl vývoj čistších a aktivnějších forem hematoporfyrinu, který byl nazván „hematoporfyrin Derivate“ (HpD) a použitý jako první pro diagnostické metody lidských nádorů. Tato látka se později stala základem pro v současné době nejrozšířenější fotosensitizer - Photofrin[®], používaný k terapii nádoru močového měchýře. Experimentální studie provedené roku 1970 potvrdily hypotézu von Tappeinera, že singletový kyslík je hlavním cytotoxickým činitelem ve fotodynamické léčbě¹². Čerpající z předešlých znalostí a zkušeností roku 1975 Dougherty a spol. demonstrovali, že HpD a světlo v červené oblasti světelného spektra mohou selektivně ničit nádorové buňky bez poškození okolní zdravé tkáně. Také provedli první rozsáhlejší studii s 25 pacienty se 113 primárními i sekundárními nádory kůže¹³. Z nich se 98 zhojilo úplně, u 13 byla pozorována částečná odpověď a 2 ložiska se ukázala být k léčbě rezistentní. Od té doby se rozběhly další studie na použití PDT nejen k léčbě nádorů kůže, močového měchýře, ale i dalších, např. rakoviny plic, jícnu, konečníku a mozkových nádorů^{14,15,16,17}. Z nich vycházející objevy a znalosti nastartovaly éru moderního vývoje PDT realizovanou zavedením HpD jako standardu léčivého přípravku Photofrin[®] do klinického použití. Avšak pro jeho značný počet vedlejších účinků a pro PDT nežádoucích vlastností, se další vývoj a výzkum zaměřuje na nové typy PS. Rozvoj PDT bude tedy vyžadovat nové účinné fotosenzitizéry s absorpcí v dalekém červeném a blízkém infračerveném spektru a vykazující minimální kožní fototoxicitu. K posílení vývoje nových látek a lepšímu porozumění jejich farmakokinetiky a biodistribuce je potřeba objevit cíleně specifické fotosenzitizéry (tzv. „targeting“).

1.3 PRINCIP PDT

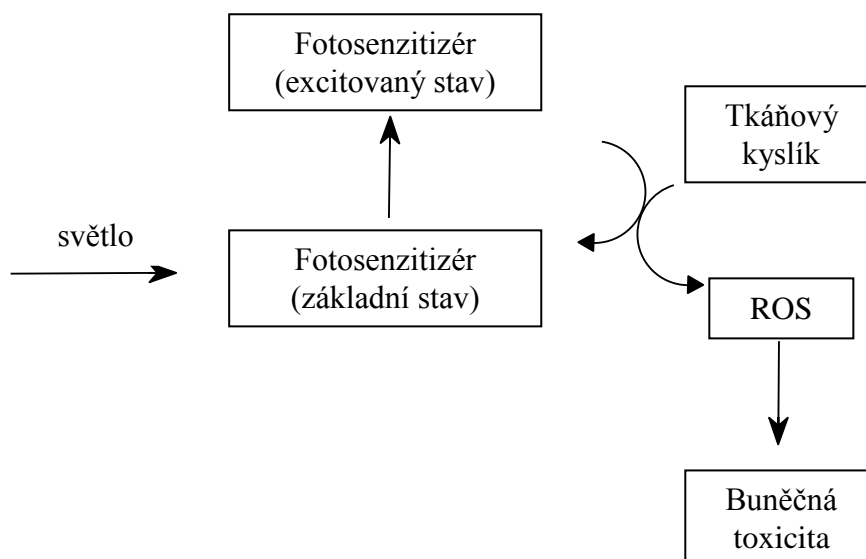
Základní mechanismus fotodynamické terapie zahrnuje tři základní komponenty (obr. 1). Prvním je fotosenzitizér – světlo absorbující molekula, která se aktivuje druhým elementem, světlem odpovídající vlnové délky. Třetí složkou je molekulární kyslík, který je využíván v průběhu fotochemické reakce k vytvoření singletového kyslíku – cytotoxického agens, které následně zničí neoplastickou tkáň. Tyto agens napadají okolní biomolekuly, porušují jejich biologickou funkci a v konečném důsledku vedou ke smrti buňky. Vlnová délka světla aktivujícího PS je pro použití v PDT velice důležitá. Světlo o nižších vlnových délkách proniká živými tkáněmi jen do hloubky několika milimetrů, přitom zasažená oblast je velice malá a dochází také k pohlcování světla endogenními chromofory (např. hemoglobinem). Jak již bylo zmíněno, původně do terapie zavedený HpD - např. Photofrin[®] má velice nízkou maximální vlnovou délku vhodnou pro aktivaci (630 nm). Optimální rozpětí vlnových délek pro PDT se pohybuje v oblasti 680-800 nm. Nad 800 nm má záření nízkou energii a již nemusí dostačovat k účinné aktivaci PS¹⁸.

Fotosenzitizér (PS) se obvykle podává intravenózně a rychle se distribuuje do tělesných tkání. Asi za 48-72 hod po podání mohou fotosenzitizující látky dosáhnout znatelně vyšší koncentrace v tumorózní tkáni než v okolní zdravé tkáni. Ačkoliv přesný mechanismus selektivního vychytávání fotosenzitizéru není dosud zcela pochopen, lze tento proces alespoň částečně objasnit. Je pravděpodobné, že důvod tkví v abnormální fyziologii samotného nádoru, jako je např. nedostatečná lymfatická drenáž, zvýšená fagocytóza, větší propustnost cévní stěny v nádorové tkáni, kyselejší pH v oblasti nádoru. K selektivnímu vychytávání PS také přispívá zvýšené množství receptorů pro LDL (low-density lipoproteiny) na buněčné membráně, které jsou schopny navázat fotosenzitizér a v neposlední řadě také abnormální složení stroma nádorové tkáně¹⁹.

Selektivně absorbovaný fotosenzitizér je následně ozářen světlem odpovídající vlnové délky, čímž se excituje do vyššího energetického stavu (PS*), což vede k produkci cytotoxického agens a nekróze tumoru. Tento mechanismus lze popsat následujícím schématem:

PS → PS* → Cytotoxické agens → Biologické poškození → Buněčná smrt

Obecně mechanismus PDT je založen na fotofyzikálních a fotochemických vlastnostech fotosenzitizéru a jeho schopnosti produkovat cytotoxická agens, která následně působením na exponovanou buňku vyvolávají biologickou odpověď²⁰.

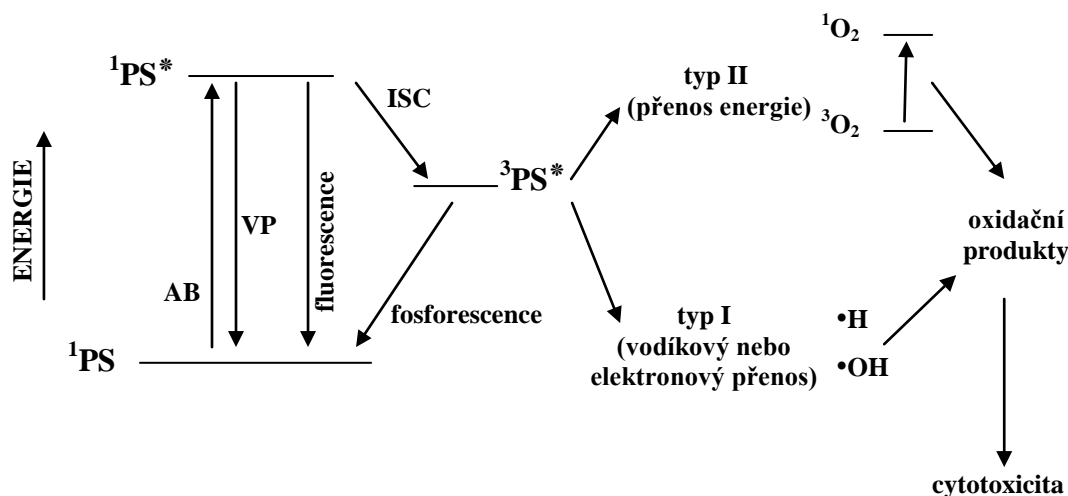


Obr. 1. Zjednodušený princip PDT

Fotofyzikální základ PDT

Základem PDT není nic jiného než přenos absorbované energie z PS na další složky, zejména molekulární kyslík, který je nejdůležitějším agens celého procesu díky své přeměně na vysoce reaktivní cytotoxické radikály. Energie absorbovaná po ozáření světlem potřebné vlnové délky excituje PS ze základního singletového stavu (S_0 –elektrony s opačným spinem) na excitovaný singletový stav (S_1) s velice krátkou dobou života (řádově nanosekund). Tento stav je velice krátký na to aby umožnil efektivní interakci PS s okolním prostředím, proto ovlivňuje fotodynamickou aktivitu jen zanedbatelně. Z této energetické hladiny se může PS uvolnit několika způsoby a to jak procesy radiačními (emisí světla - fluorescencí), tak i neradiačními (vnitřní přeměnou (VP)). V případě vnitřní konverze dojde k uvolnění energie ve formě tepla v důsledku srážek PS a rozpouštědla. Je možné, že tento děj je důležitý při vlastním účinku na buňky. Většina PS je fluorescenční, díky čemuž lze stanovit jejich množství v buňkách či tkáních a umožňuje sledovat přímo *in vivo* farmakokinetické děje a distribuci PS u pacientů a živých zvířat.

Velký význam pro PDT představuje proces přeměny excitovaného fotosenzitizéru tzv. intersystémovou přeměnou („intersystem crossing“ - ISC). Tento proces vyžaduje inverzi spinu jednoho elektronu, čímž přeměňuje fotosenzitizér do relativně dlouho trvajícího (řádově mikrosekundy) excitovaného tripletového stavu $^3\text{PS}^*$. Dlouhá životnost PS v tripletovém stavu je vysvětlována faktem, že ztráta energie emisí světla (fosforescencí) je „spinem-zakázaný“ proces, protože fotosenzitizér by měl přímo přejít z tripletového do singletového stavu. Každá taková „nepovolená“ cesta je méně preferovaná než cesta „povolená“, ale dobrý fotosenzitizér prochází „nepovolenou“ ISC cestou s vysokou pravděpodobností, což je podstatné pro vlastní fotodynamickou aktivitu²¹.



Obr. 2: Mechanismus PDT cytotoxicity (fotofyzikální reakce znázorněná upraveným Jablonského diagramem), kde AB je absorpce světla, VP je vnitřní přeměna a ISC je „intersystem crossing“.

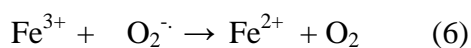
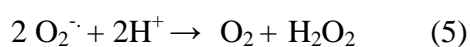
Z tripletového stavu se fotosenzitizér může uvolnit několika způsoby. Vyzářením fotonu ve formě fosforescence (tzv. triplet-singlet emise) anebo dalšími cestami již bez vyzářování, což reprezentují dva procesy, které jsou již vlastním základem PDT. Lze je rozdělit na fotoproces typu I a II. Oba fotoprocesy se objevují současně a poměr mezi nimi je dán povahou použitého PS, koncentrací substrátu a kyslíku ve tkáni. Všeobecně se přijímá, že fotoproces typu II je zvláště odpovědný za vlastní fotodynamický účinek, neboť právě při něm vzniká singletový kyslík²¹.

Fotochemický základ PDT

Relaxaci excitovaného triplexového stavu PS* můžeme rozdělit na dva typy: fotoproces I a II. Typ I zahrnuje atom vodíku nebo elektron přenesený mezi excitovaným PS* a některou okolní molekulou produkující radikály. Energetický přenos mezi PS* a kyslíkem, který zahrnuje mechanismus a tvorbu singletového kyslíku, je typ II. Oba fotoprocesy se obvykle objevují obvykle souběžně. To, který převáží a jakým stylem dojde k usmrcení buněk záleží na koncentraci kyslíku, typu PS a polaritě prostředí. Fotoproces II, při kterém je produkován vysoce reaktivní singletový kyslík, je obecně přijímán odpovědným za vlastní fotodynamický účinek.

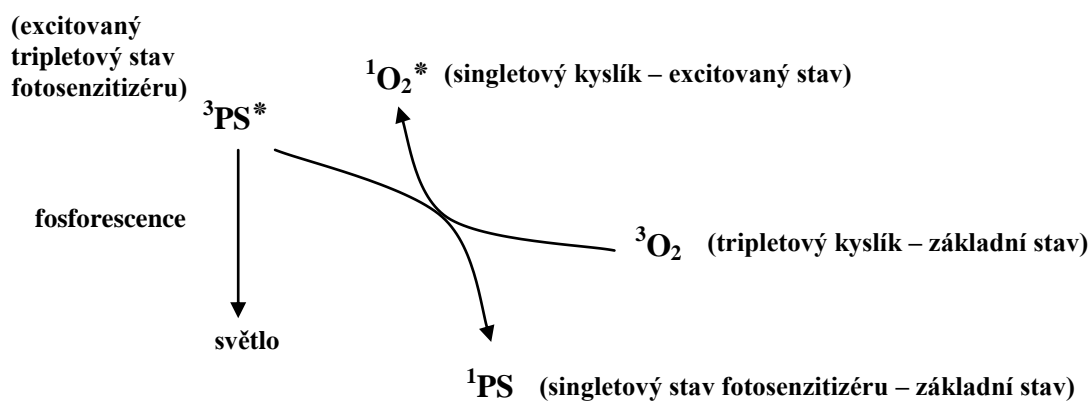
Fotoproces I

Je založen na přenosu elektronů z excitovaného PS* a produkci reaktivního kyslíku zahrnující superoxidový anion ($O_2^{\cdot -}$), hydroxylový radikál (OH^{\cdot}) a peroxid vodíku (H_2O_2). PS* může reagovat také s PS v základním stavu. Výsledkem této reakce je tvorba radikálů, kterými jsou redukovaný anion $PS^{\cdot -}$ a oxidovaný kation $PS^{\cdot +}$ (rov.1). PS* mohou redukovat i některé okolní molekuly (donory elektronů – NADH, vitamín C, cystein). Výsledkem je $PS^{\cdot -}$ a oxidovaný substrát (rov.2). Anion radikály $PS^{\cdot -}$ následně podstupují elektronovou výměnu reakcí s kyslíkem za vzniku superoxidového anionu ($O_2^{\cdot -}$) (rov.3). Teoreticky může excitovaný PS (3PS)* také přímo poskytovat superoxidový anion ($O_2^{\cdot -}$) (rov.4). Avšak energetický přenos vedoucí ke vzniku singletového kyslíku je výhodnější. Superoxidový anion může inaktivovat různé enzymy, ale jeho nejdůležitější rolí je produkce peroxidu vodíku redukcí Fe^{3+} a následná tvorba hydroxylového radikálu (HO^{\cdot}) (rov.5, 6). Uplatní se hojně v biologických systémech, protože řada buněk obsahuje železo, měď nebo jiné kovové prvky, které katalyzují tuto reakci. HO^{\cdot} snadno přechází přes buněčné membrány a způsobuje díky své vysoké reaktivitě další oxidativní změny. Reaguje s organickými substráty (R), za tvorby dalších reaktivních radikálů. Ty mohou reagovat i s molekulou kyslíku v základním stavu za vzniku dalšího opět vysoce reaktivního peroxidového radikálu (ROO^{\cdot}), který reaguje s jinými dalšími molekulami organického substrátu v následné řetězové reakci. Tento typ řetězové reakce je obvyklý u oxidačního poškození mastných kyselin a ostatních lipidů a to vysvětluje, proč radikály jako hydroxidový radikál mohou způsobit takové rozsáhlé poškození.



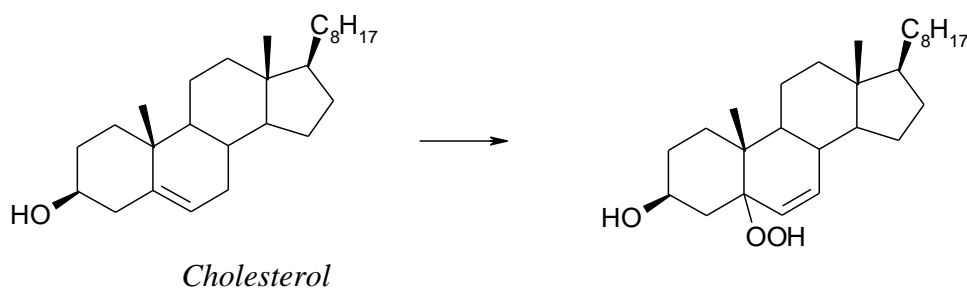
Fotoproces II

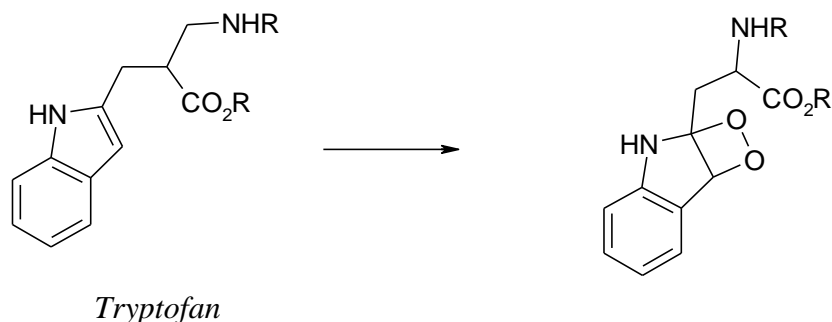
Singletový kyslík produkovaný tímto typem fotoprocesu je vysoce reaktivní a většina účinků PDT je spojena s smrtícími oxidačními účinky způsobenými touto molekulou. Souhrn jeho vlastností a charakteristik můžeme nalézt v práci Langa a spol²².



Obr. 3: Detailnější zobrazení přenosu energie u fotoprocesu typu II

Základní stav kyslíku je triplet ($^3\text{O}_2$). Tato vlastnost pro většinu molekul není velmi obvyklá a objevuje se jen u omezeného počtu (vitamín A). Excitace základního stavu kyslíku vede ke změně spinu jednoho z vnějších elektronů a tím vzniku singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$). Jednou ze zajímavých charakteristik PS je kvantový výtěžek singletového kyslíku, který můžeme definovat jako množství molekul vytvořeného absorbcí kvanta energie. Singletový kyslík má velmi krátkou životnost 3-4 μs ve vodě^{23,24}, v lipidech 50-100 μs , kdežto v biologickém prostředí jen okolo 0,04-0,6 μs kvůli jeho vysoké reaktivitě s biologickým materiálem. Vzhledem k jeho krátké životnosti v tomto prostředí je pozorování obtížné. Nejnovější naměřená hodnota 3 μs byla naměřena v živých buňkách, což je hodnota blízká měření ve vodě²⁵, v organických rozpouštědlech 19 μs (oktanol). Následkem tak krátké životnosti může difundovat do vzdálenosti pouhých 10 nm²⁶, podle jiných autorů 45 nm²⁷. Pro srovnání, tloušťka buněčné membrány je 7-10 nm, průměr lidské buňky 10-100 μm . To je důvodem, proč je účinek singletového kyslíku striktně limitován na místo vzniku a nepůsobí na okolní buňky a díky selektivní kumulaci PS v nemocné tkáni a jejímu pozdějšímu ozáření je umožněn přesný a lokalizovaný zásah. Reaktivní singletový kyslík je tedy to skutečné cytotoxické agens, neboť rychle reaguje s okolními buněčnými komponenty, především s molekulami přítomnými v membránách, cholesterolem, nenasycenými mastnými kyselinami a DNA. Terčem jsou i aminokyselinové zbytky v proteinech a to především aminokyseliny cystein, methionin, tyrozin, histidin a tryptofan. Aktivovaný kyslík reaguje s biologickým substrátem několika způsoby, např. oxidací nebo cykloadicí (obr. 4). Všechny tyto reakce razantně poškozují biologické procesy.





Obr. 4: oxidace a cykloadice biologického materiálu

Ačkoliv se v průběhu fotodynamické reakce vyskytují oba typy současně, převládá vliv typu II. Fotoproces typu II je preferovaný v okysličených tkáních a v lipofilnějším prostředí, kde je delší životnost singletového kyslíku, rovnováha je posunuta směrem k typu I v hypoxickém stavu a tyto reakce podstatně přispívají k smrti buněk v tkáních s nízkou koncentrací kyslíku. Tento mechanismus je také preferován v polárnějším prostředí. Fotoreakce mohou probíhat i v hypoxické tkáni, přítomnost kyslíku je však absolutním požadavkem pro úspěšnou fotodynamickou aktivitu. Proto je fotodynamický účinek přímo úměrný koncentraci kyslíku v tkáni a žádné rakovinné buňky nelze zničit v anoxických podmínkách²⁸.

Nedostatek kyslíku v lidské tkáni může nastat ze dvou důvodů:

Prvním je rychlá spotřeba kyslíku při fotoreakci po osvětlení malé oblasti. Z toho vyplývá, že fotodynamický účinek může limitovat sám sebe v další buněčné destrukci. Tento problém můžeme obejít použitím nižší prostorové intenzity ozáření, kdy kyslík nebude tak rychle spotřebován a dosáhneme tak lepších klinických výsledků pro stejné kvantum ozáření, ale o nižší intenzitě²⁹.

Druhý důvod vyplývá z nižšího stupně okysličení v cílové tkáni. Nádorové buňky jsou obecně spíše zásobeny kyslíkem, což vede k místní hypoxii. Samotný fotodynamický účinek způsobuje cévní poškození a ještě více tak snižuje dodávku kyslíku.

Tyto příčiny limitují použití PDT u nádorů, kde se musí s hypoxií počítat. Na druhé straně PDT indukovaný cévní uzávěr je jedním z nejdůležitějších účinků vedoucích k finálnímu zdolání nádoru. Spolu s rozvojem zánětu a imunitní odpovědi je zasažená tkáň zcela zničena pouze s malým nebo vůbec žádným poškozením okolní zdravé tkáně. Nádor je tedy zničen relativně rychle a jakékoliv případné poškození okolní tkáně se zhojí v následujících 6-8 týdnech po terapeutickém zásahu a to obvykle bez jizev^{30,31}.

Biologická odpověď

Akumulace PS a ozáření příslušného místa není jedinou příčinou způsobující regresi nádoru. Známe tři hlavní mechanismy, které vedou ke zničení nádorové tkáně. Jsou jimi přímý účinek singletového kyslíku, PDT zprostředkovaný cévní uzávěr způsobující sníženou dodávku živin a kyslíku a v neposlední řadě PDT aktivuje imunitní odpověď namířenou proti nádorovým buňkám.

Přímý účinek

Jelikož dosah toxických látek produkovaných PDT je limitován, buněčná smrt je proto následkem poškození subcelulárních struktur. Absorbovaný PS je lokalizován uvnitř buňky, především v lysozomech^{32,33}, mitochondriích^{34,35}, některé studie uvádějí i případy přítomnosti v endoplazmatickém retikulu či Golgiho aparátu^{36,37}. V plazmě je výskyt PS zpravidla pouze během prvních minut inkubace³⁸. Fragmentace DNA po PDT léčbě je spíše následkem indukované apoptózy než přímým PDT efektem na buněčné jádro³⁹. Zpravidla není možné stanovit pouze jednu cílovou organelu zodpovědnou za buněčnou smrt. Aplikovaný PS může mít různou inkubační dobu^{40,41} v různých organelách⁴². Po ozáření mohou být uvolněné molekuly redistribuovány do intracelulárních prostor^{43,44} nebo difundují do cytoplazmy^{45,46}. Hydrofobní PS mající dva a méně negativních nábojů mohou difundovat plazmatickou membránou a poté přesídlit do dalších intracelulárních prostor^{47,48}. PS méně hydrofobní mající dva a více negativních nábojů jsou příliš polární k přestupu membránou pasivní difuzí, proto jsou přenášeny endocytozou a nalezeny v lysozomech⁴⁹. Kationaktivní barviva jsou akumulována v mitochondriích^{50,51,52} a patří k nejfototoxičtějším molekulám.

Vaskulární odpověď

Cévní poškození zasažené plochy silně přispívá ke konečnému zničení nádoru. Životaschopnost nádoru je závislá na kyslíku a dalších živinách, kterými nádor zásobuje krevní řečiště. Jeho destrukce vede k lokální hypoxii, anoxii a depleci živin. Základní mechanismus je závislý na použitém PS. Dochází buď ke konstrikcí, tvorbě trombu či cévní propustnosti. Akutní cévní účinky byly charakterizovány jako vazokonstrikce, či dlouhodobý cévní uzávěr (tvorba trombu). Největší cévní efekt nastane aktivací krátce po aplikaci injekce PS. Cévní působení PDT může být efektivnější než přímý účinek.

Imunitní odpověď

Aktivace imunitní odpovědi cílené oblasti po léčbě PDT není primárním důvodem vedoucím k buněčné smrti, ale může pomoci při dlouhodobé léčbě nádoru. Aktivace zahrnuje uvolnění cytokininů, zánětlivé a chemotaktické signály z poškozených tkání následovaných invazí neutrofilů, mastocytů, monocytů a mikrořágů⁵³.

1.4 FOTOLENZITIZÉR

Fotosenzitizéry jsou látky schopné absorbovat světlo specifické vlnové délky a přetvářet jej na užitečnou energii. Jak již bylo výše zmíněno, klíčovým předpokladem jakéhokoliv PS je jeho schopnost preferenční kumulace v nemocné tkáni s následnou produkcí cytotoxických agens a indukci požadovaných biologických efektů. Většina fotosenzitizérů dnes používaných nebo testovaných v PDT vychází z porfyrinového cyklu. Dosud nejrozšířenější a nejpoužívanější PS je Photofrin[®], ale z důvodu výskytu velkého počtu nežádoucích účinků a vlastností se výzkum zaměřil na nové typy PS.

Postupem času se třídily a formulovaly určité vlastnosti ideálního PS a je pochopitelné, že žádnou z dosud známých a používaných látek nemůžeme považovat za ideální. Přesto se novější látky alespoň tomuto ideálnímu PS v mnohém přibližují.

1.4.1 VLASTNOSTI IDEÁLNÍHO FOTOLENZITIZÉRU^{55,49}

- Chemická čistota se známým konstantním složením a stabilitou – u dřívějších látek byl problém, neboť se jednalo o směsi špatně separovatelných mono-, di- a oligomerů (např. u derivatizovaného hematoporfyrinu). Novější látky jsou již obvykle lépe charakterizovatelné.
- Optimální spektrální vlastnosti – silná absorpce v červené oblasti viditelného spektra (650-800 nm), kdy je penetrační schopnost světla maximální a přitom má dostatečnou energii pro účinnou excitaci PS. Světlo nižších vln. délek méně proniká do tkáně a zvyšuje se také pravděpodobnost výskytu kožní fotosenzitivity. Naopak fotony světla vyšších vlnových délek (>800 nm) nedodají dostatečnou energii tripletovému stavu PS, aby přenesl svou energii základnímu stavu molekuly kyslíku k jeho excitaci na singletový stav.

- Minimální toxicita ve tmě – jak u člověka, tak i u pokusných zvířat má být PS toxický jen po ozáření světlem odpovídající vlnové délky vedoucí k aktivaci PS. Fotosenzitizér by neměl ani vykazovat zprostředkovanou toxicitu (např. hypotenzi, alergickou reakci).
- Vyhovující fotochemické vlastnosti – má být produkováno velké množství tripletového stavu PS, který má mít tak dlouhé trvání, aby došlo k dostatečné produkci singletového kyslíku (hlavního cytotoxického agens).
- Ideální rozpustnost ve vodě nebo ve směsi hydrofilních rozpouštědel. PS by také neměl nadměrně agregovat v biologickém prostředí, protože by se tím snížila jeho fotochemická účinnost.
- Selektivní kumulace PS v nádorové tkáni.
- Rychlá eliminace z těla pacienta – je žádoucí, aby zbylý PS nezůstával dlouho v krvi a nezpůsobil systémovou toxicitu. Pokud je PS eliminován do jednoho dne po léčbě, nehrozí problém dlouhodobé kožní fotosenzitivity a pacient se nemusí chránit před světlem.
- Snadná příprava – syntéza PS by měla být relativně snadná popř. fotosenzitivní látky jednoduše modifikovatelné (záměny postranních řetězců).
- Cenová dostupnost a snadná aplikace do průmyslové výroby.
- Fluorescence PS pro možnost vizuální kontroly.

Krátký interval mezi podáním PS injekcí a osvětlením umožňuje ambulantní provedení zákroku, což je jak příjemné pro pacienta tak i finančně výhodné. V dnešní době ještě není dořešeno, zda je lepší vyhradit jeden konkrétní PS jen pro jednu specifickou indikaci a pak mít mnoho jiných PS pro další rozmanité nemoci nebo kategorie pacientů, nebo se snažit hledat jeden PS, který by působil proti většině nemocí⁴⁹

Většina fotosenzitizérů užívaná v klinické nebo experimentální praxi je odvozena z tetrapyrrolového aromatického jádra obsaženého v mnoha přirozeně se vyskytujících pigmentech (hem, chlorofyl, bakteriochlorofyl). Tetrapyrroly mají relativně silný absorpční pás v oblasti kolem 400 nm, známý jako Soretův pás a sadu postupně se snižujících absorpčních pásů ve směru do červené oblasti spektra nazývaných Q-pásky.

Tetrapyrrolové jádro často obsahuje koordinovaný atom kovu a zjistilo se, že pouze diamagnetické kovy (Zn, Mg, Pd, In, Sn, Lu) umožní tetrapyrrolu zachovat si svou fotosenzitivní schopnost, zatímco paramagnetické kovy (Fe, Cu, Gd) to neumožňují⁴⁹.

1.4.2 ROZDĚLENÍ FOTOSENZITIZÉRU

Podle výše zmíněných kritérií mohou být PS rozděleny do třech generací. První generace obvykle absorbují záření nízkých vlnových délek (okolo 630nm), mají dlouhý biologický poločas rozpadu a zůstávají v kožní tkáni několik týdnů, někdy i měsíců. Jediným reprezentantem této generace je porfimer a jednoduché hematoporfyrinové deriváty. Druhá generace PS je excitována po použití světla delších vlnových délek (670-800nm), které prostupují do hloubky 2-3cm. Jejich absorpce je silná, proto lze použít menší množství látky. Interpretace vztahu dávky a odpovědi je snadná protože se nejedná o směs jednotlivých složek jako u porfimeru. Selektivita cílené léčby tumoru tak ještě není stále úplná. Proto kombinace druhé generace PS s monoklonálními protilátkami nebo např. steroidy v některých výzkumech nazýváme třetí generací.

1.4.2.1 1. GENERACE PS

Porfimer sodium- hematoporfyrin derivate , HpD, Photofrin, Photogen, Photosan

Porfimer sodium je názvem pro směs složek - hematoporfyrin derivat(HpD). Nejedná se o jednoduchou složku, ale směs monomerů, dimerů a oligomerů s nepřesně definovanou velikostí složek spojených etherovými nebo esterovými vazbami. Hematoporfyrin je silný PS, ale postrádá selektivitu k nádorovým tkáním. Bylo zjištěno, že oligomerní frakce získané v průběhu izolace hematoporfyrinu z krve⁵⁴, jsou zodpovědné za selektivitu k nádorovým tkáním a proto je jimi HpD obohacován. Hematoporfyrin je získáván z hemu, který je samotný fotodynamicky neúčinný, působením kyseliny borité v kyselém prostředí. Další reakcí Hp s kyselinou sírovou a následnou hydrolyzou s hydroxidem sodným a neutralizací získáme HpD. Jedná se o surovou směs, která je čištěna HPLC nebo gelovou chromatografií. Maximum absorpce je 630nm. Pro dosažení terapeutické dávky je proto třeba vysokých dávek PS i světla. HpD je rozpustný ve vodě, aplikovaný i.v. v dávce 2mg/kg s poločasem 17-22 dní. Nejvyšší vychytání nádorem je 45-50 hodin po ozáření. Nevýhodou je dlouhá fotosenzitivita kůže (až 6-8 týdnů). Také vychytávání v nádorech není příliš selektivní a jeho vysoké koncentrace lze nalézt v játrech, ledvinách, slezině a zejména kůži.

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)⁵⁵.

1.4.2.2 2. GENERACE PS

Jedná se o látky, které jsou již jednotné a snadněji charakterizovatelné s absorpčním maximem ve vlnových délkách 650-800nm. Aktivují se světlem pronikajícím hlouběji do tkání. Patří sem látky řazené do skupiny porfyrinů (630nm), chlorinů (650-690nm), benzoporfyrinů, etiopurpurinů, ftalocyanů a další sloučeniny.

5-aminolevulinová kyselina -(5-amino-4-oxo-pentanová kyselina), 5-ALA

5-ALA je prekurzorem syntézy hemoglobinu. V eukaryotických buňkách je produkována enzymem ALA synthasou z glycinu a sukcinyl CoA. Při biosyntéze hemu existují dva limitující kroky: syntéza 5-ALA a konverze PpIX na hem enzymem ferochelatázou⁵⁶.

5-ALA molekula je sama o sobě neaktivní. Produkovaná v buňkách je plynule konvertována na porfobilinogen a přes další biosyntetické kroky na hem. Koncentrace hemu je regulačním mechanismem inhibujícím endogenní tvorbu 5-ALA. Pokud je tedy 5-ALA dodána exogenně dochází k poměrně rychlé tvorbě protoporfyrinu IX (PpIX), který se hromadí v buňkách ve vysokých koncentracích a funguje jako účinný PS. Inkorporací atomu železa enzymem ferrochelatázou vzniká přirozenou cestou z PpIX fotodynamicky neaktivní hem.

5-ALA je používána k léčbě lupénky, akné, bradavic a plísňových infekcí. Selektivita je dána více faktory např. zvýšenou permeabilitou keratinu, sníženou koncentrací železa a sníženou aktivitou ferrochelatázy (nedochází k přeměně PpIX na neaktivní hem^{57,58,59,60}).

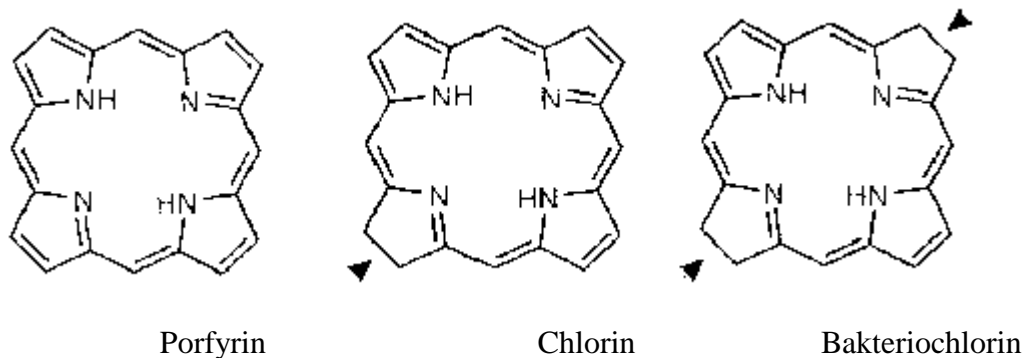
Výhody: přirozený původ snižující toxicitu, relativně nízká a krátká kožní fotosenzitivita, neakumuluje se v kožní tkáni (24-48hodin)⁶¹

Nevýhody: Je silně hydrofilní, což omezuje penetraci hlavně přes vrchní vrstvy kůže buněčné membrány, nestabilita v roztocích s fyziologickým pH, absorpce 630nm, proto použití pouze pro vrchní vrstvy kůže.

I přes tyto nevýhody je použití v humánní PDT relativně časté. Používají se převážně estery, které lépe pronikají do tkání a po hydrolýze uvolní 5-ALA (např. hexylester, benzylester, methylester)

Porfyriny jsou látky přírodního původu, které mají ve své struktuře čtyři konjugovaná pyrrolová jádra a jednotlivé sloučeniny se pak vzájemně liší typem postranních řetězců. Jejich vlnová délka se pohybuje okolo 630 nm⁶². Porfyrinům jsou velice příbuzné chloriny a bakteriochloriny, které mají o jednu (chloriny), případně dvě (bakteriochloriny)

konjugované vazby v makrocyclickém systému méně (obr. 11). To znamená, že vlnová délka chlorinů je posunuta do oblasti 650-690 nm. U bakteriochlorinů pak dochází k posunu vlnových délek až do červené části spektra.



Obr. 5 Rozdíl mezi porfyriny, chloriny a bakteriochloriny

Veterporfin (benzoporfyrin derivate monoacid ring A, BPD-MA, Visudyne®)

Je řazen do skupiny chlorinů, je derivátem protoporfyrinu, těžce rozpustný ve vodě s absorpčním maximem 690nm. Verteporfin je velice rychle absorbován nádorovou tkání, avšak také velice rychle vylučován jak z těchto tkání, tak z těla. Velkou výhodou je proto skutečnost, že verteporfin nezpůsobuje generalizovanou kožní fotosenzitivitu trvající déle než 24 hodin⁶³. Nejlepší poměr mezi nádorovými a ostatními tkáněmi je dosažen přibližně po 30-150 minutách a pak koncentrace v tumorech opět velice rychle klesá.

Byl zkoušen na léčbu nádorů, největší použití však získal v terapii makulární degenerace v oftalmologii. Je účinný samostatně⁶⁴, ale zkoušen i v kombinované terapii s dalšími látkami např. ranibizumabem, pegaptinidem a steroidy. Klinické studie stále probíhají, avšak již teď jsou k dispozici pozitivní výsledky této kombinační terapie^{65,66}. Veterporfin se ukázal prospěšný také v dermatologii při léčbě nemelanomatičkových nádorů⁶⁷

Lemuteporfin (diethylene glykol benzoporphyrin derivate, QLT0074)

Jedná se o derivát verteporfinu i svými fotofyzikálními vlastnostmi (absorpční maximum 690nm), ale jeho farmakokinetické vlastnosti jsou odlišné. Má rychlejší clearance, neakumuluje se v kůži^{68,69}, a tedy má nízkou fotosenzitivitu. Test na buňkách ukázal možnost imunomodulační odpovědi po aplikaci lemuteporfinu. Subletální dávka má za následek změnu v modifikaci buněčného povrchu, uvolnění cytokinů a ovlivnění chování buňky. Zdá se, že působí aktivaci T-lymfocytů⁷⁰. Probíhající studie se zabývají léčbou benigní hyperplazie prostaty⁷¹.

Temoporfin (m-tetrahydroxyphenylchlorin, m THPC, Foscan®)

Jde o plně syntetický chlorin s absorpčním maximem a nízkou rozpustností ve vodě, lépe ve směsi voda-etanol-PEG. Nejlepší selektivity k nádoru je dosaženo po čtyřech dnech, proto dlouhé rozmezí mezi podáním a ozářením. Je velice účinným PS podávaným v dávce pouze 0,15mg/kg. Má nízkou clearance a vysokou fotosenzitivitu (15dní). Poprvé byl schválen pro léčbu nádorů hlavy a krku (r. 2001) a je stále jedinou PDT látkou schválenou pro tento druh nádoru⁷². Dobrých výsledků bylo dosaženo také pro léčbu bazálního buněčného karcinomu ve třetí klinické fázi zkoušení. Výhodou v léčbě karcinomu bazálních kožních buněk (BCC) je hlubší penetrace světla. Bylo provedeno i několik dalších klinických zkoušek s přesvědčivými výsledky např. fotodetekce mozkových nádorů⁷³ a prostaty^{74,75}.

Talaporfin (mono-L-aspartyl chlorin e6, Npe6, LS11, Mace or LAserphyrin®)

Talaporfin je polysyntetickým derivátem chlorinu e6. Je dobře rozpustný ve vodě, s absorpčním maximem 664nm, aplikovaný i.v. v dávce 40mg/m². Osvit nádoru po 15-60 minutách po aplikaci látky. V Japonsku je dokončena třetí fáze klinických zkoušek pro léčbu časného stadia rakoviny plic. V USA se zkouší využití v terapii pokročilých stadií rakoviny prostaty, slinivky a plic, ale i v jiných protinádorových indikacích (oftalmologii, kardiologii)⁷⁶.

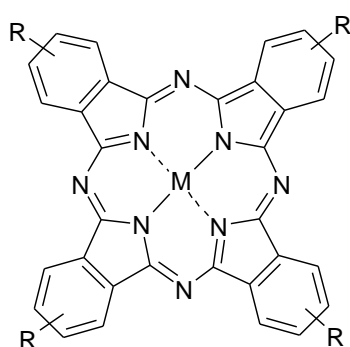
Rostaporfin –(tin etiopurpurin, SnEt2, PurlytinTM, Photrex®)

Je polysyntetickým derivátem připraveným r.1988 s absorpčním maximem 659nm. Je hydrofobní, proto se podává s emulgátory v dávce 1,2mg/kg. Ozařování aplikované 24hod po podání. Byl vyvinut pro léčbu AMD. Finišuje třetí fáze klinických zkoušek a byl již předložen FDA ke schválení. Pozitivní výsledky se ukázaly u léčby kožních metastatických nádorů^{77,78} a prostaty u psů⁷⁹.

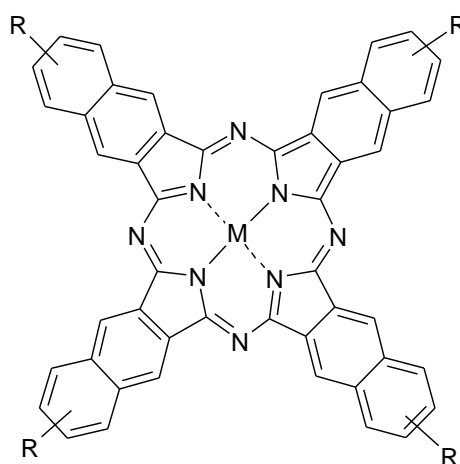
Padoporfin – (WST09, Palladium bacteriophephorbide a, Pd-BPheid, *TOOKAD*[®]) Jedná se o příklad polysyntetické modifikace přírodního PS z rodiny bakteriochlorinů s absorbcí posunutou k 763nm. Je nerozpustný ve vodě, musí být podáván s Cremophorem jako nosičem ve kterém je agregován, ale po podání in vivo dochází k rychlé deagregaci. Padoporfin je podáván v dávce 2mg/kg, neakumuluje se v kůži, nemá tutíž žádnou fotosenzitivitu. Ozařování je aplikováno spolu s podáním. Terapeutický efekt je cílený především na cévy. Je testován jako případný PDT na rakovinu prostaty. Účinek založený na vaskulárním efektu skrývá vysoký potenciál k léčbě cévní neovaskularizace⁸⁰.

Ftalocyaniny jsou syntetická barviva požívaná v mnoha průmyslových odvětvích⁸¹. Strukturálně se podobají tetraazaporfyrinům se čtyřmi přemostěnými uhlíky, v mezopozicích nahrazenými dusíkatými atomy. Mají posunuté absorpční maximum k červené oblasti spektra (670-700nm). Pro účinek PDT je důležitá přítomnost chelatovaných centrálních kovů a polokovů (Zn, Al, Si)⁺, které zvyšují její účinnost prodloužením triplexového stavu PS. Jsou špatně rozpustné ve vodě i organických rozpouštědlech a snadno agregují. Zlepšení jejich vlastností dosáhneme např. sulfonací na periferii nebo inkorporací do micel či lipozomů.

Naftalocyaniny jsou ftalocyaninovými deriváty s přidaným benzenovým kruhem připojeným na periferii. Díky prodlouženému chromoforovému systému absorbují při 740-800nm. Protože světlo, potřebné k jejich aktivaci penetruje hlouběji do tkáně a jelikož jejich absorpční maxima jsou vyšší než absorpční pás melaninů, lze je s výhodou použít na pigmentované léze^{82,83} i další druhy nádorů^{84,85,86,87,88}. Jejich nevýhodou je poměrně nízká chemická a fotochemická stabilita, také vyšší tendence k agregaci než u ftalocyanů, i horší rozpustnost⁸⁹. Relativně velká molekula může být také limitujícím faktorem pro postup biologickými membránami.



Ftalocyanin



Naftalocyanin

Zinc phthalocyanine CGP55847 – Zn Pc

Je nejjednodušším ftalocyanem v klinických zkouškách s nízkou rozpustností.



Photosens (Aluminium tetrasulfophthalocyanine, Al-PcTs, Al PcS4, Aluminium phthalocyanine tetrasulfonate)

Značná pozornost je věnovaná sulfonovaným ftalocyanům. Tento typ periferní substituce snížil agregaci a zvýšil jejich rozpustnost. Sodná sůl směsi di-až tetrasulfonovaného chlorohlinitého komplexu ftalocyaninu (676nm) je v Rusku pro PDT používána od r.2001 k léčbě ^{90,91}akoviny ústní dutiny, kůže. Aplikuje se 0,2% roztok v dávce 0,5-0,8mg/kg systémovým podáním. Photosens vykazuje velkou fotosenzitivitu až 4-6 týdnů.

Pc4 – (Si Pc IV)

Je třetím ftalocyanem jdoucím do klinické terapie PDT. Jedná se o křemičitý komplex Pc4. Je zkoušen pro topickou léčbu malignit a premalignit kůže⁹².

Ostatní fotosenzitizéry

Nejvýznamnějšími PS jsou již zmíněné PS porfyrinové struktury, avšak fotodynamickou aktivitu po ozáření vykazují i další sloučeniny, např. fenothiazininová barviva ⁹³a xantheny. Jejich použití jako PS podporuje více faktorů zahrnujících dobrou rozpustnost, relativně nízkou cenu, dobrou dostupnost, vyhovující produkci singletového kyslíku. Hlavní nevýhodou fenothiazininové struktury je metabolická nestabilita způsobená enzymatickou inaktivací na leukoformu, která je fotodynamicky neaktivní. Proto je jejich použití

limitováno hlavně na topické použití v dermatologii či lokální léčbě po intratumorálním podání. Silně polární charakter fenothiazininových solí je dalším omezením pro průchod membránami. Limitující je i vysoká toxicita omezující systémové klinické podání⁹⁴. Jak již bylo zmíněno, fenothiazininové PS mohou být používány k zevní nebo vnitřní lokální aplikaci. Jejich dalšími účinky jsou antimikrobní⁹⁵ a antifungální⁹⁶ působení. Nejpoužívanějšími z této skupiny jsou methylenová a toluidinová modř.

Methylenová modř (3,7-bis (dimethylamino)phenothiazinylium chloride, methylthioninium chloride)

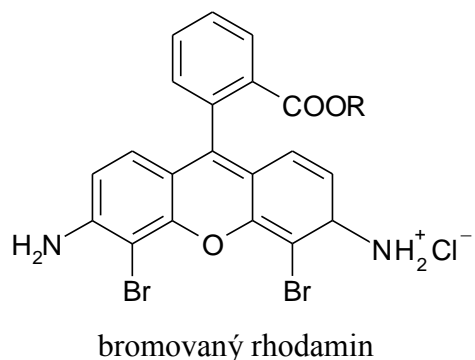
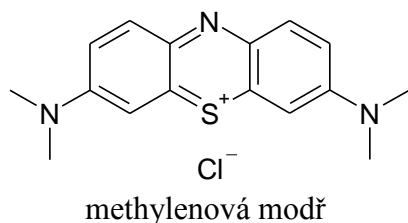
Je nejpoužívanější fenothiazininové barvivo primárně používané v histologii pro barvení s absorpcí 550-700nm maximem 664nm, v roztocích o vysoké koncentraci a kyselém prostředí 590nm. Používá experimentálně k léčbě basálního buněčného karcinomu, Kaposiho sarkomu, melanomu, onychomykoz a bradavic⁹⁷. Zdá se být v této léčbě efektivnější než 5-ALA či HpD. Dokáže inaktivovat patogeny z krve ex vivo^{98,99}. *In vivo* použití je limitováno redukcí enzymů na leukoformu jež je fotodynamicky neaktivní.

Toluidinová modř (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenothiazinylium chloride, polonium chloride)

Je druhým nejpoužívanějším fenothiazininovým barvivem s absorpčním maximem pouze kolem 625nm, i tvorba singletového kyslíku je nižší než u methylenové modři^{100,101,102}. Byla testována i na jiné použití, např. cystyckou fibrozu¹⁰³, plísňové infekce v ústech. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při odstraňování bakteriálního plaku v ústech^{104,105,106,107,108,109}.

Rhodaminy

Jsou to substituované iminoxanthenové deriváty často používané v mikrobiologii a molekulární biologii jako fluorescenční barviva. Jsou vychytávány s vysokou selektivitou do neoplastických tkání¹¹⁰. Fluorescence je pro PDT nežádoucím jevem, tento problém lze částečně vyřešit halogenací základní molekuly, zároveň dochází i k posunu absorpce k červené oblasti což je také velice důležité. Rhodaminy bez substituce mají maximum kolem 500nm. Jako nejslibnější látka s dobrou stabilitou a nízkou toxicitou byl objeven metyl ester 4,5-dibromrhodaminu s absorpčním maximem ve vodném roztoku 540nm. Používá se pro autotransplantační léčbu myeloidní leukémie *ex vivo*, kdy dochází ke zničení nemocných buněk kostní dřeně, normální přežijí a jsou poté použity k autotransplantaci

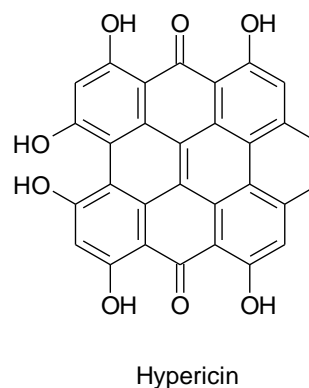
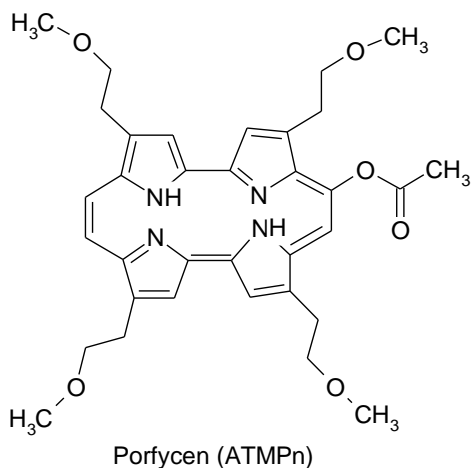


Porfyceny

Jejich absorpční maximum se pohybuje v oblasti vlnové délky 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, patří mezi nejrychleji vychytávané PS v *in vitro* studiích vůbec. Látka se aplikuje pouze topicky k léčbě kožních onemocnění (psoriáza, nemelanotický karcinom kůže)¹¹¹.

Hypericin

O této přírodní látce (izolované z *Hypericum perforatum* – třezalky tečkované) se ví, že funguje jako účinný PS, neboť způsobuje hypericismus (vede ke kožnímu dráždění a zvýšeným teplotám po ozáření) u zvířat konzumujících větší množství rostlin obsahujících tuto látku¹¹². Hypericin je pro terapeutické využití ve fázi výzkumu k léčbě proliferativní retinopatie¹¹³ a lze jej využít pro *ex vivo* fluorescenční cytologickou detekci buněk nádoru močového měchýře v moči¹¹⁴.



V současné době jsou do klinické praxe ve světě zavedeny (viz. Tab. 3) tři klasické PS (HpD, verteporfin, temoporfin) a ALA (a její methylester), avšak řada dalších je již v pokročilých fázích klinického testování. I přes své nevýhodné vlastnosti zůstává HpD stále dosud nejrozšířenějším a nejpoužívanějším PS, vzhledem k tomu, že je dosud nejprozkoumanější. Do popředí se ovšem dostávají i novější PS druhé generace a do budoucna se dá předpokládat, že díky svým výhodnějším vlastnostem a často nižší toxicitou postupně vytlačí HpD z terapie a zaujmou jeho místo⁵⁵.

1.4.2.3 3. GENERACE

Jako látky třetí generace se označují konjugáty fotosenzitizerů s různými biomolekulami (protilátkami, steroidy, cukry, mono- a polynukleotidy)¹¹⁵.

1.5 SOLUBILIZACE

1.5.1 Micely

Pochod, při němž jsou do micel surfaktantu včleňovány molekuly další látky solubilizátu (látky, včleněná do asociativní micely). Zprostředkovaným rozpouštěním neboli solubilizací málo rozpustné látky rozumíme podstatné zlepšení rozpustnosti přidáním další látky (solubilizátoru) do roztoku. Jedná se hlavně o zlepšení rozpustnosti ve vodě, o způsoby, jak připravit vodné roztoky látek, které se samy ve vodě nedostatečně rozpouštějí nebo se prakticky nerozpouštějí.

Micela asociativní

Útvar, který vzniká agregací antipatických molekul některých nízkomolekulárních látek z jejich pravých roztoků po dosažení určité koncentrace roztoku, označované jako kritická micelární koncentrace. Asociativní micely se od lyofobních micel liší tím, že nepotřebují umělou stabilizaci, jejich velikost a koncentrace je určena okamžitými stavovými veličinami, nikoliv minulostí systému. Tyto systémy jsou termodynamicky stabilní.

Ve vodném prostředí tvoří jádro micely navzájem propletené uhlovodíkové řetězce molekul povrchově aktivní látky (PAL); jejich polární skupiny jsou rozmístěny na vnějším povrchu micely. Tím je dosaženo minimálního styku mezi molekulami vody a hydrofobními částmi

molekul PAL. Jde-li o ionogenní PAL, polární skupiny disociují. Vznikají nabité micely obklopené elektrickou dvojrůstkou tvořenou disociací vzniklými protiionty.

Ve zředěných roztocích (nad kritickou micelární koncentrací) vznikají malé, kulovité, tzv. Hartleyovy micely (obr. 6), jejichž poloměr je přibližně roven délce molekuly PAL. Asociační číslo roste s délkou uhlovodíkového řetězce a klesá s velikostí plochy, kterou na povrchu micely zaujímá jedna polární skupina; pohybuje se nejčastěji mezi 50 a 150 a závisí i na fyzikálních podmínkách.

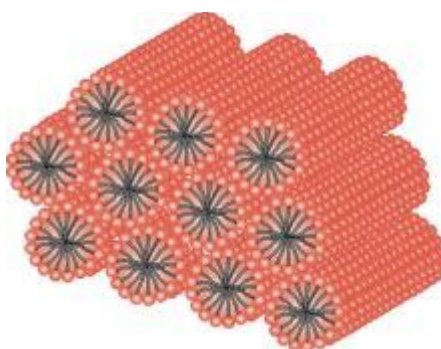


Obr. 6: Model malé (Hartleyovy) ionogenní micely

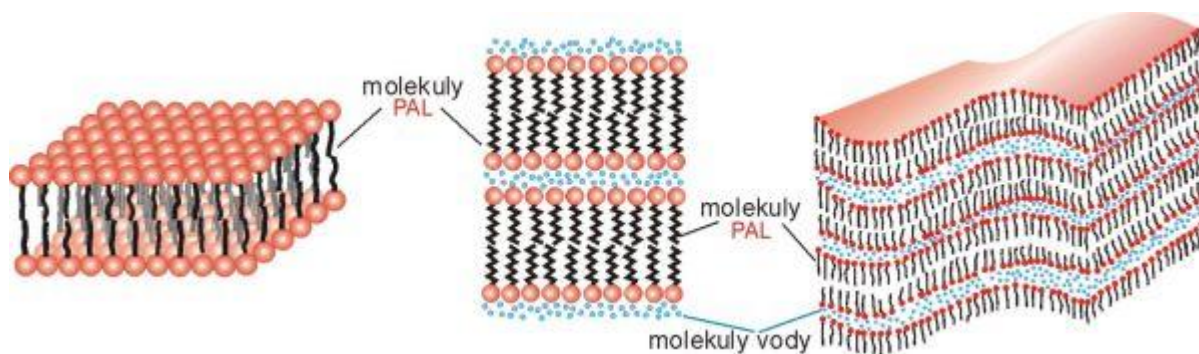
Při vyšších koncentracích roztoku se zvětšuje rozměr micel a uhlovodíkové řetězce se začínají orientovat navzájem rovnoběžně, vznikají válcovité útvary (obr.7), které mohou při vyšších koncentracích vytvářet hexagonální kapalně krystalné struktury (obr.8); při ještě větších koncentracích laminární, tzv. McBainovy micely (obr.9), složené ze dvou vrstev PAL, které jsou k sobě obráceny uhlovodíkovými řetězci a polární skupiny směřují ven. V důsledku tvorby laminárních micel a jejich charakteristického uspořádání mohou dostatečně koncentrované roztoky přecházet v gel.



Obr. 7: Válcovité micely

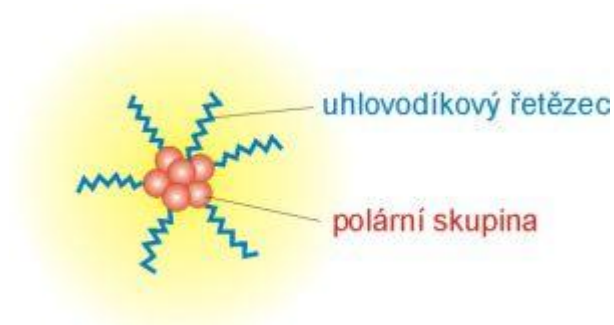


Obr. 8: Hexagonální kapalně krystalné



Obr. 9: Schéma McBainových laminárních micel

V některých případech se micely mohou tvořit i v *nevodném prostředí* - vznikají tzv. obrácené micely



Obr. 10a obrácená micela

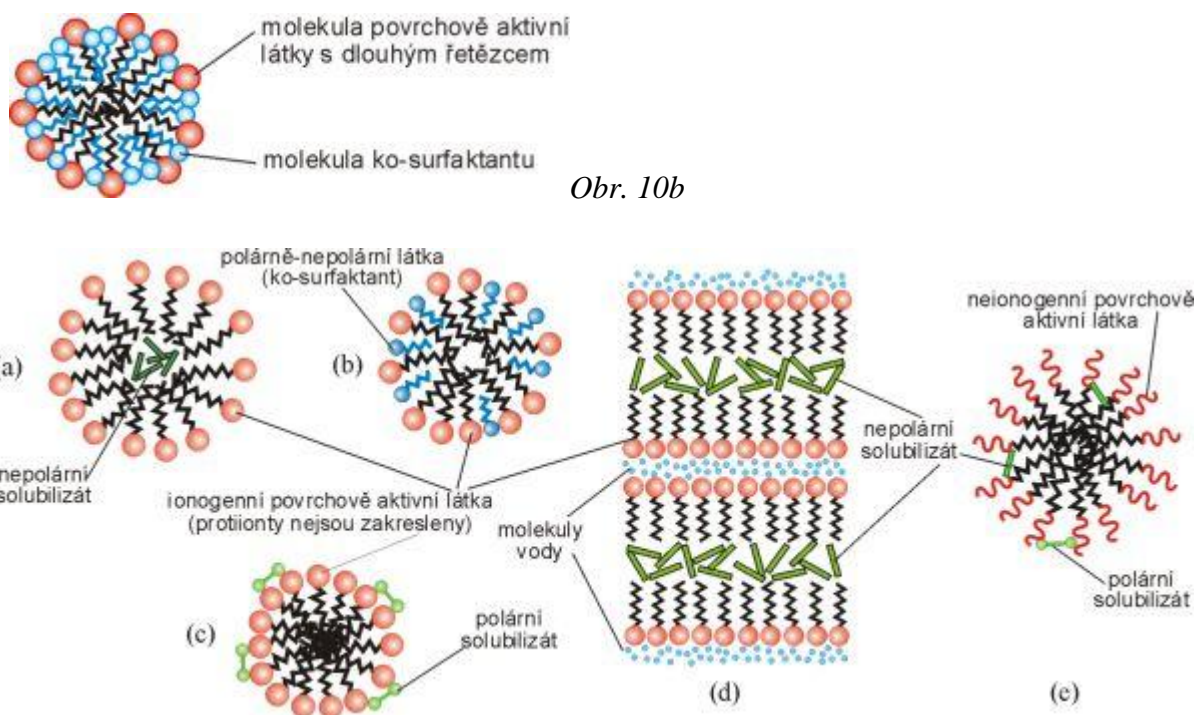
1.5.2 Solubilizace

Přímá solubilizace

- Nepochární látky, které jsou v čistém vodném disperzním prostředí nerozpustné nebo slabě rozpustné, vstupují do jádra micely (obr. 6)
- Polárně-nepochární organické látky (alkoholy, aminy, tzv. ko-surfaktanty – povrchově aktivní látky jejichž uhlovodíkový řetězec není dost dlouhý na to, aby mohly samostatně asociovat v micely, ale může vstupovat do struktury micel asociativních koloidů; povrchové napětí systému se tím dále snižuje. Příkladem mohou být alkoholy o střední délce řetězce (např. hexanol), které se rozmísťují v micelách tak, že jejich uhlovodíkové řetězce směřují dovnitř micel a polární skupiny do vodné fáze (obr. 11b).
- Polární látky jsou solubilizovány na povrchu micely nebo v těsné blízkosti povrchu (obr. 11c).

- V laminárních micelách vstupují molekuly nepolární látky mezi uhlovodíkové řetězce molekul a tím se vrstvy molekul surfaktantu od sebe oddalují (obr. 11d).
- U micel neionogenních surfaktantů, které obsahují polyoxyethylenové skupiny, se molekuly solubilizátu rozmisťují v okrajových částech micel mezi zohýbanými oxyethylenovými řetězci (solubilizace v rovině hydrofilních řetězců), molekuly nepolární povahy blíže jádru micely (obr. 11e).

Při solubilizaci roste hmotnost micel surfaktantu nejen v důsledku zabudování molekul solubilizátu do micely, ale také proto, že solubilizací se zvětší objem hydrofobního jádra a musí se tedy zvětšit i počet molekul surfaktantu tvořících micelu.



Obr. 11: Přímá solubilizace (a) nepolárních látek, (b) polárně-nepolárních látek, (c) polárních látek v malých ionogenních micelách, (d) nepolárních látek v McBainových micelách, (e) nepolárních a polárních látek v neionogenních micelách

Obrácená solubilizace

nastává v systémech s nepolárním prostředím, kde vznikají obrácené micely (vznikají v nevodném prostředí; jejich jádro tvoří polární skupiny, zatímco uhlovodíkové řetězce směřují ven do nepolárního prostředí). Asociační číslo obrácených micel nebývá větší než 10; KMK bývá obtížně definovatelná, neboť přechod z pravého roztoku na koloidní nastává v poměrně širokém intervalu koncentrací. Silně polární jádro snadno solubilizuje vodu, a

umožňuje tak koloidní rozpouštění vody v oleji v přítomnosti PAL, což má významné uplatnění zvláště v potravinářském průmyslu).

Kritická micelární koncentrace (KMK)

Koncentrace, při níž se v pravém roztoku micelárního koloidu začínají tvořit micely. Není vysoká, pro různé látky kolísá v rozmezí 10^{-5} až 10^{-3} mol/dm⁻³. Pod touto koncentrací je micelární koloid v systému pouze ve formě unimerních molekul, nad ní všechny přidávané molekuly asociují do micel.

Kritická micelární koncentrace závisí:

- Na délce a struktuře uhlovodíkového řetězce: hodnota KMK s rostoucí délkou uhlovodíkového řetězce klesá. V homologické řadě ionogenních micelárních koloidů může být závislost KMK na počtu uhlíků n_C vyjádřena vztahem

$$\ln KMK = A - B \cdot n_C$$

kde A je pro danou homologickou řadu konstanta závislá na teplotě, povaze a množství hydrofilních skupin a na substituentech v uhlovodíkovém řetězci. Konstanta B se mění s počtem iontových skupin. Rozvětvení uhlovodíkového řetězce, přítomnost dvojných vazeb, polární substituce v alkylovém řetězci a přemístění iontové skupiny od konce do středu řetězce vedou ke zvýšení KMK, zatímco připojení benzenového jádra k alkylovému řetězci vede ke snížení KMK.

- Na vlastnostech hydrofilní skupiny: Vliv hydrofilní skupiny na KMK je dán její povahou a zejména nábojem. Při stejné délce uhlovodíkového řetězce je KMK neionogenních PAL nižší než ionogenních. Hodnoty KMK neionogenních PAL značně závisí na rozměrech a povaze hydrofilní skupiny, u ionogenních PAL jsou mezi různými hydrofilními skupinami malé rozdíly.
- Na vlastnostech protiiontů vzniklých disociací (u ionogenních micelárních koloidů) Vliv protiiontů vzniklých disociací na hodnotu KMK závisí především na jejich mocenství. KMK klesá se zvyšujícím se nábojem protiiontů.
- Na přítomnosti dalších látek v roztoku: *Jednoduché anorganické elektrolyty* snižují hodnotu KMK a to tím více, čím vyšší je koncentrace elektrolytu a čím vyšší je mocenství opačně nabitého iontu. Vliv elektrolytů na KMK neionogenních micelárních koloidů je méně výrazný než u ionogenních typů. Přítomnost

neelektrolytů se projevuje různě. Např. lineární alkoholy s dlouhým řetězcem snižují KMK tím více, čím větší je koncentrace alkoholu a délka alifatického řetězce. Nepochární látky mají na KMK většinou malý vliv. Silně polární látky (dioxan, močovina) mají komplexní účinky.

- Na teplotě a tlaku: S rostoucí *teplotou* se hodnota KMK může zvyšovat (obvykle u kationogenních micelárních koloidů) nebo snižovat (obvykle u neionogenních typů) a teplotní závislost KMK může vykazovat i zřetelné minimum. Vliv *tlaku* na KMK je poměrně malý i v oblastech velmi vysokých tlaků.

1.5.3 Mikroemulze

Termín mikroemulze byl poprvé uveden Hoarem a Schulmanem r.1943¹¹⁶. Tento systém vypadá jako transparentní a může být definován jako systém vody, oleje a amfifilních složek, který je jednoduchý, izotopický a termodynamicky stálý. Je obvykle stabilizovaný surfaktanty a kosurfaktanty a tvořen částicemi menšími než 0.1 μm. Mikroemulze lze od makroemulzí rozlišit tím, že makroemulze mají větší částice, nejsou průhledné a vyžadují značnou energii k tvorbě. Ačkoliv mikroemulze V/O může být považována za podobnou reverzním miscelám, ve vztahu k orientaci polární a nepolární části surfaktantu jsou charakterizované přítomností vody, micely ji nemají. Dalším rozdílem je velikost: reversní micely mají 5nm, přičemž částice mikroemulze jsou mnohem větší, je to dáno přítomností volné vody. Tvorba ME je závislá na koeficientu olej-voda, surfaktantu a oblast existence je dána fázovým diagramem.

Za termodynamicky zajímavou lze považovat styčnou plochu ME, která je tvořena velkým množstvím kapek. Tento termodynamicky stálý systém se tvoří spontánně protože nízká hodnota povrchového napětí způsobuje difuzi surfaktantu na mezifázi, kontribuce je závislá na míchání jedné fáze v druhé a tvorbě velkého množství kapek¹¹⁷. Nízké mezipovrchové napětí v tomto systému dává vzniknout řadě struktur jako pravé emulze, hexagonální nebo kubické útvary.

Struktura a vlastnosti mikroemulzí poskytuje mnoho výhod k farmaceutickému použití. Jejich termodynamická stabilita dovoluje snadnou přípravu. Přítomnost značného množství surfaktantů a kosurfaktantů může být problémem biokompatibility, ale současně umožňuje vznik ME pro rozdílné látky, dokonce i ty, které jsou jinak nemísitelné s hydrofilními i hydrofobními rozpouštědly. Strukturální rozmanitost, skladba a pH prostředí, má vliv na

uvolňování léčivých látek. Další pozitivní vlastností jsou nízká viskozita, snížení autooxidace, možnost sterilizace filtrací na rozdíl od klasických emulzí¹¹⁸. ME nabízejí i další výhody při ústním podání, zvyšují biologickou dostupnost zvýšením rozpustnosti špatně rozpustných látek ve vodě v olejové fázi. Závisí na druhu oleje, který může zvýšit koncentraci v mízním systému a vyhnout se first pass efektu v játrech.

Uvolňování léčivé látky z ME ovlivňuje více parametrů, např. hydrofilita/lipofilita, způsob podání, objem. Rozlišují se dva hlavní mechanismy. Olejová fáze je rezervoár v případě emulzí o/v. ME v tomto případě představuje retardovanou formu. Na druhé straně, při ústním podání může být látka díky kapkám oleje rychleji fagocytována ze struktur. Toto může modifikovat farmakokinetický profil zahrnující biodostupnost ve vodě těžko rozpustných látek¹¹⁹. Lipofilní léčivo musí projít před vstupem do tkání vodným prostředím a tento krok zpomaluje transport léčivých látek se sníženou rozpustností ve vodě.

1.5.4 Nanoemulze

Nanoemulze se řadí mezi emulze s velikostí částic mezi 20 – 500nm¹²⁰. Jsou stabilizovány standardními emulgátory. Na rozdíl od mikroemulzí nejsou tvořeny spontánně, ke vzniku je potřeba dodání energie. Jejich vlastnosti závisí na termodynamických podmínkách, přípravných metodách a dalších přidaných komponentách. Nanoemulze na rozdíl od mikroemulzí, nejsou rovnovážné systémy, což je zásadní rozdíl mezi nimi^{121, 122}. Mohou mít vysokou kinetickou stabilitu a transparentnost podobnou mikroemulzím¹²⁰. Používají se i jako mikrosoučásti kontrolující velikost připravených monodisperzních částic.

2. Cíl práce

Cílem práce byla optimalizace solubilizačních systémů pro lipofilní fotosensitizéry typu azaanalogů ftalocyaninů. Na základě předchozích zkušeností na katedře byly použity triglyceridy se střední délkou řetězce (MCT) jako lipofilní biokompatibilní rozpouštědlo pro fotosensitizéry. Cílem práce bylo solubilizovat MCT formou nanoemulzí, případně mikroemulzí tak, aby bylo dosaženo stability solubilizačního systému a provést vyhodnocení některých fyzikálně-chemických a biologických vlastností vybraných systémů (měření absorpčních spekter, velikosti částic a cytotoxicity).

3. Experimentální část

Experimentální část lze rozdělit do dvou částí :

Nejprve jsem snažila připravit stabilní čirou emulzi bez přidaných barviv.

Poté jsem dvě z vybraných emulzí použila k solubilizaci jednotlivých barviv a hledání koncentrací při kterých jsou rozpuštěny a nedochází k jejich agregaci.

3.1 EMULGÁTORY A SOLUBILIZÁTORY

Veškeré emulgátory a solubilizátory byly použity ve stavu, v jakém byly komerčně zakoupeny.

CREMOPHOR[®] RH-40

Cremophor[®] RH-40 je neionogenní solubilizátor a emulgátor získávaný reakcí hydrogenovaného ricinového oleje s ethylenoxidem. Jedná se tedy o PEG-40 hydrogenovaný ricinový olej. Při teplotě 20 °C je Cremophor[®] RH-40 bílá až nažloutlá průhledná pasta s charakteristickým mdlým zápachem. Ve vodě a ethanolu tvoří čiré roztoky, přičemž se zvyšující se teplotou se tyto roztoky zakalí. Při vyšších teplotách tvoří s mastnými kyselinami a mastnými alkoholy čiré směsi. Hodnota HLB (hydrofilní-lipofilní rovnováha) je 14 – 16.

Cremophor[®] RH-40 se používá k solubilizaci esenciálních a vonných olejů ve vodě či ve směsi vody a alkoholu. Ve srovnání s jinými solubilizátory může být používán v poměrně nízkých koncentracích. Je též velmi vhodným emulgátorem – užívá se k emulgaci širokého množství hydrofobních sloučenin jako jsou mastné kyseliny, mastné alkoholy, vitamíny či další aktivní látky (např. digoxin – farmakokinetická interakce mezi digoxinem a emulgátorem Cremophor[®] RH-40 totiž zvyšuje koncentraci digoxinu v buňkách myokardu tím, že inhibuje činnost membránového transportéru P-glykoproteinu, který zapříčiňuje efflux digoxinu z buněk^{123,124}).

CAPRYLIC-CAPRIC TRIGLYCERIDES (MCT) ČL 2002

Jedná se o směs triglyceridů střední délky řetězce (medium chain triglycerides, MCT) rostlinného původu. MCT (CAS registrační číslo: 65381-09-1, ČL 2002 – Triglycerida saturanta media) je čirá až mírně nažloutlá kapalina s nepatrným a charakteristickým zápachem, prakticky nerozpustná ve vodě. Je velmi polární s hustotou $0,955 \text{ g/cm}^3$ při 20°C . Svými vlastnostmi se podobá vyšším přírodním triglyceridům, avšak oproti nim zanechává na pokožce příjemný pocit. Používá se jako rozpouštědlo pro aktivní lipofilní sloučeniny a UV filtry. Slouží též jako univerzální změkčovadlo všech typů krémů, pleťových vod a olejů, koupelových olejů, balzámů na rty, šampónů či různých prostředků na opalování, přičemž má velmi dobrý vliv na pokožku

PROPYLENGLYKOL

Propylenglykol (1,2 – propandiol, CAS 57-55-6) je bezbarvá, bez zápachu lehce nasládlá viskozní, silně hygroskopická kapalina plně mísitelná s vodou, methanolem, ethanolem, acetonem, chloroformem a rozpustný v benzenu. Používá se jako zvlhčovač léčiv, kosmetiky a potravin a rozpouštědlo

GLYCEROL

Glycerol (syn. 1,2,3-propantriol, CAS: 56-81-5, ČL 2005 – Glycerolum) je bezbarvá viskozní kapalina mísitelná s vodou, bez charakteristického zápachu, sladké chuti, pH neutrální, s teplotou varu 290°C , bodem tání 18°C a hustotou $1,262 \text{ g/cm}^3$. Je rozpustný ve vodě a alkoholu, málo rozpustný v etheru. Používá se jako rozpouštědlo, nemrznoucí přísada a plastifikátor, při výrobě kosmetiky, tekutých mýdel, barviv a maziv, k výrobě nitroglycerinu, maziv a expektorancií.

POLYSORBÁT 80

(TWEEN 80, ČL 2005 – Polysorbatum 80)

Je neionogenní surfaktant vykazující značnou povrchovou aktivitu a relativně nízkou toxicitu, HLB 15. Používá se jako solubilizační nebo stabilizační činidlo běžně užívané ve

farmaceutickém průmyslu u četných zdravotnických a farmaceutických produktů (např. vitamínových olejů, očkovacích a protinádorových látek), mastí, krémů, roztoků, také jako přísada v tabletách a velké uplatnění nalézá i v potravinářství. Polysorbát 80 je využíván dále ke zlepšení absorpce léčiv po orálním podání nebo při transdermálním neinvazivním průniku kůží. V současnosti se řeší závažný problém týkající se vyvolání anafylaktické reakce po podání přípravků s tímto solubilizátorem. Tento surfaktant slouží také k solubilizaci léčiv špatně rozpustných ve vodě. Když je surfaktant přidán do vody v koncentraci nad KMK, rozpustnost hydrofobního léčiva značně vzroste.

CREMOPHOR[®] EL

CREMOPHOR[®] EL (Polyoxyethylenglyceroltriricinoleat 35) je neionogenní emulgátor. Jeho hlavními komponentami jsou glycerol, polyethylenglycol, ricinoleát. Estery vyšších mastných kyselin polyethylenglykolu tvoří hydrofobní část, hydrofilní je tvořena polyethylenglykolem a glycerolem. Jedná se o žlutou olejovitou kapalinu se slabým charakteristickým zápachem s teplotou tání 26°C, rozpustný ve vodě, etanolu, isopropylalkoholu, chloroformu, toluenu, xylenu. S rostoucí teplotou vody se rozpustnost Cremophoru[®] EL snižuje, proto se za určité teploty roztok zakalí. Používá se jako emulgátor v mnoha odvětvích.

GLYCEROL MONOOLEÁT

(TEGIN[®] O, GMO)

Je neionogenní emulgátor. Používá se převážně na přípravu emulzí V/O. Jedná se o olejovitou kapalinu s HLB-3.

Výrobce: Franken-Chemie Nuremberg Germany

TEGO CARE[®] 450 (Polyglyceryl-3 methylglucose distearate)

Neionogenní emulgátor pro přípravu emulzí O/V jasně bílé barvy ve formě pelet. Je vysoce stabilní s HLB- kolem 12. Použití v kosmetice na přípravu krémů a mlék.

Výrobce: Evonik Goldschmidt

POLYSORBÁT 20 (ČL 2005 – Polysorbatum 20)

Jedná se o neionogenní emulgátor, směs esterů mastných kyselin, zvláště kyseliny laurové. Olejovitá až žlutohnědá čirá nebo opalizující kapalina, dobře rozpustná ve vodě, ethanolu, methanolu a nerozpustná v parafínu

HYDROXYPROPYLCELULOZA (ČL 2002 – Hydroxypropylcellulosum)

Je bílý nebo nažloutlý prášek nebo granule. Ve vysušeném stavu je hygroskopická dobře rozpustná ve studené vodě, ethanolu, methanolu, prakticky nerozpustná v horké vodě.

LECITHIN

Sterncithin, 62% fosfolipidů nerozpustných v acetonu.

3.2 POUŽITÉ FOTOLENIZITIZÉRY

P2Zn

Relativní molekulová hmotnost = 1288,32g/mol

Molekulární vzorec = C₅₆H₇₂N₁₆S₈Zn

P9Zn

Relativní molekulová hmotnost = 1280,36g/mol

Molekulární vzorec = C₆₄H₈₀N₈S₈Zn

MUZ21Zn

Relativní molekulová hmotnost = 1488,38g/mol

Molekulární vzorec = $C_{72}H_{80}N_{16}S_8Zn$

3.3 PŘÍSTROJE

Absorpční spektra byla měřena na spektrofotometru Shimadzu UV-2401PC.

Homogenizátor použitý na přípravu emulzí: IKA T10 basic homogenizer (IKA Werke, Ger., Staufen)

Velikost částic byla měřena na: Zetasizer Nano 2S A model ZEN 3600 (Malvern Instruments, GB, Maker)

3.4 PŘÍPRAVA EMULZÍ

3.4.1

Požité suroviny: MCT, LECITHIN, TWEEN 80, GLYCEROL, VODA

Vzorek	MCT(g)	Lecithin(g)	Tween 80(g)	Glycerol(g)	Voda(g)
LE-1	4	0,52	0,4	0,5	14,6
LE-2	3	0,52	0,4	0,5	15,6
LE-3	2	0,52	0,4	0,5	16,6
LE-4	1	0,52	0,4	0,5	17,6

Připravila jsem si odděleně olejovou (lecitin, MCT) a vodnou fázi (Tween 80, glycerol, voda). Obě zahřáté na 50°C smíchala a homogenizovala pomocí IKA T10 Basic homogenizátoru 2 minuty při postupném zvyšování otáček až na 30tisíc/min. Vzorek LE-4 po tomto postupu ještě zahřála na 80°C a opět homogenizovala.

Výsledky: Všechny emulze byly zakalené a po delším stání se fáze rozdělily.

3.4.2

Použité suroviny: MCT, LECITHIN, GLYCEROL, TWEEN 80, VODA

Vzorek	MCT(g)	Lecithin(g)	Glycerol(g)	Tween 80(g)	Voda(g)
LE-0,25	0,2	0,25	0,25	0,2	4,1
LE-0,125	0,1	0,125	0,125	0,1	4,55
LE-0,160	0,09	0,160	0,160	0,128	4,46

Emulze byly připraveny stejným postupem(viz.1), pouze při vyšší teplotě 80°C a homogenizovány 1min pomocí IKA T10 Basic homogenizátoru při zvyšujících se otáčkách do 30tisíc/min.

Výsledky: Všechny emulze se po delším stání rozdělily na jednotlivé fáze.

3.4.3

Použité suroviny: HYDROXYPROPYLCELULOZA 4000, MCT, VODA

Nejdříve jsem si připravila 2,5% vodný roztok hydroxypropylcelulozy 4000, který jsem následně použila jako vodné fáze k přípravě emulzí s obsahem 10% MCT a 5% MCT. Obě složky jsem zahřála odděleně v kádinkách na 30°C a homogenizovala již popsáním postupem (viz.3.3.2)

Výsledky: po delším stání se fáze nerozdělily, ale emulze měla poměrně vysokou viskozitu.

3.4.4

Použité suroviny: MCT, TEGO CARE[®] 450, VODA

vzorek	MCT(g)	Tego Care [®] 450(g)	Voda(g)
TEG-P1	1,36	0,2	3,82
TEG-P2	0,45	0,05	4,5
TEG-P3	0,45	0,1	4,45

Zahřála jsem vodu na 80°C a rozpustila v ní Tego Care[®], poté jsem homogenizovala zvlášť vodnou fází (viz.3.3.1). Po homogenizování jsem přidala MCT, které jsem také zahřála a celé množství opět homogenizovala (viz.3.3.1). To jsem opakovala čtyřikrát, neboť po první homogenizaci zůstaly fáze oddělené.

Výsledky: Vzniklé emulze byly zakalené a po delším stání se rozdělily.

3.4.5

Použité suroviny: CREMOPHOR[®] RH-40, PROPYLENGLYKOL, MCT, VODA

vzorek	Cremophor [®] RH-40(g)	Propylenglykol(g)	MCT(g)	Voda(g)
CRE-25	10	4	4	22
CRE-20	8	4	4	24

Nejdříve jsem postupně smíchala v kádince propylenglykol, MCT a Cremophor[®] RH-40 a poté za stálého míchání po velmi malých částech (1ml) přidávala vodu. Jednotlivé složky jsem nezahřívala, mísily se při obyčejné teplotě pouze mechanickým ručním mícháním bez použití homogenizátoru. Přidáním určité části vody (2ml) došlo k přechodnému zvýšení viskozity. Dalším mícháním a přidáváním vody jsem získala požadovanou emulzi.

Výsledky: emulze byly zakalené, ale neoddělily se.

3.4.6

Použité suroviny: CREMOPHOR[®] RH-40, MCT, GMO, VODA

vzorek	Cremophor [®] RH40(g)	MCT(g)	GMO(g)	Voda(g)
G-1	10	5	5	80
G-2	12	5	5	78
G-3	8	5	5	82
G-4	9	5	5	81
G-5	10	7	3	80
G-6	10	3	7	80
G-7	10	6	6	78

Navázila jsem si do kádinky MCT a GMO, které pomocí tyčinky řádně smíchala, potom přidala CRE RH-40 a opět promísila. Poté po velmi malých částech přidávala vodu a za stálého míchání homogenizovala (viz.3.3.5).

Výsledky: Ze všech zkušebních poměrů se nejlépe podařil vzorek G-1, který byl bez zákalu i po delším stání. Fáze se nerozdělily u žádné emulze, ostatní však vykazovaly zakalení.

3.4.7

Použité suroviny: MCT, POLYSORBÁT 20, GLYCEROL, GMO, VODA

vzorek	MCT(g)	Polysorbát 20(g)	Glycerol(g)	GMO(g)	Voda(g)
P20-1	5	20		5	70
P20-2	5	15		5	75
P20-3	5	20	5	5	65

Nejdříve jsem postupně smíchala MCT, GMO a polysorbát (tyčinkou za obvyčejné teploty) a s postupným pomalým přidáváním destilované vody homogenizovala.

Výsledky: Vzniklé emulze byly zakalené, ale fáze se neoddělily. Ani přidáním glycerolu se nevyčeřily.

3.4.8

Požité suroviny: MCT, POLYSORBÁT 80, GMO, VODA

vzorek	MCT(g)	Polysorbát 80(g)	GMO(g)	Voda(g)
P80-1	5	10	5	80
P80-2	5	12	5	78
P80-3	5	15	5	75

Postup přípravy viz.3.3.7

Výsledky: Emulze se nepodařilo zhomogenizovat, fáze se nespojily, zůstaly rozděleny.

3.4.9

Použité suroviny: MCT, CREMOPHOR[®] EL, PROPYLENGLYKOL, VODA

vzorek	MCT(g)	CREMOPHOR [®] EL(g)	Propylenglykol(g)	Voda(g)
CREEL-1	1	2		7
CREEL-2	1	2	0,5	6,5
CREEL-3	1	2,5		6,5

Výsledky: Vzorky CREEL-1 a CREEL-2 se nepodařilo homogenizovat, byly zakalené a fáze rozdělené. Emulze CREEL-3 zůstala čirá s nerozdělenými fázemi i po delším stání. Byl použit při další práci.

3.4.10

Použité suroviny: MCT, CREMOPHOR[®] RH, PROPYLENGLYKOL, VODA

vzorek	MCT(g)	CREMOPHOR [®] RH(g)	Propylenglykol(g)	Voda(g)
CRERH-1	1	2		7
CRERH-2	1	2	0,5	6,5
CRERH-3	1	2,5		6,5

Výsledky: Vzorky CRERH-1 a CRERH-2 se nepodařilo homogenizovat, byly zakalené a fáze rozdělené. Emulze CRERH-3 zůstala čirá s nerozdělenými fázemi i po delším stání. Byl použit při další práci.

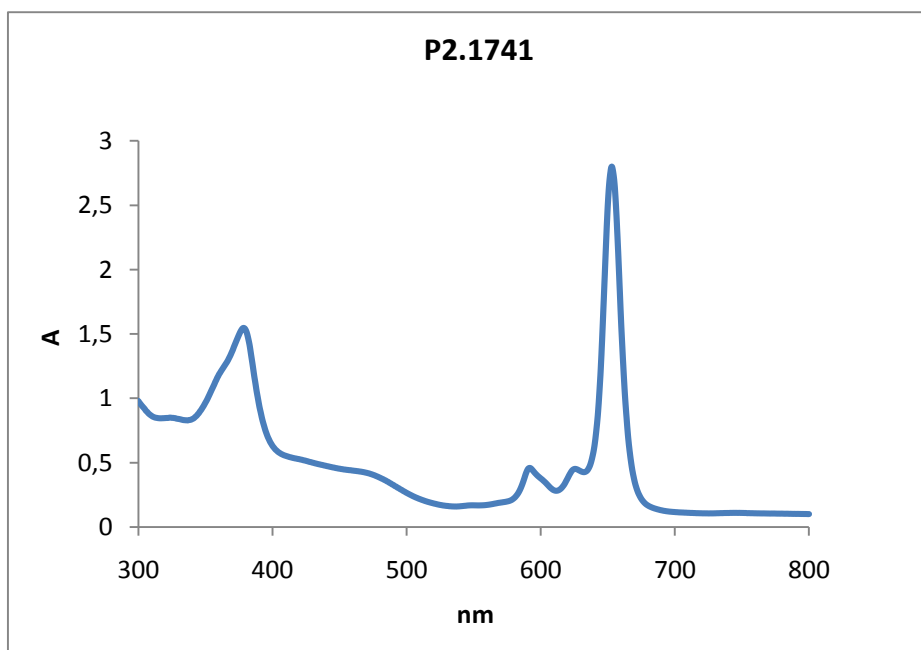
3.5 PŘÍPRAVA EMULZÍ S BARVIVY

3.5.1

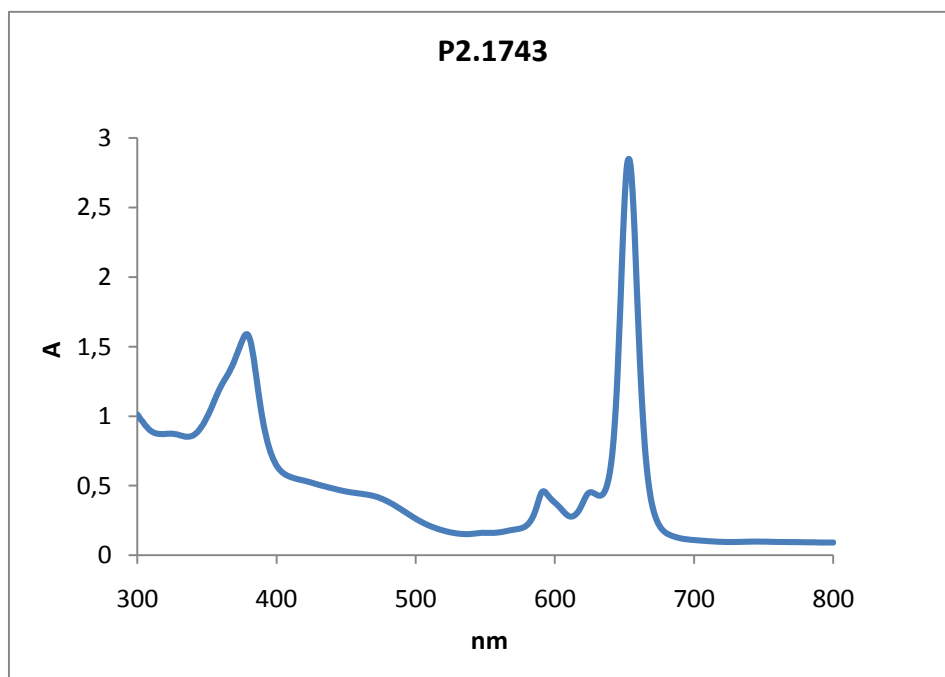
P2Zn 1,3mg (100 $\mu\text{mol/l}$) v emulzi (1g P2Zn/MCT(1 mmol/l) + 2,5g CREMOPHOR[®] EL + 6,5g H₂O)

Do suché baňky jsem si navážila 1,3mg P2Zn, které jsem rozpustila v potřebném množství chloroformu, poté přidala MCT a chloroform odpařila na vakuové odparce. Následně jsem přidala CREMOPHOR[®] EL a za stálého míchání tyčinkou po malých částech doplnila vodou. Výsledná koncentrace P2Zn v mikroemulzi byla 100 $\mu\text{mol/l}$.

Výsledky: Absorbance v této koncentraci byla příliš vysoká, proto jsem vzniklou emulzi naředila vodou na roztok o koncentraci barviva přibližně 10 $\mu\text{mol/l}$ a 1 $\mu\text{mol/l}$. Emulze v těchto koncentracích jsem poté měřila na spektrofotometru.



Graf P2.1741: roztok P2Zn 10 $\mu\text{mol/l}$ měřený ihned po přípravě



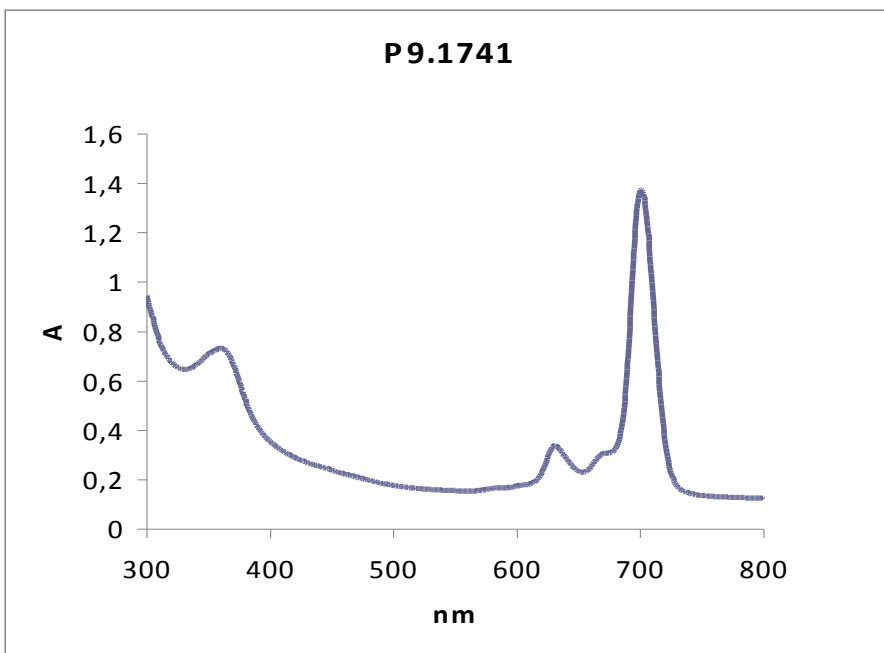
Graf P2.1743: roztok P2Zn $c=10\mu\text{mol/l}$ měřený 14dní po přípravě

3.5.2

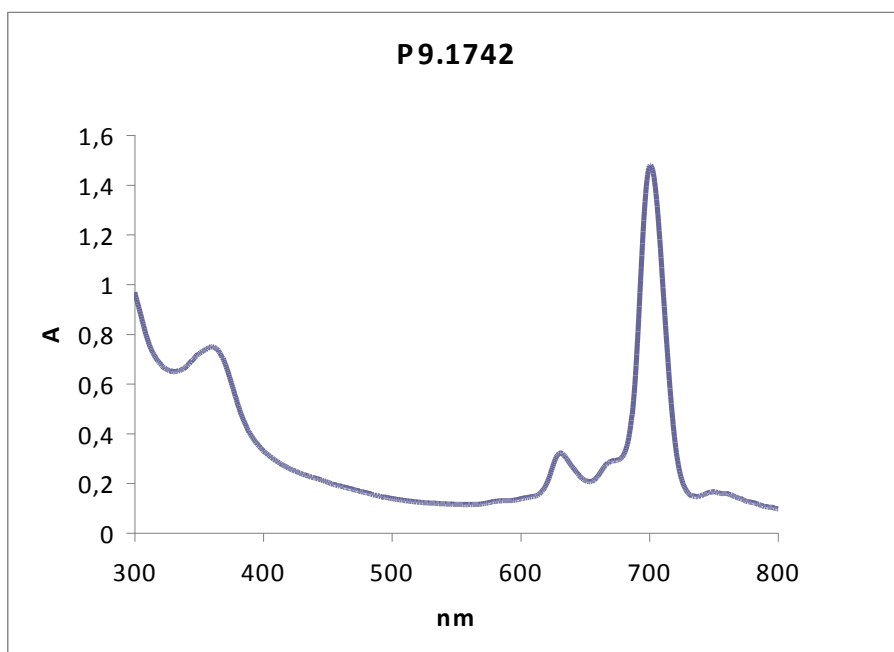
P9Zn 1,2mg (50 $\mu\text{mol/l}$) v emulzi (2g P9Zn/MCT(500 $\mu\text{mol/l}$) + 5g CREMOPHOR[®] EL + 13g H₂O)

Do baňky jsem si navázila příslušné množství barviva (1,2mg), rozpustila ho v chloroformu, přidala MCT a odpařila chloroform na vakuové odparce. Poté jsem přidala CREMOPHOR[®] EL a za stálého míchání doplnila vodou. Výsledná koncentrace P9Zn v mikroemulzi byla 50 $\mu\text{mol/l}$.

Výsledky: Absorbance v této koncentraci byla opět vysoká, emulzi jsem proto naředila na roztok o přibližné koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ a změřila na spektrofotometru.



Graf P9.1741: roztok P9Zn $c=5\mu\text{mol/l}$ měřený ihned po přípravě



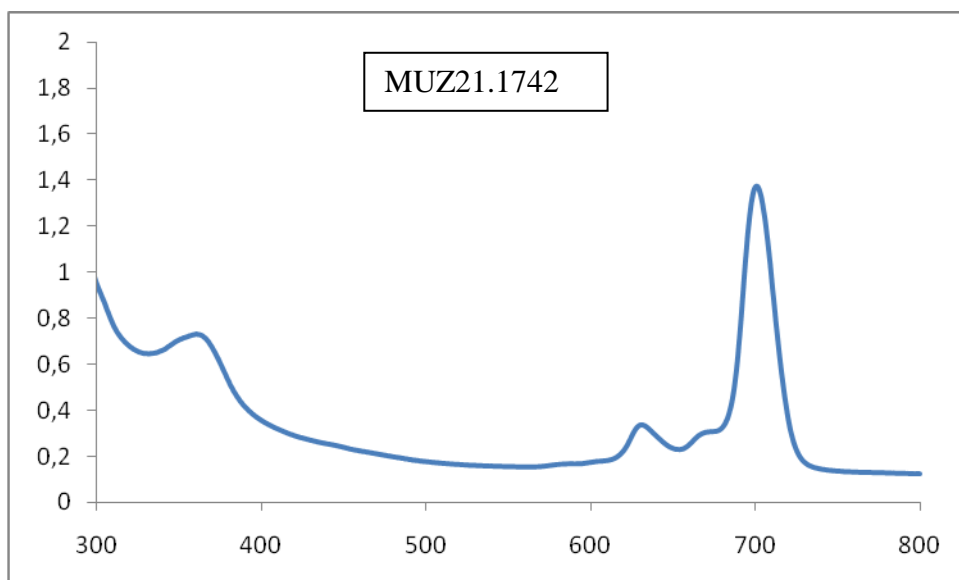
Graf P9.1742: roztok P9Zn $c=5\mu\text{mol/l}$ měřený 14 dní po přípravě

3.5.3

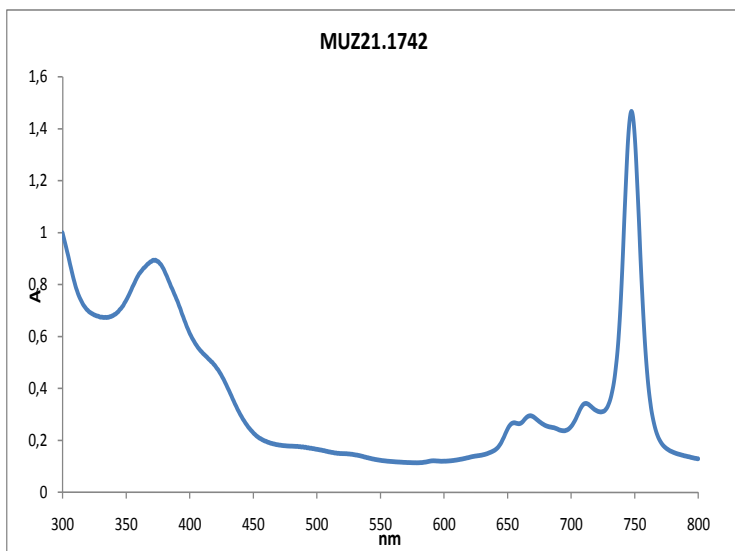
MUZ21Zn 1,5mg (50 $\mu\text{mol/l}$) v emulzi (2g MUZ21Zn/MCT(500 $\mu\text{mol/l}$) + 5g CREMOPHOR[®] EL + 13g H₂O)

Nejprve jsem si do baňky navážila 1,5mg barviva, rozpustila ho v chloroformu, přidala 2g MCT a odpařila chloroform ve vakuové odparce. Poté za stálého míchání přidala CREMOPHOR[®] EL a po malých částech doplnila vodou. Výsledná koncentrace MUZ21Zn v mikroemulzi byla 50 $\mu\text{mol/l}$.

Výsledky: Připravenou emulzi jsem poté naředila vodou na roztok o přibližné koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$, v této koncentraci již absorbance nebyla vysoká. Následně jsem měřila na spektrofotometru.



Graf MUZ 21.1741: roztok MUZ21Zn c=5 $\mu\text{mol/l}$ měřený ihned po přípravě

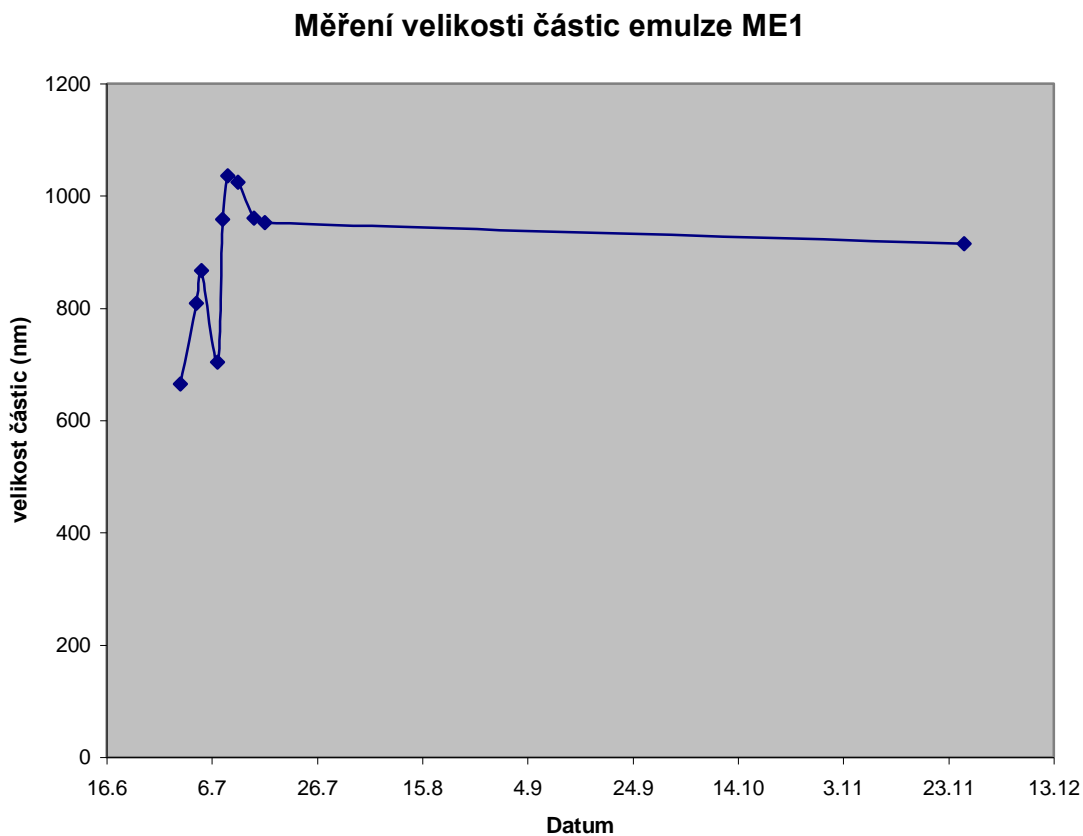


Graf MUZ 21.1742: roztok MUZ21Zn $c = 5 \mu\text{mol/l}$ měřený po 14 dnech od přípravy

3.6 MĚŘENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC

Připravila jsem si dvě emulze s přidaným barvivem P2Zn, kde jeho koncentrace $c = 100\mu\text{mol/l}$. Ve spolupráci s Katedrou farmaceutické technologie byla u těchto mikroemulzní měřena velikost částic. Měření probíhalo po dobu 6 měsíců.

ME 1: 5g P2Zn/MCT (1mmol/l) + 12,5g CREMOPHOR[®] RH-40 + 32,5g H₂O

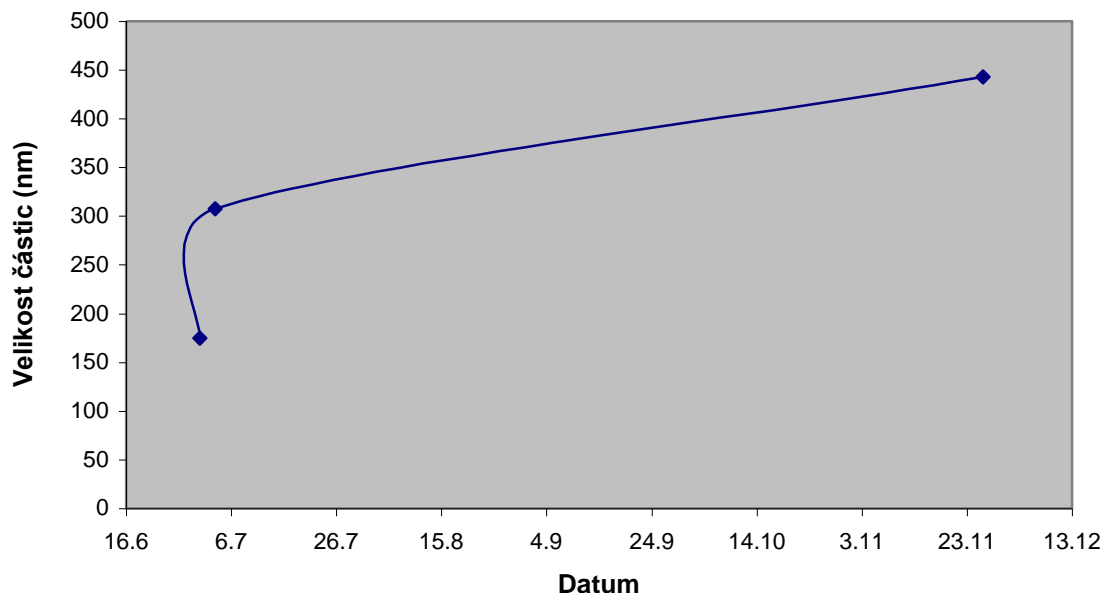


Průměrná velikost částic na počátku měření: 664nm

Průměrná velikost částic na konci měření: 914nm

ME 2: 5g P2Zn/MCT (1mmol/l) + 12,5g CREMOPHOR[®] EL + 32,5g H₂O

Měření velikosti částic emulze ME2



Průměrná velikost částic na počátku měření: 174,5nm

Průměrná velikost částic na konci měření: 443nm

3.7 MĚŘENÍ CYTOTOXICITY

Pro měření cytotoxicity byly vybrány mikroemulze, které vykázaly nejvyšší fyzikální stabilitu. Vzorby byly testovány pod následujícími kódy:

2.4.6. G-1: ME-26

2.4.9. CREEL-3: CR-EL

2.4.10. CRERH-3: CR-RH

Cytotoxicita byla měřena v laboratořích firmy Generi Biotech na Hep2 (Human Negroid cervix carcinoma) buňkách, získaných od European Collection of Cell Cultures (ECACC; Salisbury, UK). Buňky byly kultivovány v Eagle mediu modifikované dle Dulbecca (DMEM; Cambrex, Walkersville, MD) s L-glutaminem a glukózou, doplněném 10% hovězího plodového séra (FBS; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) a

gentamicinem (50 µg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), při teplotě 37 °C v atmosféře obsahující 5% CO₂. Buněčná linie byla testována na kontaminaci mykoplasmy.

Testované vzorky byly připraveny za použití fosfátového pufru (PBS). A ředěny na testované koncentrace stejným pufrům.

Buňky byly napipetovány na 96 jamkovou destičku v množství 1×10^4 buněk do 1 jamky. Druhý den byly přidány testované vzorky. Životnost buněk byla pozorována po 24 h inkubace pomocí zařízení Cell Counting Kit-8 (ALEXIS Corporation, Lausen, Switzerland). Vše bylo provedeno 3x s každou testovanou koncentrací.

Výsledky testování cytotoxicity:

vzorek	EC50 (ředění*)	netoxické ředění* (přežití buněk 95%)
ME 26	127 x	2450 x
CR-EL	75 x	145 x
CR-RH	23 x	1349 x

*Vzhledem k charakteru testovaných systémů (není možné vyjádřit koncentrací definované sloučeniny) jsou výsledky cytotoxicity vyjádřeny poměrem ředění základní dodané mikroemulze do testovacího media.

4. Diskuze

Cílem mé diplomové práce bylo vyhledat solubilizační systémy vhodné pro solubilizaci vybraných fotodynamicky aktivních látek.

Nejprve jsem se zaměřila na přípravu nanoemulzí pomocí homogenizátoru IKA T10 Basic. Snažila jsem se o vytvoření emulzí s co nejmenšími částicemi a minimálním množstvím emulgátoru, vzhledem k jeho případné cytotoxicitě. Nanoemulze ve smyslu standardních emulzních systémů o/v s velikostí částic v oblasti stovek nanometrů se mi vytvořit nepodařilo, připravené vzorky byly nestabilní a dle vizuálního hodnocení nedosahovaly potřebných velikostních parametrů. Příčinou pravděpodobně bylo, že použitý homogenizátor byl k jejich vzniku nedostačující. Pro přípravu nanoemulzí bychom potřebovali vysokotlaký homogenizátor, který jsme ale neměli k dispozici.

Dále jsem se tedy zaměřila na přípravu mikroemulzí. Vzhledem k tomu, že se jedná o termodynamicky stabilní systémy, vznikají bez použití homogenizátoru, pouhým ručním mícháním. Zkoušela jsem různé poměry a druhy solubilizátorů, ze kterých jsem vybrala k dalším experimentálním postupům tři systémy (CREEL-3, CRERH-3, G-1). Tyto splňovaly námi požadované vlastnosti transparence a stálosti. Po následném měření cytotoxicity jsem systém G-1 jako nejvíce cytotoxický z dalších experimentů vyřadila. Ze dvou dalších CRERH-3 vykázal příznivější hodnotu EC50, ale na druhou stranu výrazně vyšší ředění (a tedy vyšší cytotoxicitu) při přežití 95% buněk než CREEL-3. Proto jsem oba systémy použila k solubilizaci vybraných fotosenzitizérů a měření velikosti částic mikroemulzí. K měření UV-vis spekter byl použit pouze systém CREEL-3. Vzhledem k tomu, že v obou případech jsou fotosenzitizéry v mikroemulzi rozpuštěny v MCT jako vnitřní fázi, není pravděpodobné, že by výsledky s CRERH-3 byly jiné.

Pro měření UV-vis spekter byly fotosenzitizéry rozpuštěny v MCT v koncentraci přibližně 1 mmo/l v případě P2Zn a 500 μ mo/l pro P9Zn a MUZ21Zn. Tyto koncentrace v MCT byly v průběhu další operací přípravy a ředění mikroemulzní stejné, i když výsledné koncentrace barviv v mikroemulzích celkově byly nižší. To je ovšem důsledkem množství („koncentrace“) kapének mikroemulze v systému, nikoli změnou koncentrace v MCT. Ze změřených UV-vis spekter je zřejmé, že i v uvedených poměrně vysokých koncentracích jsou fotosenzitizéry v MCT ve zcela neagregované formě, což je dobrým předpokladem pro testování na buněčných systémech, případně pro fotodynamickou terapii.

Měření velikosti částic mikroemulzí ukázalo, že jsou dlouhodobě stabilní, i když zpočátku dochází ke zvětšování částic a unifikaci jejich velikosti. Vzhledem ke vzhledu mikroemulzí nás překvapila velikost částic. Obvykle se uvádí, že mikroemulzní systémy jsou transparentní do velikosti částic 60 – 100 nm. Naše mikroemulze, přestože byly téměř zcela transparentní, dosahovaly podle měření průměrné velikosti částic přibližně 450, resp. 900 nm.

5. Závěr

Ze všech zkoušených systémů byl následně použit pouze 3.4.9 CREEL-3 a 3.4.10. CRERH-3 lišící se pouze se změnou solubilizátoru (CREMOPHOR EL za CREMOPHOR[®] RH-40). Z ostatních vykazovaly námi hledané vlastnosti (čirost a stálost) ještě soustavy 3.4.6 G-1 a 3.4.3., ale nebyly použity pro vysokou cytotoxicitu, resp. viskozitu.

Vybrané systémy jsem následně použila k emulgaci vybraných fotosenzitizérů a sledovala, zda v nich budou stálé, nevysráží se a neagregují.

Nakonec byla u vybraných systémů měřena velikost částic.

- Měření cytotoxicity

Byla provedena měření cytotoxicity, kterými se zjistilo, že z tohoto hlediska jsou z připravených systémů nejvýhodnější 3.4.9. CREEL-3 a 3.4.10. CRERH-3.

- Systémy s barvivy

1) P2Zn (100 $\mu\text{mol/l}$) v emulzi CREEL-3

(1g P2Zn/MCT(1 mmol/l) + 2,5g CRE EL + 6,5g H₂O)

2) P9Zn (50 $\mu\text{mol/l}$) v emulzi CREEL-3

(2g P9Zn/MCT(500 $\mu\text{mol/l}$) + 5g CRE EL + 13g H₂O)

3) MUZ21Zn (50 $\mu\text{mol/l}$) v emulzi CREEL-3

(2g MUZ21Zn/MCT(500 $\mu\text{mol/l}$) + 5g CRE EL + 13g H₂O)

U všech mikroemulzí jsem změřila UV-vis spektra. Žádný nevykazoval agregaci nebo vysrážení fotosenzitizéru.

- Měření velikosti částic

Velikost částic jsem měřila u dvou systémů s barvivem P2Zn:

ME 1 (CRERH-3): 5g P2Zn/MCT(1 mmol/l) + 12,5g CRE[®] RH-40 + 32,5g H₂O

Měření probíhalo v průběhu šesti měsíců. Během prvních dvou týdnů od přípravy se částice zvětšovaly, poté se jejich velikost ustálila.

ME 2 (CREEL-3): 5g P2Zn/MCT(1 mmol/l) + 12,5g CRE[®]EL + 32,5g H₂O

Velikost částic byla změřena dvakrát (na začátku a konci šestiměsíčního období).

Z výsledku vyplývá, že částice se podobně jako v případě ME 1 zvětšily a jejich velikost se stabilizovala, a to přibližně na poloviční hodnotě oproti ME 1.

6. Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá hledáním solubilizačních systémů pro potenciálně fotodynamicky aktivní látky. Cílem bylo získání systémů s co nejmenšími částicemi, transparentních či mírně opalescentních s co nejmenší cytotoxicitou. Podařilo se vytvořit tři, které splňovaly požadavky na transparentnost, ale jen dva byly použity dále, k solubilizaci fotosenzitizérů, třetí nevyhovoval zkouškám na cytotoxicitu. Dalším cílem bylo hledání systémů pro vybrané fotosenzitizéry, ze kterých se nevysráží a nebudou agregované, tudíž použitelné v testech na buněčných kulturách. Z vyhledaných systémů, které splňovaly testy na cytotoxicitu, se ukázaly použitelné oba. Fotosenzitizéry v nich emulgované nevykazovaly agregaci ani se ze systémů nevysrážely. Nakonec bylo provedeno měření velikosti částic systémů i s emulgovanými fotosenzitizéry.

Abstract

This graduation thesis is engaged in searching for solubilisation systems for potentially photodynamically active substances. The effort was focused on finding systems with the smallest particles, transparent or modestly opalescent with the acceptable cytotoxicity. Three systems satisfying the requirements for transparency (and so the particle size) were found but only two systems were used further for the solubilization of the photosensitizers, the third one did not conform to the cytotoxicity tests. Another aim was to find, whether the photosensitizers, while solubilized using the selected systems, will not precipitate and will not be aggregated and therefore they would be usable in cell culture tests. Both the systems complying with the cytotoxicity tests proved to be usable. Photosensitizers emulsified in them did not embody the aggregation or precipitation of the system. Finally measurements of the particles size of the systems with emulsified photosensitizers were performed.

7. Literatura

-
- ¹ http://cs.wikipedia.org/wiki/Fotodynamick%C3%A1_terapie
- ² Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N. and Reed, M. (2001). The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, 74, 656-669.
- ³ Scherer, H. (1841). Chemisch-physiologische untersuchungen. *Ann. Chem. Pharm.*, 40,1
- ⁴ Hoppe-Seyler, F. (1871). The haematins. *Tubinger Med. Chem. Untersuchungen*, 4, 523-533
- ⁵ Finsen, N.: Phototherapy. London: Arnold; 1901
- ⁶ Raab, O. (1900). Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Z. Biol.*, 39, 524-546.
- ⁷ Prime, J.: Les accidentes toxiques par l'eosinate de sodium. Paris: Jouve and Boyer; 1900.
- ⁸ von Tappeiner, H. and Jesionek, A. (1903). Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Münch. Med. Wochenschr.*, 47, 2042-2044.
- ⁹ von Trappeiner, H. and Jodlbauer, A. (1904). Über Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozan und Enzyme. *Dtsch. Arch. Klin. Med.*, 80, 427-487.
- ¹⁰ von Tappeiner, H. and Jodlbauer, A.: Die Sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen. Gesamte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung. Leipzig: F. C. W. Vogel; 1907.
- ¹¹ Meyer-Betz, F. (1913). Untersuchungen über die Biologische (photodynamische) Wirkung des Haematoporphyrins und anderer Derivative des Blut- und Galenfarbstoffs. *Dtsch. Arch. Klin. Med.* 112, 476-503.
- ¹² Weishaupt, K.R., Gomer, C. J. and Dougherty, T. J. (1976). Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor *Cancer Res*, 36, 2326-2329.
- ¹³ Dougherty, T. J., Kaufman, J. E., Goldfarb, A., Weishaupt, K. R., Boyle, D. and Mittleman, A. (1978). Photoradiation Therapy for Treatment of Malignant-Tumors. *Cancer Res.*, 38, 2628-2635.
- ¹⁴ Hayata, Y., Konaka, C., Takizawa, N. and Kato, H. (1982). Hematoporphyrin Derivative and Laser Photoradiation in the Treatment of Lung-Cancer. *Chest*, 81, 269-277.

-
- ¹⁵ McCaughan, J. S., Hicks, W., Laufman, L., May, E. and Roach, R. (1984). Palliation of Esophageal Malignancy with Photoradiation Therapy. *Cancer*, 54, 2905-2910.
- ¹⁶ Barr, H., Krasner, N., Boulos, P. B., Chatlani, P. and Bown, S. G. (1990). Photodynamic Therapy for Colorectal-Cancer - a Quantitative Pilot-Study. *Br. J. Surg.*, 77, 93-96.
- ¹⁷ Laws, E. R., Cortese, D. A., Kinsey, J. H., Eagan, R. T. and Anderson, R. E. (1981). Photoradiation Therapy in the Treatment of Malignant Brain-Tumors - a Phase-I (Feasibility) Study. *Neurosurgery*, 9, 672-678.
- ¹⁸ Zimčik, P., Miletín, M. (2004). *Čes. Slov. Farm.*; 53 (5), 219
- ¹⁹ Brown, S. B., Brown, E. A., Walker, I. (2004). *The Lancet Oncology*, 5, 497
- ²⁰ Sharman, W. M., Allen, C. M., Van Lier, J. E. (2000). *Methods Enzymol.*, 319, 376
- ²¹ von Tappeiner, H. and Jodlbauer, A.: Die Sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen. Gesamte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung. Leipzig: F. C. W. Vogel; 1907.
- ²² Lang, K., Mosinger, J. and Wagnerová, D. M. (2004). Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. *Coord. Chem. Rev.*, 248, 321-350.
- ²³ Egorov, S. Y., Kamalov, V. F., Koroteev, N. I., Krasnovsky, A. A., Toleutaev, B. N. and Zinukov, S. V. (1989). Rise and Decay Kinetics of Photosensitized Singlet Oxygen Luminescence in Water - Measurements with Nanosecond Time-Correlated Single Photon-Counting Technique. *Chem. Phys. Lett.*, 163, 421-424.
- ²⁴ Rodgers, M. A. J. (1983). Solvent-Induced Deactivation of Singlet Oxygen - Additivity Relationships in Non-Aromatic Solvents. *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 6201-6205.
- ²⁵ Hatz, S., Lambert, J. D. C. and Ogilby, P. R. (2007). Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 6, 1106-1116.
- ²⁶ Henderson, B. W. and Dougherty, T. J. (1992). How Does Photodynamic Therapy Work. *Photochem. Photobiol.*, 55, 145-157.
- ²⁷ Moan, J. and Boye, E. (1981). Photodynamic Effect on DNA and Cell-Survival of Human-Cells Sensitized by Hematoporphyrin. *Photobiochem. Photobiophys.*, 2, 301-307.
- ²⁸ Henderson, B. W. and Fingar, V. H. (1987). Relationship of Tumor Hypoxia and Response to Photodynamic Treatment in an Experimental Mouse-Tumor. *Cancer Res.*, 47, 3110-3114.

-
- ²⁹ Sitnik, T. M., Hampton, J. A. and Henderson, B. W. (1998). Reduction of tumour oxygenation during and after photodynamic therapy in vivo: effects of fluence rate. *Br. J. Cancer*, *77*, 1386-1394.
- ³⁰ Brown, S. B., Brown, E. A., Walker, I. (2004). *The Lancet Oncology*, *5*, 497
- ³¹ Konan, Y. N., Gurny, R., Alléman, E.(2002). *Photochem. Photobiol.*, *66*, 89
- ³² Berg, K. and Moan, J. (1994). Lysosomes as Photochemical Targets. *International Journal of Cancer*, *59*, 814-822.
- ³³ Sibrian-Vazquez, M., Ortiz, J., Nesterova, I. V., Fernandez-Lazaro, F., Sastre-Santos, A., Soper, S. A. and Vicente, M. G. H. (2007). Synthesis and properties of cell-targeted Zn(II)-phthalocyanine-peptide conjugates. *Bioconjugate Chem.*, *18*, 410-420.
- ³⁴ Dummin, H., Cernay, T. and Zimmermann, H. W. (1997). Selective photosensitization of mitochondria in HeLa cells by cationic Zn(II) phthalocyanines with lipophilic sidechains. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, *37*, 219-229.
- ³⁵ Kessel, D. and Reiners, J. J. (2007). Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage. *Photochem. Photobiol.*, *83*, 1024-1028.
- ³⁶ Kessel, D. and Reiners, J. J. (2007). Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage. *Photochem. Photobiol.*, *83*, 1024-1028.
- ³⁷ Marchal, S., Francois, A., Dumas, D., Guillemin, F. and Bezdetnaya, L. (2007). Relationship between subcellular localisation of Foscan (R) and caspase activation in photosensitised MCF-7 cells. *Br. J. Cancer*, *96*, 944-951.
- ³⁸ Hsieh, Y. J., Wu, C. C., Chang, C. J. and Yu, J. S. (2003). 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.*, *194*, 363-375.
- ³⁹ MacDonald, I. J. and Dougherty, T. J. (2001). Basic principles of photodynamic therapy. *J. Porphyr. Phthalocyanines*, *5*, 105-129.
- ⁴⁰ Hsieh, Y. J., Wu, C. C., Chang, C. J. and Yu, J. S. (2003). 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.*, *194*, 363-375.
- ⁴¹ Nilsson, R., Swanbeck, G. and Wennersten, G. (1975). Primary Mechanisms of Erythrocyte Photolysis Induced by Biological Sensitizers and Phototoxic Drugs.

Photochem. Photobiol., 22, 183-186.

- ⁴² Sun, X. and Leung, W. N. (2002). Photodynamic therapy with pyropheophorbide-a methyl ester in human lung carcinoma cancer cell: Efficacy, localization and apoptosis. *Photochem. Photobiol.*, 75, 644-651.
- ⁴³ Berg, K., Madslie, K., Bommer, J. C., Oftebro, R., Winkelmann, J. W. and Moan, J. (1991). Light-Induced Relocalization of Sulfonated Meso-Tetraphenylporphines in NHIK 3025 Cells and Effects of Dose Fractionation. *Photochem. Photobiol.*, 53, 203-210.
- ⁴⁴ Moan, J., Berg, K., Anholt, H. and Madslie, K. (1994). Sulfonated Aluminum Phthalocyanines as Sensitizers for Photochemotherapy - Effects of Small Light Doses on Localization, Dye Fluorescence and Photosensitivity in V79 Cells. *Int. J. Cancer*, 58, 865-870
- ⁴⁵ Melnikova, V. O., Bezdetnaya, L. N., Bour, C., Fester, E., Gramain, M. P., Merlin, J. L., Potapenko, A. Y. and Guillemin, F. (1999). Subcellular localization of metatetra(4-hydroxyphenyl) chlorin in human tumor cells subjected to photodynamic treatment. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, 49, 96-103.
- ⁴⁶ Melnikova, V. O., Bezdetnaya, L. N., Bour, C., Fester, E., Gramain, M. P., Merlin, J. L., Potapenko, A. Y. and Guillemin, F. (1999). Subcellular localization of metatetra(4-hydroxyphenyl) chlorin in human tumor cells subjected to photodynamic treatment. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, 49, 96-103.
- ⁴⁷ Berg, K., Madslie, K., Bommer, J. C., Oftebro, R., Winkelmann, J. W. and Moan, J. (1991). Light-Induced Relocalization of Sulfonated Meso-Tetraphenylporphines in NHIK 3025 Cells and Effects of Dose Fractionation. *Photochem. Photobiol.*, 53, 203-210.
- ⁴⁸ Moan, J., Berg, K., Anholt, H. and Madslie, K. (1994). Sulfonated Aluminum Phthalocyanines as Sensitizers for Photochemotherapy - Effects of Small Light Doses on Localization, Dye Fluorescence and Photosensitivity in V79 Cells. *Int. J. Cancer*, 58, 865-870.
- ⁴⁹ Castano, A. P., Demidova, T. N. and Hamblin, M. R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one--photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 1, 279-293.
- ⁵⁰ Dummin, H., Cernay, T. and Zimmermann, H. W. (1997). Selective photosensitization of mitochondria in HeLa cells by cationic Zn(II) phthalocyanines with lipophilic sidechains. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, 37, 219-229.
- ⁵¹ Rashid, F. and Horobin, R. W. (1990). 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*, 94, 303-308
- ⁵² Woodburn, K. W., Vardaxis, N. J., Hill, J. S., Kaye, A. H. and Phillips, D. R. (1991). Subcellular-Localization of Porphyrins Using Confocal Laser Scanning Microscopy. *Photochem. Photobiol.*, 54, 725-732.
- ⁵³ Korbelik, M. (1996). Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, 14, 329-334.
- ⁵⁴ Sternberg, E. D., Dolphin, D. and Bruckner, C. (1998). Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron*, 54, 4151-4202.
- ⁵⁵ Zimčík, P., Miletín, M. (2004). *Čes. Slov. Farm.*; 53 (6), 271
- ⁵⁶ Martin, D.: Porphyrins. In: Martin D., Mayes, P. and Rodwel, V. editors. *Harper's Review of Biochemistry*. Los Altos, CA: Lange Medical Publications; 1983: pp. 317-333.
- ⁵⁷ Schoenfeld, N., Epstein, O., Lahav, M., Mamet, R., Shaklai, M. and Atsmon, A. (1988). The Heme Biosynthetic-Pathway in Lymphocytes of Patients with Malignant Lymphoproliferative Disorders. *Cancer Lett.*, 43, 43-48.
- ⁵⁸ Kondo, M., Hirota, N., Takaoka, T. and Kajiwara, M. (1993). Heme-Biosynthetic Enzyme-Activities and Porphyrin Accumulation in Normal Liver and Hepatoma-Cell Lines of Rat. *Cell Biol. Toxicol.*, 9, 95-105.
- ⁵⁹ Dailey, H. A. and Smith, A. (1984). Differential Interaction of Porphyrins Used in Photoradiation Therapy with Ferrochelatase. *Biochem. J.*, 223, 441-445.
- ⁶⁰ Vanhillegersberg, R., Vandenberg, J. W. O., Kort, W. J., Terpstra, O. T. and Wilson, J. H. P. (1992). Selective Accumulation of Endogenously Produced Porphyrins in a Liver Metastasis Model in Rats. *Gastroenterology*, 103, 647-651.
- ⁶¹ Gomi, S., Nishizuka, T., Ushiroda, O., Uchida, N., Takahashi, H. and Sumi, S. (1998). The structures of mono-L-aspartyl chlorin e6 and its related compounds. *Heterocycles*, 48, 2231-2243.
- ⁶² Castano, A. P., Demidova, T. N., Hamblin, M. R. (2004) : *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*; 1, 279-293
- ⁶³ Brown, Stanley B., Elizabeth A., Walker, I. (2004). *The Lancet (oncology)*, 5, 497.
- ⁶⁴ Wickens, J. and Blinder, K. J. (2006). A preliminary benefit-risk assessment of verteporfin in age-related macular degeneration. *Drug Saf.*, 29, 189-199.
- ⁶⁵ Costa, R. A., Jorge, R., Calucci, D., Melo, L. A. S., Cardillo, J. A. and Scott, I. U. (2007). Intravitreal bevacizumab (Avastin) in combination with verteporfin photodynamic

-
- therapy for choroidal neovascularization associated with age-related macular degeneration (IBeVe Study). *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 245, 1273-1280.
- ⁶⁶ Donati, G. (2007). Emerging therapies for Neovascular age-related macular degeneration: State of the art. *Ophthalmologica*, 221, 366-377.
- ⁶⁷ Lui, H., Hobbs, L., Tope, W. D., Lee, P. K., Elmets, C., Provost, N., Chan, A., Neyndorff, H., Su, X. Y., Jain, H. *et al* (2004). Photodynamic therapy of multiple nonmelanoma skin cancers with verteporfin and red light-emitting diodes - Two-year results evaluating tumor response and cosmetic outcomes. *Arch. Dermatol.*, 140, 26-32.
- ⁶⁸ Boch, R., Canaan, A. J., Cho, A., Dolphin, D. D., Hong, L., Jain, A. K., North, J. R., Richter, A. M., Smits, C. and Sternberg, E. D. (2006). Cellular and antitumor activity of a new diethylene glycol benzoporphyrin derivative (lemuteporfin). *Photochem. Photobiol.*, 82, 219-224
- ⁶⁹ Boch, R. E., Sternberg, E., Dolphin, D., Levy, J. G., Richter, A. M., Hunt, D. W. C., Jain, A., Waterfield, E. M. and Tovey, A. N. (2002). Use of ethylene glycol esters of monohydrobenzoporphyrin derivatives as photoactive agents. European Patent EP1177795. Available also from: www.freepatentsonline.com.
- ⁷⁰ Jiang, H. J., Granville, D. J., North, J. R., Richter, A. M. and Hunt, D. W. C. (2002). Selective action of the photosensitizer QLT0074 on activated human T lymphocytes. *Photochem. Photobiol.*, 76, 224-231.
- ⁷¹ Xiao, Z. W., Dickey, D., Owen, R. J., Tulip, J. and Moore, R. (2007). Interstitial photodynamic therapy of the canine prostate using intra-arterial administration of photosensitizer and computerized pulsed light delivery. *J. Urol.*, 178, 308-313.
- ⁷² Biel, M. A. (2007). Photodynamic therapy treatment of early oral and laryngeal cancers. *Photochem. Photobiol.*, 83, 1063-1068.
- ⁷³ Zimmermann, A., Ritsch-Marte, M. and Kostron, H. (2001). mTHPC-mediated photodynamic diagnosis of malignant brain tumors. *Photochem. Photobiol.*, 74, 611-616.
- ⁷⁴ Moore, C. M., Nathan, T. R., Lees, W. R., Mosse, C. A., Freeman, A., Emberton, M. and Bown, S. G. (2006). Photodynamic therapy using meso tetra hydroxy phenyl chlorin (mTHPC) in early prostate cancer. *Lasers Surg. Med.*, 38, 356-363.
- ⁷⁵ Nathan, T. R., Whitelaw, D. E., Chang, S. C., Lees, W. R., Ripley, P. M., Payne, H., Jones, L., Parkinson, M. C., Emberton, M., Gillams, A. R. *et al* (2002). Photodynamic therapy for prostate cancer recurrence after radiotherapy: a phase I study. *J. Urol.*, 168, 1427-1432.
- ⁷⁶ Light Science Corporation [online][cit. 2006-01-19]. Dostupné z: www.lightsciences.com

-
- ⁷⁷ Mang, T. S., Allison, R., Hewson, G., Snider, W. and Moskowitz, R. (1998). A phase II/III clinical study of tin ethyl etiopurpurin (Purlytin)-induced photodynamic therapy for the treatment of recurrent cutaneous metastatic breast cancer. *Cancer J.*, 4, 378-384.
- ⁷⁸ Kaplan, M. J., Somers, R. G., Greenberg, R. H. and Ackler, J. (1998). Photodynamic therapy in the management of metastatic cutaneous adenocarcinomas: Case reports from phase 1/2 studies using tin ethyl etiopurpurin (SnET2). *J. Surg. Oncol.*, 67, 121-125.
- ⁷⁹ Selman, S. H., Albrecht, D., Keck, R. W., Brennan, P. and Kondo, S. (2001). Studies of tin ethyl etiopurpurin photodynamic therapy of the canine prostate. *J. Urol.*, 165, 1795-1801.
- ⁸⁰ Framme, C., Sachs, H. G., Flucke, B., Theisen-Kunde, D. and Birngruber, R. (2006). Evaluation of the new photosensitizer tookad (WST09) for photodynamic vessel occlusion of the choroidal tissue in rabbits. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 47, 5437-5446.
- ⁸¹ Armstrong, N. R. (2000). Phthalocyanines and porphyrins as materials. *J. Porphyr. Phthalocyanines*, 4, 414-417.
- ⁸² Shopova, M., Woehrl, D., Mantareva, V. and Mueller, S. (1999). Naphthalocyanine complexes as potential photosensitizers for photodynamic therapy of tumors. *J. Biomed. Opt.*, 4, 276-285.
- ⁸³ Biolo, R., Jori, G., Soncin, M., Pratesi, R., Vanni, U., Rihter, B., Kenney, M. E. and Rodgers, M. A. J. (1994). Photodynamic Therapy of B16 Pigmented Melanoma with Liposome-Delivered Si(IV)-Naphthalocyanine. *Photochem. Photobiol.*, 59, 362-365.
- ⁸⁴ Shopova, M., Woehrl, D., Stoichkova, N., Milev, A., Mantareva, V., Muller, S., Kassabov, K. and Georgiev, K. (1994). Hydrophobic Zn(II)-Naphthalocyanines as Photodynamic Therapy Agents for Lewis Lung-Carcinoma. *J. Photochem. Photobiol. BBiol.*, 23, 35-42.
- ⁸⁵ Muller, S., Mantareva, V., Stoichkova, N., Kliesch, H., Sobbi, A., Woehrl, D. and Shopova, M. (1996). Tetraamido-substituted 2,3-naphthalocyanine zinc(II) complexes as phototherapeutic agents: Synthesis, comparative photochemical and photobiological studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 35, 167-174.
- ⁸⁶ Zuk, M. M., Rihter, B. D., Kenney, M. E., Rodgers, M. A. J. and Kreimer-Birnbaum, M. (1996). Effect of delivery system on the pharmacokinetics and tissue distribution of bis(Di-isobutyl octadecylsiloxy)silicon 2,3-naphthalocyanine (isoBOSINC), a photosensitizer for tumor therapy. *Photochem. Photobiol.*, 63, 132-140.
- ⁸⁷ Mantareva, V., Shopova, M., Spassova, G., Woehrl, D., Muller, S., Jori, G. and Ricchelli, F. (1997). Si(IV)-methoxyethylene-glycol-naphthalocyanine: synthesis and

-
- pharmacokinetic and photosensitizing properties in different tumour models. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, 40, 258-262.
- ⁸⁸ Brasseur, N., Nguyen, T. L., Langlois, R., Ouellet, R., Marengo, S., Houde, D. and Vanlier, J. E. (1994). Synthesis and Photodynamic Activities of Silicon 2,3-Naphthalocyanine Derivatives. *J. Med. Chem.*, 37, 415-420.
- ⁸⁹ Ali, H. and van Lier, J. E. (1999). Metal complexes as photo- and radiosensitizers. *Chem. Rev.*, 99, 2379-2450.
- ⁹⁰ Photosense [online]. 2008 [cited 2008-04-10]. Available from: <http://www.niopik.ru/products/medicine/photosense/>.
- ⁹¹ Miller, J. D., Nancy, O., Scull, H. M., Hsia, A., Cooper, K. D. and Baron, E. D. (2006). 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.*, 126, 46-46.
- ⁹² ClinicalTrials.gov [online]. 2008 [cited 2008-02-07]. Available from: www.clinicaltrials.gov.
- ⁹³ Wainwright, M. and Giddens, R. M. (2003). Phenothiazinium photosensitisers: choices in synthesis and application. *Dyes Pigment.*, 57, 245-257.
- ⁹⁴ Wainwright, M., Phoenix, D. A., Rice, L., Burrow, S. M. and Waring, J. (1997). Increased cytotoxicity and phototoxicity in the methylene blue series via chromophore methylation. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, 40, 233-239.
- ⁹⁵ Wainwright, M. (2005). The development of phenothiazinium photosensitisers. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2, 263-272.
- ⁹⁶ Donnelly, R. F., McCarron, P. A. and Tunney, M. M. (2008). Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol. Res.*, 163, 1-12.
- ⁹⁷ Tardivo, J. P., Del Giglio, A., de Oliveira, C. S., Gabrielli, D. S., Junqueira, H. C., Tada, D. B., Severino, D., de Fatima Turchiello, R. and Baptista, M. S. (2005). Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2, 175-191.
- ⁹⁸ Mohr, H., Lambrecht, B. and Selz, A. (1995). Photodynamic Virus Inactivation of Blood Components. *Immunol. Invest.*, 24, 73-85.
- ⁹⁹ Wainwright, M., Mohr, H. and Walker, W. H. (2007). Phenothiazinium derivatives for pathogen inactivation in blood products. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, 86, 45-58.
- ¹⁰⁰ Wainwright, M. and Giddens, R. M. (2003). Phenothiazinium photosensitisers: choices in synthesis and application. *Dyes Pigment.*, 57, 245-257.

-
- ¹⁰¹ Usacheva, M. N., Teichert, M. C. and Biel, M. A. (2001). Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg. Med.*, 29, 165-173.
- ¹⁰² Pottier, R., Bonneau, R. and Joussotdubien, J. (1975). Ph-Dependence of Singlet Oxygen Production in Aqueous-Solutions Using Toluidine Blue as a Photosensitizer. *Photochem. Photobiol.*, 22, 59-61.
- ¹⁰³ Donnelly, R. F., McCarron, P. A., Cassidy, C. M., Elborn, J. S. and Tunney, M. M. (2007). Delivery of photosensitizers and light through mucus: Investigations into the potential use of photodynamic therapy for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis pulmonary infection. *J. Control. Release*, 117, 217-226
- ¹⁰⁴ Qin, Y. L., Luan, X. L., Bi, L. J., He, G. P., Bai, X. F., Zhou, C. N. and Zhang, Z. G. (2008). Toluidine blue-mediated photoinactivation of periodontal pathogens from supragingival plaques. *Lasers Med. Sci.*, 23, 49-54.
- ¹⁰⁵ Wilson, M., Burns, T., Pratten, J. and Pearson, G. J. (1995). Bacteria in Supragingival Plaque Samples Can Be Killed by Low-Power Laser-Light in the Presence of a Photosensitizer. *J. Appl. Bacteriol.*, 78, 569-574.
- ¹⁰⁶ Williams, J., Wilson, M., Conway-Wallace, H., Pearson, G. and Colles, J. (2003). Action of toloum chloride against *S. mutans* in a collagen matrix. *J. Dent. Res.*, 82, 498-498.
- ¹⁰⁷ Williams, J. A., Pearson, G. J., Colles, M. J. and Wilson, M. (2003). The effect of variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of toluidine blue O on *Streptococcus mutans*. *Caries Res.*, 37, 190-193.
- ¹⁰⁸ Bonsor, S. J., Nichol, R., Reid, T. M. S. and Pearson, G. J. (2006). Microbiological evaluation of photo-activated disinfection in endodontics (An in vivo study). *Br. Dent. J.*, 200, 337-341
- ¹⁰⁹ Bonsor, S. J., Nichol, R., Reid, T. M. S. and Pearson, G. J. (2006). An alternative regimen for root canal disinfection. *Br. Dent. J.*, 201, 101-105.
- ¹¹⁰ Udomsakdi, C., Eaves, C. J., Sutherland, H. J. and Lansdorp, P. M. (1991). Separation of Functionally Distinct Subpopulations of Primitive Human Hematopoietic-Cells Using Rhodamine-123. *Exp. Hematol.*, 19, 338-342.
- ¹¹¹ Szeimies, R.-M., Karrer, S., Abels, Ch. et al. (1996) *J. Photochem. Photobiol.*; 34, 67
- ¹¹² Lenard, J., Rabson, A., Vanderoef, R. (1993). *Proc. Ntl. Acad. Sci. U. S. A.*; 90, 158
- ¹¹³ Agostinis, P., Vantiegghem, A., Merlevede, W. et al. (2002). *Int. J. Biochem. Cell Biology*; 34, 221
- ¹¹⁴ Olivo, M., Lau, W., Manivasager, V. et al. (2003). *Int. J. Oncol.*; 23, 1501

-
- ¹¹⁵ Sternberg, E. D., Dolphin, D., Brückner, Ch.(1998). *Tetrahedron*; 54, 4151
- ¹¹⁶ Hoar TP, Schulman JH.Transparent waterin-oil dispersions: The oleophatic hydro-micelle (1943). *Nature* 152:102–103.
- ¹¹⁷ Lawrence MJ, Rees GD.Microemulsion based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 45:89–121; 2000
- ¹¹⁸ Gasco MR. Microemulsions in the pharmaceutical field: Perspectives and applications. In: Solans C, Kunieda H, editors. *Industrial application of microemulsions*. New York: Marcel Dekker; 1997, pp 97–122.
- ¹¹⁹ Thiele L, Rothen-Rutishauser B, Wunderli-Allenspach H, Merkle HP, Walter E. Particle-uptake by monocyte-derived dendritic cells in vitro: Evaluation of particle size and surface characteristics.*Proc Int Symp Control Rel Bioact Mater* 24:163–164;1999
- ¹²⁰ Th.F. Tadros, in: P. Becher (Ed.), *Encyclopedia of Emulsion Technology*, vol. 1, Marcel Deckker, New York, 1983, pp. 129–285.
- ¹²¹ K. Shinoda, S. Friberg, *Adv. Colloid Interface Sci.* 4, 1975, 281.
- ¹²² C. Solans, M.J. Garc´ia-Celma, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2,1997, 464–471.
- ¹²³ Tayrouz, Y., Ding, R., Burhenne, J. (2003): *Clinical Pharmacology and Therapeutics*; 73, 397
- ¹²⁴ BASF Pharmaceuticals [online][cit.2006-01-19]. Dostupné z: www.basf.com/businesses/consumer/cosmeticingredients/database/detail.cgi?ID=110