

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



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Solubilizační systémy pro potenciální fotodynamicky aktivní
látky^oI.**

Hradec Králové, 2006

Helena Kučerová

Mé poděkování patří panu Miroslavu Miletínovi a Petru Zimčíkovi za trpělivé vedení mojí diplomové práce, za jejich veškerou ochotu, pomoc a poskytnutí všech potřebných materiálů během praktické části, a také paní Věnceslavě Hronové za příjemné pracovní prostředí v laboratoři.

OBSAH

1	TEORETICKÁ ČÁST.....	5
1.1	ÚVOD.....	5
1.2	HISTORIE PDT A VYUŽITÍ SVĚTLA V TERAPII.....	7
1.3	FOTODYNAMICKÁ TERAPIE.....	9
1.4	ZDROJE A PŘÍVOD SVĚTLA.....	19
1.5	PROFIL IDEÁLNÍHO PDT-LÉČIVA.....	21
1.6	GENERACE FOTOSENZITIVNÍCH LÁTEK.....	23
1.6.1	<i>První generace</i>	24
1.6.2	<i>Druhá generace</i>	25
1.6.3	<i>Třetí generace</i>	36
1.7	ZPROSTŘEDKOVANÉ ROZPOUŠTĚNÍ (SOLUBILIZACE).....	38
1.8	TRANSPORTNÍ SYSTÉMY PRO FOTOSENZITIZÉRY V PDT.....	41
1.8.1	<i>Pasivní targeting</i>	42
1.8.1.1	Lipozómy.....	42
1.8.1.2	Olejoyvé disperze a micelární systémy.....	44
1.8.1.3	Polymerní částice.....	46
1.8.1.4	Polymer-PS konjugáty.....	47
1.8.2	<i>Dlouho cirkulující transportní systémy</i>	48
1.8.3	<i>Aktivní targeting</i>	50
1.8.3.1	Lipoproteiny zprostředkovaný transport PS.....	50
1.8.3.2	Protilátkami zprostředkovaný transport.....	53
1.9	CÍL PRÁCE.....	57
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	58
2.1	FOTOSENZITIZÉRY.....	58
2.2	EMULGÁTORY A SOLUBILIZÁTORY.....	64
2.3	PŘÍSTROJE A METODIKY.....	69
2.4	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ BARVIV – TESTOVÁNÍ JEJICH ROZPUSTNOSTI.....	70
2.5	TESTOVÁNÍ CYTOTOXICITY CREMOPHORU® RH-40.....	74
2.6	SOLUBILIZACE BARVIV POMOCÍ SOLUBILIZÁTORU.....	76

2.6.1	<i>Solubilizace ZIP-T-44Mg pomocí Cremophoru® RH-40.....</i>	76
2.6.2	<i>Solubilizace ZIP-T-37Mg pomocí Cremophoru® RH-40.....</i>	77
2.6.3	<i>Solubilizace ZIP-T-37Mg pomocí různých koncentrací Cremophoru® RH-40.....</i>	78
2.6.4	<i>Solubilizace ZIP-T-37Mg pomocí decylglukosidu.....</i>	79
2.7	TESTOVÁNÍ SOLUBILIZACE LIPOFILNÍCH ESTERŮ	80
2.7.1	<i>Solubilizace lipofilních esterů pomocí různých koncentrací Cremophoru® RH-40.....</i>	80
2.7.2	<i>Solubilizace MCT ve vodě pomocí Makrogolu 400</i>	81
2.8	SOLUBILIZACE ROZTOKŮ BARVIV V LIPOFILNÍCH ESTERECH	82
2.8.1	<i>Solubilizace roztoků ZIP-T-37Mg a ZIP-21Zn v lipofilních esterech pomocí Cremophoru® RH-40.....</i>	82
2.8.2	<i>Solubilizace roztoku ZIP-65Zn·8HCl v MCT pomocí Cremophoru® RH-40.....</i>	84
2.8.3	<i>Solubilizace roztoku Pc123 v MCT pomocí cetearylglukosidu</i>	85
2.8.4	<i>Solubilizace roztoku Pc124 v MCT pomocí Cremophoru® RH-40.....</i>	86
2.8.5	<i>Solubilizace roztoku Pc124 v MCT pomocí Sepigelu 305</i>	88
3	DISKUSE A ZÁVĚR.....	90
4	LITERATURA.....	91

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 ÚVOD

Fotodynamická terapie (photodynamic therapy – PDT) je slibně se rozvíjející, relativně nová perspektivní terapeutická metoda určená k cytostatické léčbě mnoha druhů solidních tumorů. Kromě toho je možné ji využít i při léčbě dalších nekancerózních onemocnění.¹

PDT je založena na spolupůsobení tří složek, jež samy o sobě nejsou toxické a neprojevují žádné biologické efekty. Jedná se o kombinaci fotodynamicky aktivní sloučeniny (fotosenzitizér), světla a molekulárního kyslíku. Z toho se pak vytváří reaktivní formy kyslíku (zejména singletový kyslík), jež napadají okolní biomolekuly, porušují jejich biologickou funkci a v konečném důsledku vedou ke smrti buňky. Na konečném zničení nádoru se ovšem nepodílí pouze přímý efekt na zničení buněk, nýbrž i indukovaný cévní uzávěr v ozářené oblasti vedoucí k depleci živin a kyslíku, a také aktivace imunitní odpovědi.²

Účinnost PDT závisí na kumulaci fotosenzitizéru v cílové nemocné tkáni následované ozářením světlem vhodné vlnové délky. Tato vlnová délka musí korespondovat s absorpčním spektrem fotosenzitizéru. K úplnému porozumění mechanismu PDT – zprostředkovanému zničení nádorových buněk, které by vyústilo ve vyšší účinnost tohoto způsobu léčby, je však ještě daleko.¹

Předpokládá se, že PDT vytvořením reaktivního kyslíku rezultuje v oxidativní poškození buněčných organel. Tento typ poškození podporuje kombinaci biochemických, genetických a molekulárních změn, které mají na normální buňku destruktivní účinek. Nekróza a apoptóza jsou také významnou součástí PDT-vyvolaného procesu usmrcení buňky.¹ Fotosenzitizér se během celého fotodynamického procesu ve tkáni zpětně regeneruje, a proto jedna molekula fotosenzitizéru může způsobit vznik většího množství reaktivního singletového kyslíku.³ Účinek PDT na nádorovou tkáň se díky této regeneraci PS znásobuje.

Hlavním cílem každé protinádorové terapie je selektivita zaměřená na zničení nebo poškození nemocných buněk, zatímco zdravá tkáň zůstává nedotčena. Tradiční protinádorová terapie zahrnující chirurgickou léčbu, ozařování a chemoterapii se již od počátku snaží docílit jemné rovnováhy mezi destrukcí tumorózních buněk a zachováním buněk zdravých.

Ve většině případů se nedaří dosáhnout této rovnováhy a léčba je provázena řadou vedlejších účinků (zejména co se týče chemoterapie a ozařování) nebo není schopná odstranit ložisko úplně (chirurgie).²

PDT má tedy několik možných výhod oproti chirurgii a radioterapii: je ve srovnání s těmito dvěma metodami zcela neinvazivní metodou, její účinek může být přesně zacílen na postiženou tkáň, opakované dávky mohou být podávány bez omezení celkovou limitní dávkou, běžnou při radioterapii, a léčebný proces zanechává pouze malé či žádné jizvy.³

Určitou nevýhodou PDT je však skutečnost, že tuto metodu nelze použít pro léčbu pokročilých a generalizovaných onemocnění, protože ozáření celého těla dostatečnými dávkami světla není v současnosti možné. Nicméně i přesto může PDT u těchto pokročilých onemocnění zlepšit kvalitu života a prodloužit přežití u pacientů. Pro časně či lokalizované nemoci však PDT může znamenat selektivní a velmi účinnou terapii s mnoha potenciálními výhodami oproti ostatním terapeutickým alternativám. Samostatná léčba pomocí PDT může zcela eradikovat dané onemocnění s poměrně výborným kosmetickým výsledkem.³

PDT je v současnosti novou perspektivní metodou zavedenou již do klinické praxe, jež kombinuje vysokou účinnost na nádorové buňky se selektivním zásahem na postižené místo a s minimálním výskytem vedlejších nežádoucích účinků.² Zvýšené selektivity v zásahu na cílové buňky je dosaženo jednak zlepšenou kumulací fotosenzitizéru v nádorové tkáni, jednak ozářením pouze určených oblastí. Jednotlivé složky PDT jsou totiž bez přítomnosti ostatních netoxické.⁴

1.2 HISTORIE PDT A VYUŽITÍ SVĚTLA V TERAPII

Počátky využití světla jako terapeutického agens lze vysledovat několik tisíc let zpět. Již staří Egypťané, Indové nebo Číňané používali světlo k léčbě některých kožních onemocnění (např. psoriasis, vitiliga nebo dokonce i rakoviny), infekcí rickettsiemi nebo některých psychóz. Také známý řecký lékař Hérodotos, zvaný též „otec helioterapie“, zdůrazňoval vliv světla na obnovu zdraví.

Avšak rozšíření se této léčbě dostalo až na konci 19. a počátkem 20. století. Fototerapii (čili použití pouze světla k léčbě různých onemocnění) rozvinul na přelomu 19. a 20. století dánský lékař Niels Finsen, který popsal, že ozáření červeným světlem zabraňuje praskání neštovicových pustul. Pokračoval v práci dál a za použití ultrafialového světla léčil kožní formu tuberkulózy, za což obdržel v roce 1903 Nobelovu cenu.²

Další formou léčby využívající světlo je fotochemoterapie. Jedná se o kombinaci podání fotosenzitizující látky („fotosenzitizér“, photosensitizer (PS)) následované ozářením tkáně, ve které je PS přítomen. Již Staří Egypťané používali perorálně podávané rostliny obsahující psoraleny a sluneční světlo k léčbě vitiliga. Ale až od sedmdesátých let 20. století doznala léčba lupénky pomocí psoralenů aktivovaných UVA světlem (PUVA terapie) rozvoje. V současnosti se používá PUVA také pro léčbu vitiliga a v imunoterapii.

Vlastní fotodynamickou terapii lze považovat za podskupinu fotochemoterapie. Kromě světla a PS je další důležitou složkou účinku ještě kyslík, bez něhož by účinnost PDT byla takřka nulová. PDT pracuje na principu předání energie absorbované PS molekulárnímu kyslíku, z něhož vytváří reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species – ROS) jako např. volné radikály a singletový kyslík. ROS následně napadají okolní biomolekuly, dochází k jejich oxidaci a porušení funkce v buňce, což vede ke smrti buňky takto zasažené.²

Možnost indukce buněčné smrti interakcí světla a chemikálií je známa více než 100 let. První pozorování provedl Oscar Raab, student medicíny, již v roce 1900. Dalšími byli Von Tappeiner a dermatolog Jesionek, kteří v roce 1903 aplikovali topicky eosin a bílé světlo při léčbě kožního nádoru. Von Tappeiner zjistil, že pro účinný efekt je zapotřebí také kyslík a následně v roce 1907 poprvé použil výraz „fotodynamický efekt“.

Do současné doby jsou nejstudovanějšími PS porfyriny, které byly identifikovány už v polovině 19. století. První pozorování provedl v roce 1911 Hausmann, který zjistil, že kombinace hematoporfyrinu a světla zabíjí prvoky rodu *Paramecium* a červené krvinky.

V roce 1955 byl připraven z hematoporphyrinu jeho derivát (hematoporphyrin derivate – HpD), jež se vyznačoval daleko vyšší účinností. Tato látka se později stala základem pro v současné době nejrozšířenější fotosenzitizér - Photofrin[®], používaného k terapii nádoru močového měchýře.²

První experiment v moderní éře využití fotosensitizace pro léčení rakoviny se objevil v roce 1972.⁵ Richard Lipson, který se zabýval hematoporphyrinovými deriváty (HpD) využitelnými pro detekci tumorů, byl první, kdo skutečně vyléčil pacienta (metastatický nádor prsní strany hrudníku).⁶ V roce 1975, Dougherty a kol. demonstrovali, že HpD a světlo z červené oblasti světelného spektra mohou selektivně ničit nádorové buňky bez poškození zdravé tkáně.⁷ Dougherty také provedl první rozsáhlejší studii s 25 pacienty s celkem 113 primárními i sekundárními nádory kůže. Z těchto 113 ložisek se 98 zhojilo úplně, u 13 byla pozorována pouze částečná odpověď a 2 ložiska se ukázala být k léčbě rezistentní.²

Od té doby se rozběhly další studie na užití PDT nejen k léčbě nádorů kůže a močového měchýře, ale i dalších, např. rakovina plic, jícnu, konečníku.²

Problémy s čistotou derivátů hematoporphyrinu (HpD) připravenými Schwartzem v 50. letech 20. století⁸, jejich absorpční vlnovou délkou a opožděnou fototoxicitou, vedly v 80. letech 20. století ke hledání nových sloučenin s lepšími vlastnostmi jak z hlediska farmakokinetiky, tak z hlediska fotodynamických vlastností.⁹ Tak se dospělo k PS tzv. „druhé generace“. Také některé z nich už byly zavedeny do praxe (kyselina aminolevulinová, verteporfin, temoporfin) a to nejen k léčbě rakoviny, ale i např. v oftalmologii (zatím jedinou oftalmologickou aplikací je léčba senilní makulární degenerace).² V dnešní době rozlišujeme tři generace fotodynamicky aktivních látek, o nichž bude pojednáno dále.

V současné době je naprostá většina PS momentálně používaných nebo testovaných v PDT založena na tetrapyrolech⁴ (porfyriny, chloriny, bakteriochloriny a ftalocyaniny) a zdá se, že porfyriny obecně budou i nadále v této oblasti dominovat.

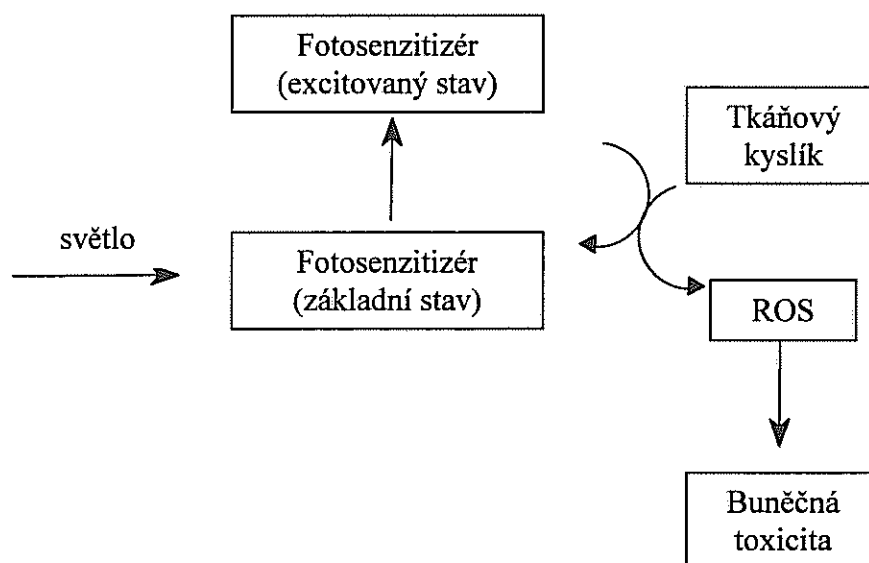
Vzhledem k tomu, že doposud nejrozšířenější a nejpoužívanější PS založený na porfyrinovém cyklu – Photofrin[®] - má značný počet vedlejších účinků a pro PDT nežádoucích vlastností, byl výzkum zaměřen na nové typy PS. Byly formulovány určité vlastnosti ideálního PS (viz. dále), a i když je zřejmé, že žádná z látek se nemůže za ideální považovat, lze u novějších látek hovořit o určitém přiblížení se onomu ideálnímu PS.⁴

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 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE

Mechanismus 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.¹⁰



Obr. 1. Zjednodušený princip PDT

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

Po absorpci světelného kvanta se PS transformuje ze základního singletového stavu (PS^0) do velice krátce trvajícího (v jednotkách nanosekund) excitovaného singletového stavu (PS^*), který vede k produkci cytotoxického agens a nekróze tumoru. Tento mechanismus může být popsán následujícím schématem:³

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

Fotosenzitizér + světlo	→ Aktivovaný fotosenzitizér
Aktivovaný fotosenzitizér + kyslík	→ Fotosezitivizér + aktivovaný (singletový) kyslík
Aktivovaný kyslík + cílová tkáň	→ Oxidovaná (zničená) tkáň

Obr. 2: Mechanismus využití energie světla v PDT k biologickému poškození a následné buněčné smrti nádorových buněk

Zatímco první a poslední krok jsou známy poměrně dobře a je jasné, že excitace fotosenzitizéru povede k buněčné smrti, mezikroky nejsou tak zřetelné a je to směs dohadů a nepřímých důkazů. Obecně však mechanismus PDT zahrnuje dvě části – fotofyzikální a fotochemické vlastnosti fotosenzitizéru a jeho schopnost produkovat cytotoxické agens je první, druhou pak biologická odpověď buňky vystavené působení cytotoxického agens.¹⁰

Fotosenzitizér (PS) se obvykle podává intravenózně a rychle se distribuuje do tělesných tkání. Zjistilo se, že zhruba za 48-72 hod. po podání je možno zaznamenat znatelný vzestup koncentrace fotosenzitizéru v tumorózní tkáni v porovnání s okolní zdravou tkání.¹¹ I přesto, že se jedná o intravenózní (systémové) podání fotosenzitizéru, je přesné lokalizace účinku fotodynamické terapie dosaženo díky precizní aplikaci světla na postiženou tkáň – většinou je totiž zdrojem světla laser a tudíž lokální účinek převažuje nad systémovým.³

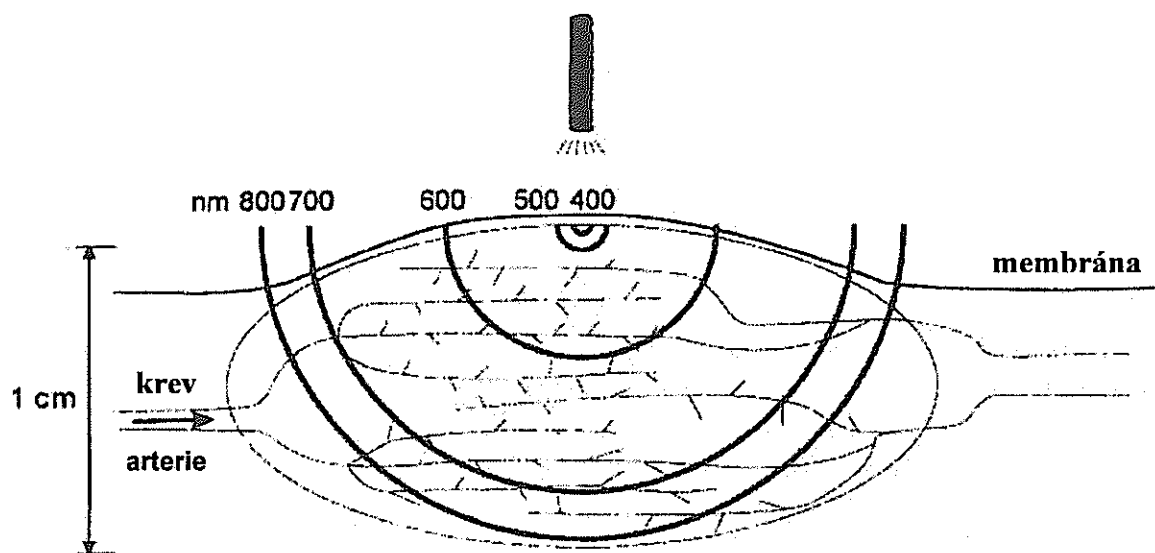
Některé PS jsou schopné dosáhnout vyšších koncentrací v nádorové tkáni než v okolních zdravých tkáních. Přestože není přesný mechanismus, který tento fakt zapříčiňuje, v současné době plně znám, je selektivita takového vychytávání („uptake“) fotosenzitizéru pravděpodobně dána abnormální fyziologií tumorózní tkáně - např. nižší intratumorální pH, snížené lymfatické odvodnění, zvýšená fagocytóza, zvýšená propustnost cévní stěny v tumorózní tkáni, zvýšené množství receptorů pro buněčné proteiny (např. lipoproteiny) na buněčné membráně, které jsou schopny navázat fotosenzitizér.^{3,12,13}

Targeting a selektivita PDT je umožněna pomocí řady faktorů, z nichž tím nejdůležitějším je v podstatě aplikace světla vhodné vlnové délky přímo na postiženou tkáň. S použitím moderních optických vláken a různých typů endoskopů může být adekvátní dávka světla přesně aplikována v jednotlivých částech organismu. Reaktivní formy kyslíku vzniklé působením PS v nádorové tkáni mají velmi krátký poločas existence, a tudíž se deaktivují dříve, než by se stačily uvolnit z buněk, ve kterých byly vyprodukovány, a ovlivnit tak okolní buňky zdravé tkáně.³

K ozáření nádorové tkáně však nedochází ihned po aplikaci vlastního PS, nýbrž až po určitém časovém úseku, který se označuje termínem „drug-to-light“ interval. Jedná se o dobu potřebnou pro distribuci PS v organismu a jeho selektivní kumulaci v postižené tkáni. Po cíleném ozáření nádorové tkáně je částečně zasažena i okolní zdravá tkáň, která se však během 6-8 týdnů zpětně regeneruje, zatímco nádorová tkáň je po zásahu PDT zničena.³

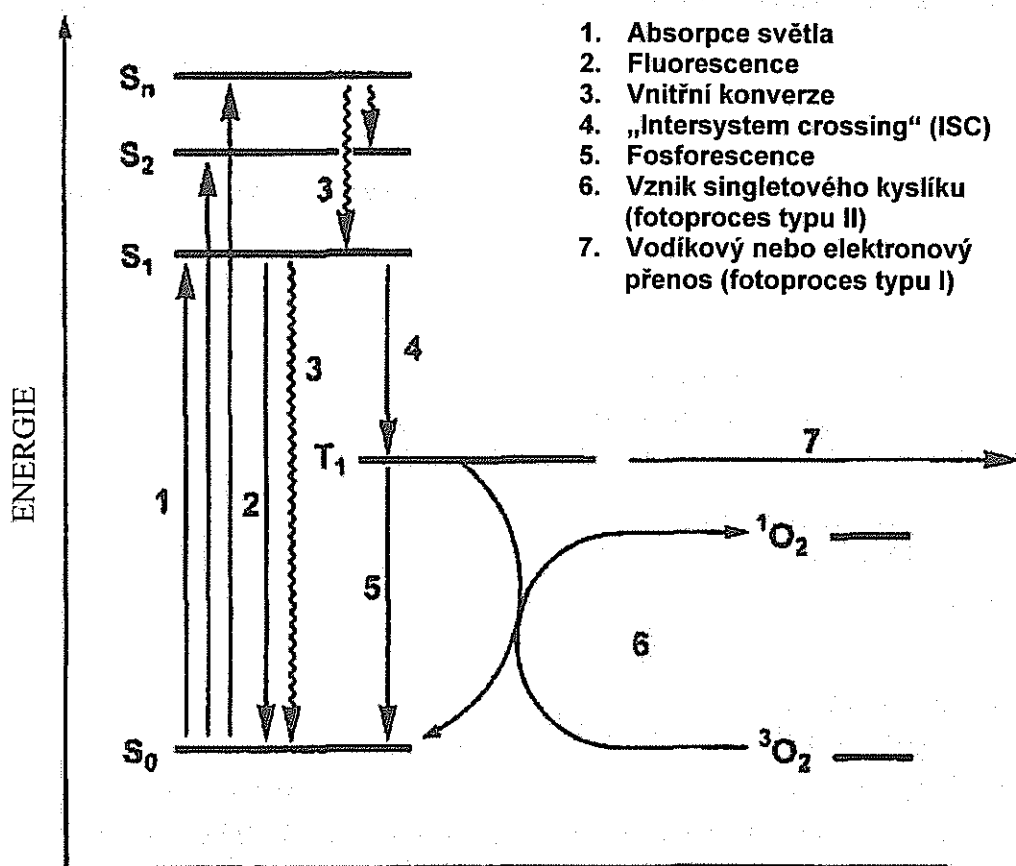
Fotofyzikální základ PDT

Fyzikálním základem PDT je aktivace fotosenzitizéru světlem vhodné vlnové délky.² Světlo delší vlnové délky penetruje hlouběji v ozářené tkáni, proto by ideální fotosenzitizér měl být látkou, která absorbuje světlo vlnových délek blízkých infračervené oblasti spektra (obr. 3).¹⁴ Pokud by totiž PS vykazoval absorpční maximum v oblasti nízkých vlnových délek, nedošlo by k jeho aktivaci kvůli minimální prostupnosti světla s nízkou vlnovou délkou tkáněmi. A navíc by tato skutečnost mohla způsobit vyšší kožní fotosenzitivitu. Naopak u fotosenzitizéru, který by vykazoval absorpční maximum při vysokých vlnových délkách ($\lambda > 800$ nm), by nemělo světlo dostatečnou energii pro aktivaci tohoto fotosenzitizéru ze základního singletového stavu do excitovaného singletového stavu. Proto se optimální rozpětí vlnových délek pohybuje v oblasti 630 – 800 nm.¹⁵



Obr. 3: Závislost prostupnosti světla do tkáně na vlnové délce

PDT je závislá na přítomnosti molekulárního kyslíku. To předpokládá, že singletový kyslík tvořený v průběhu fotosenzitizace z molekulárního tripletového kyslíku je hlavním toxickým agens působícím v průběhu PDT. Modifikovaný Jablonského diagram typického fotosenzitizéru vysvětluje princip fotofyzikálního procesu (obr. 4).¹⁴



Obr. 4: Modifikovaný Jablonského diagram chování typického fotosenzitizéru.

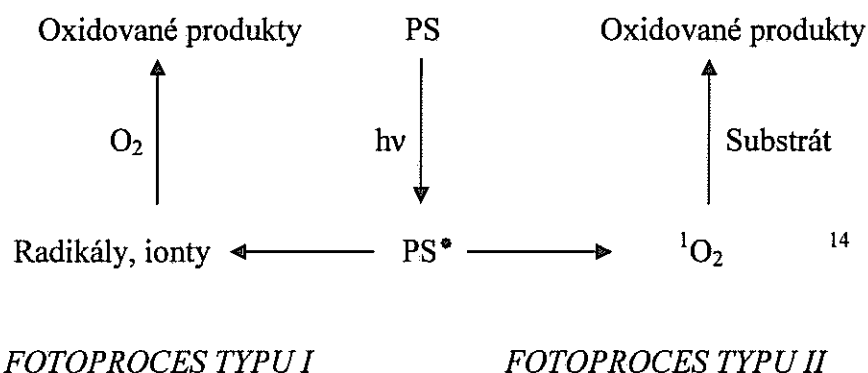
Jak už bylo řečeno, PS se po absorpci světelného kvanta dostává ze základního singletového (v tomto stavu obsahuje PS dva elektrony s opačným spinem v orbitalu s nízkou hodnotou energie) do excitovaného singletového stavu (jeden z těchto elektronů se dostává do orbitalu s vyšší energií, ale stále si zachovává svůj spin). Z této energetické hladiny se PS může uvolnit několika způsoby zahrnujícími jak procesy radiální (fluorescence – vyzáření světla), tak neradiální (vnitřní konverze – vyzáření tepla, a tzv. „intersystem crossing“ – ISC).¹⁵

U vnitřní konverze dochází ke srážkám s molekulami rozpouštědla a k uvolnění energie ve formě tepla. Někteří autoři považují tento proces také za jeden z důležitých při vlastním účinku na buňky.²

Zvláštní význam pro PDT má proces přeměny excitovaného fotosenzitizéru intersystémovou přeměnou (cesta 4 na obr. 3). Procesem „intersystem crossing“ (ISC) se PS dostává do svého tripletového stavu (T_1). Vzhledem k tomu, že při ISC dochází k inverzi spinu jednoho elektronu (čili je to proces „spinem-zakázaný; elektrony získávají totožný

spin), je daleko méně preferovaný než tzv. „povolené“ procesy. Ovšem dobrý PS prochází tímto procesem s vysokou pravděpodobností, což je podstatné pro vlastní fotodynamickou aktivitu. Molekula pak může relaxovat z tripletového stavu T_1 dvěma způsoby: vyzářením fotonu ve formě fosforescence (cesta 5) a bez vyzářování spinovou výměnou s jinou molekulou v tripletovém stavu.²

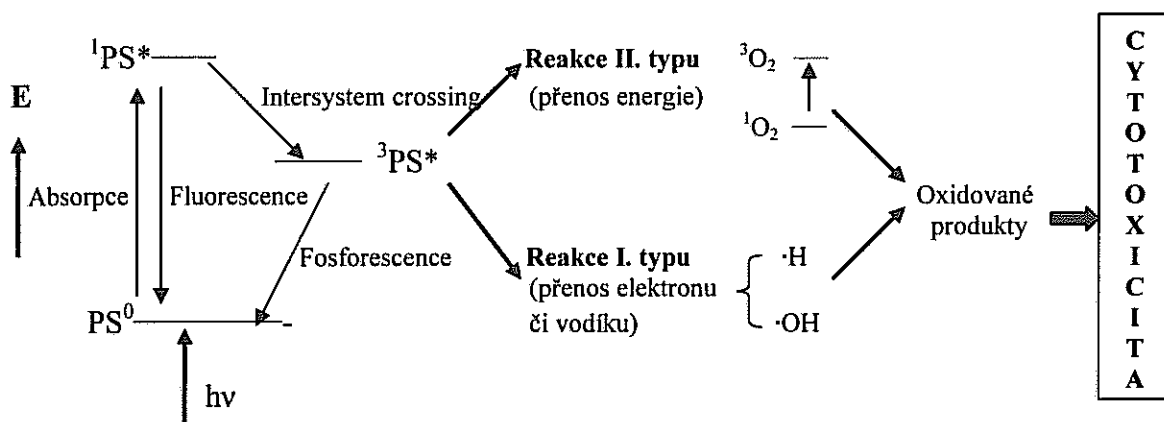
Druhý způsob je již vlastním základem PDT. Zahrnuje dva procesy, které můžeme rozdělit na tzv. fotoprocес typu I a II. Oba fotoprocесy se objevují současně a poměr mezi nimi je silně ovlivněn použitým PS, substrátem a koncentrací kyslíku. Všeobecně se přijímá, že fotoprocес typu II, při němž vzniká singletový kyslík, je zejména odpovědný za vlastní fotodynamický účinek.²



FOTOPROCES TYPU I – je proces odštěpení vodíku nebo transfer elektronu mezi excitovaným stavem fotosenzitizéru a substrátem, rozpouštědlem nebo jiným fotosenzitizérem a vytvoření radikálů a radikálových iontů. Tyto radikály jsou velmi reaktivní a mohou interagovat s molekulárním kyslíkem a vytvořit reaktivní druhy kyslíku, jako je např. superoxidový anion, nebo způsobit neopravitelné poškození. Tyto reakce způsobují oxidativní poškození a mohou eventuálně vést k cytotoxickému efektu pozorovanému v průběhu PDT.¹⁰ K tomuto fotoprocесu dochází hlavně za podmínek snížené koncentrace kyslíku. Při úplné anoxii totiž reaguje excitovaný fotosenzitizér přímo s okolním biologickým substrátem.²

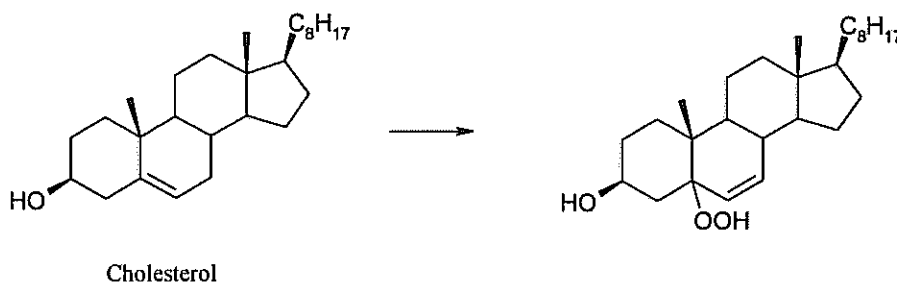
FOTOPROCES TYPU II – je proces přenosu energie z tripletového stavu fotosenzitizéru na základní stav molekulárního kyslíku vedoucí k vytvoření excitovaného stavu kyslíku známého jako singletový kyslík (1O_2).¹⁰ Tento singletový kyslík nemá schopnost penetrovat hlouběji, než je přibližně šířka lipidové buněčné membrány. Tím je

prakticky zaručeno, že přímým účinkem PDT budou usmrceny pouze buňky obsahující PS. Společně s určitou selektivitou kumulace v nádorové tkáni a ozářením pouze specifikovaného místa toto umožňuje velice přesně lokalizovaný zásah. Tento typ fotoprocesu převažuje při vyšších koncentracích kyslíku (obr. 5).²

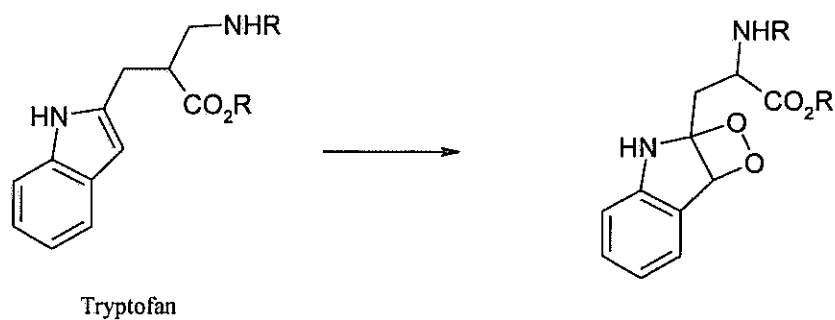


Obr. 5: Podrobný mechanismus PDT cytotoxicity: podání fotosenzitizéru je následováno fotofyzikální reakcí znázorněnou pomocí modifikovaného Jablonského diagramu¹⁶

Singletový kyslík je velmi reaktivní agens s poločasem existence ve vodě okolo 4 mikrosekund, které napadá okolní biomolekuly (zejména molekuly obsažené v membránách, cholesterol, nenasycené mastné kyseliny a aminokyseliny tryptofan, methionin a histidin a DNA) buď oxidací (obr. 6) nebo cykloadicí (obr. 7). Takto modifikované pak přestávají plnit svou biologickou funkci a dochází k poškození buňky, případně až k její smrti.^{2,17}



Obr. 6



Obr. 7

Role kyslíku v PDT

Kyslík hraje nejdůležitější roli v PDT a je také jedním z jejích limitujících faktorů. Tumorózní buňky jsou špatně zásobeny krví, což vede k lokální hypoxii. Navíc je hladina kyslíku ve tkáni v průběhu ozařování ovlivněna PDT-způsobeným vaskulárním poškozením a produkcí reaktivních druhů kyslíku. Tyto efekty velmi limitují potenciál PDT proti solidním tumorům v místech, kde musí být zohledněna hypoxie.^{18, 19}

Biologická odpověď

Na konečném zničení nádoru se nepodílí, jak se zpočátku předpokládalo, pouze destrukce každé jednotlivé buňky, která akumulovala dostatečné množství fotosenzitizéru a byla ozářena dostatečným množstvím světla potřebného k produkci reaktivní formy singletového kyslíku. Celkový PDT efekt je výsledkem spolupůsobení několika mechanismů. V současnosti se předpokládají tři hlavní mechanismy, které umožňují krátkodobou i dlouhodobou kontrolu nádoru a podílí se na jeho konečném zničení. PDT pomocí reaktivního singletového kyslíku ničí buď přímo maligní buňky v nádoru, způsobuje změny v cévním zásobování nádorové tkáně, nebo díky cytokinům a dalším mediátorům zánětu uvolněným z napadených buněk vede k aktivaci imunitního systému. Obecně se dá říct, že hydrofobní PS působí spíše přímým efektem na buňky, kdežto hydrofilní PS spíše poškozují cévy a brání tak přísunu živin. Jednotlivé složky ovšem nelze od sebe navzájem oddělovat a výsledek je vždy kombinací všech faktorů, jejichž vliv se mění v závislosti na použitém PS, typu nádoru a způsobu ozáření.²

Lokalizace PS v buňkách závisí na několika faktorech, přičemž těmi nejdůležitějšími jsou chemická povaha PS (molekulová hmotnost, lipofilita, amfifilita, iontový náboj, vazba na bílkoviny), koncentrace PS v buňce, inkubační čas, sérová koncentrace a fenotyp zasahovaných buněk.¹⁵

Fotosenzitizéry, které jsou méně hydrofobní a mají více než dva negativní náboje, mají tendenci být polární a přestupovat přes plasmatickou membránu a jsou tudíž vychytávány pomocí endocytózy. Některé PS se distribuují velmi rozsáhle v různých intracelulárních membránách. Mezi nejčastější cíle PS v buňkách patří lysozomy, mitochondrie (např. benzoporphyrinové deriváty; tyto PS mají totiž tendenci navozovat apoptózu v buňce pomocí destrukce mitochondrií po ozáření), plasmatická membrána (je méně častým cílem pro PS, přesto se např. deuteroporphyrin IX a jeho monobrom- a dibromderiváty preferenčně kumulují právě v plasmatické membráně), endoplasmatické retikulum a Golgiho aparát.¹⁵

PDT je komplexní metoda, jejíž účinnost závisí na celé řadě faktorů zahrnujících chemické a fotochemické vlastnosti PS, velikost podané dávky PS a typ transportního vehikula, „drug-to-light“ interval, vlnovou délku, celkovou energii a pulzní strukturu světla a stav oxidace/množství kyslíku přítomného v ozařované tkáni.¹⁵

Mechanismy buněčné smrti vyvolané PDT

Koncentrace, fyzikálně–chemické vlastnosti a subcelulární lokalizace PS, koncentrace kyslíku ve tkáni, vlnová délka a intenzita světla a specifické vlastnosti daného typu buněk mohou ovlivňovat způsob a rozsah buněčné smrti.

Typy buněčné smrti

J. F. Kerr byl první, který předložil důkaz, že buňky mohou podstoupit nejméně dva odlišné způsoby buněčné smrti – nekróza a apoptóza.

Nekróza je prudká a rychlá forma degenerace postihující rozsáhlé buněčné populace. Je charakterizovaná zvětšováním cytoplasmy, destrukcí organel a roztržením plasmatické membrány, což v konečném důsledku vede k uvolnění intracelulárního obsahu buněk, na který reaguje okolní tkáň zpravidla vznikem zánětlivé reakce. Nekróza je označována jako náhodná (neprogramovaná) smrt buňky, která je vyvolána fyzikálním nebo chemickým

poškozením některé ze základních buněčných funkcí - toto poškození je nevratné (irreverzibilní) a neslučitelné s dalším životem buňky.^{20,21}

Apoptóza je označovaná jako programovaná smrt buňky, pro níž je typický výskyt pouze v jednotlivých buňkách, přičemž okolní tkáň zůstává nepoškozená. Během apoptózy dochází k nápadným změnám na jádře, buňka zmenšuje svůj objem, vnitrobuněčné membránové systémy zůstávají v podstatě dlouho zachovány, ale odštěpují se od buňky jako tzv. apoptotická tělíska. Nakonec se celá buňka změní v apoptotická tělíska, která jsou fagocytována okolními buňkami. Jedná se tedy o způsob buněčné smrti, který nevyvolává zánětlivou reakci okolní zdravé tkáně a ta tudíž zůstává nepoškozená.^{20,21}

Faktory, které rozhodují o typu buněčné smrti (apoptóza či nekróza) následované po použití PDT, jsou: typ ozařovaných buněk, subcelulární lokalizace PS a velikost použité dávky světla potřebné pro efektivní aktivaci PS. Všeobecně se dá říci, že nižší dávky PDT vedou spíše k apoptóze, zatímco vyšší dávky způsobují ve větší míře nekrózu buňky.²⁰

1.4 ZDROJE A PŘÍVOD SVĚTLA

Zdroje světla

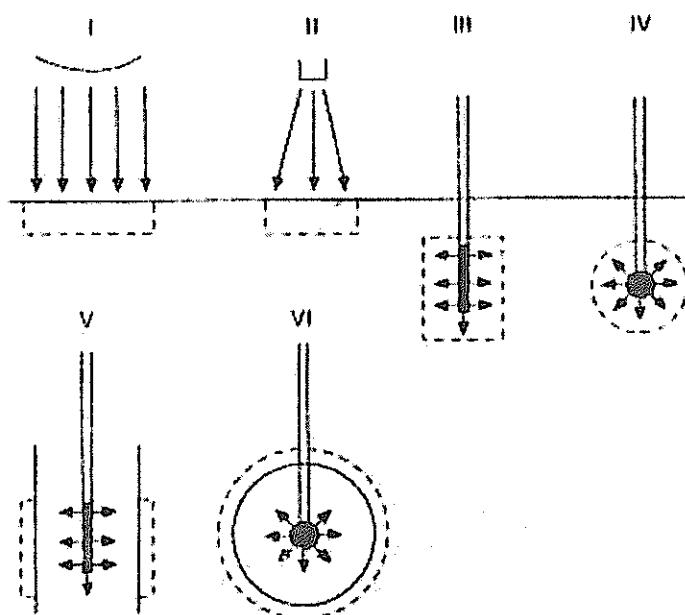
Původně se pro ozařování tkání v rámci PDT užívalo konvenčních lamp, hlavně při léčbě kožních tumorů (obr. 8). Světlo emitované klasickou lampou bylo nutné filtrovat z důvodu zahřívání tkáně způsobené infračervenou oblastí světelného spektra. Dalšími nevýhodami těchto zdrojů světla bylo jejich komplikované zavádění na nepřístupná místa, složité ovládání a intenzita osvětlení (typicky 50 mW/cm^2).²²

Představení laseru kombinovaného s optickým vláknem zvýšilo aplikovatelnost PDT. Pomocí této techniky je možné ozářit prakticky kteroukoliv část lidského těla, včetně pojiva či kostí. Jako vhodný se jevil helium-neonový laser, ale nízká energie emitovaného záření omezuje jeho využití v PDT. Proto se používá laditelný argonový laser na bázi barviva. Tento systém může produkovat záření v rozpětí vlnových délek od 350 do 700 nm. Naneštěstí jsou argonové lasery velmi drahé a náročné na obsluhu. Laser využívající páry zlata je jednodušší a levnější, ale produkuje pouze světlo fixní vlnové délky 628 nm.²³

Jedním z hlavních pokroků v oblasti zdrojů světla pro PDT je dosažitelnost diodových laserů, které jsou poměrně malé, snadno přenosné, velmi spolehlivé a finančně dostupné (okolo 20.000 liber či méně) ve srovnání s dříve používanými lasery.³

Přívod světla

Pro povrchové nádory (zejména kožní tumory) nebo pro nádory dutiny ústní lze použít jednoduchou čočku v kombinaci s optickou mřížkou. Výsledkem je jednotné ozáření (obr. 8). Pro solidní nebo hluboko uložené tumory se užívá optické vlákno zaváděné dutou jehlou, popřípadě naváděné ultrazvukem (obr. 8). Pro intraluminální a intrakavitální ozařování nádorů např. v bronších, ezofagu či močovém měchýři se používá flexibilní křemenné vlákno umístěné v nástrojovém kanálku standardního endoskopu (obr. 8). Modifikací konce vlákna²⁴ nebo umístěním vlákna do světlorozptylujícího media²⁵ může být dosaženo prostorové distribuce světla v cílové tkáni.



Obr. 8: Různé formy šíření světla používané ve fotodynamické terapii. Povrchové ozáření konvenční lampou (I) a laserové světlo vedené optickým vláknem (II). Intersticiální ozáření s cylindrickou (III) a sférickou (IV) rozptylovací čočkou. Intraluminální a intrakavitální ozáření s cylindrickou (V) a sférickou (VI) rozptylovací izotropní čočkou. Šipky znázorňují světlo emitované laserem. Přerušovaná čára zobrazuje oblast penetrace světla.

Tab. 1: Potenciální oblasti aplikace pro PDT⁹

Cílový orgán	Onemocnění, oblast aplikace
Oko	AMD
Kůže	psoriasis, akné, Kaposiho sarkom, bazaliom
Krev	antivirotika, antiparazitika
Imunomodulace	arthritis, arteriální restenóza, endometriální ablace
Ostatní	karcinom jícnu, plic, močového měchýře, prostaty, tlustého střeva

Pozn. AMD = Age-related Macular Degeneration (Senilní degenerace makuly)

1.5 PROFIL IDEÁLNÍHO PDT-LÉČIVA

Profil ideální látky pro PDT může být sestaven za použití obecných principů PDT a obecných zásad syntézy a marketingu jakéhokoliv léčiva. Jak se ukáže na následujících příkladech, některé aspekty profilu, jako třeba vlnovou délku absorpčního spektra, lze předpovědět poměrně snadno, zatímco jiné, např. farmakokinetický profil, je mnohem těžší odhadnout.⁹

Vlastnosti ideálního fotosenzitizeru

- Chemická čistota (zjednodušuje určení závislosti dávka-účinek, doby mezi podáním léčiva a ozářením stejně jako celkové množství záření) – PS by měl být chemicky čistý a známého složení. Toto je problém u HpD (hematoporphyrin derivative), kde se jedná o směs mono-, di- a oligomerů derivatizovaného hematoporfyrinu. U novějších PS se jedná již většinou o dobře charakterizované látky.⁴
- Jednoduchá příprava fotoaktivní látky
- Snadná syntéza z běžně dostupných výchozích látek; snadná aplikace do průmyslové výroby
- Fotoaktivní látka by měla fluoreskovat kvůli vizuální kontrole. Vhodné látky by za použití fluorescenční mikroskopie mohly být využity ke značení subcelulárních struktur^{26, 27}
- Minimální toxicita ve tmě – PS by měl být toxický pouze po ozářením světlem vlnové délky vhodné pro jeho aktivaci. Bez této aktivace jsou jeho jiné biologické účinky považovány za nežádoucí.
- Selektivní kumulace – PS by měl vykazovat výrazně zvýšenou kumulaci v nádorové tkáni oproti jiným tkáním. Jedná se zejména o ukládání PS v kůži, kdy jeho přítomnost způsobuje např. u HpD následnou dlouhodobou (až 6 týdnů) kožní fotosenzitivitu, což je pro pacienty velice omezující.
- Rychlá exkrece – Zbylý PS, jež zůstává v krevním řečišti po kumulaci v cílové tkáni, by mohl způsobovat systémovou toxicitu, a proto je jeho rychlá exkrece z těla žádoucí. Tento fakt souvisí s krátkým biologickým poločasem fotoaktivní látky v těle.
- Kvalitní fotochemické vlastnosti – Pro PS jsou žádoucí vysoký „triplet state quantum yield“ (Φ_T) a dlouhý „triplet state lifetime“ (τ_T), umožňující následně vysokou produkci

hlavního cytotoxického agens singletového kyslíku⁴. Žádoucí je tedy velké množství produkovaného tripletového stavu fotosenzitizéru (energie tripletu vyšší než $94 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) a velké množství produkovaného singletového kyslíku (toto splňují hlavně porfyriny, proto také většina látek v preklinickém zkoušení pochází právě z této skupiny²⁸)

- Dobré spektrální vlastnosti – Živé tkáně jsou pro elektromagnetické záření prostupné pouze v omezené míře, přičemž hloubka dostupnosti se zvyšuje se zvyšující se vlnovou délkou. Proto je potřebná silná absorpce s vysokými extinkčními koeficienty při delších vlnových délkách (v oblasti $650 - 800 \text{ nm}$), kde penetrační schopnosti světla jsou maximální a energie je stále dostačující pro účinnou produkci singletového kyslíku.
- Cena, dostupnost, modifikovatelnost – Nezanedbatelnými vlastnostmi PS je také jejich cena, snadná dostupnost a případně jednoduchá možnost modifikace pro zlepšení farmakokinetických parametrů.⁴

Pro hodnocení kvality fotosenzitizéru byly vypracovány dvě metody, které mají též vést k hodnocení látek potenciálně využitelných při fotodynamické terapii.²⁹

Jednou z obecných vlastností barviv, a tudíž i PS, je tzv. „photobleaching“ neboli vyblednutí, což je definováno jako ztráta intenzity absorpce či emise způsobená světlem. U barviv dochází působením světla k chemickým změnám (ať už fotoadicií, fotocyklizací, ireverzibilní fotoredukcí nebo nejčastěji oxidací), v jejichž důsledku dochází k narušení chromoforu. Jsou známy dva typy ireverzibilních chemických změn, fotomodifikace (kdy dochází ke ztrátě absorpce nebo fluorescence při určité vlnové délce, avšak chromofor zůstává zachován v modifikované formě), a tzv. „pravý photobleaching“ (kdy je chemický zásah hluboký a chromofor se rozpadá na malé fragmenty, jež nemají významnější absorpci ve viditelné oblasti).

Důsledkem pro PDT (dochází většinou k pravému photobleachingu) je to, že PS poté už neabsorbuje světlo, kterému je tak umožněno proniknout do hlubších vrstev. Na druhou stranu ovšem rozložený PS je již neaktivní a nemůže vykazovat žádné cytotoxické vlastnosti. Photobleaching se může také podílet na rychlejšímu vylučování PS z těla díky jeho rozkladu v kůži.⁴

1.6 GENERACE FOTOSENZITIVNÍCH LÁTEK

Fotosenzitizéry jsou látky schopné absorbovat světlo specifické vlnové délky a transformovat jej na užitečnou energii. V případě PDT toto zahrnuje v konečné fázi produkci letálních cytotoxických agens. Existují stovky přírodních i syntetických barviv, jež mohou fungovat jako PS v PDT. Klíčovou charakteristikou kteréhokoliv PS je jeho schopnost preferenční kumulace v nemocné tkáni s následnou produkcí cytotoxických produktů a indukci požadovaných biologických efektů, i když v poslední době se dá problém cílené distribuce PS do požadovaných tkání obejít několika způsoby (lipozómy, konjugace s biomolekulami aj.).⁴

Obecně se dá říct, že naprostá většina PS momentálně používaných nebo testovaných v PDT je založena na porfyrinovém cyklu. Vzhledem k tomu, že doposud nejrozšířenější a nejpoužívanější PS - Photophrin[®] - má značný počet vedlejších účinků a pro PDT nežádoucích vlastností, byl výzkum zaměřen na nové typy PS.

V současné době lze známé PS rozdělit asi do tří generací. První generaci tvoří pravděpodobně pouze HpD a vyznačuje se některými nevýhodnými vlastnostmi, kvůli nimž byly připraveny látky generace druhé. Kromě látek odvozených od porfyrinů sem patří i látky jiných chemických struktur. Třetí generaci tvoří PS generace druhé spojené s některými biomolekulami, umožňujícími tak cílenější biodistribuci v těle.⁴

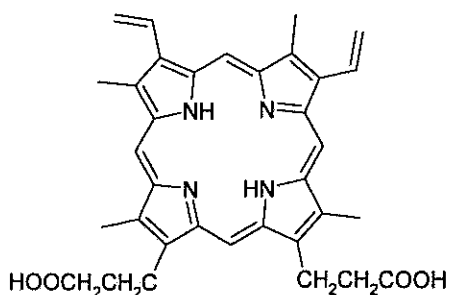
1.6.1 PRVNÍ GENERACE

Typické látky této generace jsou deriváty hematoporphyrinu (HpD), popř. protoporphyrinu IX (Pp IX, obr. 9). Přípravují se působením kyseliny sírové na^ohematoporphyrin (obr. 10) v prostředí kyseliny octové. Jedním z nich je např. Photofrin II[®] připravený Doughertym³⁰, který se po dalších úpravách dostal do klinické praxe jako Photofrin[®].³¹ Je to oligomer hematoporphyrinu, ale délku oligomerního řetězce je těžké přesně určit. Photofrin[®] byl ale přesto přijat zdravotníky USA, Kanady, Japonska a Evropy. Touto látkou se PDT etablovala na poli léčby zhoubných nádorů hned vedle chirurgie, chemoterapie a radioterapie.

První generace fotosenzitivních látek má ale několik závažných nedostatků, které dále vedly k hledání látek jiných typů. Jedním z nedostatků je jejich farmakokinetický profil.³² V případě Photofrinu[®] je to velice nízká vlnová délka vhodná pro aktivaci – 630 nm, a proto je potřeba vysokých dávek jak PS, tak světla. Dále i po vyčištění stále sestává ze směsi asi 60 látek, a tudíž je velice složité reprodukovat přesně jeho složení. Také vychytávání v nádorech není příliš selektivní a jeho vysoké koncentrace lze nalézt v játrech, ledvinách, slezině a zejména kůži. V kůži pak přetrvává až 6 týdnů, což způsobuje dlouhodobou fotosenzitivitu a pacienti nesmí přijít do kontaktu s ostrým světlem.⁴

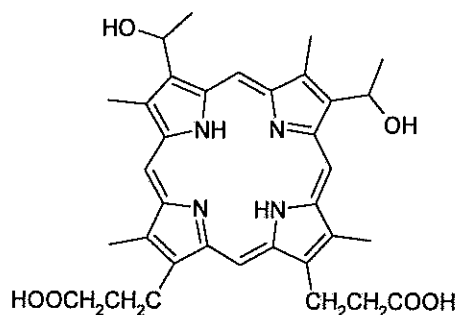
Photofrin[®] i přes veškeré výše uvedené nežádoucí vlastnosti přesto stále zůstává nejrozšířenějším PS a byl už zaveden v mnoha zemích k léčbě prekancerózních stavů (Barrettův jícn, cervikální dysplazie) i vlastních kanceróz (karcinom cervixu, jícnu, močového měchýře, žaludku a bronchiální karcinom).

Používají se také deriváty Photofrinu[®]. Například v Rusku byl akceptován Photohem[®] k léčbě rakoviny kůže, prsu, jícnu, plic, hrtanu a žaludku. Také se používá k léčbě psoriázy a jako profylaxe zákalu korneálního štěpu.⁴



Protoporphyrin IX

Obr. 9



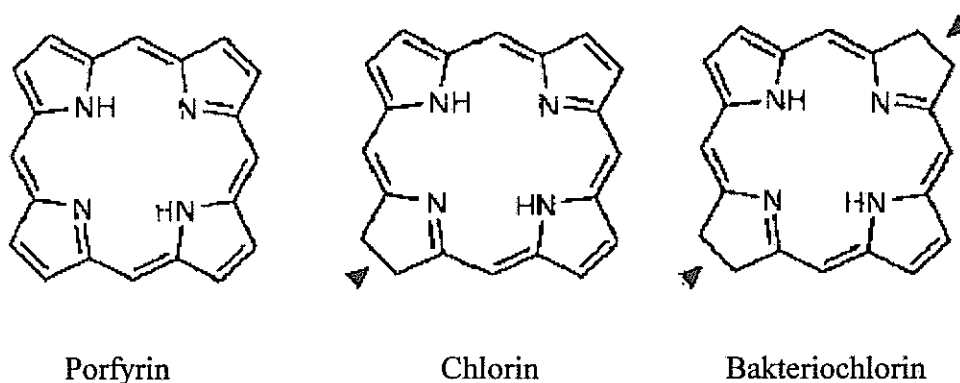
Hematoporphyrin

Obr. 10

1.6.2 DRUHÁ GENERACE

Látky druhé generace jsou již chemicky jednotné a snadno charakterizovatelné. Mají též posunuto absorpční maximum k vlnovým délkám kolem 650 – 800 nm a tudíž je lze aktivovat světlem pronikajícím hlouběji do tkání. Tyto látky již vstoupily do II. a III. fáze klinického zkoušení nebo jsou již používány v terapii. Patří sem látky zařazené do skupiny porfyrinů, chlorinů, benzoporfyrinových derivátů, etiopurpurinů, ftalocyaninů a některé další sloučeniny.⁴

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 nm.¹⁵ Porfyrinům jsou velice příbuzné chloriny a bakteriochloriny, které mají o jednu (chloriny), případně dvě (bakteriochloriny) konjugované vazby v makrocyclickém systému méně (obr. 11).⁴ 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.¹⁵



Obr. 11 Rozdíl mezi porfyriny, chloriny a bakteriochloriny⁴

Verteporfin (BPD-MA, Visudyne™)

Základní skelet této látky (obr. 12) je blízký porfyrinům (zkratka BPD-MA pochází z anglického benzoporphyrin-derivative monoacid ring A), je to derivát benzoporfyrinu. Jeho absorpční maximum je posunuto až k vlnové délce 690 nm, při níž proniká světlo přibližně dvakrát hlouběji než při 630 nm. Verteporfin je velice rychle absorbován nádorovou tkání, avšak také velice rychle vylučován jak z těchto tkání, tak z těla⁴ (velkou výhodou je proto skutečnost, že verteporfin nezpůsobuje generalizovanou kožní fotosenzitivitu trvající déle než 24 hodin).³ Nejlepší poměr mezi nádorovými a ostatními tkáněmi je dosažen přibližně po 30-150 minutách a pak koncentrace v tumorech opět velice rychle klesá.

I přesto, že selektivita k nádorům není ideální, je tato látka v počáteční fázi klinických zkoušek pro léčbu karcinomu bazálních buněk kůže. Také se dostala do druhé fáze klinických zkoušek pro nemelanotické kožní nádory, pro léčbu psoriázy a psoriatické a revmatoidní artritidy. V rozvoji jsou též studie pro autotransplantační léčbu nádorových onemocnění kostní dřeně. Od uvedení na trh v prosinci roku 1999 je dnes tato látka registrována již v 71 zemích (mimo jiné i v ČR) pod obchodním názvem Visudyne™ a používá se k terapii senilní makulární degenerace (angl. age related macular degeneration, AMD) v oftalmologii.⁴

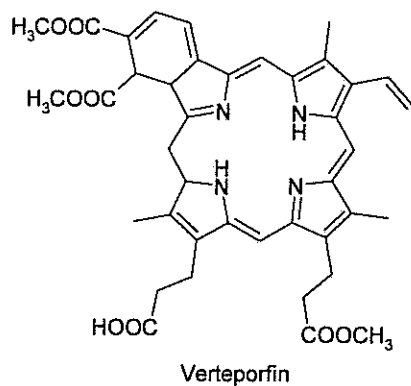
Temoporfin (mTHPC, Foscan®)

Temoporfin (tetra(*meta*-hydroxyfenyl)chlorin, mTHPC), zástupce skupiny chlorinů, byl syntetizován již v roce 1989 jako součást série porfyrinů, ze které se později ukázal být nejúčinnější (obr. 13). Jeho absorpční maximum sice není příliš posunuté k červené oblasti (652 nm), přesto je asi 100x účinnější než Photofrin® (stačí velmi malá dávka PS i světla) a dá se považovat za jeden z nejvíce fototoxických PS v současnosti zkoumaných.

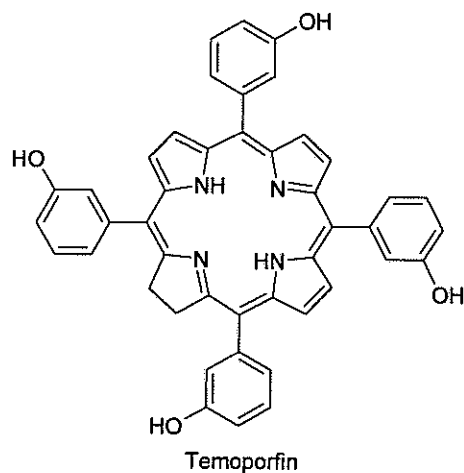
Farmakokinetické parametry ovšem již nejsou tak pozitivní. Selektivita vychytávání mezi nádorovou a zdravou tkání je poměrně malá a optimální čas mezi injekčním podáním a ozářením se v různých studiích liší, i když nejčastěji se uvádí čas 3-4 dny. Tato skutečnost souvisí s poměrně dlouho přetrvávající kožní fotosenzitivitou (cca 2-3 týdny), která pacienty značně omezuje. Také kožní fotosenzitivita přetrvává po dobu 2-3 týdnů, což pacienta velice omezuje.

I přes tyto nepříznivé farmakokinetické parametry byl Foscan® v říjnu roku 2001 zaveden v některých zemích Evropy k léčbě rakoviny hlavy a krku rezistentní k jiným

terapiím.⁴ Foscan[®] je dále v klinických zkouškách pro léčbu rakoviny jícnu a dysplazie u Barrettova jícnu. Přípravují se klinické zkoušky u karcinomu žaludku, prostaty a kůže, hyperplazie prostaty, sterilizace okolí zásahu po chirurgické léčbě nádoru nebo proti bakteriím rezistentním na antibiotika³³.



Obr. 12



Obr. 13

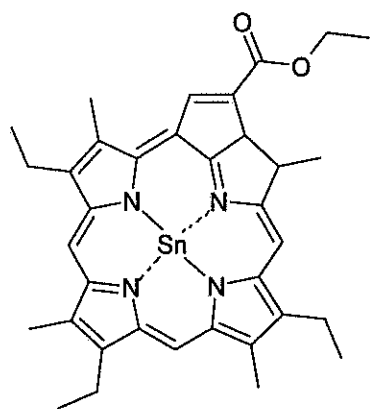
Etiopurpurin-komplex s cínem (Tin etiopurin, SnET2, Purlytin[®])

Také tato látka (obr. 14) patřící do skupiny metalochlorinů (uprostřed jádra je chelátovaný kation cínu) má silné absorpční maximum (při 660 nm), avšak přesto jsou pro terapii potřebné vysoké dávky světla (srovnatelné s Photofrinem[®]). Také kožní fotosenzitivita není oproti HpD výrazně nižší (přetrvává po dobu asi 10-14 dnů po podání).³⁴ Purlytin[®] je testován jako prostředek k léčbě senilní makulární degenerace a třetí fáze klinických zkoušek je již pro tuto aplikaci ukončena.³⁵ SnET2 se také nachází ve druhé fázi zkoušek pro léčbu kožních metastáz rakoviny prsu a Kaposiho sarkomu u pacientů s AIDS.¹⁹

Talaporfin (NPe₆, MACE)

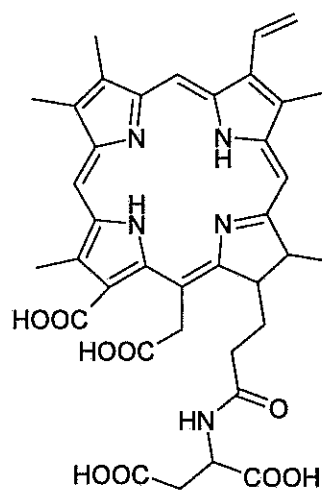
Talaporfin (mono N-aspartyl chlorin e₆, obr. 15) je další ze syntetických chlorinů, který ale vykazuje silnou absorpci při vyšších vlnových délkách (664 nm). Podobně jako verteporfin se z tkání rychle vylučuje, a tak k ozáření dochází po 4 hodinách po intravenózní aplikaci.³⁶ Kožní fotosenzitivita byla označena jako „dočasná“.⁴ V Japonsku je úspěšně ukončena třetí fáze klinických zkoušek talaporfinu na léčbu časného stadia rakoviny plic a

připravuje se jeho komerční využití v této aplikaci. V USA se zase zkouší využití této látky v terapii pokročilých stadií rakoviny (prostaty, slinivky, plic, rekta), ale i v jiných než protinádorových indikacích (např. v oftalmologii a kardiologii).³⁷



SnET2

Obr. 14



Talaporfin

Obr. 15

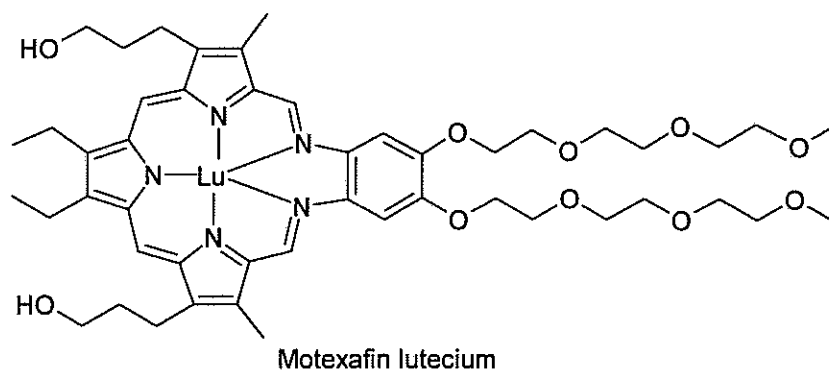
Motexafin lutecium (Lutex, Optrin[®], Antrin[®], Lutrin[®])

Motexafin lutecium (obr. 16) patří do jiné chemické skupiny než předchozí látky příbuzné porfyrinům. Jedná se o derivát texafyrinu (s charakteristickým pětiusíkatým makrocyclickým jádrem) s centrálně chelatovaným atomem lutecia. Mezi jeho velké výhody patří silná absorpce při dlouhé vlnové délce 732 nm a dobrá selektivita pro maligní tkáň s krátkodobou fotosenzitizací pacienta. Velmi rychlá clearance z krevní plazmy umožňuje opakované podání, což se jeví jako vhodnější než jediná dávka PS.³⁸

Lutrin je testován k léčbě karcinomu prsu.³⁹

Antrin slouží k léčbě kardiovaskulárních onemocnění a v současné době je tato látka ve druhé fázi klinických zkoušek pro prevenci arteriální restenózy a léčbu aterosklerózy metodou, jež se nazývá fotoangioplastika.⁴⁰

Optrin[®] prošel v roce 1999 první fází klinických zkoušek pro léčbu senilní makulární degenerace³³, ovšem v tom samém roce byly další testy ukončeny a nové informace z této oblasti aplikace nejsou známy.⁴¹



Obr. 16

Ftalocyaniny (Pc4, Photosense)

Ftalocyaniny (Pc)(obr. 17) jsou další velice nadějnou skupinou PS. S posunutou maximální vlnovou délkou absorpce směrem k červené části spektra (670-700 nm) a zesílenou absorpcí při této vlnové délce jsou velice perspektivními PS do budoucna. Důležité pro vlastní PDT účinek je přítomnost chelatovaných centrálních kovů a polokovů, z nichž některé prodlužují trvání tripletového stavu PS, a tím i zvyšují jeho účinnost v PDT (např. Zn, Al, Si).⁴

Nevýhodou některých ftalocyaninů je jejich velice špatná rozpustnost nejen ve vodě (ftalocyaniny obsahují ve své molekule čtyři fenylové skupiny, což způsobuje velmi špatnou rozpustnost a sklon k agregaci)¹⁵, ale i v organických rozpouštědlech a z toho vyplývající problémy s aplikací. Toto lze ovšem vyřešit chemickou modifikací na periférii (např. sulfonací) nebo inkorporací do micel (např. micely připravené z PEG (polyethylenglykolu) uzavírající ZnPc s vysokou selektivitou pro nádorovou tkáň)⁴² nebo lipozómů (příprava unilamelárních lipozómů obsahujících ZnPc a cholesterol).⁴³

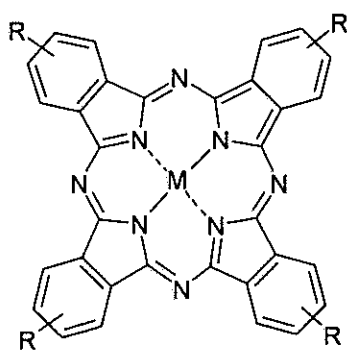
Rozpustnosti ve vodě se daří dosáhnout například sulfonací, vzniká ovšem velice špatně separovatelná směs sulfonovaných produktů. Po získání jednotlivých frakcí u hlinitého komplexu ($M=Al-Cl$, $R=SO_3H$) ftalocyaninu byl sledován vliv počtu sulfonových skupin na jeho aktivitu. Bylo zjištěno, že disulfonované deriváty jsou neúčinnější.⁴⁴ Ovšem i směs derivátů se využívá a dokonce se dostala do třetí fáze klinického zkoušení proti rakovině kůže, prsu, plic a gastrointestinálního traktu.

Dalším příkladem sloučenin tohoto typu je špatně rozpustný zinečnatý komplex nesubstituovaného ftalocyaninu ($M=Zn$, $R=H$), který byl ve formě lipozómů v první a druhé fázi klinických zkoušek pro léčbu karcinomu skvamózních buněk kůže.³³

Pc4 je zkratka pro křemičitý komplex nesubstituovaného ftalocyaninu ($R=H$, $M=Si(OH)-Si(CH_3)_2(CH_2)_3N(CH_3)_2$), jenž byl zkoušen ke sterilizaci krevních produktů.³³ Při studiu na myších bylo také zjištěno potlačení buněčné imunity, což vede k možnosti využití této látky jako potenciálního imunosupresiva.⁴⁵

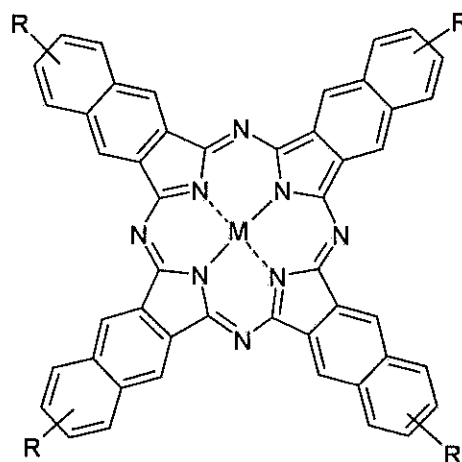
Další část výzkumu se zabývá hodnocením účinnosti ftalocyaninů při terapii zánětlivých a infekčních kožních onemocnění virového a bakteriálního původu, ale i k léčbě různých povrchových kožních mykóz, kde bylo zjištěno, že při selektivním výběru správného typu fotosenzitizéru je ke zničení fungálních buněk zapotřebí mnohonásobně menších dávek PS i světla, než k dosažení stejného efektu u keratinocytů.⁴⁶

Přidání dalšího benzenového jádra na periferii ftalocyaninů vede k látkám typu naftalocyaninů (obr. 18). Tyto látky absorbují při velice dlouhých vlnových délkách (až 770 nm), čímž je zvýšena terapeutická hloubka, které může být dosaženo, a lze tyto látky používat i pro vysoce pigmentované nádory – jako např. melanom.⁴



Ftalocyanin

Obr. 17



Naftalocyanin

Obr.18

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

Poněkud jiným přístupem v PDT je použití ALA. Jedná se o endogenní látku, která je součástí biosyntetické cesty hemu. Tato cesta je kontrolována negativní zpětnou vazbou, při které vyšší koncentrace hemu inhibují konverzi glycinu a sukcinylkoenzymu A na ALA. Exogenní dodání ALA umožňuje obejít tento kontrolní mechanismus a dochází k syntéze protoporphyrinu IX (PpIX)(obr. 19), který poté funguje jako účinný PS. Inkorporací atomu železa enzymem ferrochelatase vzniká přirozenou cestou z PpIX fotodynamicky neaktivní

hem. Selektivita k nádorové tkáni a účinnost ALA je dána mnoha faktory, jež zahrnují např. zvýšenou permeabilitu abnormálního keratinu, zvýšené hladiny porfobilinogendeaminasy, snížené koncentrace železa a sníženou aktivitu ferrochelatasy (to zaručuje, že se PpIX nemění dále na neaktivní hem). Tyto faktory poté vedou ke kumulaci PpIX v postižené tkáni.⁴

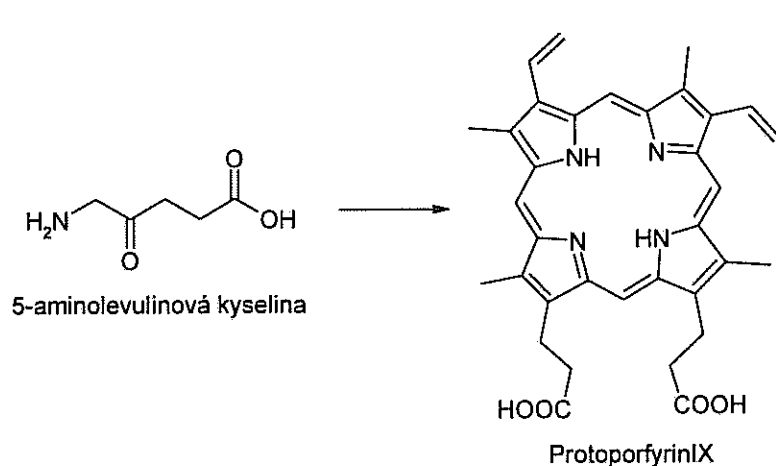
Doposud proběhly úspěšné klinické studie použití ALA v PDT, např. pro léčbu nemelanotické rakoviny kůže⁴⁷, Barretova jícnu⁴⁸, a psoriázy.⁴⁹

Vzhledem k nízké lipofilitě ALA se do terapie dostávají také její estery (obr. 20), které lépe pronikají do tkání (zejména při aplikaci na kůži) a po hydrolyze uvolňují volnou ALA.

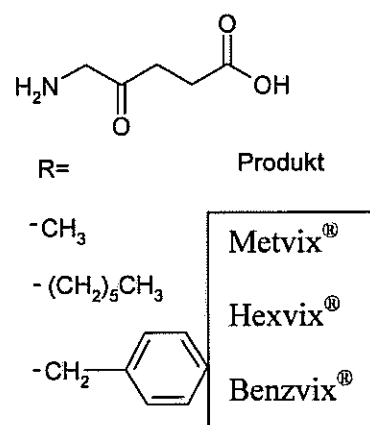
Metvix[®] je methyl ester kyseliny 5-aminolevulinové. Byl zaveden v roce 2001 k léčbě aktinoidní keratózy a později také k léčbě karcinomu bazálních buněk kůže. Další možné oblasti aplikace jsou v léčbě akné a hojení ran.⁵⁰

Hexvix[®] je hexyl ester kyseliny 5-aminolevulinové. Připravuje se k marketingu pro fotodetekci rakoviny močového měchýře. Také je ve vývoji jeho použití nejen k detekci rakoviny močového měchýře, ale i k její léčbě. Další aplikace, které se připravují, jsou z oblasti gynekologie (detekce a léčba rakoviny cervixu a vulvy).⁵⁰

Benzvix[®] je benzyl ester kyseliny 5-aminolevulinové. Připravují se jeho klinické zkoušky pro fotodetekci a léčbu rakoviny jícnu.⁵⁰



Obr. 19: Syntéza PpIX z kyseliny 5-aminolevulinové



Obr. 20 Estery ALA

Další fotosenzitizéry

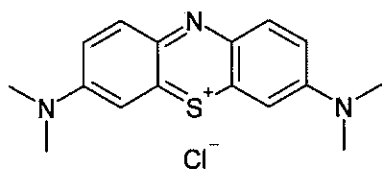
Výše zmíněné látky patří mezi hlavní, ovšem ne jediné PS, jež se používají nebo jsou ve stadiu klinických zkoušek. Ve výzkumu je řada dalších látek, ať již přírodního charakteru nebo syntetických, jež se vědci pokoušejí testovat na PDT a případně modifikovat některé jejich vlastnosti, aby odpovídaly nebo se alespoň blížily požadavkům na ideální PS. Patří sem mimo jiné i následující látky.⁴

Methylenová modř

Tento derivát fenothiazinu (obr. 21), jehož absorpční maximum leží při vlnové délce 668 nm, je používán k dekontaminaci čerstvě zmrazené plazmy.⁵¹ Účinně inaktivuje extracelulárně přítomné viry a je prakticky netoxická pro člověka.³³ Její použití *in vivo* je ovšem limitováno redukcí enzymy přítomnými v buňkách na leukoformu, jež je fotodynamicky neaktivní.

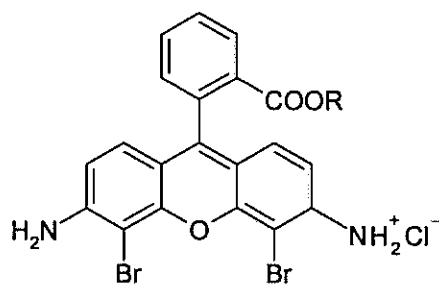
Rhodaminy

Rhodaminy jsou v buňkách specificky vychytávány mitochondriemi a jsou používány jako fluorescenční barviva vzhledem k vysoké produkci fluorescence. Toto je ovšem nevýhodné z hlediska PDT, protože PS poté nepřechází účinně ze stavu S_1 do T_1 , která je základem pro vlastní fotodynamický účinek. Tento problém lze alespoň z části vyřešit substitucí těžkými atomy (např. bromem), které zvyšují účinnost přechodu $S_1 \rightarrow T_1$ a také posouvají absorpční maximum mírně směrem k červené oblasti. Tento posun je pro rhodaminy, mající bez substituce maximum při asi 500 nm, velice důležitý. Bromovaný rhodamin (obr. 22) byl úspěšně použit v testech pro autotransplantační léčbu myeloidní leukémie.⁵² Při tomto procesu, který probíhá *ex vivo*, dochází ke zničení nemocných buněk kostní dřeně, normální zdravé buňky přežívají a jsou poté použity k autotransplantaci.



Methylenová modř

Obr. 21



Bromovaný rhodamin

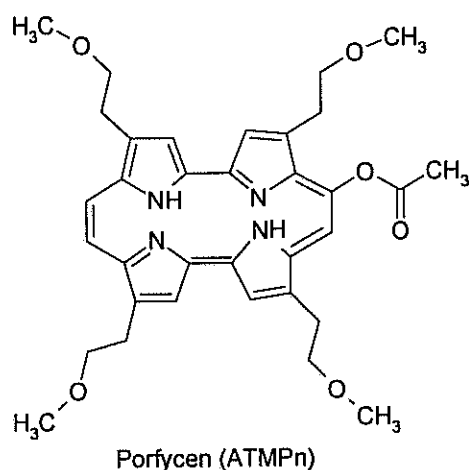
Obr. 22

Porfyceny

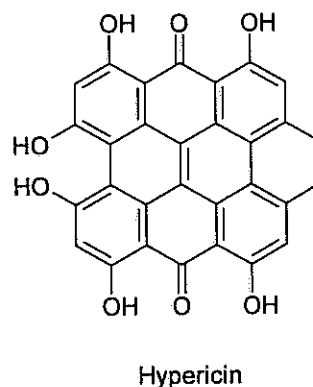
Jejich absorpční maximum se pohybuje v oblasti vlnové délky 600-650 nm. Modifikací na periférii lze dosáhnout velice dobrých farmakokinetických vlastností a derivát se čtyřmi β -methoxyethylovými skupinami, jež urychlují vstup do buňky, a jednou acetoxy skupinou zvyšující hydrofilitu (9-acetoxy-2, 7, 12, 17-tetrakis-(β -methoxyethyl)-porfycen, ATMPn, obr. 23), patří mezi nejrychleji vychytávané PS v *in vitro* studiích vůbec. Látka se aplikuje pouze topicky k léčbě kožních onemocnění (psoriáza, nemelanotický karcinom kůže).⁵³

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 látku.⁵⁴ Hypericin (obr. 24) je pro terapeutické využití ve fázi výzkumu k léčbě proliferativní retinopatie⁵⁵ a lze jej využít pro *ex vivo* fluorescenční cytologickou detekci buněk nádoru močového měchýře v moči.⁵⁶



Obr. 23



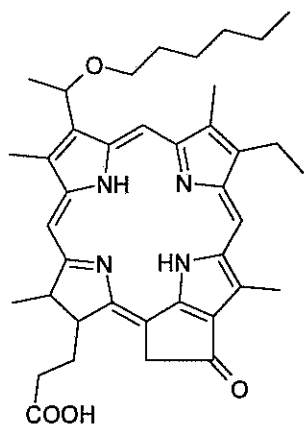
Obr. 24

Photochlor

Photochlor (obr. 25) patří do skupiny chlorinů, přesněji se jedná o derivát feoforbidu-a. Analogy feoforbidu-a jsou obecně aktivnější než podobné látky ze skupiny chlorinů-e₆ (např. talaporfin). Photochlor je hexyleter feoforbidu-a (HPPH) a je vysoce selektivní k nádorové tkáni se současně nižší kožní fototoxicitou než Photofrin®.⁵⁷

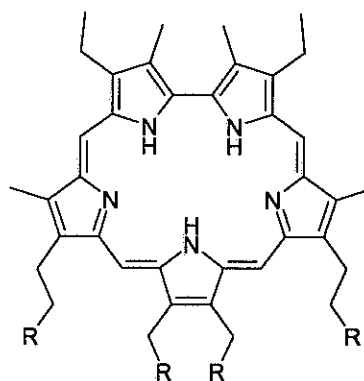
Safyriny

Safyriny (obr. 26) patří do skupiny expandovaných porfyrinů (podobně jako texafyriny). Jejich základní pentapyrrolický makrocykl s jedním přímým bipyrrolickým spojením absorbuje v oblastech okolo 675 nm. Při pokusech na myších vykazovaly některé látky vysoký poměr rozdělení PS mezi nádorovou a okolní svalovou tkání, ale hodnoty maximální koncentrace v tumorózní tkáni byly dosaženy až po 3-6 dnech po aplikaci.⁵⁸



Photoclor

Obr. 25



Safyrin

Obr. 26

V současné době jsou do klinické praxe ve světě zavedeny (viz. Tab. 3) pouze 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 budoucni se dá předpokládat, že díky svým výhodnějším vlastnostem a často nižší toxicitou postupně vytlačí HpD z terapie a zaujmou jeho místo.⁴

Tab. 2: Vybrané fotosenzitizéry: Výhody a nevýhody²⁸

Fotosenzitizér	Výhody	Nevýhody
<u>Photofrin[®]</u> (porfyrin)	snadná příprava rozšířen celosvětově	směs absorpce omezena 630 nm kožní fototoxicita
<u>m-THPC</u> (chlorin)	snadná příprava účinný fotosenzitizér dlouhovlnná absorpce (650 nm)	kožní fototoxicita expozice světlem možná až 9 dní po i.v. aplikaci
<u>BPD</u> (chlorin)	dlouhovlnná absorpce (650 nm) nulová kožní fototoxicita	složitá příprava nutnost ozáření do 3 hodin po i.v. podání
<u>Npe6</u> (chlorin)	snadná příprava nulová kožní fototoxicita	rychle odbouráván z cirkulace léčba závislá více na plazmatické hladině než na hladině v tumoru
<u>Lutex</u> (texafyrin)	snadná příprava silná absorpce (660 nm) velmi efektivní fotosenzitizér nulová kožní fototoxicita	omezená klinická data

Tab. 3: Fotosenzitizéry schválené pro terapii onkologických onemocnění³

Chemický název	Generický název	Datum a země, kde je schváleno použití	Indikace
<u>HpD,</u> <u>polyhaematoporphyrin</u> (porpfyryl)	Porfimer sodium	Poprvé schváleno v roce 1995; v současnosti používán ve více než 40 zemích	Rakovina plic a močového měchýře, povrchní rakovina žaludku, jícnový adenokarcinom
<u>m-THPC</u> (chlorin)	Temoporfin	Schváleno v roce 2001 v Evropské unii, Norsku a Islandu	Paliativní rakovina hlavy a krku
<u>5-aminolevulinová</u> <u>kyselina</u>	Aminolevulinová kyselina	Schváleno v roce 1999 v USA	Aktinoidní keratóza
<u>Methyl</u> <u>5-aminolevulinát</u>	Methyl aminolevulinát	Schváleno v roce 2001 v Evropě	Aktinoidní keratóza, rakovina bazálních buněk

1.6.3 TŘETÍ GENERACE

Jako látky třetí generace se označují konjugáty fotosenzitizerů s různými biomolekulami. Mezi látkami tvořícími fotosenzitivní část konjugátů dominují porfyriny, zřejmě z důvodu jejich snadné přípravy. Ve farmakokinetice konjugátu dominuje afinita porfyrinové části k sérovým proteinům. Afinita biomolekul k receptorům na povrchu buňky je vyjádřena méně. Porfyriny se konjugují zejména s protilátkami, steroidy, dále se sacharidy a polynukleotidy.⁹

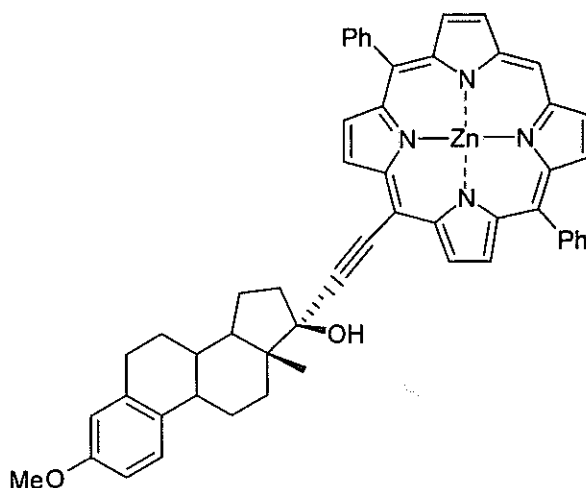
Konjugáty s protilátkami

První pokus o konjugaci porfyrinových molekul s protilátkami provedl Mew a jeho spolupracovníci v 80. letech 20. století.⁵⁹ V následujících pokusech byl úspěšný také Hasan⁶⁰, který se snažil konjugovat kyselinou polyglutamovou derivatizovaný chlorin e₆ s protilátkou přes uhlovodíkovou část této protilátky. Selektivní destrukce tkáně, dosahovaná tímto konjugátem, byla mnohem lepší nežli u samotného chlorinu e₆.

Steroidní konjugáty

Selektivní vychytávání těchto konjugátů se vysvětluje dvěma základními způsoby. První možností je selektivní vázání na plazmatické LDL proteiny pomocí konjugátů s cholesterolem. Druhou verzí je selektivní „targeting“ na steroidní receptory.

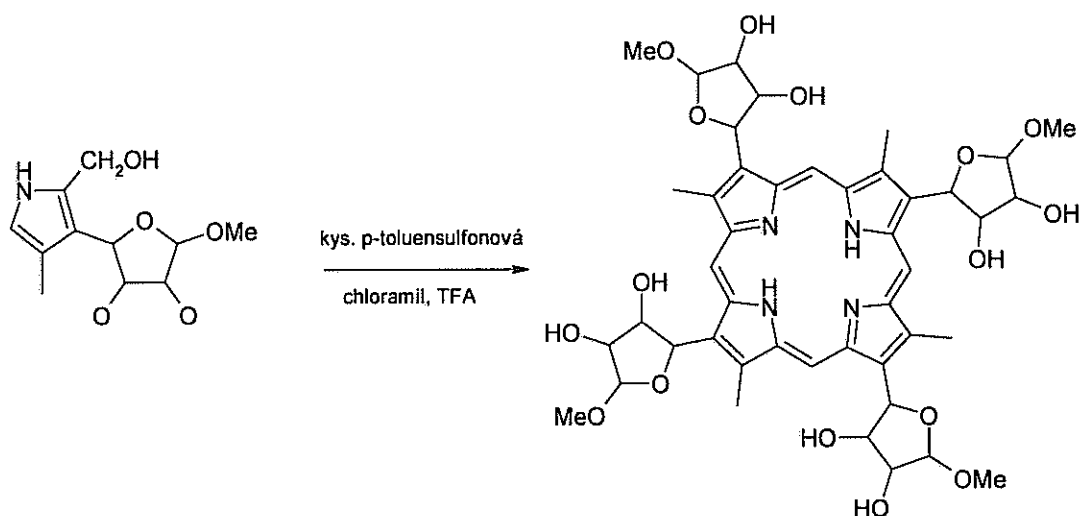
Zajímavou se jeví možnost inkorporace molekuly estronu (obr. 27) či progesteronu konjugovaného s porfyriny do buněk s určitým typem steroidních receptorů, např. buňky rakovinného bujení mediastina.⁶¹



Obr. 27

Konjugáty s cukry

Tyto sloučeniny lze připravit několika cestami, z nichž nejjednodušší se jeví použití pyrrolů derivatizovaných cukry k syntéze porfyriu (obr. 28).⁶² Ze skupiny ftalocyaninů se jedná například o křemíkový ftalocynin obsahující na centrálním atomu jednu nebo dvě molekuly substituované galaktózy.⁶³



Obr. 28

Mono- a polynukleotidové konjugáty

Konjugace s polynukleotidy je vlastně dalším stupněm konjugátů porfyriu s cukry. Zajímavé výsledky lze nalézt v práci Jianga a kol.⁶⁴, který spojil monovinylchlorin s rtuťnou solí uridinu. Výsledkem byly regioisomery.

Podobně jako ostatní sloučeniny lze s porfyriu konjugovat též peptidy⁶⁵ a ligandy DNA.⁶⁶ Tyto konjugáty vykazují určitou receptorovou specifitu *in vitro*, ale *in vivo* zatím toto nebylo pozorováno.

Uzávěrové komplexy

Další možností je tvorba tzv. kontejnerových (uzávěrových) komplexů.⁶⁷ V tomto případě se nejedná přímo o tvorbu konjugátů, ale o uzavření molekuly PS uvnitř struktur makrocyclických sloučenin, které tvoří jakousi dutinu, ve které je poutána molekula PS nekovalentními interakcemi. V úvahu vzhledem k velikosti molekuly PS přicházejí pouze cyklodextriny a calix [n] areny. Tvorbou těchto komplexů se ovlivní především farmakokinetika, event. se maskuje vysoká lipofilita PS a zlepšuje se tak jeho distribuce.

1.7 ZPROSTŘEDKOVANÉ ROZPOUŠTĚNÍ (SOLUBILIZACE)

Definice a mechanismy solubilizace

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. Rozeznávají se zejména níže popsané mechanismy solubilizace.⁶⁸

Vytvoření komplexu

Z málo rozpustné látky a solubilizátoru se reakcí ve stechiometrickém poměru vytvoří komplex vyznačující se lepší rozpustností. Pokud lze předem připravit definovaný tuhý komplex, je poměr mezi léčivem a solubilizátorem stechiometrický. Často však komplex vzniká až při rozpouštění málo rozpustného léčiva v roztoku podstatně většího množství solubilizátoru, než odpovídá stechiometrickému poměru. Je vhodné, aby komplex byl podle možnosti specifický a v každém případě musí být vratný, aby se po zředění tělesnými tekutinami léčivo z komplexu opět uvolnilo a jeho účinek se zásadně nezměnil. K určitým změnám doby nástupu a trvání účinku však zpravidla dochází.

Širší použití mají *uzávěrové komplexy* (inkluzní komplexy) řady málo rozpustných léčiv s přírodními a modifikovanými cyklodextriny a příbuznými makrocyclickými sloučeninami. Komplexací s cyklodextriny lze převést do vodného roztoku i velmi lipofilní (hydrofobní) léčiva, jako jsou steroidní hormony a v případě látek používaných ve fotodynamické terapii i řada fotosenzitizérů. Nevýhodou je malá specifita, komplexují a solubilizují se i nežádoucí látky a samotné cyklodextriny nejsou zcela bez účinku. Rozpustné organické soli vícesytných kyselin a hydroxykyselin, vitan ergotamina, salicylan fysostigminia apod., mají také do určité míry charakter molekulových komplexů.⁶⁸

Hydrotropní efekt (změna rozpouštěcí schopnosti rozpouštědla)

Hydrotropním efektem se vysvětluje mírné zvětšení rozpustnosti málo polárních látek ve vodných roztocích některých dobře rozpustných solí a polárních neelektrolytů (amidů apod.). Hydrotropně účinné soli a polární látky podle starších názorů zlepšují schopnost vody

rozpouštět málo polární látky tím, že částečně rozrušují její asociovanou strukturu. Poněvadž se jedná o působení na rozpouštědlo, je hydrotropní solubilizace nespecifická a nestechiometrická.⁶⁸

Micelární solubilizace

Micelární solubilizace představuje vstup solubilizované látky do koloïdních micel tenzidů. Hydrofilnější tenzidy se rozpouštějí ve vodě a po překročení kritické micelární koncentrace zde vytvářejí micely (shluky) s hydrofilním povrchem a lipofilní vnitřní částí. Vodné micelární roztoky tenzidů rozpouštějí lipofilní látky tak, že se tyto látky zabudují do nitra micel, nebo vytváří s tenzidem smíšené micely, jedná se o nestechiometrickou a málo specifickou koloïdní solubilizaci. Reverzní micely tenzidů naopak solubilizují hydrofilní látky do prostředí lipofilních rozpouštědel (olejů). S micelární solubilizací souvisí též rozpouštění látek v mezofázích tenzidů a mikroemulzích.⁶⁸

Přídavek kosolventu

Přídavek kosolventu do vody je vysoce účinným způsobem přípravy roztoků řady málo rozpustných nepolárních i polárních látek. Kosolventem je nevodné rozpouštědlo mísící se s vodou, přidáním jednoho nebo více vhodně zvolených kosolventů do vody vzniká směsné rozpouštědlo se zvýšenou rozpouštěcí schopností. Kosolventní rozpouštění obecně znamená rozpouštění ve směsích kapalných rozpouštědel. Pro přípravu roztoků léčiv se do vody jako kosolventy přidávají zejména organická rozpouštědla, přípustná pro dané použití roztoku. Běžným kosolventem je glycerol nebo ethanol, novějšími kosolventy jsou propylenglykol, dimethylisosorbid, dimethylacetamid, nižší kapalně polyethylenglykoly (PEG 400) apod.

Solubilizace přidavkem kosolventů se vysvětluje příznivým ovlivněním Hildebrandova parametru rozpustnosti vzniklého směsného rozpouštědla, které má nižší povrchové napětí než voda. Nevhodný kosolvent může ovšem rozpustnost zhoršit. Vhodné kosolventy jsou nepostradatelné hlavně při přípravě roztoků peptidů a jim podobných léčiv, která se jen velmi málo rozpouštějí v libovolném jednotlivém rozpouštědle. Snížený podíl vody ve směsném rozpouštědle navíc zlepšuje chemickou stabilitu léčiv podléhajících hydrolytickému rozkladu.⁶⁸

Kombinací přídavku kosolventů a úpravy pH lze do společného roztoku rozpustit nepolární (hydrofobní) léčivo i soli organických kyselin nebo zásad. Výhodně se kombinuje také solubilizace pomocí kosolventů a tenzidů (např. polysorbátů 20 a 80), mezi kapalnými

tenzidy a kosolventy ostatně ani nelze stanovit ostrou hranici. Solubilizací vhodnými kosolventy a její kombinací lze zvýšit rozpustnost řady léčiv zhruba 1000 násobně i více, tvorbou komplexu s cyklodextriny více než 100 násobně, micelární solubilizací tenzidy zpravidla méně než 100 násobně a hydrotropním efektem pouze několikanásobně.

Solubilizace pomocí kosolventů je tedy vysoce účinná, kosolventy však musí splňovat přísná kritéria nezávadnosti. I tak se roztoky s vyšším podílem kosolventů před perorálním, orálním (kloktadla) a parenterálním podáním musí zpravidla ředit. Přitom není přípustné, aby ředěním do infúzních parenterálních roztoků docházelo ke srážení léčiva či vzniku zákalu.⁶⁸

1.8 TRANSPORTNÍ SYSTÉMY PRO FOTOLEZIVIZÉRY V PDT

PDT je velice slibná léčebná metoda pro různá onkologická, kardiovaskulární, kožní a oční onemocnění. Jedním z hlavních problémů, s kterým se PDT potýká a který značně omezuje využití fotosenzitizérů v terapii, je obtížnost přípravy farmaceutických formulací, které by byly vhodné pro parenterální aplikaci PS. Hydrofobní PS nemohou být jednoduše aplikovány intravenózně kvůli jejich velmi nízké rozpustnosti ve vodě. A proto probíhá v této oblasti rozsáhlý výzkum, který se zabývá různými metodami (např. hydrofilní polymer-PS konjugace, enkapsulace PS v koloidálních nosičích jako jsou olejové disperze, lipozomy či polymerní částice – mikro- a nanočástice) umožňující aplikaci hydrofobních PS do organismu. Navíc je snaha o přípravu takových systémů, které by cíleně dopravily PS do nádorové tkáně (jedná se o specifický targeting pomocí navázání monoklonálních protilátek či jiných molekul specificky vychytávaných nádorovou tkání na molekulu PS) a následně tak snížily výskyt vedlejších nežádoucích účinků PDT (především nežádoucí vliv na okolní zdravou tkáň).¹⁶

Vlastnosti ideálního transportního systému

Ideální transportní systém by měl umožnit selektivní kumulaci PS poškozenou tkání tak, aby v cílových buňkách byla přítomná terapeutická koncentrace PS a minimální či nulová koncentrace v okolních zdravých buňkách. Další vlastností takovýchto systémů musí být schopnost inkorporovat PS bez jakéhokoli ovlivnění či ztráty jeho aktivity. Vzhledem k vysoké pravděpodobnosti opakovaných aplikací PS během léčebného procesu vyvstává požadavek biodegradability systému a minimálního či žádného vyvolání imunitní reakce organismu na přítomnost transportního systému.⁶⁹

Jiným důvodem, proč se využívají nosiče pro transport PS, je vytvoření takového prostředí, ve kterém by se PS vyskytoval ve své monomerní formě. Vzhledem k jejich chemické struktuře má totiž mnoho PS sklon k agregaci ve vodném prostředí (tato agregace PS je dána snahou hydrofobní molekuly vyhnout se kontaktu s molekulami vody).⁷⁰

Další diskutovanou strategií v oblasti transportních systémů je využití receptorů cílové tkáně či antigenů, které by umožnily specifické vychytávání PS danými tkáněmi.¹⁶

1.8.1 PASIVNÍ TARGETING

Vzhledem ke skutečnosti, že transportní systémy jako jsou lipozómy, olejové disperze, biodegradabilní polymerní částice a hydrofilní polymer-PS konjugáty využívají přirozeně se vyskytující distribuční procesy v organismu, označujeme tento typ transportních částic jako pasivní targeting.⁶⁹ Mnoho studií ukázalo, že selektivní kumulace nosičů PS v nádorových tkáních je dána fenoménem známým jako „zvýšená permeabilita a retenční efekt“.

Zvýšená permeabilita cévní stěny (vedoucí k nekompletní endoteliální bariéře) a snížené lymfatické odvodnění v tumorózní tkáni (způsobené nedostatečným vytvořením lymfatického systému nebo lymfatickou obstrukcí) patří k mechanismům, které umožňují těmto částicím dosáhnout jejich cílové tkáně pouhou pasivní difuzí.¹⁶

1.8.1.1 Lipozómy

Lipozómy jsou multilamelární nebo unilamelární fosfolipidové submikroskopické částice, které umožňují inkorporaci lipofilních či hydrofilních léčiv do vnitřní matrix vzhledem k jejich částicové povaze (jedná se o koncentricky uspořádané lipidové dvojrstvy, které uzavírají vodný kompartment). Jejich hlavní součásti (fosfolipidy a cholesterol) jsou látky, které se ve velkém množství běžně vyskytují v organismu a tudíž zajišťují velmi dobrou biokompatibilitu těchto částic v těle.

Příprava lipozómů je hojně využívána jako efektivní přenašečový systém PS jak u experimentálních studií PDT, tak i při klinických zkouškách. Užitečný efekt těchto koloidálních nosičů byl popsán v řadě různých výzkumů, které ukázaly na výhody těchto systémů oproti ostatním, jako jsou např. vodné disperze PS.

Například Jori a kol. studovali farmakokinetický profil hematoporfyrinu (Hp) uzavřeného do malých unilamelárních dipalmitoylfosfatidylcholinových lipozómů ve srovnání s Hp rozpuštěným ve fosfátovém pufru (PBS). Po aplikaci těchto systémů do laboratorních myší s fibrosarkomem bylo pozorováno, že v případě lipozómů byla maximální koncentrace látky v nádorových buňkách mnohem vyšší než v případě PBS.¹⁶

Richter a kol. zase pro svůj výzkum použili jako PS benzoporfyrinový derivát verteporfin (BPD-MA), u kterého porovnávali biodistribuci a vylučování unilamelárních lipozomálních systémů (L-BPD-MA) oproti PS rozpuštěného v dimethylsulfoxidu (DMSO-BPD-MA) a PS rozpuštěného ve fosfátovém pufru (PBS-BPD-MA). Opět po intravenózní

aplikaci myším s rhabdomyosarkomem bylo zjištěno, že v případě L-BPD-MA bylo dosaženo významně vyšší koncentrace PS v nádorové tkáni. Na tomto poznatku je založeno použití lipozomálního transportního systému verteporfinu (Visudyne®) v PDT terapii senilní makulární degenerace. Tento způsob léčby je schválen ve Švýcarsku a USA.⁷¹

Jedním z předpokladů inkorporace PS do lipozómů je zachování monomerního (neagregovaného) stavu PS. Je totiž potvrzeno, že tato monomerní forma PS zvyšuje spotřebu kyslíku a je tedy fotodynamicky mnohem účinnější než agregovaný PS. Isele a kol. vyvinuli metodu ředění pomocí organického rozpouštědla, pomocí které inkorporovali monomerní Zn-ftalocyanin (ZnPc) do stabilních lyofilizovaných lipozómů složených ze směsi 1-palmitoyl-2-oleoylfosfatidylcholinu (POPC) a 1,2-dioleoylfosfatidylserinu (OOPS) v poměru 9:1. Vliv tohoto faktoru byl potvrzen v následujících studiích, ve kterých byl objeven vztah mezi různými stupni agregace ZnPc v lipozómech (vyjádřen jako procentuální zastoupení monomerní frakce ZnPc (% MF)) a farmakokinetickými a biodistribučními parametry. Po intravenózní aplikaci jednotlivých forem agregovaného ZnPc bylo zjištěno, že poločas eliminace látky z plasmy se zvyšuje se snižujícím se % MF ZnPc. Naopak selektivní vychytávání látky v nádorové tkáni stoupá se zvyšujícím se % MF ZnPc. Frakce ZnPc, u které došlo v lipozómu k agregaci, způsobila zvýšenou opsonizaci těchto lipozómů, což následně vedlo k jejich vychytávání makrofágy a snížení celkové koncentrace ZnPc v nádorové tkáni. Tento stupeň agregace může pravděpodobně ovlivnit schopnost transportu ZnPc lipozómů do lipoproteinů, které jsou důležitými přenašeči pro PS do nádorové tkáně. Bylo totiž zjištěno, že lipozómy mohou v krevním řečišti zprostředkovat přímý přenos látky (PS) do LDL (=low-density lipoproteins). Tento transport je nejspíš způsoben destabilizací lipozomální membrány pomocí HDL (=high-density lipoproteins), což vede ke zvýšení lipozomální permeability. Nedostatek cholesterolu v lipozomální dvojvrstvě je pak na základě tohoto poznatku hlavním faktorem, který zesiluje destabilizaci membrány.¹⁶

1.8.1.2 Oleјové disperze a micelární systémy

Disperzní systémy obsahující emulgátor a micelární systémy patří k dalším koloidálním systémům, které jsou testovány v PDT. V takovýchto soustavách dochází k významnému zvýšení rozpustnosti fotosenzitizéru.¹⁶

Oleјové disperze

Disperze obsahující jako emulgátor Cremofor-EL (= neionogenní polyethoxylovaný ricinový olej (CRM)) patří k dalším alternativám, které řeší problém s rozpustností hydrofobních PS. Tyto disperze jsou používány pro přípravu parenterálních formulací.¹⁶ Selman a kol. využili CRM v PDT studiích jako nosič pro purpurinové deriváty, které následně sloužily jako PS v terapii rakoviny močového měchýře u laboratorních myši. Tyto PS byly dispergovány v CRM a v cytotoxických zkouškách vykázaly výrazný pokles nádorových buněk v mnohem nižších dávkách než v případě HpD. Následující studie provedená stejnou výzkumnou skupinou ukázala, že pokud se použije Sn etiopurpurin (SnET₂) v dávce 1 mg/kg, je dosaženo stejné terapeutické odpovědi v místě nádoru (100% vyléčení nádoru) jak u CRM disperze, tak u PS obsaženého v DPPC lipozómech. Naopak v případě nižších dávek bylo vyšší cytotoxické aktivity dosaženo pouze u CRM disperze.^{72,73}

Kessel a kol. byli dalšími, kteří provedli srovnávací studii fotobiologických vlastností SnET₂ u jeho ethanického roztoku v porovnání se třemi typy nosičů: CRM, γ -cyklodextrin (γ -CD) a molecusol (MOL; = ve vodě více rozpustný cyklodextrinový derivát). Došli ke zjištění, že kumulace látky v nádorových buňkách je závislá na čase a na teplotě pro CRM, γ -CD a MOL, následkem čehož je lokalizace PS v buněčných strukturách a vysoce efektivní zničení nádorové tkáně. Mezi těmito třemi nosiči způsobil CRM velmi efektivní fotodestrukci nádorové tkáně, přičemž intenzita tohoto účinku je závislá na intracelulární koncentraci látky.⁷⁴

Další studie prováděné s SnET₂ se zabývaly vazbou tohoto PS na lipoproteiny. Bylo potvrzeno, že hladina SnET₂ vázaného na LDL je závislá na lipofilním charakteru nosiče, tzn. pořadí těchto nosičů je následující: CRM > γ -CD > DPPC lipozómy. Přednostní vychytávání hydrofobních PS dispergovaných v CRM nádorovou tkání je přisuzováno distribuci zprostředkované lipoproteiny. Ve skutečnosti je úspěšnost CRM spojena s degradací plasmatických lipoproteinů vyúsťující ve vznik „pseudo-LDL“, což je nový druh molekuly, který však má elektroforetické chování lipoproteinů. Toto bylo potvrzeno Woodburnem a

kol., kteří porovnávali relativní biodistribuci ketochlorinu solubilizovaného pomocí CRM a polyethylensorbitan monoleátu (Tween[®] 80). Vysoká koncentrace CRM (>0,03%) způsobila změny v elektroforetickém chování HDL, který byl následně přeměněn na produkt o stejné molekulové hmotnosti jako LDL. Zvyšující se množství CRM podporuje vazbu látky na LDL a naopak snižuje vazbu na albumin. *In vivo* PDT studie prokázaly, že vyšší fotodynamická účinnost je přisuzovaná právě CRM systémům.¹⁶

Vzhledem ke všem zjištěným experimentálním údajům se dají CRM disperze považovat za vhodný transportní systém pro hydrofobní PS. Nevýhodou ale je, že po parenterálním podání formulací obsahujících CRM jako emulgátor byla hlášena řada akutních anafylaktických reakcí. Přítomnost CRM je pravděpodobně příčinou těchto reakcí a riziko jejich výskytu souvisí s dávkou a rychlostí infuze. Mechanismus této hypersenzitivní reakce podrobně popsal Dorr a kol. V současné době je stále obtížné zcela se vyhnout těmto neakceptovatelným vedlejším účinkům, avšak přesto může být jejich intenzita snížena pomocí nízké rychlosti podávání PS do organismu a pomocí premedikace antihistaminiky a kortikosteroidy.¹⁶

Micelární systémy

Na základě těchto nežádoucích účinků CRM probíhá rozsáhlý výzkum pH-senzitivních polymerních micelárních systémů, které představují slibnou alternativu pro přenos PS místo disperzních systémů využívající CRM.

In vitro provedená studie využívající jako PS chlorohlinitý komplex ftalocyaninu (AlClPc) inkorporovaný do různých typů polymerních micel ukázala, že PS v těchto micelárních soustavách vykazuje vyšší fototoxicitu proti nádorovým buňkám než PS dispergovaný pomocí CRM. Nicméně při provedení *in vivo* studie se došlo k závěru, že oba dva typy transportních systémů AlClPc vykazují přibližně stejnou účinnost i přes poměrně vysokou clearance z krevního řečiště, jejich kumulaci ve zdravých tkáních a nízké vychytávání nádorovou tkání.⁷⁵

Emulze, které obsahují fosfolipidy, sojový olej nebo Miglyol 812 a jako vodnou fázi 2,5% glycerol v destilované vodě, se rovněž používají jako transportní systémy pro PS ze skupiny benzochlorinových derivátů.¹⁶

1.8.1.3 Polymerní částice

Biodegradabilní nanočástice, které jsou považovány za alternativu lipozómů, získávají v posledních letech ohromnou pozornost jako možné transportní systémy v terapii nádorových onemocnění pomocí PDT. Jejich největší výhodou tkví v přenosu velkého množství PS a v možnosti ovlivnit rychlost uvolňování PS z těchto částic. Dalšími výhodami je rozsáhlý výběr materiálů a výrobních procesů, pomocí kterých můžeme nanočástice získat.¹⁶

V této oblasti již byla provedena řada experimentálních studií. Různé výzkumy s hematoporfyrinem⁷⁶, ftalocyaniny⁷⁷ či m-THPC⁷⁸ zabudovanými do biodegradabilních nanočástic poskytly povzbuzující výsledky. Labib a kol. použili tetrasulfonovaný zinečnatý komplex ftalocyaninu ($ZnPcS_4$) nebo hlinitý komplex naftalocyaninu, které opouzdřili do poly(isobutylkyanoakrylátových) (PIBCA) nebo poly(ethylbutylkyanoakrylátových) (PEBCA) nanokapslí nebo nanosfér. V následující studii bylo zjištěno, že tato nanoenkapsulace zvyšuje lokalizaci PS v buňkách, což má za následek velmi dobrou *in vitro* fototoxickou aktivitu.⁷⁷

Další výzkumné skupiny se zabývaly inkorporací ftalocyaninových derivátů do nanočástic tvořenými polyestery jako je např. poly(D,L-mléčná kyselina) (PLA). Allémann a kol. provedli srovnávací studii fotodynamické aktivity dvou různých transportních systémů zinečnatý komplex hexadekafluorovaného ftalocyaninu ($ZnPcF_{16}$) – PLA nanočástice a CRM disperze. Při použití dávky 5 $\mu\text{mol/kg}$ došlo k potlačení nádoru u 100% laboratorních myší, kterým byl aplikován PS ve formě nanočástic, zatímco při aplikaci CRM emulze byl účinek PDT potvrzen pouze u 60% myší.

Dalšími polymerními částicemi zkoumanými v PDT studiích jsou mikrosféry větší než 1000 nm. Doposud zaznamenané studie se však zabývají pouze hydrofilními PS. Bachor a kol. tak ke svému výzkumu použili chlorin e_6 konjugovaný v polystyrenových mikrosférách (Ce_6 -MS), u kterého zjistili, že vykazuje mnohem vyšší fototoxický účinek ve srovnání s nekonjugovanou látkou v ekvivalentní dávce. Také se ukázalo, že vychytávání Ce_6 -MS buňkami je 20krát vyšší než u volné látky, a že Ce_6 -MS je 10krát fototoxičtější (to vede k úplné inhibici nádorových buněk).

Přes tyto všechny poměrně zajímavé výsledky je *in vivo* aplikace těchto mikročástic nevhodná, protože polystyrenové částice nejsou biodegradabilní.¹⁶

1.8.1.4 Polymer-PS konjugáty

Poměrně zajímavé možnosti v oblasti transportních systémů skýtá konjugace PS s vhodnými polymery jako jsou N-(2-hydroxypropyl)methakrylamid (HPMA), poly-L-lysin, polyethylenglykol (PEG) nebo polyvinylalkohol (PVAL), což vede ke zvýšení hydrofility PS. U PS navázaných na polymery probíhá v současné době rozsáhlý výzkum a tyto systémy se zdají být slibnými pro PDT aplikaci ve srovnání s volnými PS. Jejich výhodami jsou prodloužený poločas v krevním řečišti, zvýšená selektivita k nádorové tkáni a velmi dobrá PDT účinnost.¹⁶

Byla provedena studie, která porovnávala biodistribuci a farmakokinetické vlastnosti AICIPc v různých transportních systémech: CRM disperze, konjugát PS s PEG a konjugát PS s PVAL. Z těchto třech systémů měl nejlepší farmakokinetický profil AICIPc-PVAL, který vykazoval nejdelší cirkulační poločas v plasmě, rovněž u něho byla prokázána nejnižší retence játry, slezinou a plicemi, nejlepší poměr koncentrace PS v nádorové tkáni ku koncentraci PS v kůži, nejlepší poměr koncentrace PS v nádorové tkáni ku koncentraci PS ve svalech a také nejvyšší a nejtrvalejší selektivní vylučování PS nádorovou tkání.⁷⁹

Dalším fotosenzitizérem, který byl studován jako konjugát s polymerem, je m-THPC. Ten byl navázán na PEG a vytvořený konjugát (PEG-m-THPC) se ukázal být efektivní při zpomalení růstu nádorové tkáně v ekvimolárních dávkách m-THPC. Dokonce se potvrdilo, že PEG-m-THPC je ještě více efektivní při indukci nekrózy nádorových buněk, což bylo dokázáno na modelech některých nádorů. Navíc má tato nekróza minimální dopad na okolní zdravé buňky.

Je důležité podotknout, že jedním z nejčastěji používaných polymerů pro konjugaci s PS je právě PEG. Ten má však velmi často různou délku řetězce, což způsobuje problémy s porovnáváním výsledků jednotlivých studií prováděných s tímto polymerem. Délka PEG řetězce může totiž ovlivnit farmakokinetické chování celého systému.¹⁶

1.8.2 DLOUHO CIRKULUJÍCÍ TRANSPORTNÍ SYSTÉMY

Terapeutické využití koloidálních nosičů aplikovaných intravenózně je značně omezeno schopností mononukleárního fagocytárního systému (MFS) odstraňovat tyto částice z krevního řečiště poměrně vysokou rychlostí. Následkem tohoto procesu dochází k nedostatečnému vychytávání koloidálních nosičů či samotného PS cílovými tkáněmi.

Fagocytující buňky mají schopnost odstraňovat tyto částice na základě opsonizace – jedná se o adsorpci ligandů, které jsou schopné interagovat s receptory přítomnými na povrchu fagocytujících buněk. *In vivo* studie prokázaly, že interakce opsoninu (ligandu) s částicí závisí na fyzikálně – chemických vlastnostech dané částice jako jsou hydrofobicita, iontový náboj, velikost a fluidita jejího povrchu. Bylo již podniknuto mnoho kroků, které se snaží předcházet vychytávání těchto nosičů pomocí MFS. Jedná se např. o blokádu MFS pomocí saturace nebo o modifikaci povrchu částic (náboj, hydrofilicita, sterická stabilizace). Při terapii nádorových onemocnění však není blokáda MFS žádoucí, protože peritoneální makrofágy a žírné buňky se aktivně účastní na protinádorové imunitní reakci (kontrolují tak rozvoj a rozšiřování nádoru). Proto se všechny další výzkumy odebírají hlavně cestou modifikace povrchu částic.¹⁶

Na základě různých studií bylo potvrzeno, že všeobecně probíhá adsorpce opsoninů mnohem častěji na hydrofobní nežli hydrofilní povrchy, což způsobuje výrazné odstraňování hydrofobních částic z krevního řečiště. Aby se předešlo tomuto jevu, byly prováděny různé modifikace povrchových vlastností koloidálních částic, které zcela zamezily nebo případně minimalizovaly jejich *in vivo* rozpoznávání a vychytávání pomocí MFS. Toto snížení clearance koloidálních nosičů umožnilo zvýšení celkové koncentrace PS v cílové tkáni.

Zvýšení hydrofility povrchů koloidálních nosičů je možné několika různými způsoby: pokrytím povrchu částic pomocí hydrofilní vrstvičky tvořené např. poloxamery, poloxaminy či PEG, nebo vmezeřením gangliosidů (např. GM₁) do lipidové dvojvrstvy lipozómů.¹⁶

Allémann a kol. porovnávali biodistribuci ZnPcF₁₆ umístěného ve třech různých typech transportních systémů: PLA nanočástice (PLA-NČ), CRM a PLA nanočástice potažené PEG (PEG-PLA-NČ). Výsledky výzkumu ukázaly značné rozdíly v distribuci ZnPcF₁₆ v organismu. V případě nepokrytých nanočástic (PLA-NČ) došlo k jejich výrazné clearance z krevního řečiště a vysoké koncentrace PS byly nalezeny v játrech, slezině a plicích. Maximálních koncentrací PS v nádorové tkáni bylo dosaženo u jednotlivých systémů v různých časových okamžicích, přičemž nejvyšší koncentrace PS v nádorových buňkách

bylo dosaženo v případě PEG-PLA-NČ. PEG-PLA-NČ se ukázal být také nejúčinnější při terapii EMT-6 nádoru, kdy po podání PS v dávce 5 $\mu\text{mol/kg}$ došlo k vyléčení 100% laboratorních myší podrobených výzkumu, zatímco u CRM disperze se jednalo pouze o 60%.⁸⁰

Protektivní účinek poloxamerů byl následně prostudován Lenaertsem a kol. Zabývali se vlivem třech různých poloxamerů (238, 403, 407) použitých na pokrytí nanokapsulí obsahující ZnPc na jejich distribuci po intravenózní aplikaci zdravým myším. Za těchto podmínek se ukázalo, že poloxamer 403 je nejméně účinný oproti dvěma zbývajícím. Tato skutečnost je vysvětlována kvůli jeho krátkým postranním řetězcům, které umožňují pouze slabé pokrytí hydrofobního povrchu částic a tudíž velmi nízké zvýšení jejich hydrofilicity. Tímto se potvrdil vztah mezi sníženým vychytáváním částic z krevního řečiště a zvyšující se tloušťkou ochranné vrstvy. Nanočástice, které jsou potažené větším množstvím hydrofilních molekul, se také minimálně hromadí v játrech a slezině. Na druhou stranu však není zvyšující se hydrofilita vhodná, pokud jsou na povrch částice navázány skupiny, které naopak komplement aktivují (např. hydroxylové skupiny). Účinnost stérického stínění, které je dalším mechanismem zabraňující opsonizaci částic a zvyšující cirkulaci v krevním řečišti, závisí na molekulové hmotnosti, povrchové hustotě částic a na délce řetězce použitého polymeru.

Další způsob, pomocí kterého se dá prodloužit setrvání částic, respektive lipozómů, v krevním oběhu, je modifikace fosfolipidové dvojvrstvy lipozómů pomocí různých vhodných sloučenin. Oku a kol. použili BPD-MA umístěný do lipozómů, jejichž lipidová dvojvrstva je modifikovaná pomocí palmitoyl-D-glukuronidu. Tento modifikovaný lipozóm se ukázal být velmi efektivní při redukcii růstu nádoru v porovnání s nemodifikovanými lipozómy či BPD-MA solubilizovaného pomocí DMSO. Zároveň nebyly pozorovány žádné vedlejší účinky (např. nedošlo k váhovému úbytku u testovaných myší).¹⁶

1.8.3 AKTIVNÍ TARGETING

Za účelem zvýšení selektivity vychytávání PS nádorovými tkáněmi se nejnovější výzkumy ubírají cestou aktivního targetingu, který spočívá v existenci konjugátů obsahující PS a tu část, která se specificky váže na receptory přítomné v cílové tkáni (vazebné místo).

Teoreticky má tento způsob transportu PS řadu výhod oproti předešlým transportním systémům. Jednak je to velmi vysoká afinita vazebného místa k receptoru či antigenu na povrchu cílových buněk, dále přímá či vysoce specifická lokalizace zvyšující efektivitu a selektivitu PS a nakonec z toho vyplývající nižší efektivní dávka PS.

Oproti těmto výhodám je účinnost takovéto strategie ovlivněna řadou faktorů, mezi které patří stabilita vytvořeného konjugátu v krevním řečišti, ochrana proti možné inaktivaci během transportu, schopnost konjugátu prostupovat fyziologickými bariérami a nakonec je to požadavek netoxicity, neimunogenity a biodegradability celého systému.

Výše uvedeným požadavkům vyhovují dva typy systémů: lipoproteiny zprostředkovaný transport PS a konjugáty PS s monoklonálními protilátkami.¹⁶

1.8.3.1 Lipoproteiny zprostředkovaný transport PS

Na základě existence přímého vztahu mezi relativním počtem lipoproteinových receptorů na povrchu různých nádorů a vychytáváním PS maligními buňkami, je v posledních letech soustředěna velká pozornost na klinické využití plasmatických lipoproteinů. Ze všech druhů lipoproteinů se LDL (low-density lipoproteins) zdají být těmi nejdůležitějšími v transportu a uvolňování PS do nádorových buněk.

Tento mechanismus může být vysvětlen na základě skutečnosti, že nádorové buňky patří k velmi rychle se množícím buňkám a navíc se vyznačují vysokou permeabilitou. Exprese LDL receptorů na povrchu těchto buněk je regulována potřebou cholesterolu. Je všeobecně známo, že rychle se množící tkáň vykazuje vysokou poptávku po cholesterolu, který je potřebný pro syntézu buněčné membrány. Cholesterol získávají buňky buď de novo syntézou nebo vychytáváním LDL z okolí pomocí receptorů (Apo B/E receptory) nebo procesem, který není zprostředkovaný receptory (pasivní difúze). Navíc mnoho nádorových buněk ztratilo kontrolu nad normálními regulačními mechanismy a exprimují tak abnormálně vysoké množství LDL receptorů oproti zdravým buňkám.¹⁶

Tyto endogenní částice jsou složeny z lipofilního jádra, které je z velké části tvořeno estery cholesterolu, a z povrchové vrstvičky (obalu), která je tvořena fosfolipidy, neesterifikovaným cholesterolem a „rozpoznávací“ částí představovanou apoproteinem B-100, který je tím nejdůležitějším prvkem pro targeting.

Lipoproteiny používané jako transportní systémy PS se vyznačují řadou následujících výhod. Díky jejich endogennímu původu se předchází rozpoznávání těchto částic MFS, což vede k delšímu setrvání v plasmě a v biologických tekutinách, a navíc nevyvolávají imunitní reakci organismu. Jejich poměrně malá velikost (v průměru 10-23 nm) umožňuje difúzi přes cévní membránu a jejich nepolární jádro představuje významný depo pro lipofilní látky, které jsou tak dokonale chráněny před krevním prostředím během transportu. Přičemž umístění PS v lipofilním jádře lipoproteinů nemá žádný vliv na jejich rozpoznávání buněčnými receptory.⁸¹

Mnoho studií již potvrdilo, že LDL se zdají být velmi výhodnými transportními systémy pro řadu látek a navíc zvyšují účinnost a selektivitu tohoto aktivního targetingu. Nicméně selektivita tohoto targetingu závisí na míře vychytávání LDL nádorovou tkání. Hydrofobní PS jsou samovolně inkorporovány do lipidového jádra lipoproteinů bez jakékoliv změny fyzikálních či biologických vlastností těchto částic. Výsledný komplex se ukázal být velmi účinný terapii nádorů u zvířat.¹⁶ Candide a kol. předvedli, že je možné inkorporovat až 130 molekul Photofrinu® II (P2) do jedné částice LDL. Přitom nebylo pozorováno žádné viditelné ovlivnění interakce mezi LDL a jeho specifickým receptorem přítomným na povrchu cílových buněk. Přesto došlo jen k mírnému zvýšení negativního náboje LDL. Při porovnávání účinnosti transportu P2 na základě třech různých mechanismů, LDL-P2, HDL-P2 a vodný roztok P2, bylo zjištěno, že přenos PS pomocí LDL je přibližně třikrát účinnější nežli pomocí HDL. Vodný roztok P2 se ukázal být nejméně účinný, což je vysvětlováno agregací P2 ve vodě. Ta následně ovlivňuje chemické vlastnosti P2. Toto může vést ke změně distribuce látky mezi sérové proteiny a negativnímu vlivu na kumulaci PS v nádorové tkáni.⁸²

Na základě několika studií bylo doloženo, že PS smíchané nekovalentně s LDL ještě před aplikací vedou ke zvýšení fotodynamické účinnosti ve srovnání se samostatně podaným PS. Barel a kol. zaznamenali, že po intravenózním podání hematoporfyrinu asociovaného se třemi hlavními lipoproteiny (VLDL, LDL a HDL) došlo k různorodé efektivitě těchto komplexů. Specifické vychytávání Hp-LDL komplexu nádorovými buňkami bylo mnohonásobně vyšší než v případě Hp-HDL, Hp-VLDL či samotného Hp.¹⁶

Reddi a kol. provedli srovnávací farmakokinetickou studii ZnPc, který inkorporovali buď do DPPC lipozómů (ZnPc-DPPC) nebo vytvořili jeho komplex s lidským LDL (ZnPc-LDL), a ty následně aplikovali do laboratorních myši s MS-2 fibrosarkomem. Zjistili, že bez ohledu na typ použitého transportního systému je kinetika eliminace látky ze séra dvoufázová: eliminace většího množství látky (~70%) je následovaná pomalou fází eliminace. Maximální kumulace PS v nádorové tkáni bylo dosaženo v případě ZnPc-LDL, která byla dvakrát vyšší než u ZnPc-DPPC. Tato maxima však měla velmi krátké trvání, protože poměrně rychle došlo ke snížení jejich koncentrace v nádoru. Přesto se ukázalo, že pouhým jednoduchým smícháním PS s LDL docházelo k redistribuci PS mezi nenádorové plasmatické proteiny. Toto je jednoznačně způsobeno nestálou interakcí mezi PS a LDL, která značně omezuje targeting PS do nádorových buněk. Aby se předešlo tomuto problému, byla již řadou autorů použita chemická vazba PS na LDL.⁸³ Např. Schmidt-Erfurth a kol. navázali kovalentně pomocí peptidové vazby Chlorin (Ce_6) na LDL, přičemž optimální poměr Ce_6 a LDL, při kterém je dosaženo maximální účinnosti vychytávání komplexu, je 50:1. Při tomto poměru je vychytávání konjugátu cílovými buňkami tři až čtyřikrát vyšší než u samotné látky, zatímco vychytávání směsi Ce_6 a LDL vedlo v podstatě k neselektivnímu vychytávání volné látky.⁸⁴

Ačkoliv byly všechny předešlé poznatky získány na základě *in vitro* pozorování u zvířecích modelů, objevila se u klinického využití lipoproteinů jako transportních systémů řada problémů. Údaje získané testováním na zvířatech totiž není možné přenést na lidský organismus, protože složení sérových proteinů je odlišné jak mezi jednotlivými zvířecími druhy, tak mezi jedinci téhož organismu, a je současně ještě ovlivněn fyziologickými vlastnostmi daného jedince (např. metabolické funkce) a dietním režimem.¹⁶

1.8.3.2 Protilátkami zprostředkovaný transport

Protilátkami zprostředkovaný transport PS patří k dalšímu způsobu, pomocí kterého se dá zvýšit specifita PDT a zároveň snížit vedlejší nežádoucí účinky spojené s touto terapií. Tato strategie je založena na spojení PS s monoklonálními protilátkami (MoAb) proti specifickým antigenům na povrchu maligních buněk. Dá se říci, že MoAb tak vytvářejí obrovskou možnost v usnadnění transportu různých látek do požadovaných cílových struktur a to na základě specifické interakce MoAb s daným antigenem. Je všeobecně známo, že mezi nádorovými a zdravými buňkami existují charakteristické odlišnosti, jako je např. zvýšená exprese specifických antigenů a onkoproteinů na povrchu nádorových buněk.

Některé *in vitro* výzkumy imunokonjugovaných PS vedly k velmi povzbuzujícím výsledkům, především u malých nádorů vhodných pro tento typ terapie. Zjistilo se, že spojení MoAb s molekulami obsahující PS a cytotoxické látky je možné bez jakékoliv významné ztráty aktivity PS či specifity MoAb. Výsledky těchto pozorování také odhalily, že je potřeba poměrně nízká dávka imunokonjugátu, která vyvolá vysoce selektivní fototoxický účinek ve srovnání s PS a MoAb použitých samostatně.¹⁶

Mew a kol. byli mezi prvními, kteří provedli předběžnou studii týkající se použitelnosti fotoimunoterapie jako potenciální léčby rakovinových onemocnění. Jejich výzkum spočíval v přímém navázání anti-myosarkom M1 (anti-M1) na hematoporfyrin pomocí peptidové vazby. *In vitro* fototoxické zkoušky ukázaly, že anti-M1-Hp konjugát odstranil až 95% T1-nádorových buněk, zatímco ekvivalentní koncentrace Hp nebo MoAb nevykázala na růst nádoru žádný efekt. *In vivo* zkouška protinádorové aktivity potvrdila, že anti-M1-Hp konjugát potlačuje růst nádorových buněk při desetkrát nižší koncentraci než v případě samotného Hp.⁸⁵

Přímé spojení molekul PS s MoAb je poměrně snadno proveditelné a to navíc za velmi mírných podmínek. Nicméně tato skutečnost neposkytuje dostatečné uspokojení, neboť se zvyšujícím se stupněm substituce dochází k významnému snížení antigenní specifity MoAb. Ztráta protilátkové aktivity je pravděpodobně způsobená některými modifikacemi fyzikálně-chemických vlastností MoAb. Toto značně omezuje celkové množství látky, které lze navázat na jednu molekulu MoAb. Navíc vazba hydrofobního PS může ovlivnit rozpustnost protilátky a tím tak ještě více snížit množství PS, který může být transportován.

Pro vyřešení tohoto problému doporučují někteří autoři „spojovací rameno (tzv. „spacer arm“), ve kterém je PS spojen s MoAb přes polysacharid nebo polymerní nosič, jako

je např. dextran, polyglutamová kyselina (PGA) nebo PVAL. Výhodou této nepřímé metody je možnost navázání velkého počtu molekul PS na jednu molekulu MoAb. Tuto strategii poprvé popsal Oseroff a kol., kteří navázali Ce_6 na MoAb proti T-buňkám (anti-Leu-1) pomocí dextranu. Tímto způsobem se získal imunokonjugát, ve kterém 1 mol MoAb vázal 36 mol PS, přičemž bylo zachováno více než 85% vazebné aktivity MoAb na antigen. Určitou nevýhodou této vazebné metody je riziko vzájemné interakce jednotlivých MoAb mezi sebou na základě přítomnosti volných aminoskupin dextranu. To může způsobit tvorbu vysokého stupně agregátů a následně vést ke snížení účinnosti PDT.¹⁶

Nedávno byla též přednesena metoda využívající pro přípravu fotoimunokonjugátu poly-L-lysin jako spojovací molekulu, která je schopná navázat více molekul Ce_6 a která umožňuje zavedení polykationických a polyanionických nábojů do molekuly. Oba odlišně nabitě imunokonjugáty si zachovávají většinu své imunoreaktivity a vykazují mnohem více selektivní vychytávání a fototoxicitu proti lidským kolorektálním nádorovým buňkám nežli volný Ce_6 . V předcházející studii bylo zjištěno, že jak velikost, tak i náboj konjugátů mají zásadní vliv na biodistribuci látky. *In vitro* bylo pozorováno, že kationický konjugát je schopen dopravit čtyřikrát více Ce_6 do cílových buněk nežli jeho anionický konjugát. Na druhou stranu se však během *in vivo* zkoušek zjistilo, že polyanionický konjugát poskytuje po intravenózním podání mnohem vyšší kumulaci látky v nádorových buňkách než kationický konjugát a navíc dochází ke zřetelnému zvýšení vychytávání látky nádorovou tkání oproti okolní zdravé tkáni. Při intraperitoneálním podání je však vyššího množství látky, které se dostane do nádorové tkáni, dosaženo pomocí kationického konjugátu. Závěr vyplývající z těchto studií je, že polyanionické konjugáty jsou výhodnější pro intravenózní aplikaci, zatímco polykationické konjugáty poskytují lepší výsledky při aplikaci do tělních dutin.¹⁶

Velmi často je též popisována skutečnost, že u PS-MoAb konjugátů dochází k velmi rychlé eliminaci z krevního řečiště ve srovnání s nekonjugovanými látkami. Vrouenraets a kol. dokázali, že po intravenózní aplikaci m-THPC navázaného na MoAb U36 byla clearance z krevního řečiště více vyjádřena u konjugátů, které obsahovaly vysoký počet molekul m-THPC na jednu molekulu MoAb U36. Konjugát m-THPC-MoAb U36 byl během *in vitro* zkoušek fotodynamicky účinný, avšak znatelně méně nežli ekvimolární dávka volného m-THPC.⁸⁶

Odlišným způsobem, jak zvýšit množství PS transportovaného pomocí molekuly MoAb, je využití koloidálních přenašečových systémů, které jsou pokryty molekulami MoAb. Bylo prokázáno, že specifický transport látek do cílových tkání je daleko více účinný při použití koloidálních nosičů pokrytých MoAb nežli v případě systémů bez protilátky.

Navíc zde existuje možnost pokrýt povrch těchto částic obrovským počtem molekul MoAb (např. v průměru 935 molekul MoAb na jeden lipozóm). MoAb poté můžou být na povrch koloidálních nosičů (např. lipozómy a polymerní částice) navázány buď nekovalentně (specifická adsorpce jednoduchou inkubací molekul PS a MoAb) nebo kovalentní vazbou. Morgan a kol. uzavřeli hlinitý komplex sulfonovaného ftalocyaninu (AlSPc) do lipozómů, na jejichž povrch navázali MoAb 791 T/36. *In vitro* provedené fotodynamické zkoušky na dvou buněčných liniích potvrdily okamžitou produkci volných radikálů a vysoce specifické usmrcení nádorových buněk ve srovnání s kontrolní buněčnou linií, která neobsahovala příslušný antigen. Tento cytotoxický efekt samozřejmě závisí na koncentraci látky, hustotě antigenů na povrchu cílových buněk a na časovém okamžiku, kdy dojde k ozáření tkáně světlem vhodné vlnové délky. Bohužel pouze omezený počet preklinických studií provedených *in vivo* potvrdil úspěšný transport těchto částic pokrytých MoAb, jelikož docházelo k jejich častému vychytávání MFS. Intrakavitální aplikace imunokonjugátů přímo do okolí nádorové tkáně tak představuje jeden ze způsobů, jak omezit MFS vychytávání.¹⁶

Přes všechny povzbuzující výsledky získané *in vitro* musí být ještě vyřešena řada problémů související s použitím těchto konjugátů v klinických zkouškách. *In vivo* účinnost PS-immunokonjugátů totiž závisí na několika faktorech, které mohou ovlivnit dosažení nádoru a protilátkami zprostředkovanou lokalizaci v nádoru. Navíc nádorová tkáň nemá statický charakter, neustále dochází ke změnám v antigenním profilu nádorových buněk, což následně vede ke ztrátě specifických receptorů, down-regulaci či skrytí receptorů. Tato snížená hustota antigenů zamezuje efektivní lokalizaci MoAb konjugátů a je jedním z hlavních důvodů selhávání terapie pomocí imunokonjugátů. Pro vyřešení tohoto problému navrhla řada autorů použití různých typů MoAb, které by účinkovaly proti různým antigenům přítomným na povrchu nádorových buněk s cílem dosažení maximálního fototoxického účinku.

Další problém, se kterým se potýká využití imunokonjugátů, je takový, že většina protilátek používaných v klinických zkouškách je myššího původu, tudíž jejich opakovaná aplikace do lidského organismu může vyvolat protilátkovou reakci. Myší MoAb konjugáty jsou v organismu rozpoznány jako cizí částice a následně jsou zneutralizovány lidskými protilátkami. To samozřejmě vede ke zvýšenému odstraňování konjugátů z krevního řečiště a nízké koncentraci PS-MoAb v nádorových buňkách. Kvůli snížení imunogenicity již byla podniknuta řada výzkumů. Na jejich základě bylo navrženo použití lidských protilátek jako částic regulujících targeting PS do cílové tkáně současně spojených se snížením intenzity imunitní odpovědi (např. využití imunosupresivních látek jako je třeba cyklosporin A).

Zvýšení fotodynamických selektivních účinků a snížení požadované dávky PS může být rovněž dosaženo na základě použití molekul specificky vychytávaných nádorovými tkáněmi místo MoAb, jako jsou např. růstové faktory (např. epidermální růstový faktor), specifické proteiny (např. transferin) nebo hormony (např. insulin). Tyto molekuly mohou být buď přímo spojeny s PS nebo pomocí některých hydrofilních spojovacích článků jako je např. albumin, dextran či PVAL. Například Akhlynina a kol. potvrdili, že nejlepší fotodynamická aktivita proti nádorovým buňkám s hepatomem byla dosažena právě při použití konjugátu sérového albuminu s insulinem a Ce_6 (BSA-insulin- Ce_6). Přes tyto všechny zajímavé výsledky je však použití insulin-PS konjugátu v protinádorové terapii omezeno skutečností, že buněčné linie s hepatomem nemají na svém povrchu velké množství insulinových receptorů.¹⁶

1.9 CÍL PRÁCE

Použití fotosenzitizérů v terapii nádorových, ale i dalších nezhoubných onemocnění se zdá být velmi výhodné a perspektivní. V praxi však jejich využití naráží na řadu problémů týkající se především poměrně špatné rozpustnosti těchto látek nejen ve vodě, ale i v organických rozpouštědlech a z toho vyplývající potíže s aplikací. Toto lze ovšem překlenout jednak modifikací PS na periferii nebo vytvořením vhodného transportního systému (jako jsou např. lipozómy, olejové disperze, micelární systémy, transport pomocí polymerních částic, polymer-PS konjugáty).

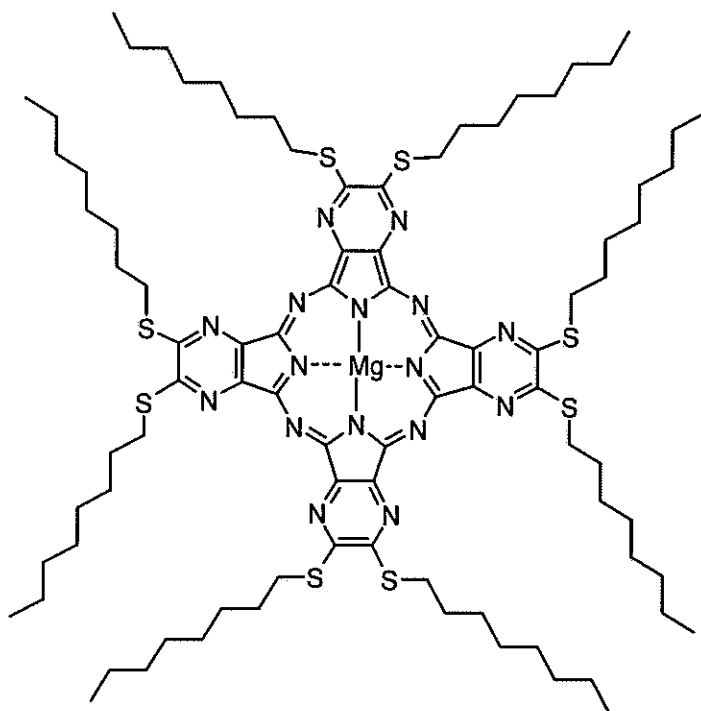
Mým úkolem bylo pokusit se právě o solubilizaci vybraných potenciálně fotodynamicky aktivních látek pomocí různých solubilizátorů a emulgátorů. U takto vytvořených soustav jsem po určité době zhodnotila jejich vzhled a stabilitu. Systémy, které se chovaly jako dostatečně stabilní i po delším časovém úseku, byly následně podrobeny testování na cytotoxické a fototoxické vlastnosti ve výzkumném centru v Praze. Na základě zjištěných výsledků jsem určila ty soustavy, které by nejlépe vyhovovaly obecným požadavkům na takové systémy.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 FOTOSENZITIZÉRY

V následujících pokusech jsem použila níže uvedená barviva:

ZIP-T-44Mg



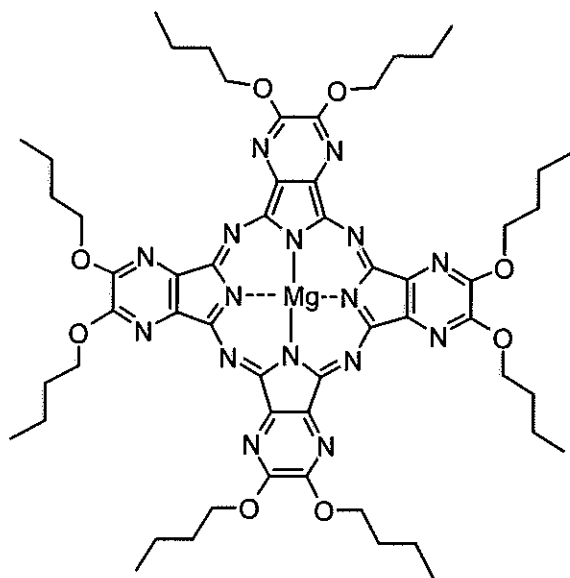
2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(oktylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninato
hořečnatý komplex

relativní molekulová hmotnost = 1699,00 g/mol

molekulární vzorec = $C_{88}H_{136}MgN_{16}S_8$

procentuální zastoupení prvků: C 62,21%; H 8,07%; Mg 1,43%; N 13,19%; S 15,10%

ZIP-T-37Mg



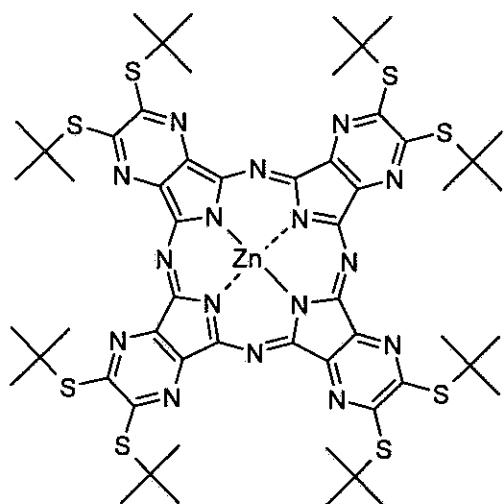
2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(butoxy)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninato hořečnatý komplex

relativní molekulová hmotnost = 1121,61 g/mol

molekulární vzorec = $C_{56}H_{72}MgN_{16}O_8$

procentuální zastoupení prvků: C 59,97%; H 6,47%; Mg 2,17%; N 19,98%; O 11,41%

ZIP-21Zn



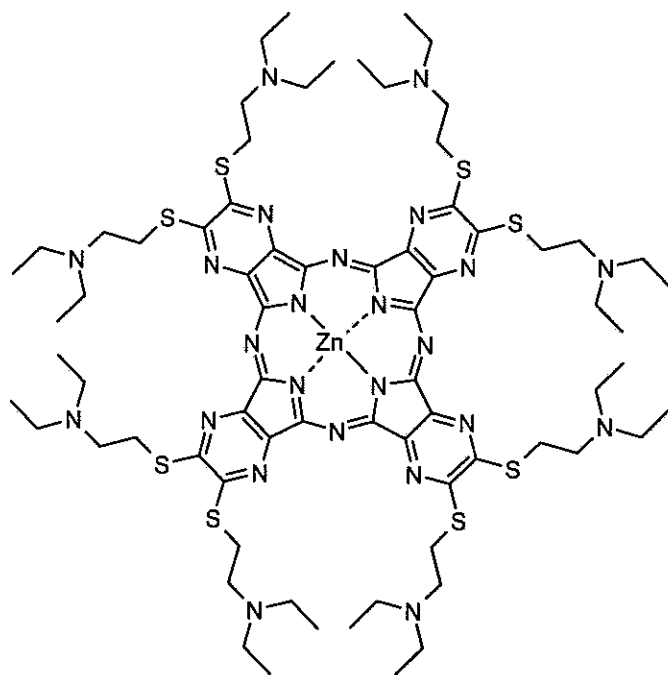
2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(*tert*-butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninato zinečnatý komplex

relativní molekulová hmotnost = 1291,19 g/mol

molekulární vzorec = C₅₆H₇₂N₁₆S₈Zn

procentuální zastoupení prvků: C 52,09%; H 5,62%; N 17,36%; S 19,87%; Zn 5,06%

ZIP-65Zn·8HCl



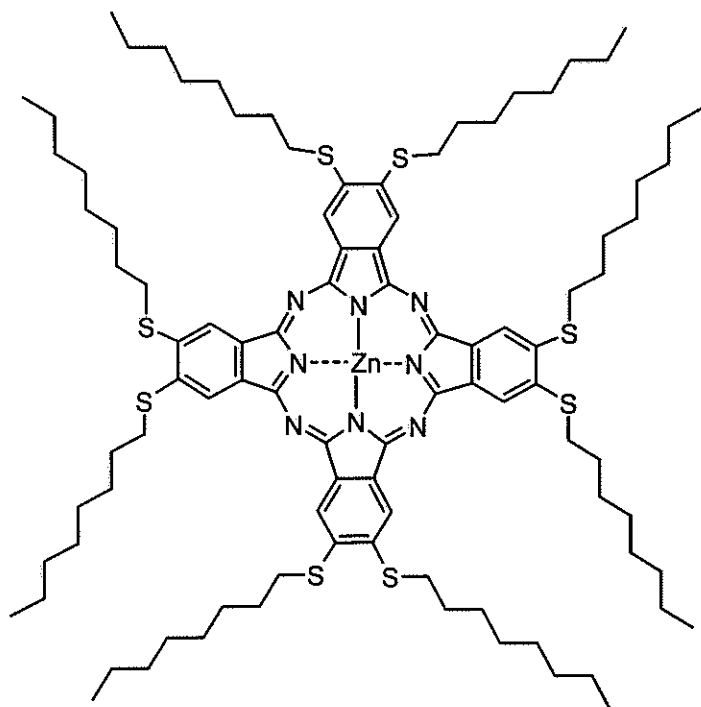
2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(2-diethylaminoethylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninato zinečnatý komplex (jedná se o sůl s kyselinou chlorovodíkovou)

relativní molekulová hmotnost = 1635,74 g/mol

molekulární vzorec = $C_{72}H_{112}N_{24}S_8Zn$

procentuální zastoupení prvků: C 52,87%; H 6,90%; N 20,55%; S 15,68%; Zn 4,00%

Pc123



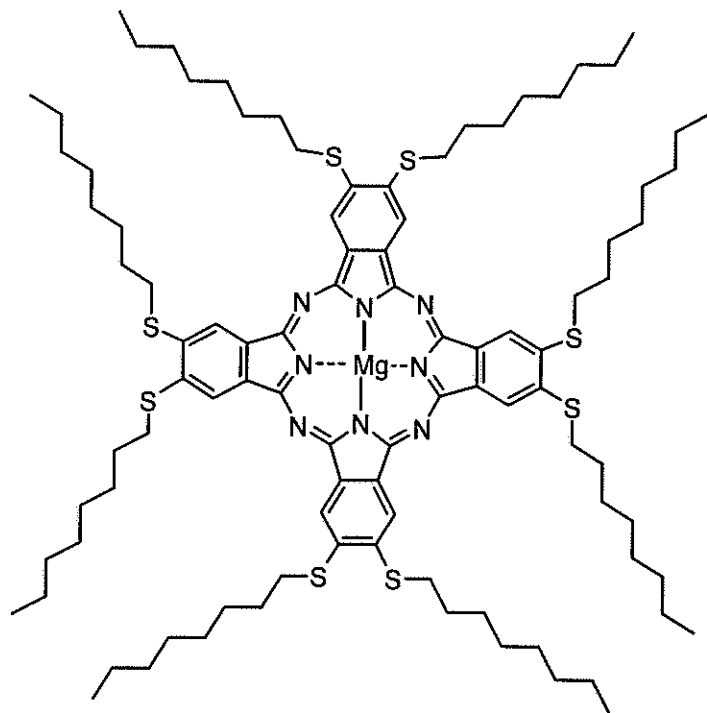
2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(oktylsulfanyl)ftalocyaninato zinečnatý komplex

relativní molekulová hmotnost = 1732,15 g/mol

molekulární vzorec = $C_{96}H_{144}N_8S_8Zn$

procentuální zastoupení prvků: C 66,57%; H 8,38%; N 6,47%; S 14,81%; Zn 3,77%

Pc124



2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(oktylsulfanyl)ftalocyaninato hořečnatý komplex

relativní molekulová hmotnost = 1691,10 g/mol

molekulární vzorec = $C_{96}H_{144}MgN_8S_8$

procentuální zastoupení prvků: C 68,18%; H 8,58%; Mg 1,44%; N 6,63%; S 15,17%

2.2 EMULGÁTORY A SOLUBILIZÁTORY

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

CREMOPHOR® RH-40

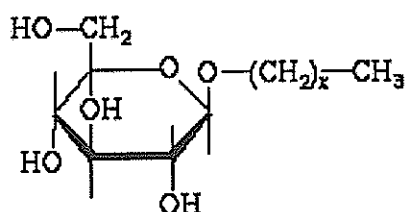
Cremophor® RH-40 je neionický solubilizátor a emulgátor získávaný reakcí hydrogenovaného ricinového oleje s ethylenoxidem. Jedná se tedy o PEG-40 hydrogenovaný ricinový olej. Při teplotě 20 °C je Cremophor® RH 40 bílá až nažloutlá průhledná pasta s charakteristickým mdlým zápachem. Ve vodě a ethanolu 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 lipofilních látek 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 buněk⁸⁷).⁸⁸

SEPIGEL 305

Sepigel 305 je směs polyakrylamidu, rozvětvených nasycených uhlovodíků o délce řetězce 13 až 14 uhlíků a polyethylenglykol (7) lauryletheru. Jedná se tedy o polymerní sloučeninu tekuté konzistence. Obvyklé dávkování je 0,3 – 3,0%. Používá se jako zahušťující a stabilizační prostředek při přípravě emulzí, krémů a gelů za pokojové teploty. Pouhým smícháním Sepigelu 305 s vodou tak vznikají gely, aniž by vyžadovaly jakékoliv předběžné bobtnání či neutralizaci. Jeho další výhodou je použití v širokém rozmezí pH (2-12), při kterém je dostatečně stabilní. Navíc má i poměrně dobrou toleranci - 3% roztok Sepigelu 305 ve vodě nedráždí pokožku ani oko.⁸⁹

DECYLGLUKOSID



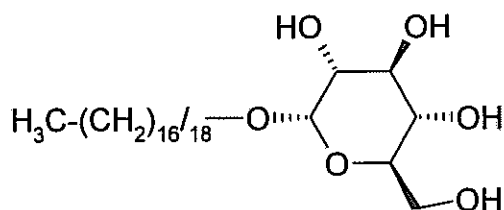
Přesný chemický název decylglukosidu je n-decyl-β-D-glukopyranosid (CAS registrační číslo: 41444-55-7). Relativní molekulová hmotnost je 322 g/mol.⁹⁰ Decylglukosid je čirá nažloutlá tekutina bez zápachu, rozpustná ve vodě. Jedná se o poměrně stabilní látku, která je v organismu zcela biodegradabilní.⁹¹

MAKROGOL 400

Makrogoly (polyethylenglykoly, polyethylenoxidy) jsou směsi polymerů s obecným vzorcem $H-[OCH_2-CH_2]_n-OH$ odpovídající průměrné relativní molekulové hmotnosti jmenovité hodnoty (n) uvedené v označení na obalu. Může k nim být přidán vhodný stabilizátor, jehož název a koncentrace se uvede na obalu. Makrogol 400 (hustota 1,120 g/cm³) je čirá viskózní bezbarvá nebo téměř bezbarvá hygroskopická kapalina. Je mísitelný s vodou, velmi snadno rozpustný v acetonu, v lihu 96% a v dichlormethanu. Je prakticky nerozpustný v mastných olejích a v minerálních olejích.⁹²

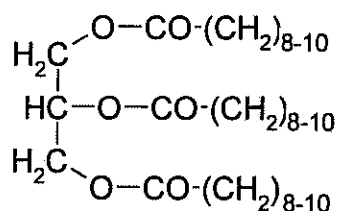
Makrogoly se používají jako solubilizátory (např. injekčních roztoků), stabilizátory suspenzí, emulgátory a viskozifianty. Jejich využití je i v oblasti přípravy mastí a čípků jako nosičů, či při výrobě tablet jako kluzné látky.⁶⁸

CETEARYLGLUKOSID



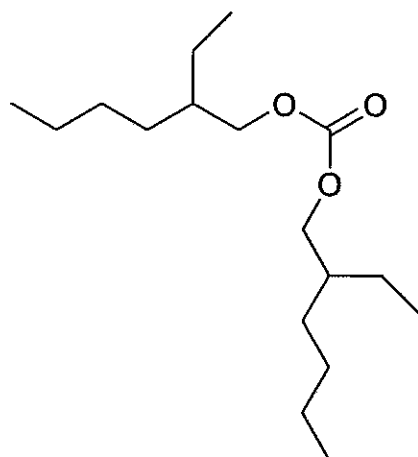
Z chemického hlediska se jedná o cetearylglukosid (CAS registrační číslo: 54549-27-8, 27836-65-3). Je to pevná látka práškovitého charakteru bílé barvy a rostlinného původu, jejíž HLB hodnota (hydrophilic-lipophilic balance = hydrofilně-lipofilní rovnováha...charakteristika tenzidů) je přibližně 11. Je nerozpustný ve vodě. Používá se jako neionogenní emulgátor pro přípravu emulzí typu O/V, přičemž pro jejich tvorbu je potřeba jen velmi malé koncentrace cetearylglukosidu (~ 1,0 – 1,5%).⁹³

MCT (CAPRYLIC TRIGLYCERIDES)



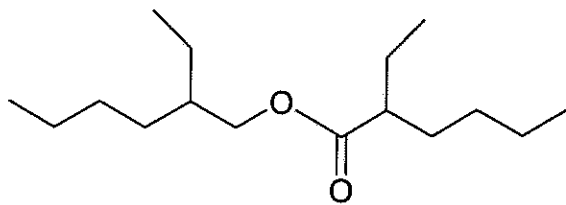
Jedná se o směs triglyceridů střední délky řetězce (medium chain triglycerides) rostlinného původu. MCT (CAS registrační číslo: 65381-09-1) je čirá až mírně nažloutlá kapalina s nepatrným a charakteristickým zápachem, prakticky nerozpustná ve vodě. Svými vlastnostmi se podobá přírodním triglyceridům. Je velmi polární s hustotou 0,955 g/cm³ při 20°C.⁹³

DIETHYLHEXYLKARBONÁT



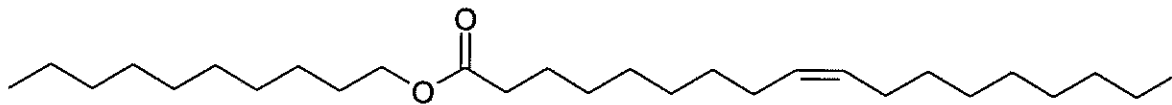
Přesný chemický název je bis(2-ethylhexyl)karbonát (CAS registrační číslo: 14858-73-2). Je to bezbarvá kapalina syntetického původu vyznačující se charakteristickým zápachem, jejíž hustota je přibližně $0,88 \text{ g/cm}^3$. Je rozpustná v ethanolu, ve vodě nikoliv. Vyznačuje se nízkou viskozitou a poměrně vysokou roztíratelností. Jedná se o jedinečné změkčovadlo, které zvyšuje roztíratelnost emulzí typu O/V, ale i V/O. Doporučená koncentrace v přípravcích je maximálně 15%.⁹³

ETHYLHEXYLOKTANOÁT



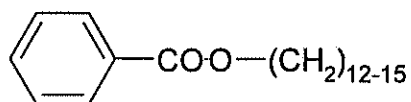
Přesný chemický název ethylhexyloktanoátu je 2-ethylhexyl-2-ethylhexanoát (CAS registrační číslo: 7425-14-1). Je to čirá kapalina, která je prakticky nerozpustná ve vodě, ale velmi dobře rozpustná v nepolárních rozpouštědlech. Relativní molekulová hmotnost je $256,43 \text{ g/mol}$ a hustota $0,86 \text{ g/cm}^3$.⁹⁴

DECYLOLEÁT



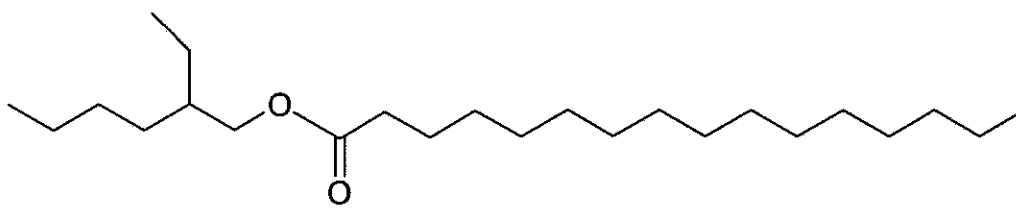
Decyloleát (CAS registrační číslo: 3687-46-5) je nažloutlá kapalina charakteristického zápachu a rostlinného původu, která se svým složením podobá přírodním lipidům přítomných v pokožce. Je nerozpustná ve vodě a její hustota je přibližně $0,86 \text{ g/cm}^3$. Vyznačuje se vysokou polaritou a střední roztíratelností. Používá se jako rozpouštědlo aktivních lipofilních sloučenin.⁹³

C12-15 ALKYL BENZOÁT



C12-15 alkybenzoát (CAS registrační číslo: 68411-27-8) je bezbarvá či lehce nažloutlá kapalina bez zápachu, syntetického původu s hustotou přibližně 0,923 g/cm³. Ve vodě je nerozpustný. Vyznačuje se velmi vysokou polaritou, ale poměrně nízkou roztíratelností a nízkou viskozitou. Je používán jako změkčovadlo, které snadno rozpouští aktivní lipofilní látky.⁹³

OKTYLPALMITÁT



Z chemického hlediska se jedná o 2-ethylhexylpalmitát (CAS registrační číslo: 29806-73-3). Oktylpalmitát je nažloutlá kapalina rostlinného či syntetického původu mající charakteristický zápach a hustotu rovnu 0,857 g/cm³. Ve vodě je nerozpustný. Vyznačuje se poměrně vysokou roztíratelností, střední polaritou a viskozitou. Používá se jako univerzální změkčovadlo a je též dobrým solubilizátorem řady aktivních látek.⁹³

2.3 PŘÍSTROJE A METODIKY

Fluorescence vzorků byla ověřována za použití UV lampy CAMAG MuttENZ - Schweiz 29200 při vlnové délce 366 nm.

Fluorescence vzorků byla měřena na spektrofluorimetru PERKIN ELMER LS 50B.

Metodika testů na fototoxicitu:

Na testy fototoxicity se používají buňky 3T3 Balb/c - myší fibroblasty, které jsou doporučené v testu fototoxicity dle směrnice EU i OECD.⁹⁵

2.4 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ BARVIV – TESTOVÁNÍ JEJICH ROZPUSTNOSTI

ZIP-T-37Mg v MCT:

Nejprve jsem si do umyté a vysušené baňky navázila příslušné množství barviva (0,5 mg v 1 ml MCT, což je $c = 446 \mu\text{mol/l}$; $M_r = 1121,61 \text{ g/mol}$), které jsem rozpustila v dostatečném množství chloroformu a následně jsem přidala MCT. Chloroform jsem z roztoku odstranila odpařením na vakuové odparce při teplotě 30°C .

Výsledky : Ani po delším stání nedošlo k vysrážení barviva, v MCT je roztok látky stabilní.

ZIP-T-37Mg v C12-15 alkylbenzoátu:

Do baňky jsem si navázila příslušné množství barviva ($c = 2000 \mu\text{mol/l}$), které jsem nejprve rozpustila v potřebném množství THF a následně jsem přidala C12-15 alkylbenzoát. THF jsem poté z roztoku odstranila odpařením na vakuové odparce.

Výsledky: Po dlouhodobém stání došlo k vysrážení látky z roztoku.

ZIP-T-37Mg v decyloleátu:

Nejprve jsem si do baňky navázila příslušné množství barviva ($c = 2000 \mu\text{mol/l}$), které jsem rozpustila v dostatečném množství THF a následně jsem přidala decyloleát. THF jsem poté z roztoku odstranila odpařením na vakuové odparce.

Výsledky: Téměř ihned po přípravě došlo k vysrážení látky z roztoku.

ZIP-T-37Mg v diethylhexylkarbonátu:

Do baňky jsem si navázila dané množství barviva ($c = 2000 \mu\text{mol/l}$), které jsem rozpustila v dostatečném množství THF a následně jsem přidala diethylhexylkarbonát. THF jsem poté z roztoku odstranila odpařením na vakuové odparce.

Výsledky: Po delším stání došlo k vysrážení látky z roztoku (pravděpodobně z důvodu vysoké koncentrace), proto jsem připravila roztok s poloviční koncentrací ($c = 1000 \mu\text{mol/l}$) – ani po delším stání nedošlo k precipitaci látky, roztok je stabilní.

ZIP-T-37Mg v ethylhexyloktanoátu:

Do baňky jsem si navázila příslušné množství barviva ($c = 2000 \mu\text{mol/l}$), které jsem nejprve rozpustila v potřebném množství THF a následně jsem přidala ethylhexyloktanoát. THF jsem poté z roztoku odstranila odpařením na vakuové odparce.

Výsledky: Po delším stání došlo k vysrážení barviva z roztoku (pravděpodobně z důvodu vysoké koncentrace), proto jsem připravila roztok s poloviční koncentrací ($c = 1000 \mu\text{mol/l}$) – po dlouhodobějším stání vznikl na dně baňky jemný roztřepatelný precipitát..

ZIP-T-37Mg v oktylpalmitátu:

Do baňky jsem si navázila příslušné množství barviva ($c = 2000 \mu\text{mol/l}$), které jsem nejprve rozpustila v dostatečném množství THF a následně jsem přidala oktylpalmitát. THF jsem poté z roztoku odstranila odpařením na vakuové odparce.

Výsledky: Po delším stání došlo k vysrážení barviva z roztoku (pravděpodobně z důvodu vysoké koncentrace), proto jsem připravila roztok s poloviční koncentrací ($c = 1000 \mu\text{mol/l}$) – po dlouhodobějším stání vznikl na dně baňky jemný roztřepatelný precipitát.

ZIP-T-44Mg v MCT:

Nejprve jsem si do baňky navázila příslušné množství barviva ($0,5 \text{ mg}$ v 1 ml MCT, což je $c = 294 \mu\text{mol/l}$; $M_r = 1699,00 \text{ g/mol}$), které jsem rozpustila v potřebném množství chloroformu a následně jsem přidala MCT. Chloroform jsem poté z roztoku odstranila odpařením na vakuové odparce při teplotě 30°C .

Výsledky: Látka precipitovala, má špatnou rozpustnost v lipidech.

ZIP-21Zn v MCT:

Do baňky jsem si navázila příslušné množství barviva ($c = 2000 \mu\text{mol/l}$, $M_r = 1291,19 \text{ g/mol}$), které jsem nejprve rozpustila v dostatečném množství THF a následně jsem přidala MCT. THF jsem poté z roztoku odstranila odpařením na vakuové odparce.

Výsledky: Po delším stání došlo k vysrážení látky z roztoku (pravděpodobně z důvodu vysoké koncentrace), proto jsem připravila roztok s poloviční koncentrací ($c = 1000 \mu\text{mol/l}$) – po dlouhodobějším stání vznikl na dně baňky jemný roztřepatelný precipitát.

ZIP-21Zn v C12-15 alkylbenzoátu:

Nejprve jsem si do baňky navázila příslušné množství barviva ($c = 2000 \mu\text{mol/l}$, $M_r = 1291,19 \text{ g/mol}$), které jsem nejprve rozpustila v potřebném množství THF a následně jsem přidala C12-15 alkylbenzoát. THF jsem poté z roztoku odstranila odpařením na vakuové odparce.

Výsledky: Po dlouhodobém stání se na dně baňky vysrážely částice barviva, proto jsem připravila roztok s poloviční koncentrací ($c = 1000 \mu\text{mol/l}$) – opět došlo k precipitaci látky.

ZIP-21Zn v decyloleátu:

Nejprve jsem si do baňky navázila příslušné množství barviva ($c = 2000 \mu\text{mol/l}$, $M_r = 1291,19 \text{ g/mol}$), které jsem rozpustila v dostatečném množství THF a následně jsem přidala decyloleát. THF jsem poté z roztoku odstranila odpařením na vakuové odparce.

Výsledky: Po delším stání částice barviva sedimentovaly na dně baňky, proto jsem připravila roztok s poloviční koncentrací ($c = 1000 \mu\text{mol/l}$) – tento roztok se již choval jako stabilní, ani po dlouhodobém stání nedošlo k precipitaci látky.

ZIP-65Zn·8HCl v MCT:

Nejprve jsem si do baňky navázila příslušné množství barviva ($c = 2000 \mu\text{mol/l}$; $M_r = 1635,74 \text{ g/mol}$), které jsem nejprve rozpustila v dostatečném množství THF a následně jsem přidala MCT. THF jsem poté z roztoku odstranila odpařením na vakuové odparce.

Výsledky: Ani po dlouhodobém stání nedošlo k vysrážení látky z roztoku.

Pc123 v dimethylsulfoxidu:

Nejprve jsem si do baňky navázila příslušné množství barviva (2 mg barvy v 1 ml dimethylsulfoxidu, což je $c = 1155 \mu\text{mol/l}$; $M_r = 1732,15 \text{ g/mol}$), které jsem nejprve rozpustila v dostatečném množství chloroformu a následně jsem přidala dimethylsulfoxid (DMSO). Chloroform jsem poté z roztoku odstranila odpařením na vakuové odparce při teplotě 30°C .

Výsledky: Látka se po delším stání vysrážela z roztoku.

Pe123 v MCT:

Do baňky jsem si navázila příslušné množství barviva ($c = 2000 \mu\text{mol/l}$), které jsem nejprve rozpustila v dostatečném množství THF a následně jsem přidala MCT. THF jsem poté z roztoku odstranila odpařením na vakuové odparce.

Výsledky: Ani po dlouhodobém stání nedošlo ke vzniku precipitátu, v MCT je roztok látky poměrně stabilní.

Pe124 v MCT:

Nejprve jsem si do baňky navázila příslušné množství barviva (2 mg látky v 1 ml MCT, což je $c = 1183 \mu\text{mol/l}$; $M_r = 1691,10 \text{ g/mol}$) a rozpustila ji v dostatečném množství chloroformu. Po rozpuštění veškeré látky jsem přidala MCT, promíchala a chloroform jsem odpařila při 30°C na vakuové odparce.

2.5 TESTOVÁNÍ CYTOTOXICITY CREMOPHORU® RH-40

Postup přípravy zásobního roztoku Cremophoru® RH-40:

Do vyčištěné, vysušené a vytárované baňky jsem si navážila dostatečné množství Cremophoru® RH-40 (CR). Do baňky jsem přidala magnetické míchadlo a umístila ji na vodní lázeň vytemperované na teplotu 60 – 65°C. Vodní lázeň byla umístěna na vyhřívané magnetické míchačce. Pufr jsem vytemperovala na teplotu vodní lázně a postupně ho po mililitrech přidávala ke Cremophoru v baňce. Zpočátku začala směs houstnout, ale po přidání veškerého množství pufru vznikl čirý roztok. Jestliže je první polovina pufru přidána příliš rychle, může se roztok zakalít.

Vzorky roztoků solubilizátoru Cremophoru® RH-40 s klesající koncentrací:

Z připraveného 10% zásobního roztoku Cremophoru® RH-40 ve fosfátovém pufru jsem postupným ředěním získala řadu vzorků s klesající koncentrací solubilizátoru (5 %, 1 %, 0,1 %). Ke vzorkům č. CR5, CR6 a CR7 jsem po vychladnutí přidala vypočítaný objem THF (hustota = 0,89 kg/dm³), aby v konečném objemu vzorku činil požadovanou koncentraci 1 %, 0,5 % a 0,1 %. THF byl použit jako rozpouštědlo některých barviv, proto bylo nutné zjistit, jaká koncentrace je již pro buňky toxická. Následně byly vzorky podrobeny testu cytotoxicity.

Vzorek č.	Cremophor® RH-40 (%)	THF (%)
CR1	10	-
CR2	5	-
CR3	1	-
CR4	0,1	-
CR5	1	1
CR6	1	0,5
CR7	1	0,1

Výsledky testování cytotoxicity:

Testováno na buněčné linii HeLa v mediu RPMI, 10% FCS.

Vzorek č.	Koncentrace 1 c = 10%	Koncentrace 2 c = 5%	Koncentrace 3 c = 1%
CR1	+cr	+cr	+
CR2	+cr	+cr	*
CR3	+	*	*
CR4	*	*	*
CR5	*+	*	*
CR6	+*	*	*
CR7	+	*	*

+...vzorek je pro buňky toxický

*...vzorek je pro buňky netoxický

cr...ve vzorku se vytvořily krystalky

Koncentrace 1...naředění původního vzorku CR1 až CR7 10krát

Koncentrace 2...naředění původního vzorku CR1 až CR7 20krát

Koncentrace 3... naředění původního vzorku CR1 až CR7 100krát

Nejvyšší netoxické koncentrace pro Cremophor[®] RH-40:

- pro CR2 je netoxická koncentrace 3, tj. $5 \times 0,01 = 0,05\%$
- pro CR3 je netoxická koncentrace 2, tj. $1 \times 0,05 = 0,05\%$
- pro CR4 je netoxická koncentrace 1, tj. $0,1 \times 0,1 = 0,01\%$

Z uvedeného vyplývá, že samotný Cremophor[®] RH-40 byl netoxický v koncentraci 0,05%.

Nejvyšší netoxické koncentrace pro roztok Cremophoru[®] RH-40 s THF:

- pro CR5 je netoxická koncentrace 2, tj. 0,05% CR a 0,05% THF
- pro CR6 je netoxická koncentrace 2, tj. 0,05% CR a 0,025% THF
- pro CR7 je netoxická koncentrace 2, tj. 0,05% CR a 0,005% THF

Z uvedeného vyplývá, že roztok Cremophoru[®] RH-40 s THF byl netoxický v koncentraci 0,05% Cremophoru[®] RH-40 a 0,05% THF.

2.6 SOLUBILIZACE BARVIV POMOCÍ SOLUBILIZÁTORU

2.6.1 SOLUBILIZACE ZIP-T-44MG POMOCÍ CREMOPHORU® RH-40

1% roztok Cremophoru® RH-40

$c(\text{ZIP-T-44Mg}) = 100 \mu\text{mol/l}$

$M_r(\text{ZIP-T-44Mg}) = 1699,00 \text{ g/mol}$

Pufř (PBS): pH = 7,3

$c(\text{NaCl}) = 137 \text{ mmol/l}$

$c(\text{KCl}) = 2,7 \text{ mmol/l}$

$c(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) = 4,3 \text{ mmol/l}$

$c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 1,4 \text{ mmol/l}$

Nejprve jsem si připravila zásobní roztok barviva ZIP-T-44Mg o koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$ rozpuštěné v tetrahydrofuranu (THF).

Poté jsem si navázila odpovídající množství Cremophoru do baňky se zabroušenou zátkou a k němu přidala příslušné množství zásobního roztoku barviva v THF a pomocí magnetické míchačky řádně promíchala. THF se pak ze směsi odpařilo na vakuové odparce. Následně jsem baňku se směsí umístila na vodní lázeň temperovanou na 65°C a za stálého míchání magnetickou míchačkou jsem postupně přidávala pufř (PBS) předem zahřátý taktěž na teplotu 65°C.

Výsledky: V soustavě došlo ihned po ukončení přípravy roztoku k vysrážení barvy (ta je pravděpodobně vzhledem k solubilizátoru mnohem lipofilnější, proto ji Cremophor nesolubilizoval).

2.6.2 SOLUBILIZACE ZIP-T-37MG POMOCÍ CREMOPHORU® RH-40

1% roztok Cremophoru® RH-40

$c(\text{ZIP-T-37Mg}) = 5 \mu\text{mol/l}$

$M_r(\text{ZIP-T-37Mg}) = 1121,61 \text{ g/mol}$

Nejprve jsem si připravila zásobní roztok barviva ZIP-T-37Mg o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ rozpuštěné v tetrahydrofuranu (THF).

Poté jsem si navázila odpovídající množství Cremophoru do baňky se zabroušenou zátkou, vytemperovala na teplotu 65°C a k němu za stálého míchání postupně přidávala příslušné množství zásobního roztoku barviva v THF. Tuto směs jsem nechala asi ještě dalších 30 minut řádně míchat pomocí magnetické míchačky. Následně jsem do baňky se vzniklou směsí postupně přidávala pufr předem vytemperovaný na 65°C.

Výsledky: Při umístění vzorku pod UV lampu došlo ke změně světla zelenkavého fluoreskujícího zbarvení na modré, které bylo způsobené vysrážením látky i přesto, že ZIP-T-37Mg je méně lipofilní než ZIP-T-44Mg.

Na základě těchto výsledků jsem zvolila odlišný způsob přípravy: Do baňky jsem si navázila příslušné množství Cremophoru, vytemperovala na teplotu 65°C a k němu postupně přidávala dané množství pufru předem zahřátého na 65°C. Až k tomuto roztoku jsem následně přidala zásobní roztok barviva a pomocí magnetické míchačky řádně promíchala.

Výsledky: I v tomto případě však došlo k vysrážení barviva z roztoku.

2.6.3 SOLUBILIZACE ZIP-T-37MG POMOCÍ RŮZNÝCH KONCENTRACÍ CREMOPHORU® RH-40

1%, 5%, 10%, 15%, 20% roztok Cremophoru® RH-40

$c(\text{ZIP-T-37Mg}) = 5 \mu\text{mol/l}$

$M_r(\text{ZIP-T-37Mg}) = 1121,61 \text{ g/mol}$

Nejprve jsem si připravila zásobní roztok barviva ZIP-T-37Mg o koncentraci $100 \mu\text{mol/l}$ rozpuštěné v tetrahydrofuranu (THF).

Poté jsem si do baňky navážila příslušné množství Cremophoru, vytemperovala na teplotu 65°C a k němu postupně přidávala dané množství pufru předem zahřátého na 65°C . Až k tomuto roztoku jsem následně přidala zásobní roztok barviva a pomocí magnetické míchačky řádně promíchala.

Baňka č.	c (Cremophoru) (%)	c (ZIP-T-37Mg) ($\mu\text{mol/l}$)
C1	20	5
C2	15	5
C3	10	5
C4	5	5
C5	1	5
C6	20	-
C7	15	-
C8	10	-
C9	5	-
C10	1	-

C1 – C5.....měřené vzorky

C6 – C10...porovnávací vzorky obsahující místo roztoku barvy v THF pouze odpovídající množství čistého THF

Výsledky: Vzorky byly podrobeny měření na spektrofluorimetru, avšak intenzita naměřené fluorescence byla u všech vzorků velmi nízká – pravděpodobně došlo k agregaci barviva v roztoku.

2.6.4 SOLUBILIZACE ZIP-T-37MG POMOCÍ DECYLGLUKOSIDU

3% roztok decylglukosidu

$c(\text{ZIP-T-37Mg}) = 100 \mu\text{mol/l}$

$M_r(\text{ZIP-T-37Mg}) = 1121,61 \text{ g/mol}$

Nejprve jsem si do baňky navážila příslušné množství barviva, které jsem rozpustila v potřebném množství THF. Poté jsem přidala decylglukosid, promíchala a THF následně odpařila na vakuové odparce. Roztok barviva v decylglukosidu jsem následně umístila na vodní lázeň (teplota 60°C) a postupně za stálého míchání přidávala destilovanou vodu teplou 60°C.

Výsledky: Po dlouhodobém stání došlo k vysrážení barvy (sediment na dně zkumavky).

2.7 TESTOVÁNÍ SOLUBILIZACE LIPOFILNÍCH ESTERŮ

2.7.1 SOLUBILIZACE LIPOFILNÍCH ESTERŮ POMOCÍ RŮZNÝCH KONCENTRACÍ CREMOPHORU® RH-40

Nejprve jsem si připravila řadu vzorků, které obsahovaly různou koncentraci Cremophoru® RH-40 a různé estery (decyloleát, oktylpalmitát, diethylhexylkarbonát, ethylhexyloktanoát, C12-15 alkybenzoát) (viz. Tab.). Následující den jsem z řady vzorků obsahujících stejný ester vybrala vždy ten, který obsahoval nejnižší koncentraci Cremophoru® RH-40 a choval se jako stabilní.

Označení	Koncentrace (%)	OP (%)	DEHK (%)	EHO (%)	DO (%)	C12-15 Alkybenzoát (%)	Vzhled
CR1	3	5	-	-	-	-	A
CR2	2	5	-	-	-	-	N
CR3	1	5	-	-	-	-	N
CR4	3	-	5	-	-	-	A
CR5	2	-	5	-	-	-	A
CR6	1	-	5	-	-	-	N
CR7	3	-	-	5	-	-	A
CR8	2	-	-	5	-	-	N
CR9	1	-	-	5	-	-	N
CR10	3	-	-	-	5	-	A
CR11	2	-	-	-	5	-	N
CR12	1	-	-	-	5	-	N
CR13	3	-	-	-	-	5	A
CR14	2	-	-	-	-	5	A
CR15	1	-	-	-	-	5	N

OP (Oktylpalmitát)

DEHK (Diethylhexylkarbonát)

EHO (Ethylhexyloktanoát)

DO (Decyloleát)

A...roztok je stabilní

N...roztok je nestabilní, došlo k oddělení esteru a solubilizátoru

Do baňky jsem si navázila dané množství Cremophoru[®] RH-40, přidala k němu příslušný ester, umístila na vodní lázeň teplou 65°C a řádně promíchala pomocí magnetické míchačky. K této směsi jsem následně za intenzivního míchání postupně přidávala destilovanou vodu přehřátou též na 65°C.

Soustavy esteru a solubilizátoru, které jsem vyhodnotila jako stabilní, jsem následně použila pro solubilizaci roztoků barviv v příslušných esterech.

2.7.2 SOLUBILIZACE MCT VE VODĚ POMOCÍ MAKROGOLU 400

5% Makrogol 400

5% MCT

Nejprve jsem si do kovové třenky navázila příslušná množství MCT a Makrogolu 400, řádně promísila a umístila na vodní lázeň teplou 40°C. Poté jsem postupně za stálého míchání přidávala destilovanou vodu přehřátou též na 40°C.

Výsledky: Makrogol 400 je příliš polární na to, aby byl schopen solubilizovat MCT. Došlo k oddělení obou složek ve směsi.

2.8 SOLUBILIZACE ROZTOKŮ BARVIV V LIPOFILNÍCH ESTERECH

2.8.1 SOLUBILIZACE ROZTOKŮ ZIP-T-37MG A ZIP-21ZN V LIPOFILNÍCH ESTERECH POMOCÍ CREMOPHORU® RH-40

Příprava vzorků obsahujících nejnižší účinné koncentrace Cremophoru® RH-40 a 5% jednotlivých esterů, případně 50 µmol/l příslušného barviva (viz. Tab.).

Označení	c (%)	DEHK (%)	EHO (%)	MCT (%)	DO (%)	AB (%)	OP (%)	ZIP-T-37Mg (µmol/l)	ZIP-21Zn (µmol/l)
CR1	2	5	-	-	-	-	-	-	-
CR2	2	5	-	-	-	-	-	50	-
CR3	3	-	5	-	-	-	-	-	-
CR4	3	-	5	-	-	-	-	50	-
CR5	2,5	-	-	5	-	-	-	-	-
CR6	2,5	-	-	5	-	-	-	-	50
CR7	3	-	-	-	5	-	-	-	-
CR8	3	-	-	-	5	-	-	-	50
CR9	2	-	-	-	-	5	-	-	-
CR10	2	-	-	-	-	5	-	-	50
CR11	4	-	-	-	-	-	5	-	-
CR12	4	-	-	-	-	-	5	50	-

DEHK (Diethylhexylkarbonát)

EHO (Ethylhexyloktanoát)

MCT (Caprylic Triglycerides)

DO (Decyloleát)

AB (C12-15 alkylbenzoát)

OP (Oktylpalmitát)

Postupy přípravy vzorků:

Vzorky č. CR1, CR3, CR5, CR7, CR9, CR11: Do baňky jsem si navázila dané množství Cremophoru® RH-40, přidala k němu příslušný ester, umístila na vodní lázeň teplou 65°C a řádně promíchala pomocí magnetické míchačky. K této směsi jsem následně za intenzivního míchání postupně přidávala destilovanou vodu predehřatou též na 65°C.

Vzorky č. CR2, CR4, CR6, CR8, CR10, CR12: Do baňky jsem si navážila dané množství Cremophoru® RH-40, přidala k němu příslušné množství zásobního roztoku barviva v esteru (1000 µmol/l; viz. „Příprava roztoků různých barviv“), umístila na vodní lázeň teplou 65°C a řádně promíchala pomocí magnetické míchačky. K této směsi jsem následně za intenzivního míchání postupně přidávala destilovanou vodu přehřátou též na 65°C.

Vzorky č. CR13 a CR14 (viz. Tab.) obsahovaly 3% Cremophoru® RH-40, avšak u vzorku č. CR 14 došlo k vysrážení barviva z roztoku, proto jsem připravila vzorky č. CR11 a CR12 obsahující 4% Cremophoru® RH-40.

Označení	Koncentrace (%)	OP (%)	ZIP-T-37Mg (µmol/l)
CR13	3	5	-
CR14	3	5	50

Výsledky testování fototoxicity:

Vzorek	EC50 (+UV)	EC50 (-UV)	MPE	PIF
CR2	0,2453	0,7283	0,07	2,996
CR4	6,522	39,08	0,154	6,006
CR6	0,1735	40,73	0,545	236,007
CR8	0,02087	0,99	0,492	51,237
CR10	0,2259	18,2	0,502	80,743
CR12	21,21	46,74	0,163	2,358

3T3 NRU Phototoxicity Test, software Phototox Version 2.0

EC50 = efektivní koncentrace, která usmrtí 50% testovaných buněk, uvedená v µg/ml

PIF = Photo Irritation Factor, poměr EC50 (-UV) a EC50 (+UV) – tzn. poměr EC50 bez použití UV a EC50 s použitím UV záření...je to rozhodující faktor při hodnocení fototoxicity

MPE= Mean Photo Effect, porovnává průběh křivek (neuveďeno v diplomové práci)

podle OECD Guideline 432:

PIF < 2 nebo MPE < 0.1.....látka není fototoxická

PIF > 2 ale <5 a MPE >0.1 ale < 0.15.....látka je pravděpodobně fototoxická

PIF > 5 nebo MPE >0.15.....látka je fototoxická

2.8.2 SOLUBILIZACE ROZTOKU ZIP-65ZN·8HCL V MCT POMOCÍ CREMOPHORU® RH-40

Postupy přípravy vzorků:

Vzorek č. CR1: Do baňky jsem si navázila dané množství Cremophoru® RH-40 (viz. Tab.), přidala k němu příslušný ester, umístila na vodní lázeň teplou 65°C a řádně promíchala pomocí magnetické míchačky. K této směsi jsem následně za intenzivního míchání postupně přidávala destilovanou vodu přehřátou též na 65°C.

Vzorky č. CR2: Do baňky jsem si navázila dané množství Cremophoru® RH-40, přidala k němu příslušné množství zásobního roztoku barviva v esteru (1000 µmol/l; viz. „Příprava roztoků různých barviv“), umístila na vodní lázeň teplou 65°C a řádně promíchala pomocí magnetické míchačky. K této směsi jsem následně za intenzivního míchání postupně přidávala destilovanou vodu přehřátou též na 65°C.

Navíc byl testu fototoxicity podroben i 100 µmol/l roztok barviva ZIP-T-65Zn·8HCl v MCT.

Označení	Koncentrace (%)	MCT (%)	ZIP-65Zn (µmol/l)
CR1	3,5	5	-
CR2	3,5	5	100

Výsledky testování fototoxicity:

Vzorek č.	EC50 (+UV)	EC50 (-UV)	MPE	PIF
CR2	0,009113	6,758	0,697	816,048
ZIP-65Zn 8HCl (100µM)	0,02544	34,87	0,491	1379,903

EC50 je uvedena v µg/ml

3T3 NRU Phototoxicity Test, software Phototox Version 2.0

PIF = Photo Irritation Factor, porovnává EC50

MPE = Mean Photo Effect, porovnává průběh křivek

podle OECD Guideline 432:

PIF < 2 nebo MPE < 0.1.....látko není fototoxická

PIF > 2 ale < 5 a MPE > 0.1 ale < 0.15.....látko je pravděpodobně fototoxická

PIF > 5 nebo MPE > 0.15.....látko je fototoxická

2.8.3 SOLUBILIZACE ROZTOKU PC123 V MCT POMOCÍ CETEARYLGLUKOSIDU

1,5% roztok cetearylglukosidu

5% MCT

$c(\text{Pc123}) = 100 \mu\text{mol/l}$

$M_r = 1732 \text{ g/mol}$

Nejprve jsem si do kovové třenky navážila příslušné množství cetearylglukosidu, umístila jej na vodní lázeň o teplotě 75-80°C a rozpustila v malém objemu vodné fáze. Poté jsem postupně za stálého míchání přidala dané množství roztoku barviva v MCT (viz. „Příprava roztoků různých barviv“) a nakonec doplnila destilovanou vodou též předehřátou na teplotu 75-80°C.

Výsledky: Emulze se nejprve za krátkou dobu po přípravě rozdělila (tmavší zelené zbarvení v horní části zkumavky) a do dalšího týdne se barvivo z roztoku vysráželo.

2.8.4 SOLUBILIZACE ROZTOKU PC124 V MCT POMOCÍ CREMOPHORU[®] RH-40

Příprava vzorků obsahujících různou koncentraci Cremophoru[®] RH-40 (viz. Tab.):

Vzorek	Cremophor [®] RH 40 (%)	MCT (%)	Pc124 ($\mu\text{mol/l}$)
C1	5,0	-	-
C2	5,0	5,0	-
C3	5,0	5,0	59
C4	2,5	-	-
C5	2,5	5,0	-
C6	2,5	5,0	59

Postupy přípravy vzorků:

Postup pro vzorky č. C1 a C4: Do baňky jsem si navážila příslušné množství Cremophoru[®] RH-40, vytemperovala na teplotu 65°C a za neustálého míchání pomocí magnetické míchačky jsem postupně přidávala destilovanou vodu též předeřhátou na teplotu 65°C.

Postup pro vzorky č. C2 a C5: Do baňky jsem si navážila příslušné množství Cremophoru[®] RH-40, vytemperovala na teplotu 65°C a za neustálého míchání pomocí magnetické míchačky jsem nejprve přidala dané množství MCT předem zahřátého na teplotu 65°C a poté postupně destilovanou vodu též o teplotě 65°C.

Postup pro vzorky č. C3 a C6: Do baňky jsem si navážila příslušné množství Cremophoru[®] RH-40, vytemperovala na teplotu 65°C a za neustálého míchání pomocí magnetické míchačky jsem přidala dané množství nepředehřátého roztoku barviva v MCT (viz. „Příprava roztoků různých barviv“) a poté postupně destilovanou vodu předeřhátou na teplotu 65°C.

Výsledky testování fototoxicity:

Testu fototoxicity byl podroben pouze vzorek č. C3, protože u vzorku č. C6 došlo zřejmě z důvodu nízké koncentrace solubilizátoru k vysrážení barviva z roztoku.

Postup: ředění v PBS ze zásobního roztoku (100 μ g/ml), faktor 2,15; inkubace 1 hod., pak ozáření 5 J/cm², druhá sada ve tmě, inkubace dalších 24 hod. a barvení NR; fluorimetricky stanovení NR uptake, výpočet životnosti oproti kontrole (PBS)

Koncentrace (μg/ml)	+UV (%)	-UV (%)
46,4	97,0	96,4
21,5	100,9	102,6
10,0	101,8	104,3
4,64	104,3	104,3
2,15	104,5	98,7
1,00	105,9	100,6
0,464	96,6	103,6
0,215	103,0	105,0

+UV (%)...životnost buněk za použití UV v %

-UV (%)...životnost buněk bez aplikace UV v %

Emulze vzorku č. C3 byla stabilní i po ředění, avšak výsledky měření fototoxicity ukázaly, že životnost buněk po aplikaci UV záření je přibližně stejná jako u kontrolních vzorků bez aplikace UV. Z toho vyplývá, že vzorek není fototoxický.

2.8.5 SOLUBILIZACE ROZTOKU PC124 V MCT POMOCÍ SEPIGELU 305

Příprava vzorků obsahujících 0,5% Sepigelu 305 a 5% MCT (viz. Tab.):

Vzorek	Sepigel 305 (%)	MCT (%)	Pc124 ($\mu\text{mol/l}$)
Sg1	0,5	-	-
Sg2	0,5	5,0	-
Sg3	0,5	5,0	59

Postupy přípravy vzorků:

Postup pro vzorek č. Sg1: Příslušné množství Sepigelu 305 jsem při pokojové teplotě smíchala v kovové třence s daným množstvím destilované vody.

Postup pro vzorek č. Sg2: Příslušné množství Sepigelu 305 jsem při pokojové teplotě smíchala v kovové třence nejprve s daným množstvím MCT a následně přidala destilovanou vodu a řádně promíchala.

Postup pro vzorek č. Sg3: Příslušné množství Sepigelu 305 jsem při pokojové teplotě smíchala v kovové třence nejprve s daným množstvím roztoku barviva v MCT (viz. „Příprava roztoků různých barviv“) a následně přidala destilovanou vodu a řádně promíchala.

Výsledky testování fototoxicity:

Testu fototoxicity byl podroben vzorek č. Sg3.

Postup: ředění v PBS ze zásobního roztoku (100 μ g/ml), faktor 2,15; inkubace 1 hod., pak ozáření 5 J/cm², druhá sada ve tmě, inkubace dalších 24 hod. a barvení NR; fluorimetricky stanovení NR uptake, výpočet životnosti oproti kontrole (PBS)

Koncentrace (μg/ml)	+UV (%)	-UV (%)
46,4	48,3	84,8
21,5	92,3	93,3
10,0	96,6	97,1
4,64	100,1	99,5
2,15	99,8	98,0
1,00	104,2	103,8
0,464	97,3	100,8
0,215	99,3	97,6

+UV (%)...životnost buněk za použití UV v %

-UV (%)...životnost buněk bez aplikace UV v %

Vzorek č. Sg3 se v ředění 46,4 a 21,5 rozpadá, na povrchu byly viditelné zelené kuličky.

Výsledky měření naznačují, že vzorek by mohl být fototoxický pouze při vyšších koncentracích barviva v roztoku (při ředění 46,4 je životnost buněk za použití UV záření mnohem menší než u kontrolního vzorku bez aplikace UV).

3 DISKUSE A ZÁVĚR

Cílem mé diplomové práce bylo solubilizovat vybrané potenciální fotodynamicky aktivní látky pomocí solubilizátorů, přičemž se jednalo především o Cremophor® RH-40.

Nejprve jsem se zaměřila na jednoduchou solubilizaci těchto látek pomocí solubilizátoru Cremophor® RH-40, ale jelikož se jedná o látky značně lipofilního charakteru, docházelo k jejich časté precipitaci z roztoku či k agregaci, která byla následně potvrzena buď pomocí UV lampy nebo spektrofluorimetru. U agregovaného barviva totiž docházelo ke vzájemnému zhášení fluorescence jednotlivých molekul, a proto u vzorků bez přítomnosti precipitátu nebyla pozorována fluorescence.

Na základě těchto výsledků jsem pro rozpouštění barviv použila lipofilní estery, v nichž jsem daná barviva nejprve rozpustila a až poté tyto roztoky solubilizovala pomocí solubilizátorů. Soustavy, které se po delším časovém úseku jeví jako dostatečně stabilní, a ve kterých nedošlo k precipitaci barviva, byly následně podrobeny testování fototoxicity.

Na základě získaných výsledků se jako relativně výhodné pro rozpouštění barviv ukázaly být tyto estery: MCT, diethylhexylkarbonát, ethylhexyloktanoát, decyloléát, C12-C15 alkybenzoát a oktylpalmitát. Na základě zjištění nejnižší použitelné koncentrace solubilizátoru, který je ještě schopen solubilizovat určité množství esteru, jsem připravila jednotlivé vzorky obsahující roztok barviva v esteru solubilizovaný ve vodné fázi pomocí této nejnižší účinné koncentrace solubilizátoru. Ze vzorků podrobených fototoxicitě vykazují nejvyšší fototoxickou účinnost právě ta barviva, která byla rozpuštěna v MCT. Jednalo se o roztoky látek ZIP-21Zn a ZIP-65Zn·8HCl v MCT solubilizované ve vodě pomocí Cremophoru® RH-40. Tyto vzorky vykazovaly minimální toxicitu na buňky bez aplikace UV záření, ale při ozáření testovaných buněk došlo k výrazným fototoxickým účinkům. Míru tohoto účinku definuje tzv. PIF faktor. Jedná se o poměr efektivní koncentrace schopné usmrtit 50% testovaných buněk bez užití UV a efektivní koncentrace schopné usmrtit 50% buněk s použitím UV záření. Například u vzorku obsahujícího jako fotodynamicky aktivní látku ZIP-21Zn (50µM; 2,5% CR a 5% MCT) je hodnota PIF rovna 236,007. U vzorku obsahujícího ZIP-65Zn·8HCl (100µM; 3,5% CR a 5% MCT) činí hodnota PIF 816,048. Tyto hodnoty naznačují, že se jedná o vzorky poměrně málo toxické, teprve při aplikaci vhodné dávky světla o určité vlnové délce dochází k aktivaci fotosenzitizéru a uplatnění jeho účinků na testované buňky, což je podstatou fotodynamické terapie.

4 LITERATURA

- 1 AHMAD, N., MUKHTAR, H.; *Methods Enzymol.*, **2000**; 319, 342
- 2 ZIMČÍK, P., MILETÍN, M.; *Čes. Slov. Farm.*, **2004**; 53 (5), 219
- 3 BROWN, STANLEY B., BROWN, ELIZABETH A., WALKER, IAN; *The Lancet (oncology)*, **2004**; 5, 497
- 4 ZIMČÍK, P., MILETÍN, M.; *Čes. Slov. Farm.*, **2004**; 53 (6), 271
- 5 DIAMOND, I., GRANELLI, S. G., McDONAGH, A. F., et al.; *Lancet*, **1972**; 2; 1175
- 6 LIPSON, R. L., GRAY, M. J., BALDES, E. J.; *Ninth Internat. Cancer Congr., Tokyo, Japan*, **1966**, 393
- 7 DOUGHERTY, T. J., GRINDEY, G. B., FIEL, R.; *Nat. Cancer Inst.*, **1975**; 55, 155
- 8 SCHWARTZ, S.; *Minnesota university's Medical Bulletin*, **1955**, 7, 27
- 9 STERNBERG, E. D., DOLPHIN, D., BRÜCKNER, Ch.; *Tetrahedron*, **1998**; 54, 4151
- 10 SHARMAN, W. M., ALLEN, C. M., VAN LIER, J. E.; *Methods Enzymol.*, **2000**; 319, 376
- 11 PHILIPS, D.; *Progr. React. Kinet.*, **1997**; 22, 175
- 12 STABLES, G. I., ASH, D. V.; *Cancer Treat. Rev.*, **1996**; 21, 311
- 13 MOAN, J., PENG, Q., SORENSEN, R. et al.; *Endoscopy*, **1998**; 30, 387
- 14 FOOTE, C.S.; *Photochem. Photobiol.*, **1991**; 54, 659
- 15 CASTANO, A. P., DEMIDOVA, T. N., HAMBLIN, M. R.: *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2004**; 1, 279
- 16 KONAN, Y. N., GURNY, R., ALLÉMANN, E.: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2002**; 66, 89
- 17 MAGDA, D., WRIGHT, M., MILLER, R. A., et al.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**; 117, 3365
- 18 FUCHS, J., THIELE, J.; *Free Radic. Biol. Med.*, **1998**; 24, 835
- 19 DOUGHERTY, T. J., GOMEZ, C. J., HENDERSON, B. W., et al.; *J. Nat. Cancer Inst.*; **1998**; 90, 889
- 20 CASTANO, A. P., DEMIDOVA, T. N., HAMBLIN, M. R.: *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2005**; 2, 1
- 21 NEČAS, O. a kol.: *Obecná biologie pro lékařské fakulty*, **2000**, 295
- 22 WILSON, B. C., PATTERSON, M. S.; *Phys. Med. Biol.*, **1985**; 31, 327

- 23 HILLEGERSBERG, R., KORT, J. W., WILSON, J. H. P.; *Drugs*, **1994**; *48*, 510
- 24 MARIJNISSEN, J. P. A., STAR, W. M., VERSTEEG, A. A. C. et al.; *Liberia*
Progetto, **1985**; 387
- 25 MULLER, P. J., WILSON, B. C.; *Photochem. Photobiol.*, **1987**; *46*, 929
- 26 BONNET, R.; *Chem. Soc. Rev.*, **1995**; 19
- 27 MacROBERTS, A. J., BOWN, S. G., PHILIPS, D.; *Photosens. Comp.: „Their*
Chemistry, Biology and Clinical Use“; **1989**; 4
- 28 PADNEY, R. K., HERMAN, CH. K.; *Chem. Ind.*, **1998**; 739
- 29 NAKAE, E., FUKUSAKI, E., KAJIYAMA, S. et al.; *J. Photoch. Photobiol.* **2004**;
171, 67
- 30 DOUGHERTY, T. J., MANG, T. S.; *Photochem. Photobiol.*, **1987**; *46*, 67
- 31 HUEGER, B. D., LAWTER, J. R., WARINGREKAR, V. H. et al.; United States
patent No. 5059619, **1991**
- 32 HENDERSON, B. W., DOUGHERTY, T. J.; *Photochem. Photobiol.*, **1995**; *30*, 145
- 33 SHARMAN, W. M., ALLEN, C. M., van LIER, J. E.; *Drug Discov. Today*, **1999**; *4*,
507
- 34 MacDONALD, I. J., DOUGHERTY, T. J., *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2001**; *5*,
105
- 35 Miravant Medical Technologies [online][cit. 2006-01-19]. Dostupné z:
www.miravant.com
- 36 BOYLE, R. W., DOLPHIN, D.; *Photochem. Photobiol.*, **1996**; *63*, 469
- 37 Light Science Corporation [online][cit. 2006-01-19]. Dostupné z: www.lightsciences.com
- 38 STEWART, F., BAAS, P., STAR, W.; *Radiother. Oncol.*, **1998**; *48*, 233
- 39 SESSLER, J. L., MILLER, R. A.; *Biochem. Pharmacol.*, **2000**; *59*, 733
- 40 Drug News Perspect- 15(3) [online][cit.2006-01-19]. Dostupné z: www.prous.com
- 41 Pharmacyclics [online][cit.2006-01-19]. Dostupné z: www.pharmacyclics.com
- 42 SIBATA, M. N., TEDESCO, J. M., MARCHETTI, J. M.; *Eur. J. Pharmac. Sciences*,
2004; *23*, 131
- 43 DeOLIVEIRA, C. A., MACHADO, A. E. H., PESSINE, F. B. T.; *Chem. Phys. Lipids*,
2005; *133*, 69
- 44 BOYLE, R. W., PAQUETTE, B., van LIER, J. E.; *Br. J. Cancer*, **1992**; *65*, 813
- 45 REDDAN, J. C., ANDERSON, C. Y., XIU, H. et al.; *Photochem. Photobiol.*, **1999**;
70, 72

- 46 CALZAVARA-PINTON, P. G., VENTURINI, M., SALA, R.; *J. Photochem. Photobiol.* **2005**; 78, 1
- 47 SALIM, A., LEMAN, J. A., McCOLL, J. H. et al.; *Br. J. Dermatol.*, **2003**; 148, 539
- 48 ACKROYD, R., KELTY, C. J., BROWN, N. J. et al.; *Endoscopy*, **2003**; 35, 496
- 49 GUPTA, A. K., RYDER, J. E.; *Am. J. Clin. Dermatol.*, **2003**; 4, 699
- 50 DUSA Pharmaceuticals, inc. [online][cit.2006-01-19]. Dostupné z: www.dusapharma.com
- 51 MOHR, H., LAMBRECHT, B., SCHMITT, H.; *Imunol. Invest.*, **1995**; 24, 73
- 52 BRASSEUR, N., MENARD, I., FORGET, A. et al.; *Photochem. Photobiol.*, **2000**; 72, 780
- 53 SZEIMIES, R.-M., KARRER, S., ABELS, Ch. et al.; *J. Photochem. Photobiol.*, **1996**; 34, 67
- 54 LENARD, J., RABSON, A., VANDEROEF, R.; *Proc. Ntl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1993**; 90, 158
- 55 AGOSTINIS, P., VANTIEGHEM, A., MERLEVEDE, W. et al.; *Int. J. Biochem. Cell Biology*, **2002**; 34, 221
- 56 OLIVO, M., LAU, W., MANIVASAGER, V. et al.; *Int. J. Oncol.*, **2003**; 23, 1501
- 57 PADNEY, R. K., HERMAN, Ch. K.; *Chem. Ind.* **1998**; 739
- 58 KRÁL, V., DAVIS, J., ANDRIEVSKI, A. et al.; *J. Med. Chem.*, **2002**; 45, 1073
- 59 MEW, D., LUM, V., LEVY, J. G. et al.; *Cancer Res.*, **1985**; 45, 4380
- 60 HASAN, T., LIN, A., YARMUSH, D. et al.; *J. Control. Release*, **1989**; 10, 107
- 61 BOYLE, R. V., DOLPHIN, D.; *PCT Int. Apl.*, **1996**; 16, 966
- 62 ONO, N., BOUGAUCHI, M., MARUYAMA, K.; *Tetrahedron*, **1992**; 33, 1629
- 63 LEE, P. P. S., LO, P-Ch., CHAN, E. Y. M. et al.; *Tetrahedron Letters*, **2005**; 46, 1551
- 64 JIANG, X., PANDEY, R. K., SMITH, K. M.; *J. Chem. Soc.*, **1996**; 1, 1607
- 65 HAMBLIN, M. R., NEWMAN, E. L.; *Photochem. Photobiol.*, **1994**; 26, 45
- 66 ANNEHEIM-HERBELIN, G., PERRÉE-FAUVET, M., GAUDEMER, A. et al.; *Tetrahedron*, **1993**; 33, 7263
- 67 LANG, A., MOSINGER, J., WAGNEROVA, D. M.; *Coordin. Chem. Reviews*, **2004**; 248, 321
- 68 CHALABALA, M. et al.: *Technologie léků*, **2001** (druhé přepracované vydání)
- 69 POSTE, G., KIRSH, R., ALLISON, B. A.: *Bio/technology*, **1983**; 1, 869
- 70 ROSENTHAL, I.: *Photochem. Photobiol.*, **1991**; 53, 859

- 71 RICHTER, A. M., WATERFIELD, E., JAIN, A. K.: *Photochem. Photobiol.*, **1993**; *57*,
1000
- 72 SELMAN, S. H., GARBO, G. M., KECK, R. W.: *J. Urol.*, **1987**; *137*, 1255
- 73 MORGAN, A. R., GARBO, G. M., KECK, R. W.: *Cancer Res.*, **1988**; *48*, 194
- 74 KESSEL, D., MORGAN, A., GARBO, G. M.: *Photochem. Photobiol.*, **1991**; *54*, 193
- 75 TAILLEFER, J., BRASSEUR, N., VAN LIER, J. E.: *J. Pharm. Pharmacology*, **2001**;
53, 166
- 76 BRASSEUR, N., BRAULT, D., COUVREUR, P.: *Int. J. Pharm.*, **1991**; *70*, 129
- 77 LABIB, A., LENAERTS, V., CHOUINARD, F.: *Pharm. Res.*, **1991**; *8*, 1027
- 78 BOURDON, O., MOSQUEIRA, V., LEGRAND, P.: *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.*, **2000**; *55*, 164
- 79 BRASSEUR, N., OUELLET, R., LA MADELEINE, C.: *Br. J. Cancer*, **1999**; *80*,
1533
- 80 ALLÉMANN, E., ROUSSEAU, J., BRASSEUR, N.: *Int. J. Cancer*, **1996**; *66*, 821
- 81 VAN BERKEL, Th. J. C.: *J. Control. Release*, **1993**; *24*, 145
- 82 CANDIDE, C., MORLIERE, P., GOLDSTEIN, S.: *FEBS Lett.*, **1986**; *207*, 133
- 83 REDDI, E., ZHOU, C., BIOLO, R.: *Br. J. Cancer*, **1990**; *61*, 407
- 84 SCHMIDT-ERFURTH, U., DIDDENS, H., BIRNGRUBER, R.: *Br. J. Cancer*, **1997**;
75, 54
- 85 MEW, D., WAT, C. K., TOWERS, G. H. N.: *J. Immunol.*, **1983**; *130*, 1473
- 86 VROUENRAETS, M. B., VISSER, G. W. M., STEWART, F. A.: *Cancer Res.*, **1999**;
59, 1505
- 87 TAYROUZ, Y., DING, R., BURHENNE, J.: *Clinical Pharmacology and
Therapeutics*, **2003**; *73*, 397
- 88 BASF Pharmaceuticals [online][cit.2006-01-19]. Dostupné z:
www.basf.com/businesses/consumer/cosmeticingredients/database/detail.cgi?ID=110
- 89 Firemní katalog firmy SEPPIC: C/0019/GB/02/May 1993
- 90 Dostupné z [online][cit.2006-04-20]: http://strucbio.biologie.uni-konstanz.de/det/det_b.htm
- 91 Somerset Cosmetic Company [online][cit.2006-04-20]. Dostupné z:
<http://66.249.93.104/search?q=cache:F7QVERHB1cAJ:www.makingcosmetics.com/msds/msds-polyglucose.pdf+decyl+glucoside+physical+chemical+properties&hl=cs&ct=clnk&cd=5>
- 92 ČESKÝ LÉKOPIS 2002
- 93 DEGUSSA Personal Care Documentation, issue: srpen 2003 (CD)

-
- ⁹⁴ Dostupné z [online][cit.2006-04-20]:
http://66.249.93.104/search?q=cache:ZytlgxLNzYAJ:ecb.jrc.it/classlab/11004_DE_2-ethylhexyl-2-ethylhexanoate.doc+Ethylhexyl+ethylhexanoate+properties&hl=cs&ct=clnk&cd=9
- ⁹⁵ Commission Directive 2000/33/EC of 25 April 2000 adapting to technical progress for the 27th time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. Annex II, Method B.41. Phototoxicity - in vitro 3T3 NRU phototoxicity test. Official Journal of the European Communities, 8 June 2000, Volume 43, L136, pp.98-107. OECD TG 432 : In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test (adopted 13th April, 2004).