

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Hradec Králové, 2006

Veronika HORÁKOVÁ

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv



**Solubilizační systémy pro potenciální fotodynamicky  
aktivní látky II.**

Vypracovala: Veronika Horáková

Školitel: PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracovala samostatně. Veškerou použitou literaturu a materiály uvádím v seznamu literatury.

Honětice, květen 2006

podpis: .....

Chtěla bych poděkovat svému školiteli PharmDr. Miroslavu Miletínovi, Ph.D. za odborné vedení a trpělivost při vypracovávání úkolů a experimentů k diplomové práci. Taktéž děkuji PharmDr. Petru Zimčíkovi, Ph.D. za cenné rady a v neposlední řadě paní laborantce Věnceslavě Hronové za vytvoření příjemného pracovního prostředí v laboratoři.

## OBSAH

<i>OBSAH</i> .....	1
<i>SEZNAM ZKRATEK</i> .....	3
<i>SEZNAM OBRÁZKŮ</i> .....	5
<i>SEZNAM TABULEK</i> .....	6
<b>1. REŠERŠE</b> .....	<b>7</b>
1.1. ÚVOD.....	7
1.2. HISTORIE A SOUČASNOST .....	9
<i>Historie</i> .....	9
<i>Současnost</i> .....	10
1.3. PRINCIP PDT.....	13
<i>Mechanismus PDT</i> .....	13
<i>Fotofyzikální základ PDT</i> .....	14
<i>Fotochemický základ PDT</i> .....	15
1.4. SVĚTLO – ZDROJ A PŘÍVOD .....	20
<i>Přístrojové vybavení – vývoj</i> .....	20
<i>Přívod světla</i> .....	21
<i>Chování světla v PDT</i> .....	22
1.5. FOTOSENZITIZÉR .....	26
<i>Vlastnosti ideálního fotosenzitizéru</i> .....	26
<i>Klasifikace fotosenzitivních látek</i> .....	27
1.6. MOŽNOSTI DISTRIBUCE PS DO CÍLOVÝCH MÍST .....	37
<i>Aktivní targeting</i> .....	37
<i>Pasivní targeting</i> .....	42
<i>Dlouhocirkulující dopravní systémy</i> .....	49
<i>Cyklodextriny – moderní přenašeče PS</i> .....	50
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>51</b>
2.1. CÍL PRÁCE .....	51
2.2. POMOCNÉ LÁTKY PRO KAPALNÉ DISPERZNÍ SYSTÉMY .....	52
<i>Emulgátory</i> .....	52
<i>Solubilizátory</i> .....	53
2.3. POUŽÍVANÉ SOLUBILIZÁTORY, EMULGÁTORY A LIPIDY .....	60
2.4. FTALOCYANINY .....	68
2.5. METODIKY .....	72
<i>Test na fototoxicitu</i> .....	72
<i>Test na cytotoxicitu</i> .....	72
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>73</b>

3.1.	PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ BARVIV.....	74
3.2.	SOLUTOL <sup>®</sup> HS 15 – VODNÉ SOUSTAVY.....	78
3.2.1.	<i>Vzorky disperzí solubilizátoru Solutol<sup>®</sup> HS 15 s klesající koncentrací.....</i>	78
3.2.2.	<i>25% Solutol se ZIP-T-44Mg o koncentraci 0,1 μmol/l.....</i>	79
3.2.3.	<i>1% Solutol se ZIP-T-44Mg o koncentraci 100 μmol/l.....</i>	80
3.2.4.	<i>1% Solutol se ZIP-T-37Mg o koncentraci 5 μmol/l.....</i>	81
3.2.5.	<i>20% Solutol se ZIP-T-37Mg o koncentraci 5 μmol/l.....</i>	82
3.3.	SOLUTOL <sup>®</sup> HS 15 – SOUSTAVY S MCT.....	83
3.3.1.	<i>5%; 2,5% Solutol s 5 % MCT.....</i>	83
3.3.2.	<i>5% Solutol, 5% MCT s různými barvivy.....</i>	83
3.4.	ABIL CARE 85.....	85
3.4.1.	<i>1%, 2% a 3% Abil Care 85 s 5% MCT.....</i>	85
3.4.2.	<i>3% Abil care 85 se ZIP-T-37Mg v koncentraci 100 μmol/l.....</i>	85
3.5.	POLYSORBÁT 80, POLYSORBÁT 20.....	86
3.5.1.	<i>Různé koncentrace Polysorbátu 80 (Polysorbátu 20) s 5% MCT.....</i>	86
3.5.2.	<i>Test na cytotoxicitu u PS 80 a PS 20:.....</i>	88
3.5.3.	<i>PS 80, PS 20 s 5% MCT, popř. barvivem 123Zn o koncentraci 100 μmol/l.....</i>	89
3.5.4.	<i>Test na fototoxicitu u vzorku PS80-1B.....</i>	90
3.5.5.	<i>Různé koncentrace Polysorbátu 80 s různými lipidy.....</i>	90
3.5.6.	<i>Soustavy PS 80 s různými estery a barvivy ZIP-T-37Mg nebo ZIP-T-21Zn.....</i>	92
3.5.7.	<i>Test na fototoxicitu u vzorků PS80-34, 36, 38, 40, 42, 44.....</i>	95
3.6.	POLYGLYCERYL-3-OLEÁT.....	96
	<i>Různé koncentrace Polyglyceryl-3-oleátu s 5 % MCT.....</i>	96
3.7.	PEG-7-GLYCERYLCOCOÁT.....	97
	<i>Soustava s 5 % PEG-7-GC, 5 % MCT.....</i>	97
<b>4.</b>	<b>DISKUSE.....</b>	<b>98</b>
<b>5.</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>101</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>102</b>

## SEZNAM ZKRATEK

Ab	protilátka
ALA	aminolevulinová kyselina
AMD	senilní makulární degenerace
BPD-MA	verteporfin
C12-C15 AB	C12-C15 alkylbenzoát
CMC	kritická micelární koncentrace (koncentrace tenzidu, při které začne docházet k tvorbě micel)
CRM	cremophor
DEHK	diethylhexylkarbonát
DMSO	dimethylsulfoxid
DO	decyloleát
EGF	epidermální růstový faktor
EHO	ethylhexyloktanoát
emulze o/v	emulze typu olej ve vodě
EO	ethylenoxid
EPR	mechanismus zvýšené propustnosti a retenčního efektu („enhanced permeation and retention effect“)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA („Food and Drugs Administration“)
HLB	hydrofilní-lipofilní rovnováha
Hp	hematoporfyrin
HpD	hematoporfyrinový derivát
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
i.v.	intravenózní podání
LDL	plazmatické lipoproteiny o nízké hustotě
MCT	triglyceridy složené ze středně dlouhých řetězců
MoAb	monoklonální protilátky
mTHPC	temoporfin

OP	oktylpalmitát
PBS	fosfátový pufr
Pc	ftalocyaniny
PDT	fodynamická terapie
PE	fosfatidylethanolamin
PEG	polyethylenglykol
PEO	polyethylenoxid
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů
PHS	fagocytární systém
PPO	polypropylenoxid
PpIX	protoporfyrin IX
PS	fotosenzitizér
PS 80 (PS 20)	polysorbát 80 (polysorbát 20)
PVAL	polyvinylalkohol
ROS	reaktivní formy kyslíku
SnET2	etiopurpurin-komplex s cínem
THF	tetrahydrofuran
UV-VIS	spektrometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti spektra
ZnPc	ftalocyanin s centrálním atomem Zn



## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1:	Zjednodušený mechanismus PDT.....	11
Obr. 2:	Mechanismus PDT cytotoxicity.....	15
Obr. 3:	Detailnější zobrazení přenosu energie u fotoprocesu typu II .....	17
Obr. 4:	Oxidační degradace.....	18
Obr. 5:	Různé formy šíření světla používané ve fotodynamické terapii. ....	22
Obr. 6:	Závislost vlnové délky světla na hloubce průniku do nádoru .....	24
Obr. 7:	Struktury přírodních porfyrinů .....	28
Obr. 8:	Struktury verteporfinu a temoporfinu .....	30
Obr. 9:	Struktury etiopurpurinu a talaporfinu.....	31
Obr. 10:	Struktura photochloru .....	32
Obr. 11:	Struktury ftalocyaninů a naftalocyaninů .....	33
Obr. 12:	Struktura motexafinu .....	34
Obr. 13:	Struktury porfycenu a safyriu .....	34
Obr. 14:	Struktura hypericinů.....	35
Obr. 15:	Struktura methylenové modři a bromovaného rhodaminu .....	36
Obr. 16:	Schéma tvorby polymerní micely .....	45
Obr. 17:	PEG-PE – sloučenina vytvářející micely .....	46
Obr. 18:	benzoporfyrinové deriváty .....	47
Obr. 19:	Struktura Solutol HS 15 .....	60
Obr. 20:	Struktura polysorbátů.....	64
Obr. 21:	Struktura barviva ZIP-T-44Mg .....	68
Obr. 22:	Struktura barviva ZIP-T-37Mg .....	69
Obr. 23:	Struktura barviva 123Zn .....	70
Obr. 24:	Struktura barviva ZIP-T-21Zn .....	71

## **SEZNAM TABULEK**

Tab. 1:	Oblasti aplikace PDT .....	36
Tab. 2:	HLB tenzidů a jejich použití .....	53
Tab. 3:	Vyplavení histaminu a pokles krevního tlaku po injekčním podání emulgátorů .....	62
Tab. 4:	Stupeň cytotoxicity vzorku .....	72
Tab. 5:	Vzorky pro test cytotoxicity Solutolu HS 15 .....	78
Tab. 6:	Výsledky testu cytotoxicity Solutolu HS 15 (+ THF).....	79
Tab. 7:	Vzorky Solutol HS 15 + MCT + barvivo.....	84
Tab. 8:	Vzorky PS 80 (20) s MCT .....	87
Tab. 9:	Výsledky testů na cytotoxicitu .....	88
Tab. 10:	Vzorky PS 80 (20) + MCT + <sup>123</sup> Zn .....	89
Tab. 11:	Výsledky testu fototoxicity vzorku PS80-1B (tabulka a graf) .....	90
Tab. 12:	Vzorky PS 80 + lipidy.....	91
Tab. 12:	- pokračování .....	92
Tab. 13:	Vzorky PS 80 + roztoky barviv v lipidech.....	94
Tab. 14:	Vzorky PS 80 + roztoky barviv v lipidech.....	94
Tab. 15:	Výsledky testu fototoxicity vzorků s PS 80 .....	95
Tab. 16:	Vzorky polyglyceryl-3-oleátu s MCT .....	96

# 1. REŠERŠE

## 1.1. ÚVOD

Fotodynamická terapie (photodynamic therapy - PDT) je známa již více než sto let, ale až v posledních letech se začala v praxi více uplatňovat. Původně se rozvinula jako jedna z možností nádorové terapie, ale své důležité místo nalezne bezpochyby i při léčbě jiných onemocnění (nenádorových).

V současné době jsou intenzivně studovány nové možnosti fotochemoterapie nádorových onemocnění. Fotodynamická terapie je vedle základních léčebných postupů (chirurgie, chemoterapie, radioterapie a imunoterapie) další perspektivní metodou léčby nádorového onemocnění. Jde o fotochemoterapii, která představuje kombinované použití fotodynamicky aktivní látky (fotosenzitizér) a světla za přítomnosti kyslíku.<sup>1</sup> PDT je možné využít i při léčbě dalších nezhoubných onemocnění (např. různých kardiovaskulárních, dermatologických i oftalmologických nemocí). Účinnost PDT závisí na selektivní kumulaci fotosenzitizéru v cílové nemocné tkáni, následované ozáření tkáně UVA nebo viditelným zářením (světlem), jehož vlnová délka odpovídá absorpčnímu maximu fotosenzitizéru. Po ozáření dochází k produkci cytotoxických agens, jež nevratně ničí nádorové buňky.

Po absorpci světla dochází ve fotosenzitizéru ke vzniku excitovaných stavů a k přesunu transformované energie na kyslík se vznikem singletového kyslíku, který je reaktivnější než základní molekulární stav a vede k oxidaci membránových proteinů a lipidů, což se projevuje cytolýzou a tumorózní destrukcí. Oxidativní poškození buněčných organel podporuje kombinaci biochemických, genetických a molekulárních změn, které mají na normální buňku destruktivní účinek. Výsledným terapeutickým efektem je nekróza současně s apoptózou nádorových buněk.<sup>2</sup>

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. Ne vždy se podaří této rovnováhy dosáhnout a léčba je provázena řadou vedlejších účinků nebo nelze odstranit ložisko úplně.<sup>3</sup>

Je tomu více jak 25 let, co byla fotodynamická terapie navržena jako vhodný prostředek k léčbě onkologických onemocnění, ale teprve nyní se tento přístup v

klinické praxi více využívá. PDT má oproti chirurgii a radioterapii několik potenciálních výhod: je poměrně neinvazivní, lze ji přesně zacílit, je možné podat opakované dávky bez limitujícího celkového počtu dávek (jak je tomu u radioterapie), proces hojení nevede ke vzniku jizev nebo je zjizvení jen malé. PDT lze obvykle provádět ambulantně nebo za jednodenní hospitalizace, je pro pacienta pohodlná a téměř nemá vedlejší účinky. Značně již pokročilo pochopení biologie PDT a dnes jsou také běžně dostupná účinná, vhodná a nepřiliš drahá zařízení k aplikaci světla. K dispozici přibývají rovněž užitečné výsledky dobře kontrolovaných randomizovaných studií III. fáze klinického zkoušení, zvláště u léčby nemelanomových nádorů kůže a Barrettova jícnu, vyvíjejí a zdokonalují se lepší fotosenzitizující látky.<sup>4</sup>

## 1.2. HISTORIE A SOUČASNOST

### Historie

První léčebné využití světla (terapeutického agens) sahá několik tisíc let zpět. Některá kožní onemocnění (např. psoriasis, vitiligo, rakovina), infekce rickettsiemi nebo některé psychózy byly právě tímto způsobem léčeny již ve starověkém Egyptě, Indii nebo Číně. Teprve až na přelomu století 19. a 20. se začala fototerapie více využívat. O její rozvoj se ve velké míře zasloužil dánský lékař Niels Finsen, který použitím ultrafialového světla léčil kožní formu tuberkulózy, za což získal v roce 1903 Nobelovu cenu.

Egyptané používali perorálně podávané rostliny obsahující psoraleny a sluneční světlo k léčbě vitiliga a později ve 12. století také k léčbě leukodermy. Ale až od sedmdesátých let 20. století doznala léčba lupénky pomocí psoralenů aktivovaných UVA světlem (PUVA terapie) rozvoje. V současné době 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 fotosenzitizérem 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 (Obr. 1).

Buněčná smrt indukovaná interakcí světla a chemikálie je známa více než 100 let. Fotodynamické reakce byly poprvé systematicky studovány již v roce 1900 Oskarem Raabem na kulturách prvoků rodu Paramecium. Kombinace akridinu a světla měla na protozoa letální efekt. Von Tappeiner prokázal závislost těchto procesů na kyslíku a v roce 1903 publikoval první klinické zkušenosti s užitím eosinu a světla v léčbě kožních nádorů. Byl také prvním, kdo použil poprvé v roce 1907 výraz „fotodynamický efekt“.<sup>3</sup>

V polovině 50. let minulého století Richard Lipson a jeho spolupracovníci syntetizovali hematoporfyrinové deriváty (Photofrin<sup>®</sup> I, HpD) za účelem zlepšení jejich akumulace v nádorové tkáni a následně k využití PS jako fluorescenčního markeru pro detekci tumorů v nádorové diagnostice. V 70. letech provedl Dougherty rozsáhlejší

preklinickou studii s 25 pacienty s celkem 113 primárními i sekundárními nádory kůže. Výsledky léčby HpD byly více než uspokojivé. V 111 případech léčených nádorů se docílilo částečné nebo úplné nekrózy nádorových buněk.<sup>5</sup> Tyto výsledky doložily, že HpD a světlo z červené oblasti světelného spektra mohou selektivně ničit nádorové buňky bez poškození zdravé tkáně.<sup>6</sup>

### **Současnost**

Photofrin<sup>®</sup> II, čištěný hematoporfyrinový derivát (HpD), je dnes nejběžněji používaným PS a jedinou látkou schválenou FDA k léčbě povrchového nádoru žaludku v Kanadě, rakoviny plic v časném stádiu a pokročilé rakoviny jícnu v Holandsku a Japonsku. Tato látka se řadí k první generaci fotosenzitizérů, jež má celou řadu nevýhod. Jsou to směsi těžko separovatelných, částečně neidentifikovatelných porfyrinů, které vykazují nízkou selektivitu k cílové tkáni. Vzhledem k jejich nízkému extinkčnímu koeficientu je zapotřebí velkého množství fotosenzitizéru k dosažení uspokojivé fotodynamické reakce. Jejich absorpční maxima se pohybují v relativně krátkých vlnových délkách (630 nm) a to zapříčiňuje malou propustnost světla tkáněmi. Pomalá eliminace z těla vede k jejich ukládání v kůži a tedy k dlouhodobé kožní fotosenzitivitě dokonce až 6-8 týdnů po PDT léčbě. Léčený se nesmí během této doby vystavovat slunečnímu světlu, aby se předešlo prudké a vážné erytematózní reakci, což je pro pacienty velice omezující.<sup>5</sup> Photofrin<sup>®</sup> II tedy nepatří mezi ideální fotosenzitizéry a proto se hledaly látky s výhodnějšími vlastnostmi z hlediska farmakokinetiky i farmakodynamiky. Tak postupně vznikaly látky vyšších generací, z nichž některé jsou již zavedené do klinické praxe (aminolevulinová kyselina, verteporfin, temoporfin).<sup>3</sup>

Do dalších generací fotodynamicky aktivních látek spadají novější sloučeniny již dobře chemicky identifikovatelné. Jsou to porfyrinové deriváty (ftalocyaniny, naftalocyaniny, chloriny a bakteriochloriny), tedy látky založené na struktuře tetrapyrrolových makrocyclů. Vykazují výrazný absorpční pík v rozmezí vlnových délek 650-800 nm, při kterých světlo více proniká do tkáně. Navíc mají větší selektivitu k nemocným tkáním a rychleji se eliminují z těla ven, což omezuje výskyt vedlejších účinků.<sup>5</sup>

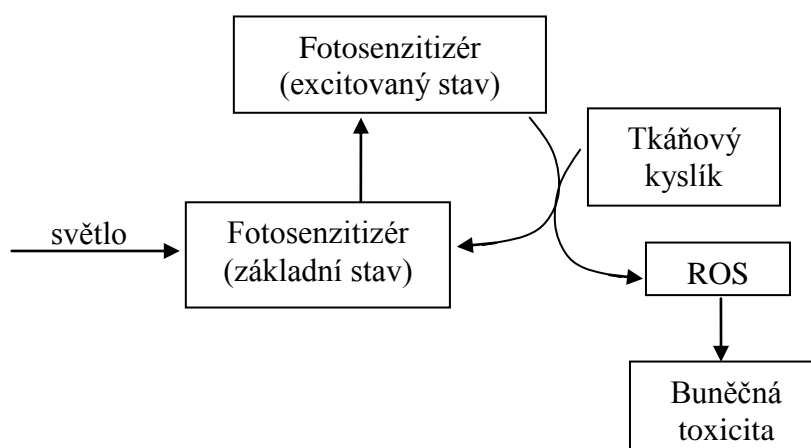
Avšak mnohé z těchto PS jsou hydrofobní. Jejich lipofilní povaha může být důležitým faktorem ovlivňujícím přednostní akumulaci v hydrofobních místech v buňce. Proto je nutné, aby byly tyto molekuly schopné přecházet do buněk přes lipidové

membrány. V důsledku jejich minimální rozpustnosti ve vodě nelze využít cestu intravenózního podání do organismu. Z toho důvodu bylo nezbytné vyvinout vhodné „dopravní systémy“ jako např. olejové disperze, liposomy, polymerní částice (nano a mikročástice) nebo konjugáty PS s hydrofilním polymerem. Navíc pro zdokonalení specifického příjmu (uptake) cílovou tkání a zlepšení PDT účinnosti se v nedávných letech zkoumaly a vyvíjely další možnosti: např. komplexy PS se sérovými lipoproteiny, PS konjugované se specifickými monoklonálními protilátkami nebo specifické „tumor-vyhledávající“ molekuly.

Ideální dopravní systém by měl umožnit selektivní akumulaci fotosenzitizéru v nemocné tkáni a dodání jeho potřebné terapeutické koncentrace do cílového místa s minimální nebo žádnou kumulací v ostatních buňkách. Přenašeč musí být schopen transportovat PS bez ztráty nebo změny jeho aktivity. Systém by měl být taktéž biodegradabilní s malou nebo žádnou negativní imunitní odpovědí.

Mnoho fotosenzitizérů má kvůli své chemické struktuře tendenci agregovat ve vodném prostředí v důsledku snahy jejich hydrofobního skeletu vyhnout se kontaktu s molekulami vody. To je určující faktor, který brání in vivo účinnosti léku svou sníženou biodostupností a limitující kapacitou absorpce světla.<sup>5</sup>

Další rozvoj PDT je zaměřen na 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 objevovat cíleně specifické fotosenzitizéry (tzv. „targeting“).



Obr. 1: Zjednodušený mechanismus PDT (ROS - reaktivní formy kyslíku, z angl. „reactive oxygen species“)

V současné době jsou do klinické praxe ve světě zavedeny pouze 3 klasické PS. Pro systémové podávání jsou schváleny dvě fotosenzitizační látky: sodná sůl porfimeru a temoporfin. Pro lokální aplikaci byly schváleny aminolevulová kyselina a její methyl ester - methylaminolevulinát.<sup>4</sup> Řada dalších se již nachází v pokročilých fázích klinického testování. I přes své nevýhodné vlastnosti zůstává HpD stále dosud nejrozšířenějším a nejpoužívanějším PS, neboť je doposud nejprozkoumanější. Dá se předpokládat, že novější PS druhé generace v budoucnosti zaujmou jeho místo díky svým výhodnějším vlastnostem.



### 1.3. PRINCIP PDT

#### Mechanismus PDT

Základní mechanismus fotodynamické terapie zahrnuje tři základní složky. První je fotosenzitizér - světlo absorbující molekula, která se aktivuje druhým elementem - světlem odpovídající vlnové délky. Třetí složkou je molekulární kyslík, jemuž excitovaný PS předává energii. Molekulární kyslík je využíván v průběhu fotochemické reakce k vytvoření reaktivních forem kyslíku (zejména singletového kyslíku) - cytotoxických agens, které následně zničí neoplastickou tkáň. Tyto agens napadají okolní biomolekuly, porušují jejich biologickou funkci a v konečném důsledku vedou ke smrti buňky. Definitivní zničení nádoru není přičítáno pouze přímému efektu na zničení buněk, svou úlohu hraje i indukovaný cévní uzávěr v ozářené oblasti vedoucí k nedostatku živin a kyslíku. V neposlední řadě k celé věci přispívá i aktivace imunitní odpovědi organismu.<sup>3,7</sup>

Vlnová délka světla aktivujícího PS je pro použití v PDT velice důležitá. Světlo o nižších vlnových délkách proniká živými tkáněmi jen do hloubky několika milimetrů, přitom zasažená oblast je velice malá a dochází také k pohlcování světla endogenními chromofory (např. hemoglobinem). Jak již bylo zmíněno, původně do terapie zavedený HpD - např. Photofrin<sup>®</sup> má velice nízkou maximální vlnovou délku vhodnou pro aktivaci (630 nm). Optimální rozpětí vlnových délek se pohybuje v oblasti 680-800 nm. Nad 800 nm má záření nízkou energii a již nemusí dostačovat k účinné aktivaci PS.<sup>3</sup>

Fotosenzitizér (PS) se obvykle podává intravenózně a rychle se distribuuje do tělesných tkání. Asi za 48-72 hod po podání mohou fotosenzitizující látky dosáhnout znatelně vyšší koncentrace v tumorózní tkáni než v okolní zdravé tkáni. Ačkoliv přesný mechanismus selektivního vychytávání (uptake) fotosenzitizéru není dosud zcela pochopen, lze tento proces alespoň částečně objasnit. Je pravděpodobné, že důvod tkví v abnormální fyziologii samotného nádoru, jako je např. nedostatečná lymfatická drenáž, zvýšená fagocytóza, větší propustnost cévní stěny v nádorové tkáni, kyselější pH v oblasti nádoru. K selektivnímu vychytávání PS také přispívá zvýšené množství receptorů pro LDL (low-density lipoproteiny) na buněčné membráně, které jsou schopny navázat fotosenzitizér a v neposlední řadě také abnormální složení stroma nádorové tkáně.<sup>4</sup>

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

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

Obecně mechanismus PDT je založen na fotofyzikálních a fotochemických vlastnostech fotosenzitizéru a jeho schopnosti produkovat cytotoxická agens, která následně působením na exponovanou buňku vyvolávají biologickou odpověď.<sup>7</sup>

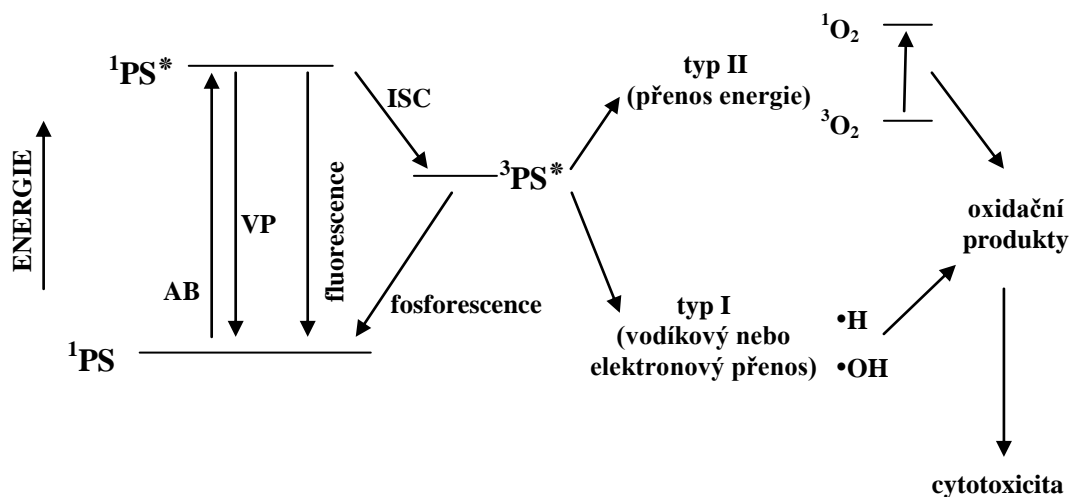
### **Fotofyzikální základ PDT**

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. 2).<sup>8</sup>

Základní stav fotosenzitizéru má dva elektrony s opačným spinem (známo jako singletový stav) v molekulovém orbitalu s nízkou energií. Po absorpci světla je jen jeden ze dvou elektronů excitován do orbitalu s vyšší energií a PS přechází ze základního singletového stavu ( $^1PS$ ) do velice krátce trvajícího (v jednotkách nanosekund) excitovaného singletového stavu  $^1PS^*$ . Tento stav pravděpodobně jen zanedbatelně ovlivňuje fotodynamickou aktivitu PS, neboť trvá velice krátce na to, aby umožnil efektivní interakci s okolním prostředím. Z této energetické hladiny se může PS uvolnit několika způsoby a to jak procesy radiačními (emisí světla - fluorescencí), tak i neradiačními (vnitřní přeměnou (VP)). V případě vnitřní přeměny dojde k uvolnění energie ve formě tepla v důsledku srážek PS s molekulami rozpouštědla. Je možné, že tento děj je důležitý při vlastním účinku na buňky. Fakt, že většina PS jsou fluorescentní, dovoluje stanovit množství fotosenzitizéru v buňkách nebo tkáních a umožňuje sledovat přímo in vivo farmakokinetické děje a distribuci PS u pacientů a živých zvířat.

Velký význam pro PDT představuje proces přeměny excitovaného fotosenzitizéru tzv. intersystémovou přeměnou („intersystem crossing“ - ISC). Tento proces vyžaduje inverzi spinu jednoho elektronu, čímž přeměňuje fotosenzitizér do relativně dlouho trvajícího (řádově mikrosekundy) excitovaného tripletového stavu  $^3PS^*$ . Dlouhá životnost PS v tripletovém stavu je vysvětlována faktem, že ztráta energie emisí světla

(fosforescenci) je „spinem-zakázaný“ proces, protože fotosenzitizér by měl přímo přejít z tripletového do singletového stavu. Každá taková „nepovolená“ cesta je méně preferovaná než cesta „povolená“, ale dobrý fotosenzitizér prochází „nepovolenou“ ISC cestou s vysokou pravděpodobností, což je podstatné pro vlastní fotodynamickou aktivitu.<sup>3,9</sup>



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

Z tripletového stavu se fotosenzitizér může uvolnit několika způsoby. Vyzářením fotonu ve formě fosforescence (tzv. triplet-singlet emise) anebo dalšími cestami již bez vyzářování, což reprezentují dva procesy, které jsou již vlastním základem PDT. Lze je rozdělit na fotoproces typu I a II. Oba fotoprocesy se objevují současně a poměr mezi nimi je dán povahou použitého PS, koncentrací substrátu a kyslíku ve tkáni. Všeobecně se přijímá, že fotoproces typu II je zvláště odpovědný za vlastní fotodynamický účinek, neboť právě při něm vzniká singletový kyslík.<sup>3</sup>

### **Fotochemický základ PDT**

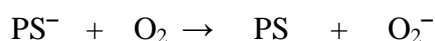
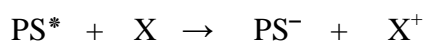
Excitovaný tripletový stav ( $^3\text{PS}^*$ ) může podstoupit dva druhy následujících reakcí:

#### ***Fotoproces Typu I***

Fotosenzitizér v excitovaném stavu může přímo reagovat se substrátem (buněčná membrána nebo molekula), rozpouštědlem nebo jiným fotosenzitizérem. Dochází k transferu protonu nebo elektronu na radikálovou formu iontu (příslušný radikálový anion nebo kation). Tyto radikály jsou velmi reaktivní a mohou dále reagovat

s molekulárním kyslíkem a vytvořit reaktivní druhy kyslíku, jako je např. superoxidový anion, nebo způsobit neopravitelné poškození. Tyto reakce způsobují oxidativní poškození a mohou eventuelně vést k cytotoxickému efektu pozorovanému v průběhu PDT.<sup>3,9</sup>

K fotoprocesu typu I dochází především za podmínek snížené koncentrace kyslíku. Za úplné anoxie reaguje excitovaný fotosenzitizér (PS<sup>\*</sup>) přímo s okolním biologickým substrátem (X), dojde k přenosu elektronu za vzniku oxidovaného substrátu (X<sup>+</sup>) a redukovaného fotosenzitizéru (PS<sup>-</sup>). Ten může za hypoxie dále reagovat s kyslíkem za vzniku superoxidového anionu (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), který poskytuje reaktivní hydroxidový radikál (HO•) a právě ten se dále významně účastní oxidačních procesů na biomolekulách.



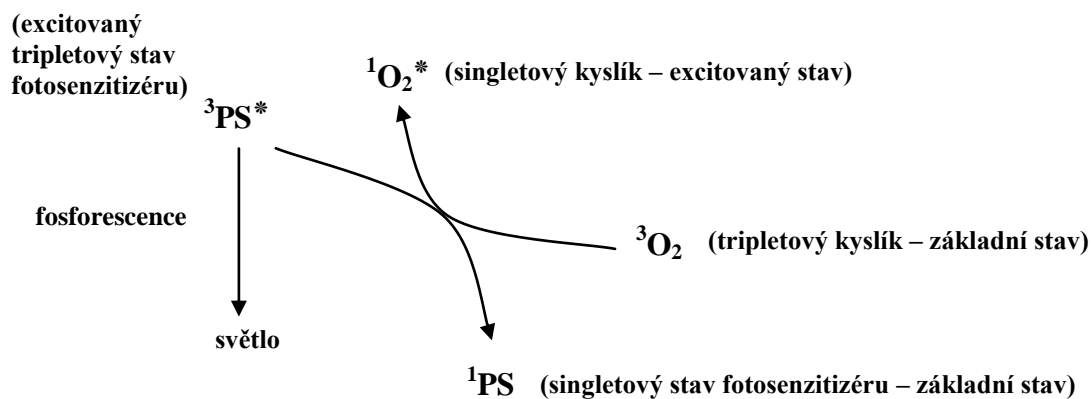
Může také dojít k přenosu elektronu již v prvním kroku a vytvoří se radikál z biologického substrátu (X•) nebo okolního rozpouštědla. Radikály pak reagují přímo s kyslíkem za tvorby např. superoxid anion radikálu (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>) anebo přímo zafixují změnu v biologické molekule její oxidací (XO).<sup>3</sup>

Superoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) není příliš reaktivní v biologických systémech a sám o sobě nezpůsobuje velké oxidační poškození, avšak může zreagovat sám se sebou, pak vzniknou molekuly peroxidu vodíku a kyslíku reakcí označovanou jako „dismutace“, kterou katalyzuje enzym superoxid-dismutáza (SOD). Peroxid vodíku hraje důležitou roli v biologických systémech, přes buněčné membrány prochází rychle, ale nemůže být eliminován z těla buňky ven. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je potřebný pro funkci mnoha enzymů a ty jsou také samozřejmě nepostradatelné (stejně jako kyslík) pro správné fungování životních dějů. Superoxid je důležitý, jak již bylo výše zmíněno, k produkci vysoce reaktivního hydroxidového radikálu (HO•). V tomto ději vystupuje superoxid jako redukční nikoliv oxidační činidlo, neboť poskytuje jeden elektron k redukci kovových iontů (např. Fe<sup>3+</sup>), které katalyzují přeměnu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na hydroxidový radikál. Tato reakce byla pojmenována jako Fentonova reakce a byla objevena před více než sto lety. Uplatní se hojně v biologických systémech, protože řada buněk obsahuje železo, měď nebo jiné kovové prvky, které katalyzují tuto reakci. Redukované ionty (např. Fe<sup>2+</sup>) se pak účastní reakce, při níž se štěpí vazba O–O v molekule peroxidu vodíku a vzniká hydroxidový radikál (HO•) a hydroxidový iont (HO<sup>-</sup>).

Stejně jako peroxid vodíku tak i HO• snadno přechází přes buněčné membrány a způsobuje díky své vysoké reaktivitě další oxidativní změny. Reaguje s organickými substráty (R), za tvorby dalších reaktivních radikálů. Ty mohou reagovat i s molekulou kyslíku v základním stavu za vzniku dalšího opět vysoce reaktivního peroxidového radikálu (ROO•), který reaguje s jinými dalšími molekulami organického substrátu v následné řetězové reakci. Tento typ řetězové reakce je obvyklý u oxidačního poškození mastných kyselin a ostatních lipidů a to vysvětluje, proč radikály jako hydroxidový radikál mohou způsobit takové rozsáhlé poškození.<sup>9</sup>

### **Fotoproces Typu II**

Tento fotoproces převažuje především při vyšších koncentracích kyslíku ve tkáni. PS v tripletovém stavu předá svou energii přímo molekulárnímu kyslíku (ten se nachází v základním tripletovém stavu), což vede k vytvoření excitovaného stavu kyslíku známého jako singletový kyslík ( $^1\text{O}_2^*$ ). Vzniku této silně reaktivní formy kyslíku předchází inverze spinu jednoho z jeho vnějších elektronů. Díky své vysoké reaktivitě může singletový kyslík reagovat s velkým množstvím biologických substrátů, způsobovat oxidativní poškození a buněčnou smrt.<sup>7</sup>



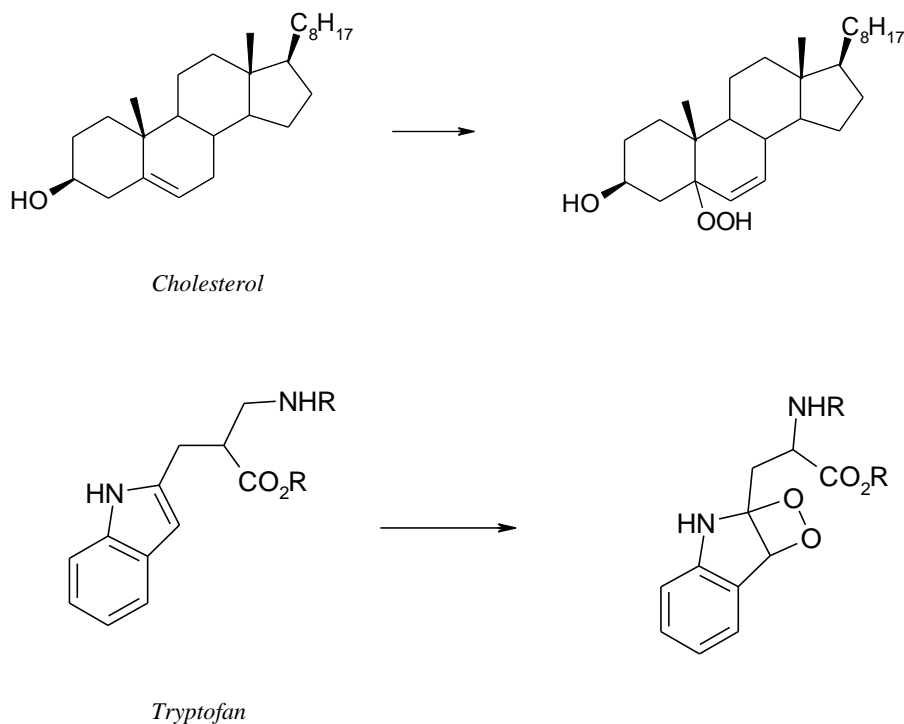
#### **„spinem – povolený“ energetický přenos**

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

Singletový kyslík je velmi reaktivní agens, jehož životnost se liší podle prostředí, ve kterém se nachází. Např. ve vodě se pohybuje okolo 2-4  $\mu\text{s}$ , v lipidech 50-100  $\mu\text{s}$ , kdežto v biologickém prostředí jen okolo 0,04-0,6  $\mu\text{s}$ . Získané hodnoty doby existence singletového kyslíku v biologickém prostředí se značně liší a to právě z důvodu jeho

obtížné detekce. Přesto se předpokládá, že  $^1\text{O}_2$  není schopen pronikat hlouběji do tkáně než jen přibližně na šířku buněčné lipidové membrány. Z toho vyplývá, že přímým účinkem PDT jsou usmrceny jen buňky obsahující PS, což je samozřejmě žádoucí. Dále díky selektivní kumulaci PS v nemocné tkáni a jejímu pozdějšímu ozáření je umožněn přesný a lokalizovaný zásah.

Reaktivní singletový kyslík je tedy to skutečné cytotoxické agens, neboť rychle reaguje s okolními buněčnými komponenty, především s molekulami přítomnými v membránách, cholesterolem, nenasycenými mastnými kyselinami a DNA. Terčem jsou i aminokyselinové zbytky v proteinech a to především aminokyseliny cystein, methionin, tyrozin, histidin a tryptofan. Aktivovaný kyslík reaguje s biologickým substrátem několika způsoby, např. oxidací nebo cykloadicí (Obr. 4). Všechny tyto reakce razantně poškozují biologické procesy.<sup>3</sup>



Obr. 4: Oxidační degradace

V PDT je singletový kyslík hlavním a limitujícím faktorem, je zodpovědný za ireverzibilní poškození různých buněčných membrán včetně plasmy, mitochondrií, lyzozomů, modifikaci proteinů i jaderné membrány.

PDT využívá zároveň několik různých mechanismů k úplnému poškození nádorové tkáně. Kromě spuštění buněčné nekrózy a apoptózy ke zničení ve velké míře přispívá i přerušení krevního zásobení nemocné tkáně, což znemožňuje přísun kyslíku a živin.

Nakonec s rozvojem zánětu a imunitní odpovědi je zasažená tkáň zcela zničena pouze s malým nebo vůbec žádným postižením okolní zdravé tkáně. Nádor je tedy zničen relativně rychle a jakékoliv případné poškození okolní tkáně se zhojí v následujících 6-8 týdnech po terapeutickém zásahu a to obvykle bez jizev.<sup>4,5</sup>

## 1.4. SVĚTLO – ZDROJ A PŘÍVOD

U PDT lze zacílení (targeting) a selektivity dosáhnout pomocí několika faktorů. Prvním z nich je způsob přívodu světla. S využitím moderních systémů s optickým vláknem a různých druhů endoskopie lze světlo přesně zacílit na téměř jakoukoliv část těla. Jak již víme, singletový kyslík produkovaný aktivací fotosenzitizéru, má velmi krátkou životnost a je deaktivován dříve než by mohl uniknout z buňky, v níž byl vytvořen. I tento fakt přispívá k targetingu.<sup>4</sup>

### Přístrojové vybavení – vývoj

V minulosti se pro ozařování v rámci PDT používaly hlavně konvenční lampy a to především při léčbě kožních nádorů. Světlo z lamp však osvícenou tkáň značně zahřívalo. K zamezení tohoto jevu bylo proto nezbytné infračervenou oblast spektra odfiltrovat. Mezi další nevýhody lamp patřilo jejich komplikované zavádění na nepřístupná místa, složité ovládání a nízká intenzita osvětlení (typicky 50 mW/cm<sup>2</sup>).<sup>10</sup> Paralelně s pokroky v chemii bylo nutné vyvíjet nové výhodnější zdroje světla pro PDT.

Časem se vyvinuly modernější přístroje pro přívod světla ve fotodynamické terapii. Významný pokrok se v této oblasti uskutečnil zavedením laseru kombinovaného s optickým vláknem, což značně rozšířilo aplikaci PDT. Adekvátní dávka světla mohla být díky nové technice a provedení přesněji aplikována na prakticky kteroukoliv část a místo lidského těla (vnitřní i vnější) 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 iontový laser na bázi barviva. Tento systém může produkovat záření v rozpětí vlnových délek od 350 do 700 nm. Avšak argonové lasery jsou velmi drahé a náročné na obsluhu. Laser využívající páry zlata je jednodušší a levnější, ale produkuje pouze světlo fixní vlnové délky 628 nm.<sup>11</sup> Obecně lze říci, že laserové zdroje světla se používají k léčení vnitřních nádorů s využitím endoskopie, protože právě díky laseru lze lépe a účinněji soustředit světlo do jednoho nebo více optických vláken.

Běžně jsou u kožních a podkožních lézí efektivní i nelaserové zdroje. Mnoho nelaserových zdrojů světla bylo vyvinuto právě pro jejich léčbu. Tyto zdroje jsou reprezentovány buď různými typy filtrovaných širokopásmových lamp nebo novějšími a nenákladnými LED diodami.<sup>12</sup> Ve všech případech je v daném rozmezí vlnových délek intenzita světla rovnoměrná, takže dodávaná dávka může být přesně spočítána.

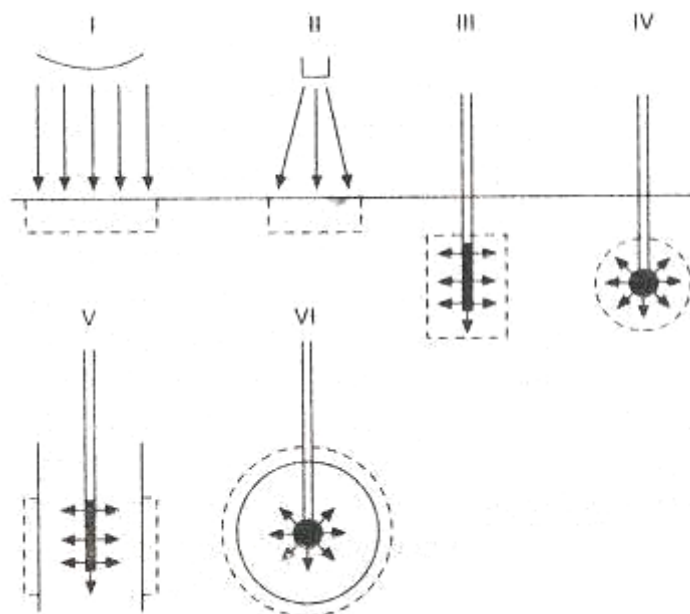


Energie zdroje je důležitým faktorem, protože ta určuje dobu léčení. Nicméně s moderními laserovými i nelaserovými zdroji není dosažení dostatečné energie obtížné, proto ošetření obvykle trvá 5-20 min.<sup>4</sup>

Další pokrok přinesly snadno ovladatelné lasery založené na laserových diodách pevného skupenství.<sup>12</sup> Mezi výhody laserových diod se řadí jejich běžná dostupnost, jsou malé a tedy i snadno přenosné, také spolehlivé a levné v porovnání s dřívějšími lasery pro PDT. Diodové lasery jsou proto ideální pro běžné klinické užití a práce s nimi nevyžaduje ani hluboké technické odborné znalosti. Mají fixní vlnovou délku (okolo 750-850 nm) a jsou určeny pro práci se specifickými fotosenzitizéry.<sup>4</sup>

### **Přívod světla**

Pro povrchové nádory nebo pro nádory dutiny ústní lze použít jednoduchou čočku v kombinaci s optickou mřížkou. Výsledkem je jednotné ozáření celé oblasti. Pro solidní nebo hluboko uložené tumory se užívá optické vlákno zaváděné dutou jehlou, popřípadě naváděné ultrazvukem. Pro intraluminální a intrakavitální ozařování nádorů např. v bronších, ezofagu či močovém měchýři se používá flexibilní křemenné vlákno umístěné v nástrojovém kanálku standardního endoskopu. Modifikací konce vlákna<sup>13</sup> nebo umístěním vlákna do světlorozptylujícího media<sup>14</sup> může být dosaženo prostorové distribuce světla v cílové tkáni.



Obr. 5: 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.

Fakt, že většina PS je také fluorescentní a fotochemicky aktivní, znamená, že v PDT lze využít i detekčních a zobrazovacích metod, které jsou někdy označovány jako foto (dynamická)detekce a diagnostika. Díky tomu je možné odhalit jinak skryté nemoci (např. dysplazie), zjistit a popsat ohraničení nádoru, vizualizovat výskyt onemocnění na nepřístupném místě (např. v jícnu, bronchu nebo kolonu). Fluorescenci lze jako zobrazovací a kvantifikační metodu využít rovněž pro zdokonalení PDT dozimetrie. Kupříkladu měření fluorescence nám umožní stanovit skutečné množství PS v lézi, a to je potřebné pro určení a nastavení přiměřených parametrů následného ozáření.<sup>9</sup>

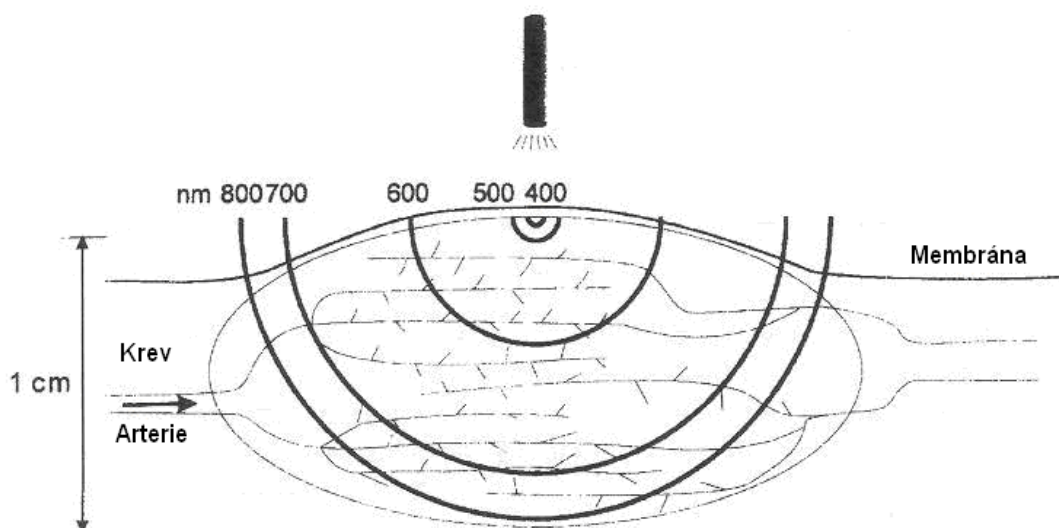
### **Chování světla v PDT**

Poslední desetiletí s sebou přineslo další významné poznatky. Lépe můžeme porozumět tomu, jak se světlo chová v lidské tkáni, čímž se zabývá obor označovaný jako tkáňová optika. Díky jejím poznatkům lze dokonaleji léčit, plánovat a předvídat, jak se bude světlo šířit uvnitř tkáně nebo orgánu a pak ovlivnit co nejoptimálněji klinický výsledek. Světlo je buď rozptýleno nebo absorbováno, když vstupuje do tkáně a rozsah obou jevů závisí na typu tkáně i vlnové délce světla. Zjistilo se, že nejen různé typy tkání vykazují odlišné optické vlastnosti, ale i stejný typ tkáně či orgánu se může

výrazně lišit v absorpci a rozptylu světla u různých pacientů. Biologické tkáně jsou nehomogenní kvůli přítomným mikroskopickým částicím (makromolekuly, buněčné organely, organizovaná buněčná struktura, vmezeřené vrstvy atd.). Vícenásobný rozptyl uvnitř tkáně vede ke ztrátě orientace paprsku. Absorpci zapřičiňují převážně endogenní chromofory jako jsou hemoglobin, myoglobin a cytochromy.<sup>9</sup>

Získávání a sjednocování poznatků z mnoha úrovní zkoumání vedlo ke snaze vytvořit model transportu světla ve tkáni. Její realizace vyžaduje získat přesné hodnoty optických vlastností tkáně. Rozptýlení světla ( $\mu_s$ ) je obecně nejvýznamnějším faktorem limitujícím penetraci světla do většiny tkání a pro měkké tkáně se pohybuje v rozmezí 100-1000  $\text{cm}^{-1}$ . Absorpce ( $\mu_a$ ) je obvykle méně důležitá, hodnoty se vyskytují v rozmezí 0,1-5  $\text{cm}^{-1}$  pro většinu tkání v zelené a delší vlnové délce. Třetím parametrem nezbytným k definování tkáňových optických vlastností je anisotropický faktor, který měří směr rozptylu světla. Pak je možné použít například metodu matematickou nebo difúzní pro nastavení parametrů osvětlení (intenzita, vlnová délka, úhel dopadu) tak, aby se maximalizovala světelná dávka.<sup>9</sup>

Samozřejmě se při výpočtu musí zohlednit absorpce nižších vlnových délek světla důležitými tkáňovými chromofory (oxy i deoxyhemoglobin, melanin) společně s redukováným světelným rozptylem ve vyšších vlnových délkách a s výskytem vodní absorpce (vlnové délky > 1300 nm). Průměrná účinná hloubka průniku do tkáně okolo 1-3 mm je u 630 nm, což je vlnová délka užívaná pro klinické léčení s Photofrinem<sup>®</sup>, zatímco u vlnové délky 700-850 nm je průnik přibližně dvojnásobný.<sup>9</sup> Z toho vyplývá, že 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. 6).



Obr. 6: Závislost vlnové délky světla na hloubce průniku do nádoru

Dalším jevem nazývaným „self-schielding“ je absorpce světla samotným fotosenzitizérem, což omezuje průnik světla do tkáně. Jev je obzvlášť zřetelný, když PS silně absorbuje v oblasti terapeutických vlnových délek.

Častý proces, při kterém je PS náchylný k fotodestrukci v průběhu osvitů, se nazývá „photobleaching“ (vyblednutí). Jde o jednu z obecných vlastností barviv a tedy i fotosenzitizérů. Dochází k němu v případě, když vzniklý singletový kyslík a ostatní ROS reagují se samotným PS ve smyslu snížení jeho účinnosti pro další procesy (ztráta intenzity absorpce či emise). Ačkoliv „photobleaching“ obvykle znamená ztrátu PDT reaktivity, může mít stále ještě prospěšný vliv v terapii. To dokládá následující úvaha. Existuje totiž určitá prahová hodnota dávky PDT vedoucí ke tkáňové nekróze. Pokud se „photobleaching“ (ten nemá žádný podobný mezní práh) odehraje ještě před dosažením této prahové hodnoty, neobjeví se žádné poškození tkáně. To je žádoucí pro normální zdravou tkáň vystavenou osvitům, ne však pro tumorózní léčenou tkáň. Po chemické stránce dochází při „photobleachingu“ k tomu, že se chromofor fotosenzitizéru rozpadne na malé fragmenty, které již mnohem méně absorbují ve VIS a neabsorbované světlo pak může proniknout do hlubších vrstev. Avšak rozložený PS je již neaktivní a nevykazuje žádné cytotoxické vlastnosti. Tedy konečným a optimálním výsledkem pak může být docílení hlubší nekrózy nádoru, zatímco zásah bude šetrný ke zdravé tkáni.

Photobleaching se může také podílet na rychlejším vylučování PS z těla díky jeho rozkladu v kůži.<sup>1,9</sup>

Jedním z hlavních aspektů PDT je pojetí tzv. dvojí selektivity. Poškození zdravé tkáně je minimalizováno vzrůstající selektivní kumulací fotosenzitizéru v nádoru nebo v dalších nemocných tkáních a také ozářením jen vytyčené omezené oblasti. Přesto s sebou PDT nese některé nežádoucí vedlejší účinky, např. dlouhodobou kožní fotosenzitivitu, občasné systémové a metabolické poruchy nebo nepřiměřeně velkou tkáňovou destrukci léčeného místa. Doufejme, že hlubší pochopení PDT bude minimalizovat poměr riziko/užitek léčby a rozšíří se aplikovatelnost PDT a to nejen na vážná onemocnění.<sup>9</sup>

## 1.5. FOTOLENIZITIZÉR

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

Postupem času se třídily a formulovaly určité vlastnosti ideálního PS a je pochopitelné, že žádnou z dosud známých a používaných látek nemůžeme považovat za ideální. Přesto se novější látky alespoň tomuto ideálnímu PS v mnohém přibližují.<sup>1</sup>

### Vlastnosti ideálního fotosenzitizéru<sup>1,9</sup>

- Chemická čistota se známým konstantním složením a stabilitou – u dřívějších látek byl problém, neboť se jednalo o směsi špatně separovatelných mono-, di- a oligomerů (např. u derivatizovaného hematoporfyrinu). Novější látky jsou již obvykle lépe charakterizovatelné.
- Optimální spektrální vlastnosti – silná absorpce v červené oblasti viditelného spektra (650-800 nm), kdy je penetrační schopnost světla maximální a přitom má dostačující energii pro účinnou excitaci PS. Světlo nižších vln. délek méně proniká do tkáně a zvyšuje se také pravděpodobnost výskytu kožní fotosenzitivity. Naopak fotony světla vyšších vlnových délek (>800 nm) nedodají dostatečnou energii tripletovému stavu PS, aby přenesl svou energii základnímu stavu molekuly kyslíku k jeho excitaci na singletový stav.
- Minimální toxicita ve tmě – jak u člověka tak i u pokusných zvířat má být PS toxický jen po ozáření světlem odpovídající vlnové délky vedoucí k aktivaci PS. Fotosenzitizér by neměl ani vykazovat zprostředkovanou toxicitu (např. hypotenzi, alergickou reakci).
- Vyhovující fotochemické vlastnosti – má být produkováno velké množství tripletového stavu PS, který má mít tak dlouhé trvání, aby došlo k dostatečné produkci singletového kyslíku (hlavního cytotoxického agens).

- Ideální rozpustnost ve vodě nebo ve směsi vodných rozpouštědel. PS by také neměl nadměrně agregovat v biologickém prostředí, protože by se tím snížila jeho fotochemická účinnost.
- Selektivní kumulace PS v nádorové tkáni.
- Rychlá eliminace z těla pacienta – je žádoucí, aby zbylý PS nezůstával dlouho v krvi a nezpůsobil systémovou toxicitu. Pokud je PS eliminován do jednoho dne po léčbě, nehrozí problém dlouhodobé kožní fotosenzitivity a pacient se nemusí chránit před světlem.
- Snadná příprava – syntéza PS by měla být relativně snadná popř. fotosenzitivní látky jednoduše modifikovatelné (záměny postranních řetězců).
- Cenová dostupnost a snadná aplikace do průmyslové výroby.
- Fluorescence PS pro možnost vizuální kontroly.

Krátký interval mezi podáním PS injekcí a osvětlením umožňuje ambulantní provedení zákroku, což je jak příjemné pro pacienta tak i finančně výhodné. V dnešní době ještě není dořešeno, zda je lepší vyhradit jeden konkrétní PS jen pro jednu specifickou indikaci a pak mít mnoho jiných PS pro další rozmanité nemoci nebo kategorie pacientů, nebo se snažit hledat jeden PS, který by působil proti většině nemocí.<sup>9</sup>

### **Klasifikace fotosenzitivních látek**

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

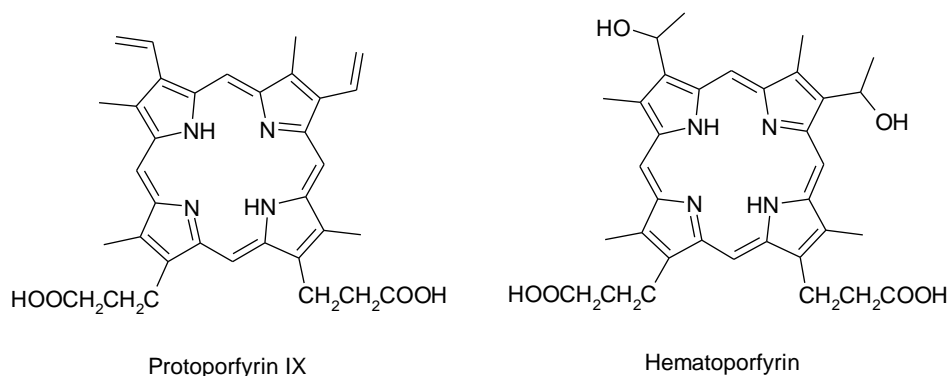
Tetrapyrrolové jádro často obsahuje koordinovaný atom kovu a zjistilo se, že pouze diamagnetické kovy (Zn, Mg, Pd, In, Sn, Lu) umožní tetrapyrrolu zachovat si svou fotosenzitivní schopnost, zatímco paramagnetické kovy (Fe, Cu, Gd) to neumožňují.<sup>9</sup>

Všechny dosud známé fotosenzitizéry dělíme podle vlastností a typických charakteristik do několika generací.

### První generace

Do této generace patří hematoporfyrinové deriváty - HpD (porfimer sodium, Photofrin<sup>®</sup>), případně i deriváty Protoporfyrinu IX.<sup>1</sup> Protoporfyrin IX je silný fotosenzitizér a je bezprostředním prekurzorem hemu, který již PS není.<sup>4</sup> Přirozeně se vyskytující **porfyriny** jsou plně konjugované (neredukované) tetrapyrroly a liší se v počtu a typu bočních řetězců obzvláště karboxylových skupin (protoporfyrin má dvě, coproporfyrin čtyři, uroporfyrin osm). Porfyriny vykazují absorpční pás v dlouhovlnné oblasti okolo 630 nm, který mívá malou intenzitu.<sup>9</sup>

HpD jsou směsí dimerů a oligomerů (s jednotkami pospojovanými éterovými nebo esterovými vazbami) připravené z hematoporfyrinu izolovaného z hemu (barevná část červeného krevního barviva hemoglobinu).<sup>1</sup>



Obr. 7: Struktury přírodních porfyrinů

Směs dimerů a oligomerů se po částečném vyčištění stala základem Photofrinu<sup>®</sup>, který byl poprvé v roce 1993 v Kanadě zaveden do praxe jako první látka v PDT k léčbě rakoviny močového měchýře.<sup>1</sup> Má řadu výhodných vlastností - efektivně zničí nádor, je netoxická za nepřítomnosti světla, jednoduše vytvoří ve vodě rozpustnou formu pro intravenózní podání. Po dobu jejího používání v praxi se neobjevil žádný závažný ani dlouhodobý problém zpochybňující její bezpečnost a zdá se, že PDT může být opakovaně aplikována bez omezení. To znamená, že u PDT neexistuje maximální celoživotní dávka na rozdíl od radioterapie.<sup>4</sup>

Photofrin<sup>®</sup> má však i řadu nežádoucích vlastností. Nejen vlnová délka (630 nm) vhodná pro aktivaci je velmi nízká, ale nízký je i extinkční koeficient při tomto maximu, proto je třeba podat vysokou dávku PS i světla. Je složitou směsí, i po vyčištění se skládá asi z 60 látek, proto je obtížné charakterizovat jeho přesné složení.<sup>1</sup>



Není příliš selektivně vychytáván v nádoru, kumuluje se v játrech, ledvinách, slezině a hlavně v kůži<sup>15</sup>. Jeho vysoké koncentrace v kůži lze detekovat po dobu až 6 týdnů, což způsobuje vleklou kožní fotosenzitivitu. Další nevýhodou představuje i dlouhá prodleva (48-72 hod) mezi podáním látky a ozářením, po kterou musí být pacient chráněn před světlem.<sup>4</sup>

Přes všechny zmíněné nevýhodné vlastnosti zůstává Photofrin<sup>®</sup> nejrozšířenějším a nejběžnějším fotosenzitizérem pro léčbu nedermatologických nádorů. Látka je určena k terapii tumorů v časném i pokročilém stádiu rakoviny plic, povrchového nádoru žaludku, jícnového adenokarcinomu, rakoviny děložního čípku, močového měchýře ale i dalších nerakovinových onemocnění (psoriáza).<sup>1,4</sup>

Používají se také deriváty Photofrinu<sup>®</sup>, například v Rusku byl schválen Photohem<sup>®</sup> pro léčbu rakoviny různých orgánů (kůže, prsu, plic atd.), ale i jako profylaxe zákalu korneálního štěpu.<sup>1</sup>

### ***Druhá generace***

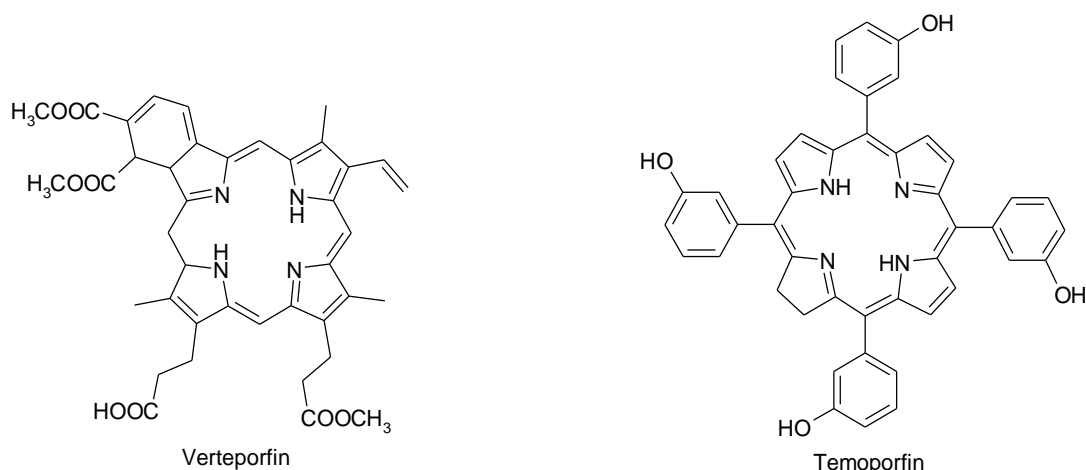
Látky spadající do druhé generace můžeme již snadněji charakterizovat, neboť jsou na rozdíl od látek první generace chemicky jednotné. Jejich absorpční maximum se posouvá k vyšším vlnovým délkám (650-800 nm) a tedy světlo, které tyto PS aktivuje, proniká hlouběji do tkáně. Jsou také podstatně selektivnější, což umožňuje zvýšení efektivity PDT. Zástupci této generace patří do skupiny **porfyrinů** a jim příbuzných **chlorinů** a **bakteriochlorinů**, dále **ftalocyaninů**, **naftalocyaninů**, **texafyrinů**, **porfycenů** a dalších.<sup>1</sup>

**Chloriny** jsou tetrapyrroly s jednou redukovanou dvojnou vazbou v pyrrolovém kruhu. To znamená, že se absorpční pás v dlouhovlnné oblasti posouvá k hodnotám 650-690 nm a zvyšuje svou intenzitu. Oba tyto faktory jsou pro PDT žádoucí.<sup>9</sup>

Verteporfin (BPD-MA z angl. benzoporphyrin-derivate monoacid ring A) je benzoporfyrinový derivát registrovaný pod obchodním názvem Visudyne<sup>TM</sup>. Je to velmi užitečný lék v oftalmologii, byl vyvinutý pro léčbu senilní makulární degenerace (angl. age-related macular degeneration (AMD)). Látka vstoupila také do druhé fáze klinických zkoušek pro nemelanotické kožní nádory, pro léčbu psoriázy a psoriatické a revmatoidní artritidy. Její absorpční maximum je posunuto k vlnové délce 690 nm, při níž proniká světlo přibližně dvakrát hlouběji než při 630 nm. Verteporfin je nádorovou

tkání velice rychle absorbován ale i vylučován, proto nezpůsobuje kožní fotosenzitivitu trvající déle než 24 hodin.<sup>1,4</sup>

**Temoporfin** (mTHPC, tetra(meta-hydroxyfenyl)chlorin, Foscan<sup>®</sup>) je nyní kromě sodné soli porfimeru dalším a jediným PS schváleným k systémovému užití v PDT k léčbě nádorů. Je to účinný lék u rakoviny hlavy a krku a pro tyto indikace byl v Evropě schválen v roce 2001.<sup>4</sup> Nemá absorpční maximum příliš posunuto k červené oblasti (652 nm). Je však velmi aktivním fotosenzitizérem, asi 100x účinnějším než Photofrin<sup>®</sup>, proto v porovnání s ním vyžaduje mnohem nižší dávky PS i světla. Má však špatnou selektivitu vychytávání mezi nádorovou a zdravou tkání.<sup>1</sup> Také kožní fotosenzitivita přetrvává po dobu 2-3 týdnů, což pacienta velice omezuje.<sup>16</sup> Musí být injekčně podán 3-4 dny před ozářením. Foscan<sup>®</sup> je testován v klinických studiích k léčbě nádorů jícnu, žaludku, karcinomu prostaty a kůže, sterilizace okolí zásahu po chirurgické léčbě nádoru nebo proti bakteriím rezistentním na antibiotika.<sup>17</sup>



Obr. 8: Struktury verteporfinu a temoporfinu

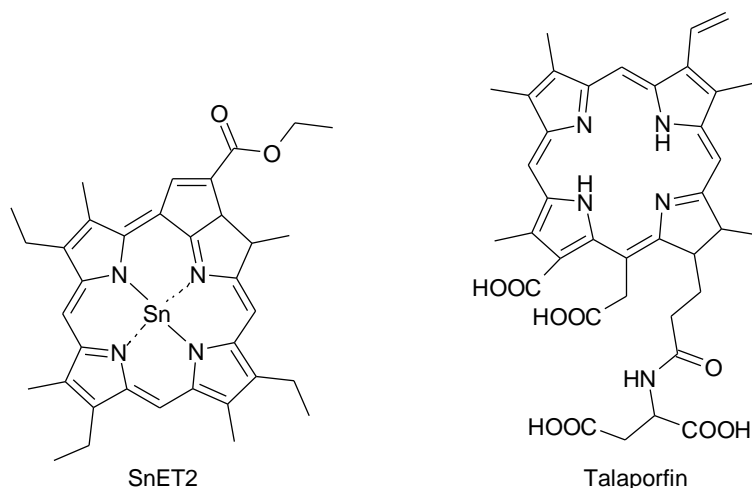
**Bakteriochloriny** mají již o dvě konjugované vazby v makrocyclickém systému méně, než je tomu u porfyrinů. Absorpční pás mají posunutý ještě dále do červené oblasti spektra. Možná se bakteriochloriny v budoucnosti ukáží dokonce jako účinnější fotosenzitizéry než jsou chloriny, zatím však tomu brání několik nedostatků. Dosud známe jen relativně málo kandidátních molekul bakteriochlorinů a také se musí řešit otázka jejich stability při skladování.<sup>9</sup>

Existuje skupina klasických chemických derivátů obvykle získaných z přirozeně se vyskytujících porfyrinů a chlorinů, kam řadíme struktury jako jsou **purpuriny**,

**feoforbidy, pyrofeoforbidy, feofytiny a forbiny.** Některé z nich byly obsáhle zkoumány jako fotosenzitizéry pro PDT.<sup>9</sup>

Etiopurpurin-komplex s cínem (Tin etiopurpurin, SnET2, Purlytin<sup>®</sup>) – tato látka patří do skupiny metalochlorinů, neboť má uprostřed jádra chelatovaný kation cínu. Přestože má silné absorpční maximum (při 660 nm), pro účinnou terapii jsou potřebné vysoké dávky světla (srovnatelné s Photofrinem<sup>®</sup>). Také kožní fotosenzitivita přetrvává po dobu asi 10-14 dnů po podání.<sup>18</sup> S Purlytinen<sup>®</sup> již byla ukončena III. fáze klinických zkoušek jako prostředku k léčbě AMD.<sup>19</sup>

Talaporfin (NPe<sub>6</sub> (mono N-aspartyl chlorin e<sub>6</sub>), MACE) je syntetický chlorin, který vykazuje silnou absorpci při vyšších vlnových délkách (664 nm). Z tkání se rychle vylučuje (podobně jako verteporfin), proto k ozáření musí dojít asi po 4 hodinách po intravenózním podání.<sup>20</sup> Za nízkých dávek PS i světla dochází jen ke krátkodobé regresi nádoru. Dlouhodobé regrese lze dosáhnout zvýšením dávek, což však vyústí ve ztrátu selektivity.<sup>21</sup> V Japonsku byla ukončena III. fáze klinických zkoušek talaporfinu na léčbu časného stadia rakoviny plic. V USA probíhají testy na využití této látky v terapii pokročilých stadií rakoviny (prostata, slinivky, hlavy a krku, plic, rekta), ale i v jiných než protinádorových indikacích (např. v oftalmologii a kardiologii).<sup>22</sup>

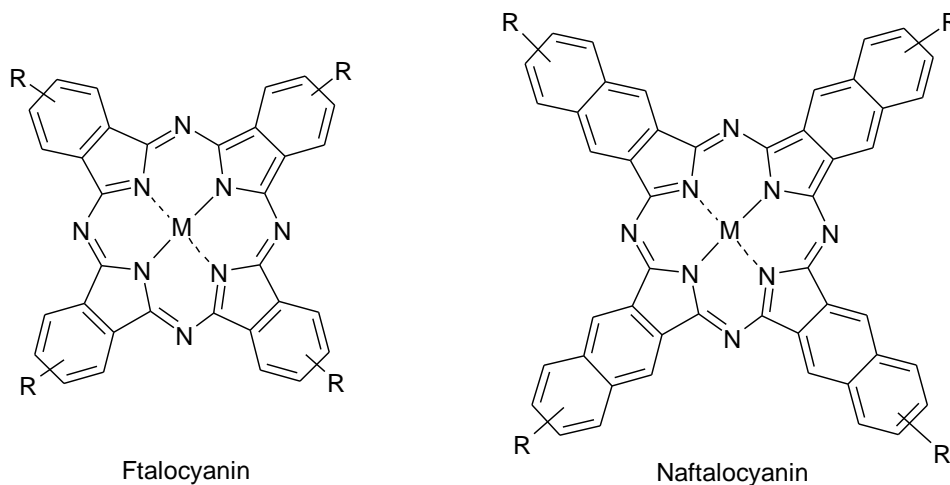


Obr. 9: Struktury etiopurpurinu a talaporfinu

Photoclor patří do skupiny chlorinů, přesněji jde o derivát feoforbidu-a. Analogy feoforbidu jsou obecně aktivnější než podobné látky ze skupiny chlorinů-e<sub>6</sub> (např. talaporfin). Photoclor je vysoce selektivní k nádorové tkáni současně s nižší fototoxicitou než Photofrin<sup>®</sup>.<sup>1</sup>



(až 770 nm), čímž se zvyšuje terapeutická hloubka zásahu a lze tyto látky používat i pro vysoce pigmentované nádory - jako např. melanom.<sup>1</sup>

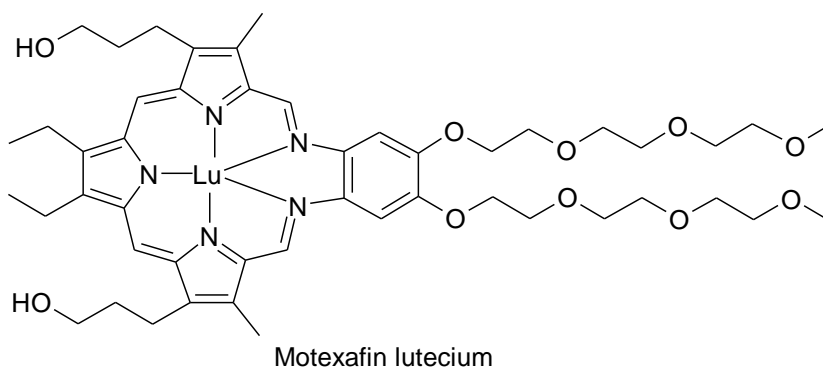


Obr. 11: Struktury ftalocyaninů a naftalocyaninů

**5-aminolevulinová kyselina** (ALA, Levulan<sup>®</sup>, Metvix<sup>®</sup>, Hexvix<sup>®</sup>, Benzvix<sup>®</sup>) je v PDT také používána. Způsob použití se však od předešlých zcela liší. ALA představuje endogenní látku, která je součástí biosyntetické cesty hemu. Tato cesta je kontrolována negativní zpětnou vazbou, při které vyšší koncentrace hemu inhibuje konverzi glycinu a sukcinylkoenzymu A na ALA. Pokud dodáme ALA exogenně, objdeme tím tento kontrolní mechanismus a dojde k syntéze Protoporfyrinu IX (PpIX), který poté funguje jako účinný PS. Inkorporací atomu železa enzymem ferrochelatase vzniká přirozenou cestou z PpIX fotodynamicky neaktivní hem. Levulan<sup>®</sup> se uplatňuje v indikacích jako je léčba akné, fotodetekce a léčba cervikální dysplazie a rakoviny močového měchýře. Klinické testy proběhly pro léčbu nemelanotické rakoviny kůže, Barretova jícnu a psoriázy. Kvůli nízké lipofilitě ALA se do terapie zavádí i její methyl, hexyl a benzyl estery (Metvix<sup>®</sup>, Hexvix<sup>®</sup>, Benzvix<sup>®</sup>), které lépe pronikají do tkání (zejména při aplikaci na kůži) a po hydrolýze uvolňují volnou ALA.<sup>1</sup>

Další skupinu potenciálních fotosenzitizérů tvoří látky kompletně syntetické. Zahrnujeme sem struktury jako jsou **texafyriny**, **porfyceny**, **safyriny**.<sup>9</sup>

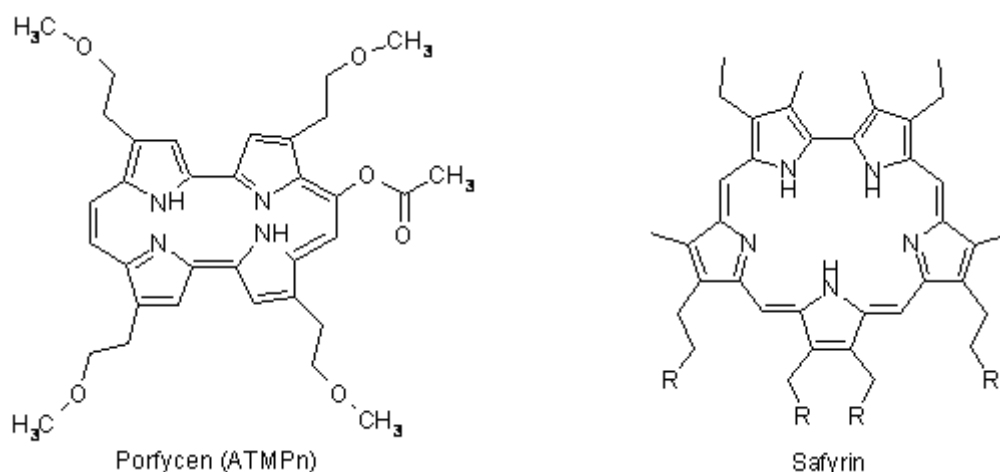
Motexafin lutecium (Lutex, Optrin<sup>®</sup>, Antrin<sup>®</sup>, Lutrin<sup>®</sup>) – jde o derivát texafyrinu (s charakteristickým pětiusíkatým makrocyclickým jádrem) s centrálně chelatovaným atomem lutecia. Silně absorbuje při dlouhé vlnové délce 732 nm a má dobrou selektivitu pro maligní tkáně. Je rychle vylučován z krevní plazmy a vykazuje jen krátkodobou fotosenzitivitu pacienta.<sup>25</sup>



Obr. 12: Struktura motexafinu

**Porfyceny** – jejich absorpční maximum se pohybuje v oblasti 600-650 nm. Modifikací na periferii lze dosáhnout velice dobrých farmakokinetických vlastností. ATMPn je derivát se čtyřmi  $\beta$ -methoxyethylovými skupinami, jež urychlují vstup do buňky, a jednou acetoxy skupinou zvyšující hydrofilitu patří mezi nejrychleji vychytávané PS v in vitro studiích vůbec. Látka se aplikuje pouze topicky k léčbě kožních onemocnění (psoriáza, nemelanotický karcinom kůže).<sup>26</sup>

**Safyriny** patří do skupiny expandovaných porfyrinů (podobně jako texafyriny) a absorbují 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.<sup>27</sup>

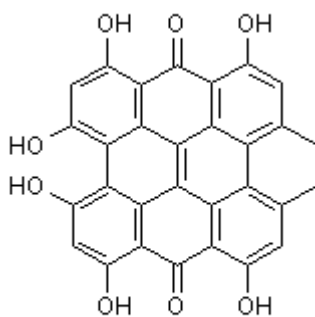


Obr. 13: Struktury porfycenu a safyrinu

Poslední skupinu studovaných fotosenzitivních látek tvoří netetrapyrrolové deriváty syntetických nebo přirozeně se vyskytujících barviv. Patří sem např. **hypericin**, který

nalezneme v přírodě anebo syntetická barviva **toluidinová modř O** a **Bengálská růže**. Tyto sloučeniny byly zatím spíše více zkoumány z hlediska zprostředkovatelů antimikrobiální fotoinaktivace než jako fotosenzitizéry určené k ničení savčích buněk v takových aplikacích jako je rakovina.<sup>9</sup>

**Hypericin** – přírodní látka izolovaná z *Hypericum perforatum* (třezalky tečkované) 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. Hypericin je pro terapeutické využití ve fázi výzkumu k léčbě proliferativní retinopatie<sup>28</sup> a lze jej využít pro ex vivo fluorescenční cytologickou detekci buněk nádoru močového měchýře.<sup>29</sup>

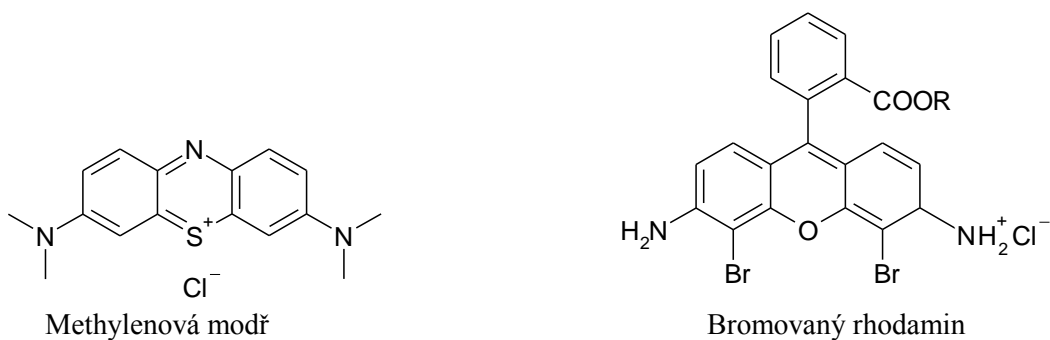


Hypericin

Obr. 14: Struktura hypericinu

**Methylenová modř** je derivátem fenothiazinu a je používána k dekontaminaci čerstvě zmrazené plazmy. Je netoxická pro člověka a přitom účinně inaktivuje extracelulárně přítomné viry.<sup>17</sup> Její použití in vivo je však limitováno redukcí enzymy přítomnými v buňkách na leukoformu, která je fotodynamicky neaktivní.<sup>1</sup>

**Rhodaminy** jsou používány jako fluorescenční barviva vzhledem k vysoké produkci fluorescence. To je ovšem z hlediska PDT nevhodné, protože PS poté nepřechází účinně ze stavu <sup>1</sup>PS do tripletového stavu <sup>3</sup>PS, který je základem pro vlastní fotodynamický účinek. Tento problém lze částečně řešit substitucí těžkými atomy (např. bromací), které zvyšují účinnost přechodu do tripletového stavu. Bromovaný rhodamin byl úspěšně použit v testech pro autotransplantační léčbu myeloidní leukémie.<sup>30</sup>



Obr. 15: Struktura methylenové modři a bromovaného rhodaminu

Tab. 1: Oblasti aplikace PDT<sup>31</sup>

<b>cílový orgán</b>	<b>onemocnění/oblast aplikace</b>
oko	AMD
kůže	psoriasis, akné, Kaposiho sarkom, batalion, maligní tumory (nemelanotická rakovina kůže, rekurentní rakovina hrudní stěny)
různé orgány	premaligní tumory: Barrettův jícen, ústní dutiny, žaludku karcinomy: hlavy a krku, jícnu, plic, močového měchýře, žaludku, prostaty, cervixu a vulvy, tlustého střeva
krev	antivirotika, antiparazitika
imunomodulace	arthritis, arteriální restenóza, endometriální ablace



## 1.6. MOŽNOSTI DISTRIBUCE PS DO CÍLOVÝCH MÍST

Aby mohla být PDT úspěšně aplikována do klinické praxe, je zapotřebí vyřešit nejen otázku, jaká je přiměřená dávka PS a optimální čas aktivace světlem po jejím podání do organismu, ale i jaký nejvhodnější způsob distribuce PS zvolit pro konkrétní typ fotosenzitizéru i nádoru. PS je schopný se do určité míry selektivně hromadit v cílových místech (obvykle nádorové tkáni). Tato selektivita je však velmi nízká a nízký je i poměr mezi koncentrací PS v nádorových a zdravých tkáních. Právě vhodná volba dopravení PS ovlivní jeho biodistribuci a farmakokinetiku, zvýší jeho akumulaci v tumoru a tak zlepší celkový léčebný potenciál PDT a odpověď na terapii tím, že je PS v cílových strukturách obsažen ve vyšších koncentracích.<sup>5</sup>

Některé PS se aplikují v různých aplikačních formách zlepšujících jejich farmakokinetiku (liposomy, olejové disperze a další) anebo se připravují tzv. „fotosenzitizéry třetí generace“. Nejde o nové struktury PS, ale o látky druhé generace kovalentně navázané k menším biologicky aktivním molekulám (např. steroidy, insulin, monoklonální protilátky) nebo syntetickým polymerům (PEG) a pak lze hovořit o cílené distribuci, tzv. targetingu - cílenému rozpoznávání konkrétní tkáně.

Protože mnoho fotosenzitizérů obvykle vykazuje toxicitu vůči zdravým buňkám a tkáním, jsou přednostně požadovány nosiče, které dopraví PS do patogenních míst a to díky pasivnímu nebo aktivnímu targetingu.<sup>32</sup>

### **Aktivní targeting**

K zajištění selektivní distribuce a kumulace fotosenzitizéru do nádorové tkáně se využívá přístup tvorby konjugátů fotosenzitizérů s různými biomolekulami. Konjugát je složen z PS a molekuly, která umožňuje targeting. Zvolené řešení má několik výhod: konjugovaná molekula má vysokou afinitu k receptoru nebo antigenu na povrchu cílových struktur, lze dosáhnout přímé a specifitější lokalizace se zvýšenou účinností a selektivitou a přitom postačí nižší efektivní dávka fotosenzitizéru. Účinnost této strategie je však ovlivněna několika faktory jako jsou stabilita konjugátu v cirkulujícím krevním řečišti, jeho ochrana proti možné inaktivaci během transportu a aktivace na cílovém místě. Dalším faktorem je schopnost konjugátu procházet fyziologickými bariérami a dosáhnout místa, kde bude rozpoznán před tím, než dojde k jeho endocytóze. Mezi další významné rysy se řadí netoxicity, neimunogenita a biodegradabilita konjugátu. Cíle aktivního targetingu se v pokusech dosáhlo využitím

konjugátů s monoklonálními protilátkami a zprostředkováním transportu přes lipoproteiny.<sup>5</sup>

### ***Lipoproteiny zprostředkovaný transport***

V posledních letech se více pozornosti zaměřilo na klinické využití plazmatických lipoproteinů vzhledem k prokázání přímého vztahu mezi relativním počtem lipoproteinových receptorů v různých nádorech a uptake fotosenzitizéru maligními buňkami. LDL (z angl. low-density lipoproteins, lipoproteiny s nízkou hustotou) hrají významnou roli v transportu a následném uvolnění PS v tumorózní tkáni. Lze to vysvětlit faktem, že nádory jsou obecně charakterizovány vysokou proliferací buněk a zvýšenou permeabilitou pro LDL. Exprese LDL receptorů na buněčném povrchu je regulována vlastní buněčnou poptávkou po cholesterolu. Je totiž známo, že rychle proliferující tkáň má vyšší spotřebu cholesterolu pro syntézu buněčných membrán. Navíc mnoho nádorových buněk ztratí na rozdíl od normální zdravé tkáně kontrolu nad přirozeným regulačním mechanismem a abnormálně zvýší expresi LDL-receptorů.<sup>5</sup>

Transport je zprostředkován pomocí tvorby tzv. kontejnerových (uzávěrových) komplexů.<sup>33</sup> Nejedná se přímo o tvorbu konjugátů, ale o uzavření PS uvnitř struktur makrocyclických sloučenin, které tvoří jakousi dutinu, ve které je PS poután nekovalentními interakcemi. Tvorbou těchto komplexů se ovlivní především farmakokinetika, event. se maskuje vysoká lipofilita PS a zlepšuje se tak jeho distribuce.

Využití lipoproteinů jako dopravních systémů pro léčivou látku má následující výhody: díky jejich přirozenému složení uniknou rozpoznání fagocytárního systému a déle cirkulují v plazmě a tělních tekutinách a nejsou imunogenní. Vzhledem ke svému malému rozměru (průměr 10-23 nm) mohou snadno proniknout difúzí do buňky. Lipoproteiny jsou endogenní substance tvořené nepolárním jádrem složeným hlavně z esterů cholesterolu a povrchovou vrstvou reprezentovanou fosfolipidy a neesterifikovaným cholesterolem. Jádro představuje vhodný prostor pro „ukrytí“ lipofilní látky (PS) a ta je pak chráněná před krevním prostředím během transportu. Navíc vazbou hydrofobního PS do nitra lipoproteinu se nemění fyzikální ani biologické vlastnosti těchto částic, tedy ani afinita a schopnost rozpoznání lipoproteinu membránovými LDL-receptory. Zjistilo se, že výsledný komplex je účinný při léčbě nádorů na zvířecích modelech.<sup>5</sup>

Candide a kol.<sup>34</sup> dokázali, že je dokonce možné vložit do jedné LDL entity 130 molekul Photofrinu<sup>®</sup> II aniž by se významně změnila interakce mezi LDL a jeho membránovým specifickým receptorem navzdory malému vzrůstu záporného náboje LDL.

Několik studií prokázalo, že PS vázaný nekovalentně s LDL ještě před aplikací vede ke vzrůstu fotodynamické účinnosti ve srovnání se samotnými roztoky či suspenzemi PS anebo jejich liposomálními formulacemi. Při pouhé nekovalentní vazbě PS na LDL dochází po aplikaci do živého organismu k redistribuci PS mezi ostatní plazmatické proteiny, jejichž selektivita k cílovým strukturám je mnohem nižší.<sup>5</sup>

Pokusy se prováděly s i.v. podanými volnými hematoporfyriny spojenými se třemi hlavními typy lipoproteinů (VLDL (lipoproteiny o velmi nízké hustotě), LDL a HDL (lipoproteiny o vysoké hustotě)). Specifický uptake komplexu Hp-LDL nádorem byl vyšší než u komplexů s dalšími dvěma typy lipoproteinů nebo s volným barvivem.

Schmidt-Erfurth a kol.<sup>35</sup> použili komplex BPD-MA s LDL, aby zlepšili kumulaci látky v neovaskulární tkáni cévnatky u králíka. Stejný kolektiv autorů později provedl pokusy s kovalentně vázaným Chlorinem (Ce<sub>6</sub>) s LDL a to přes peptidickou vazbu. Kovalentní vazba PS přinesla ještě lepší výsledky než při použití PS volně uloženého do lipofilní části LDL.

Reddi a kol.<sup>36</sup> provedli srovnávací farmakokinetickou studii s ZnPc inkorporovaných do dipalmitoylfosfatidylcholin liposomů (ZnPc-DPPC) nebo do lidských LDL (ZnPc-LDL) injekčně podaných do fibrosarkomů u myši.

Ačkoliv se podařilo shromáždit zajímavá data z in vitro studií na zvířecích modelech, klinické využití lipoproteinů jako dopravních systémů naráží na řadu problémů. Takto získaná data nemohou být snadno převedena na lidský organismus, neboť složení sérových proteinů není shodné u zvířecího a lidského druhu a dokonce ani mezi jedinci stejného druhu. Velké rozdíly byly pozorovány mezi člověkem a hlodavcem, který je obvykle užíván v experimentálních PDT studiích. Hlodavci mají mnohem méně cirkulujícího LDL (0,6 mg/ml u myši) ve srovnání s člověkem (1-2 mg/ml). Výsledky získané na zvířecích modelech tedy nemohou odrážet skutečnou situaci v lidském organismu a přímá extrapolace je složitá a omezená.<sup>5</sup>

### ***Konjugáty s protilátkami***

Tvorba konjugátů fotosenzitizérů s protilátkami (antibody (Ab)) představuje další metodu zdokonalení selektivity fototoxického účinku, přesnosti PDT terapie a lepší překonání vedlejších účinků s ní spojených. Metoda je založena na spojení PS s monoklonálními protilátkami (MoAb z angl. monoclonal antibody) a interakci tohoto konjugátu se specifickými antigeny na povrchu maligních buněk bez významné ztráty aktivity PS nebo specifity MoAb. Je známo, že mezi tumorózní a normální zdravou buňkou existují charakteristické rozdíly a to např. i větší exprese specifických antigenů a onkoproteinů rakovinovými buňkami.<sup>37</sup> Vzniklé imunokonjugáty vykazují slibné výsledky v in vitro výzkumech a jsou vhodné zvláště pro léčbu malých nádorů nebo nádorů v dutině břišní. Výsledky studií ukázaly, že dostatečný selektivní fotodynamický efekt je dosažen již při nižších efektivních dávkách imunokonjugátu, tedy v koncentracích, při kterých vodné roztoky nebo suspenze PS nevykazují žádnou aktivitu.<sup>5</sup>

Mew a kol. provedli první předběžné studie o realizovatelnosti fotoimunoterapie jako potenciální léčby nádorových onemocnění.<sup>38</sup> Spojili hematoporfyrin přes náhodnou peptidickou vazbu s anti-mysarkomem M1. Tento konjugát odstranil až 95 % nádorových buněk zatímco ekvivalentní koncentrace samotných Hp a MoAb neměla žádný vliv na růst nádoru.

Přímá vazba PS na MoAb však s sebou přináší problémy v případě zvyšujícího se počtu jednotek PS vázaných na jednu MoAb. Dochází totiž k postupné ztrátě aktivity a afinity konjugátu k antigenu v důsledku změny fyzikálně chemických vlastností MoAb. Změny způsobují molekuly PS, což se při jejich větším počtu výrazně projeví na aktivitě.<sup>39</sup>

Dalším problémem je, že často při přípravě dochází k vazbě PS spíše nekovalentně do hydrofobních kapes proteinu MoAb než kovalentně, což se pak projeví uvolněním léčiva po aplikaci do organismu. To lze obejít navázáním PS na MoAb přes polymerní nosič (dextran, polyglutamová kyselina, PVAL, poly-L-Lysin), který umožňuje nést velké množství molekul PS bez ztráty výhodných vlastností MoAb.<sup>5</sup>

Jiang a kol.<sup>40</sup> použili reprodukovatelnou a kvantifikovatelnou techniku spojení specifické MoAb (T48) pro lidský chorionogonadotropický hormon s BPD-MA s využitím modifikovaného PVAL jako přímého nosiče.

Další metodou je značení komplexů PS s koloidním nosičovým systémem (např. liposomem, polymerní částicí) pomocí protilátek. Ukázalo se, že je možné pokrýt povrch těchto komplexů velkým množstvím MoAb (průměrně až 935 molekul Ab na liposom), čímž se zlepšuje možnost specifické dopravy léčiv nebo PS na cílové místo v porovnání s koloidními systémy bez protilátek. MoAb mohou být spojeny s povrchem nosiče nekovalentní vazbou nebo kovalentními interakcemi. Targeting částic pokrytých MoAb se úspěšně podařilo pouze u omezeného počtu in vivo preklinických studií a to především z důvodu častého vychytávání částic fagocytárním systémem. To lze významně omezit pokrytím povrchu částic místo celými MoAb pouze jejich fragmenty anebo vhodnými polymery.<sup>5</sup>

Navzdory slibným výsledkům má využití protilátek některé nedostatky. Jedním z nich je skutečnost, že povrch nádorových buněk není stabilní a neustále se mění. Změny v antigenním profilu nádorových buněk vedou ke ztrátě specifických receptorů, down-regulaci nebo ukrytí antigenů. Dochází tedy ke značným rozdílům v hustotě specifických antigenů na povrchu buňky. Tyto změny mohou vést ke snížení až ztrátě specifity protilátka-antigen a jsou jednou z hlavních příčin selhání imunokonjugací léčby. Pro překonání této hlavní překážky někteří autoři navrhovali použít směs MoAb zaměřených proti různým antigenům za účelem dosažení maximální účinnosti.<sup>5</sup>

### ***Další ligandy***

Zlepšení selektivních fotodynamických účinků a snížení potřebné dávky PS pro úspěšnou terapii může být dosaženo užitím specifických „tumor-vyhledávajících“ molekul jako jsou růstové faktory (např. epidermální růstový faktor - EGF), specifické proteiny (např. transferrin) nebo hormony (např. inzulin). Tyto molekuly by mohly být využity jako alternativy k MoAb a tedy jako ligandy vázané s PS a to buď přímo anebo přes vhodné hydrofilní molekuly (albumin, dextran, PVAL). Gijssens a kol.<sup>41</sup> dokázali, že intracelulární akumulace konjugátu je značně ovlivněná povahou ligandu.

Mezi další ligandy lze zařadit steroidy. Může jít o konjugáty s cholesterolem, které by se následně selektivně vázaly na plazmatické LDL v místech zvýšené exprese LDL-receptorů. Další možností představují konjugáty PS s pohlavními steroidními hormony (estradiol, estron, progesteron), které mají vyšší afinitu k buňkám exprimujícím ve zvýšené míře steroidní receptory (např. buňky rakoviny prsu).<sup>42</sup>

## **Pasivní targeting**

Od farmaceutických nosičů léčiv pro parenterální (intravenózní) podání je vyžadováno, aby byly biodegradabilní, měly malou velikost částic, přitom však velkou kapacitu a dlouhodobou cirkulaci, a aby se hromadily na požadovaných patologických místech v těle. Stále však zůstává náročným úkolem vyvinout takový nosič pro ve vodě špatně rozpustná léčiva, který by splňoval všechny tyto požadavky. Terapeutická aplikace hydrofobních ve vodě špatně rozpustných látek je spojena s některými podstatnými problémy, neboť nízká rozpustnost léčiv ve vodě má často za následek jejich špatnou absorpci a biologickou dostupnost a přináší komplikace spojené s agregací léčiva (např. embolie). Na druhou stranu hydrofobicita pomáhá molekule léčiva procházet buněčnou membránou v případě, kdy je její cíl lokalizován intracelulárně. Navíc se zjistilo, že biologicky aktivní molekula potřebuje hydrofobní skupinu, aby měla dostatečnou afinitu k příslušnému cílovému receptoru.<sup>43</sup>

Mnoho PS je hydrofobních, tedy špatně rozpustných ve vodě. Tato vlastnost podstatně snižuje jejich schopnost akumulace ve tkáni, proto musí být dopraveny pomocí vhodných přenašečů PS. Tento způsob dopravy je označován za pasivní targeting. Řadíme k němu systémy jako jsou liposomy, olejové disperze, micelární systémy, biodegradabilní polymerní částice a konjugáty PS s hydrofilními polymery. Lze u nich hovořit o „pasivně cílené biodistribuci“, neboť k cílení využívají přirozené distribuční mechanismy (pasivní difúzi, fagocytózu). Zjistilo se, že k selektivní akumulaci pasivních přenašečů v cílové oblasti přispívá zvýšená cévní permeabilita, tedy neúplná endoteliální bariéra a snížená lymfatická drenáž (způsobená nižším rozvinutím lymfatického systému a jeho obstrukcí) v tumorózní tkáni. Dále se na akumulaci spolupodílí efekt prodlouženého zadržení přeneseného PS ve tkáni. To vše dává těmto velkým částicím možnost dosáhnout požadovaného místa jednoduchým fyzikálním dějem - zvýšenou filtrací přes cévní stěnu v poškozených oblastech.<sup>5</sup>

## ***Liposomy***

Liposomy jsou uměle vytvořené jedno nebo mnoholamelární fosfolipidové vezikuly, které umožňují vpravení lipofilních nebo hydrofilních látek do své matrice v důsledku jejich zvláštního charakteru (tj. koncentrického uspořádání lipidových dvojvrstev uzavírajících vodné kompartmenty). Liposomy jsou dobře biokompatibilní, neboť jejich hlavními složkami jsou fosfolipidy a cholesterol, tedy látky vyskytující se v těle ve

velkém množství. Využití těchto koloidních nosičů v PDT bylo již popsáno v mnoha studiích a nyní se liposomy využívají jako efektivní dopravní systémy jak v experimentální oblasti tak i klinické praxi. Richter a kol.<sup>44</sup> prováděli studie na myších M1 rhabdomyosarkomech, přičemž pracovali s fotosenzitizérem typu benzoporfyrinového derivátu - BPD-MA (Verteporfin). Studie srovnávala biodistribuci a clearance unilamelární liposomální formulace (L-BPD-MA) proti dimethylsulfoxidovému roztoku (DMSO-BPD-MA) a roztoku pufru (PBS-BPD-MA), (PBS z angl. phosphate buffer saline). Po intravenózním podání se rychle a významně akumulovala právě L-BPD-MA v nádorové tkáni. Liposomální formulace se ukázala být významně účinnější než vzorky obou porovnávaných vodných formulací.

Fotosenzitizér je inkorporován do liposomu také za účelem udržení jeho monomerního stavu, protože právě PS v monomerním uspořádání zvyšuje spotřebu kyslíku a je více fotodynamicky účinný než fotosenzitizér v agregovaném stavu.<sup>5</sup>

### ***Olejové disperze***

Disperze (emulze) Cremophoru-EL (CRM-EL), neionogenního polyethoxylovaného ricinového oleje jako emulgačního činidla jsou další alternativou řešení problémů s rozpustností hydrofobních PS. Takové disperze se užívají k přípravě a aplikaci parenterálních forem preparátů v PDT. Selman a kol.<sup>45</sup> prováděli PDT studie k experimentální léčbě transplantovaných nádorů močového měchýře u krys s purpurinovými deriváty jako fotosenzitizéry. Cytotoxické vzorky barviv dispergované v CRM-EL vykazaly tumorózní regresi při výrazně nižších dávkách než u vodných suspenzí PS.

Podle výsledků z experimentálních dat lze říct, že Cremophorové disperze mohou být považovány za vhodné transportní prostředky pro hydrofobní PS. Zjistilo se však, že po parenterálním vpravení přípravku obsahujícího CRM-EL v roli emulgačního agens byla pozorována akutní anafylaktická reakce. Její příčinou byla pravděpodobně přítomnost CRM-EL a její výskyt koreluje s dávkou a rychlostí infúze. Stále je velmi obtížné zcela zabránit tomuto nepřijatelnému vedlejšímu účinku, můžeme ho však zmírnit pomalou rychlostí infúze a premedikací antihistaminiky a kortikosteroidy. Dokumentované případy výskytu nežádoucí reakce však brání širšímu uplatnění tohoto aplikačního systému v praxi.<sup>5,46</sup>

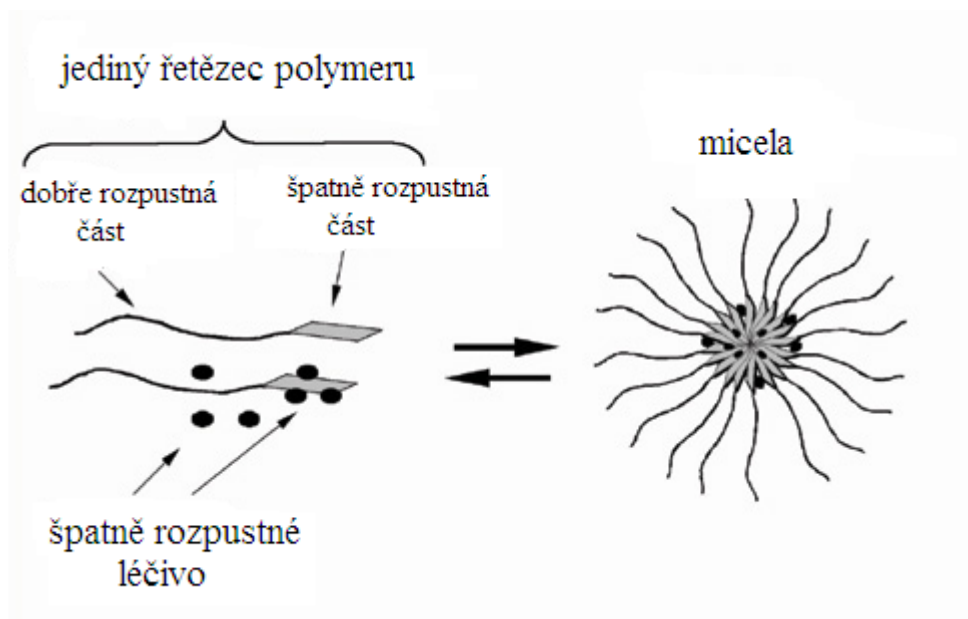
Lipidové emulze obsahující fosfolipidy a sojový olej nebo Miglyol 812 jako lipidovou fází a 2,5 % glycerolu v destilované vodě reprezentující vodnou fází byly užity jako „dopravní systémy“ pro benzochlorinové deriváty.<sup>47</sup>

### ***Micelární systémy***

Obecně jsou micely sférické (kulovité) koloidní nanočástice, které se spontánně tvoří ve vodném prostředí z mnoha amfifilních molekul. Hydrofobní části amfifilních molekul vytváří jádro micely, které může solubilizovat málo rozpustné látky (léčiva). Hydrofilní části molekul naopak tvoří obal micely (viz. Obr. 16). Micelární enkapsulací se zvýší rozpustnost a biologická dostupnost špatně rozpustných látek, zvyšuje se také jejich stabilita v okolním biologickém prostředí a zlepšuje farmakokinetika a biodistribuce, zatímco se snižuje jejich toxicita.<sup>43</sup>

Hydrofobní látky jsou k hydrofobnímu micelárnímu jádru zachyceny fyzikálně a/nebo kovalentní vazbou. Obvykle je fyzikálního zachycení dosaženo elektrostatickou interakcí mezi látkou a polymerem (výsledné částice se pak nazývají polyion komplex (PIC) micely), rozkladem z organického rozpouštědla nebo postupem tvorby emulze typu o/v. Jako solubilizační činidla pro hydrofobní látky (léčiva) mají polymerní micely zřejmé výhody oproti nízkomolekulárním surfaktantům vzhledem k vysoké stabilitě micel. Ta se odráží v souvislosti s obvykle velmi nízkou kritickou micelární koncentrací (CMC) polymerních surfaktantů. To znamená, že polymerní micely jsou odolné vůči účinkům ředění, např. při i.v. podání látky<sup>48</sup>, zatímco běžné nízkomolekulární surfaktanty mají relativně vysokou hodnotu CMC, což vede k poměrně rychlé disociaci micel při ředění a výsledné precipitaci látky.<sup>43</sup>





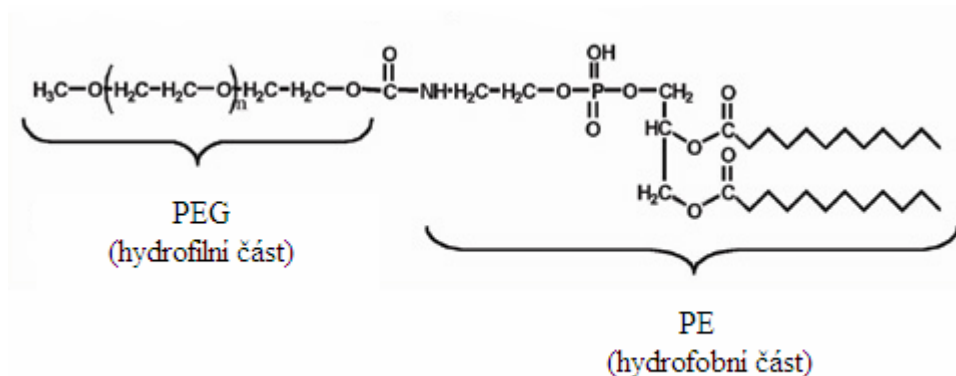
Obr. 16: Schéma tvorby polymerní micely z amfifilních bloků kopolymerů a začlenění léčiva do micely (kovalentními vazbami k hydrofobní části molekuly polymeru a nekovalentními vazbami k hydrofobní části obalu micely)

Další důležitou charakteristikou micel ve srovnání s např. mikrosférami nebo liposomy je jejich malá (obvykle 5-50 nm) a jednotná velikost částic. Tato velikost je však stále dostatečná na to, aby se uskutečnil pasivní targeting. Díky malým rozměrům se micely samovolně hromadí v patologických oblastech, kde je zvýšená permeabilita cév a narušená lymfatická drenáž, tedy v místech tumorů a zánětlivých tkání a to pomocí mechanismů zvýšené propustnosti a retenčního efektu (EPR z angl. enhanced permeation and retention effect)).<sup>43, 48</sup>

Polymerní micely vykazují celou škálu výhodných vlastností. Micelární obal tvořený hydrofilními polymerními bloky poskytuje in vivo dlouhou životnost, neboť brání opsonizaci a „ukořistění“ buňkami a orgány retikuloendoteliárního systému. Polymerní micely jsou vysoce stabilní a zadržují enkapsulované látky v solubilizované formě během parenterálního podání.<sup>43</sup>

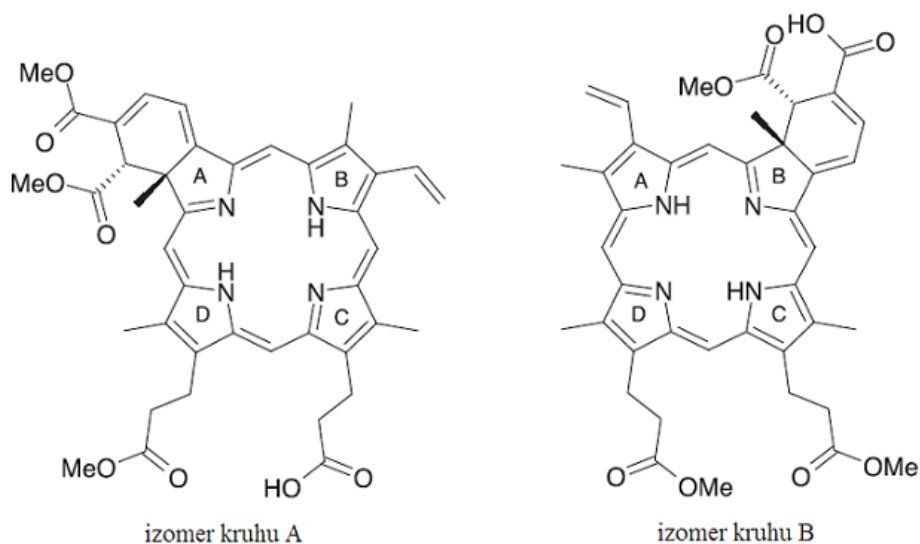
Pro farmaceutické účely byly již zaznamenány značné obměny ve složení jádra, které může být tvořeno polyestery, poly(amino kyselinami), poly(meth)akryláty nebo poly(akrylamidy). Nicméně obal se téměř výhradně skládá z poly(ethylenglykolu) (PEG), neboť je to velmi dobře biokompatibilní polymer, který vykazuje pouze malé nebo žádné nežádoucí interakce s proteiny a buňkami. PEG se často užívá jako „ochrana“ koloidních nosičů léčiv před vnitřním prostředím (ochrana před interakcemi s krevními složkami) a za účelem prodloužení doby jejich cirkulace v oběhu.<sup>48</sup>

Polymerní micely připravené z konjugátů PEG a diacyllipidu jako je fosfatidylethanolamin (PE) jsou zvláště zajímavé. PEG řetězce jsou ve vodě rozpustné, dobře hydratované a slouží jako účinná stérická ochrana pro různé mikročástice (např. micely, liposomy, nanočástice a nanokapsuly) v biologickém prostředí. PEG-PE micely mají malý rozměr, jsou stabilní a mohou pojmout různé druhy slabě rozpustných látek.<sup>43</sup>



Obr. 17: PEG-PE – sloučenina vytvářející micely

Pluronic (poloxamery) jsou komerčně dostupné ve vodě rozpustné triblokové kopolymery poly(ethylenoxidu) a poly(propylenoxidu) (ve zkratce známé jako PEO-PPO-PEO), které jsou často užívány jako solubilizační činidla léčiv.<sup>48</sup> Hioka a kol.<sup>49</sup> zkoumali užití Pluronic P123 k solubilizaci benzoporfyrinového derivátu (B-kruh izomeru) pro PDT. Nad kritickou micelární koncentrací je fotosenzitizér (P123) přítomen v monomerním stavu v jádře micely v koncentraci 1 mg/ml, zatímco agregáty se ve vodě vytváří až při hodnotě nižší než je CMC. Tento poznatek je velmi důležitý, protože agregované PS špatně absorbují světlo a nedostatečně produkují singletový kyslík. Stabilní micely (dosahující rozměrů od 15 do 20 nm) se tvoří při vysoké koncentraci (10 % w/v) P123. Za nízké koncentrace (0,2 % a méně) vznikají částečně agregované micely.



Obr. 18: benzoporfyrinové deriváty

Tvorbou micel z izomerů benzoporfyrinu A a B kruhu připravených obdobným způsobem se zabývali Zhang a kol.<sup>50</sup>, pracovali s methoxypoly(ethylenglykolem) (s molekulovou hmotností 2000 Da) kovalentně navázaným na lipid distearoylfosfatidylethanolamin jako surfaktant (mPEG<sub>2000</sub>-DSPE). Micely mPEG<sub>2000</sub>-DSPE : benzoporfyrinový derivát A nebo B kruhu byly připraveny v poměru 6:1 a po in vivo i.v. podání a expozici světlem (690 nm) se zkoumal vliv na tumorózní regresí u myši. Injekce s benzoporfyrinem B-kruhu nijak neovlivnila nádor, zatímco derivát A-kruhu vyvolal úplnou tumorózní regresí za 3-20 dnů.

Tvorba micel schopných specifické nebo alespoň preferenční akumulace v požadovaném tělním kompartmentu nebo patologické oblasti může dále zvýšit účinnost micelárně enkapsulovaných léčiv nebo diagnostických látek. Např. adriamycin vložený do polymerních micel byl mnohem účinnější v experimentální léčbě myšního solidního adenokarcinomu tlustého střeva než při léčbě samostatným volným léčivem.<sup>43</sup>

Účinnost pasivního targetingu v PDT byla dále zdokonalena vývojem micel, které reagují na podněty za účelem uvolnění PS (léčiva) selektivně v cílovém místě. Byly již představeny micely schopné dezintegrace při zvýšené teplotě nebo při poklesu pH, tedy vlastností často charakteristických pro nádory a zánětlivé tkáně. Navíc po buněčném uptake mohou micely skončit v buněčných kompartmentech jako jsou např. endosomy či lyzosomy s kyselým pH. V důsledku toho se může změnit polarita a struktura

polymeru, která způsobí destabilizaci endosomální membrány a uvolnění fotosenzitizéru.<sup>48</sup>

Jde o kombinaci EPR efektu a schopnosti reagovat na podněty. pH-senzitivní polymerní micely obsahující ftalocyaniny jsou nadějnými nosiči pro fotodynamickou nádorovou terapii. Také polymerní micely s navázaným doxorubicinem přes vazby štěpící se v kyselém prostředí poskytují vylepšenou intracelulární dopravu léčiva do nádorových buněk a tedy i vyšší účinnost.<sup>51, 52</sup>

Nedávno byly zkoumány pH-senzitivní polymerní micely a zdálo se, že se stanou nadějnou alternativou CRM disperzím chlorovaných ftalocyaninů s centrálním hliníkem (AlClPc). V pokusech in vitro na prsních nádorových buňkách u myši vykazovaly vyšší fototoxicitu než disperze s Cremophorem. Avšak in vivo pokusy prokázaly obdobnou účinnost v tumorózní regresi a léčbě a dokonce menší akumulaci v nádorové tkáni a rychlou clearance z krevního řečiště.<sup>53</sup>

Teplotně citlivé polymerní micely dokáží zvýšeně uvolňovat léčivo (PS) při teplotních změnách.<sup>54</sup> Průnik polymerní micely do tumorózní buňky stejně jako uvolnění jejího obsahu může být zvýšeno zevně aplikovaným ultrazvukem.<sup>55</sup> Dosud nejširší možnosti v rámci různorodosti cílů a specifiky interakce poskytuje metoda targetingu založená na protilátkách.

Novou vazebnou technikou byly nedávno připraveny PEG-PE imunomicely modifikované s tumor-specifickými monoklonálními protilátkami.<sup>56</sup> Důležité je také to, že touto modifikací nevzroste velikost micel a zachovají si i stejný sférický tvar. Nedávno se dokonce zjistilo, že některé nepatogenní monoklonální antinukleární autoprotiátky s nukleosomálně vyhrazenou specifitou rozpoznají povrch mnoha odlišných nádorů ale ne normálních zdravých buněk.<sup>57</sup> Výzkumy ukázaly, že toho lze využít např. pokud imunomicely nesou protinádorové léčivo (např. paklitaxel), značně se zvyšuje schopnost zničit nádorové buňky jak in vitro tak in vivo.

### ***Polymerní částice a nanočástice***

Biodegradabilní nanočástice jsou považované za alternativu k liposomům, tedy za další možný způsob dopravy antineoplastických agens. Jejich hlavní výhody tkví ve schopnosti pojmout velké množství látky (PS, léčiva) a v možnosti kontroly jejího následného uvolňování a také ve velké rozmanitosti materiálů a snadných výrobních technologiích. Na poli PDT proběhla řada experimentálních studií s nanočásticemi

(nanokapsuly a nanosféry) obsahujícími HpD, ftalocyaniny nebo mTHPC, které přinesly nadějně výsledky. Mezi látkami tvořícími nanočástice se objevily např. poly(isobutylkyanoakrylát), poly(ethylbutylkyanoakrylát), poly(isohexylkyanoakrylát), polyestery (jako např. PLA (polymlečná kyselina)) atd. Ukázalo se, že nanoenkapsulace zvyšuje buněčnou lokalizaci PS a dává dobrou in vitro fototoxickou aktivitu, lepší než by vykazovalo samotné volné barvivo. Hone a kol.<sup>58</sup> použili nanočástice ze zlata v kombinaci se Zn-ftalocyaninem. Zjistili zvýšenou efektivitu generace singletového kyslíku ve srovnání s PS samotným.<sup>5</sup>

V PDT studiích se zkoumaly také ostatní polymerní částice jako jsou např. mikrosféry s rozměrem větším než 1000 nm, ale byly popsány pouze experimenty zaměřující se jen na hydrofilní fotosenzitizéry.<sup>5</sup>

### ***Konjugáty PS–hydrofilní polymer***

Tvorba vazby vhodného polymeru (hydroxylpropylmetakrylamid - HPMA, polyetylglykol - PEG, polyvinylalkohol - PVAL a další) k fotosenzitizéru je stále rozsáhle studovanou problematikou a přináší s sebou některé výhody pro PDT aplikaci na rozdíl od volného PS. Tvorbou konjugátu se např. prodlouží intravaskulární poločas, zlepši tumorózní selektivita a zvýrazní účinnost PDT.<sup>5</sup>

### **Dlouhocirkulující dopravní systémy**

Terapeutická aplikace intravenózně podaných koloidních systémů („nosičů“) je omezena snahou fagocytárního systému (phagocytic systém - PHS) tyto částice z cirkulujícího krevního oběhu rychle odstraňovat. To následně ovlivní uptake koloidních nosičů nebo barviva cílovou tkání, jež je pak nedostatečný. Vychytávání fagocytujícími buňkami je podpořeno opsonizací cizích těles (tj. adsorpcí ligandů plazmatických proteinů citlivých k interakci s receptory umístěnými na povrchu fagocytující buňky).

V provedených in vivo studiích se zjistilo, že interakce opsonizujících částic je závislá na fyzikálně-chemických vlastnostech cizích částic (nosičů) jako jsou hydrofobicita, náboj, velikost a přizpůsobivost jejich povrchu. Modifikací těchto vlastností nebo saturací PHS lze zabránit fagocytóze jednotlivých nosičů. U nádorové léčby však není žádoucí blokáda fagocytárního systému, protože se jeho buňky (makrofágy, „přirození zabíječi“- natural killer buňky) účastní potřebných imunitních

reakcí pro kontrolu rozvoje nádoru a hrají tedy významnou roli při vlastním protinádorovém účinku. Více pozornosti si proto zaslouží druhá strategie, tedy modifikace povrchu koloidních systémů.

Zjistilo se, že opsoniny při adsorpci upřednostňují spíše hydrofobní než hydrofilní povrch částic, proto jsou hydrofobní molekuly rychleji rozpoznány a „uklizeny“. Tato nevýhoda může být překonána právě vhodnou modifikací povrchových vlastností koloidních nosičů. Tím se minimalizuje nebo dokonce zabrání rozpoznávání a následnému vychytávání fagocytárním systémem a dlouhocirkulující částice mohou lépe dosáhnout cílového místa. Jedním ze způsobů zvýšení hydrofility je potažení povrchu hydrofilními vrstvami (poloxamery, poloxaminy, PEG) nebo inkorporace gangliosidů do lipidové dvojvrstvy. Tyto vrstvy polymerů musí tvořit stérickou překážku mezi povrchem nosiče a opsoninů, která účinně čelí fagocytujícím buňkám. Doba cirkulace koloidních nosičů je pak delší a závisí na molekulové hmotnosti, povrchové hustotě a délce řetězce polymeru.<sup>5</sup>

### **Cyklodextriny – moderní přenašeče PS**

Cyklodextriny jsou intenzivně studovány jako jedny z vhodných přenašečů celé řady léků. V současné době je ověřována možnost jejich využití i u fotodynamicky aktivních látek. Jsou to cyklické oligosacharidy tvořené glukopyranozovými jednotkami. Struktura cyklodextrinů připomíná kuželový pohár, který vytváří hydrofobní dutinu. Vnější plášť je hydrofilní a jeho polarita je přisuzována primárním a sekundárním hydroxylovým skupinám. Fotodynamicky aktivní látky jsou vázány v dutině cyklodextrinů pomocí hydrofobních a van der Waalsových sil. Vazba tedy umožňuje hydrofobním PS transport ve vodném prostředí. Cyklodextriny mají také významný monomerizující efekt, který zabraňuje vzájemné agaregaci PS a zvyšuje kvantový výtěžek a dobu života excitovaného stavu PS.<sup>59</sup>

Přírodní cyklodextriny však mají poměrně nízkou rozpustnost jak ve vodě, tak v organických rozpouštědlech, což omezuje jejich použití ve farmaceutickém průmyslu. Proto je vyvíjena celá řada cyklodextrinových derivátů s vhodnějšími fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Tyto deriváty jsou vysoce biokompatibilní, a to především při parenterálním podání.<sup>60</sup>

## **2. TEORETICKÁ ČÁST**

### **2.1. CÍL PRÁCE**

Cílem této diplomové práce byla snaha najít vhodný a účinný solubilizační systém pro fotodynamicky aktivní látky. Za úkol jsem měla vyzkoušet různé postupy příprav soustav s vybranými solubilizačními, emulgačními činidly a rozličnými lipidy a zjistit, které z nich jsou vhodné pro solubilizaci konkrétních ftalocyaninů.

Ftalocyaniny jsou potenciálně fotodynamicky aktivní látky, které jsou poměrně špatně rozpustné ve vodě. Ftalocyaniny ve funkci fotosenzitizéru v PDT jsou podávány parenterální cestou do krevního oběhu, a proto je nezbytné převést je do takové formy, aby bylo možné aplikaci provést. Pro zvýšení rozpustnosti ftalocyaninů lze volit několik přístupů. Jedním z nich je zásah do vlastní struktury ftalocyaninu, například substitucí na periférii nebo centrálním atomu. Další volbou je výběr vhodného distribučního systému, který hydrofobní PS dopraví na místo určení. Nabízí se více způsobů, jak toho docílit. PS může být inkorporován do zvolené transportní molekuly (např. liposomu, micelárního systému, cyklodextrinu) a ta pasivním targetingem dopraví PS do nemocné tkáně. Lze také využít emulgačních schopností některých povrchově aktivních látek (např. emulgátoru Cremophoru) a vytvořit disperze, které slouží jako transportní prostředek hydrofobnímu PS.

Pracovala jsem s ftalocyaninovými barvivy s převážně lipofilní povahou a s různými centrálními atomy kovu. V předložené diplomové práci jsem se zaměřila na využití kombinace solubilizačních a emulgačních vlastností některých látek za účelem převést hydrofobní ftalocyaniny do formy stabilní disperze. K realizaci úkolu jsem hledala a využívala rozličné solubilizátory, emulgátory a lipidy v různých koncentracích a kombinacích. Vybrané připravené soustavy disperzí byly podrobeny testu na fototoxicitu a cytotoxicitu, aby se zjistilo, zda splňují požadavek zachování fotodynamické aktivity a zároveň netoxicity pro tkáňové kultury.

## 2.2. POMOCNÉ LÁTKY PRO KAPALNÉ DISPERZNÍ SYSTÉMY

Ke stabilizaci kapalných disperzních systémů se používají emulgátory, smáčedla, solubilizátory, látky zvyšující viskozitu disperzního prostředí. Disperze jsou látkové systémy charakterizované tím, že v homogenní a zpravidla souvislé fázi jedné látky jsou rozptýleny částice jiné látky (fáze).

### Emulgátory

Největší část emulgátorů patří do skupiny tenzidů, další skupinou jsou nepravé a nerozpustné emulgátory, zvláštní skupinu tvoří emulgátory komplexní.

Tenzidy, surfaktanty, povrchově aktivní látky mají vystupňovanou schopnost snižovat povrchové napětí kapalin, zejména vody a vodných roztoků, snižovat mezipovrchové napětí mezi polární a nepolární kapalinou a zvyšovat smáčení tuhých látek kapalinami.<sup>61</sup>

### *Tenzidy*

Tenzidy jsou povrchově aktivní látky využívané v průmyslu i teoretickém výzkumu. Tenzidy vykazují smáčecí, emulgační, pěnicí, čistící nebo stabilizační účinky. Tyto sloučeniny mají schopnost ovlivňovat fotochemické reakce, jsou u nich pozorovány katalytické účinky i vlastnosti analogické vlastnostem biologických membrán.<sup>62</sup>

Společnou vlastností tenzidů je schopnost hromadit se na rozhraní fází. Už při nízké koncentraci mění energetické poměry na fázovém rozhraní, což se projevuje hlavně snížením povrchového napětí kapalin a adsorpcí tenzidu na fázovém rozhraní. Tenzidy obsahují vždy dvě části – lipofilní a hydrofilní. Látky s touto strukturou se nazývají amfifilní nebo amfipatické. Lipofilní je nepolární část nebo části molekuly tenzidu odpuzující vodu. Hydrofilní jsou polární části molekuly, které mají afinitu k vodě a ve vodném prostředí jsou v různé míře hydratovány. To znamená, že se kolem nich vytvoří solvatační obal z molekul vody vázaných díky vodíkovým můstkům mezi hydratovanou částí molekuly tenzidu a molekulami vody.

V technologii léků je obvyklé třídění tenzidů podle jejich iontového charakteru a podle hydrofilně lipofilní rovnováhy (HLB z angl. hydrophilic-lipophilic balance). Ionový charakter je významný z hlediska kompatibility tenzidů s ostatními složkami emulzního systému. Podle náboje, tedy podle schopnosti tenzidů disociovat ve vodě se



tenzidy dělí na ionogenní (iontové) a neionogenní (neiontové). Ionogenní tenzidy ve vodě disociují. Neionogenní tenzidy nemají výrazně lokalizovaný náboj hydrofilní skupiny - její polární část je zde dána například větším počtem kyslíkových atomů v molekule.

HLB je poměr mezi intenzitou manifestace hydrofilních a lipofilních vlastností jednotlivých částí molekuly tenzidu. Při hodnotě HLB do 9 převládá charakter lipofilní. 9 až 11 jsou hodnoty střední a HLB nad hodnotou 11 znamená, že vlastnosti molekuly tenzidu určují převážně hydrofilní složky.<sup>61, 62</sup>

Tab. 2: HLB tenzidů a jejich použití

HLB	použití
4-6	emulgátor v/o
7-9	smáčedlo
8-18	emulgátor o/v
13-15	detergent
10-18	solubilizátor

Tenzidy mají asociační schopnosti a při dosažení určité koncentrace tzv. kritické micelární koncentrace (CMC) molekuly nebo ionty tenzidu spontánně agregují do větších útvarů označovaných jako micely. Ty se skládají z agregátů s velikostí typickou pro koloidní stav. CMC je dána zejména strukturou tenzidu.

Normální micely vznikají z ionogenních tenzidů v polárních rozpouštědlech. Jádra těchto micel jsou tvořena hydrofobními uhlovodíkovými řetězci. Inverzní (invertní) micely se vyskytují v prostředí nepolárních rozpouštědel. Částice tenzidu jsou zde orientovány opačně ve srovnání s normálními micelami. Jádro tenzidu je tedy v tomto případě tvořeno hydrofilními skupinami. Micely nejeví na rozdíl od monomerů povrchově aktivní vlastnosti a jsou v termodynamické rovnováze s molekulami monomeru tenzidu. Schopnost poutat a solubilizovat látky přítomné v systému je významnou vlastností micelárních roztoků tenzidů.<sup>61, 62</sup>

### **Solubilizátory**

Solubilizátory jsou látky, které zvyšují rychlost a rozsah rozpouštění, přičemž umožňují do roztoku převádět málo rozpustné látky beze změny jejich chemické

struktury.<sup>63</sup> Solubilizátory účinkují vytvářením komplexů (např. uzávěrové komplexy cyklodextrinů), tuhých roztoků, hydrotropním efektem a jako koloidní micely tenzidů. Solubilizovat lze i přísadou kosolventů. Všechny tyto způsoby jsou dále podrobněji probrány.

### ***Solubilizace***<sup>61</sup>

Solubilizací neboli zprostředkovaným rozpouštěním málo rozpustné látky rozumíme tedy podstatné zlepšení rozpustnosti přidáním další látky (solubilizátoru) do roztoku. Jedná se zejména o zlepšení rozpustnosti látek, které se samy ve vodě nedostatečně rozpouštějí nebo se prakticky nerozpouštějí. Termín solubilizace zahrnuje způsoby, jimiž lze připravit z těchto látek vodné roztoky. Zprostředkovaného rozpouštění lze dosáhnout několika různými mechanismy:

- Vytvoření komplexu – reakcí málo rozpustné látky a solubilizátoru v stechiometrickém poměru vznikne komplex s již lepší rozpustností. Často však komplex vzniká až při rozpouštění málo rozpustného léčiva v roztoku podstatně většího množství solubilizátoru, než odpovídá stechiometrickému poměru. Komplex musí být vratný, aby se po zředění tělesnými tekutinami mohlo léčivo z komplexu opět uvolnit a nezměnil se tak zásadně jeho účinek. Takovým příkladem vzniku komplexu je již zmíněný tzv. uzávěrový (inkluzní) komplex. Lze uzavřít i velmi lipofilní molekulu uvnitř struktury přírodního nebo modifikovaného cyklodextrinu nebo příbuzné makrocyclické sloučeniny a převést ji tak do vodného roztoku.
- Micelární solubilizace – představuje vstup solubilizované látky do koloidních micel tenzidů. Lokalizace solubilizované látky v micelle závisí na tom, zda je látka hydrofobní či hydrofilní. Vodné micelární roztoky tenzidů rozpouštějí lipofilní látky tak, že se tyto látky zabudují do nitra micel tenzidů (do hydrofobních uhlovodíkových vnitřků micel) nebo vytváří s tenzidem smíšené micely. Hydrofilní polární látky jsou lokalizovány v povrchové vrstvě micel.<sup>62</sup>
- Hydrotropní efekt – vysvětluje se jím mírné zvětšení rozpustnosti málo polárních látek ve vodných roztocích některých dobře rozpustných solí a polárních neelektrolytů. Hydrotropně účinné soli a polární látky částečně rozrušují asociovanou strukturu vody, čímž zlepšují její schopnost rozpouštět málo polární látky.

- Přídavek kosolventu – zajistí účinnou přípravu roztoků řady málo rozpustných nepolárních i polárních látek. Kosolventem je nevodné rozpouštědlo mísící se s vodou. Směsné rozpouštědlo se zvýšenou rozpouštěcí schopností vzniká přidáním jednoho nebo více vhodně zvolených kosolventů do vody. Běžným kosolventem je glycerol nebo ethanol, mezi novější se řadí propylenglykol, dimethylacetamid, nižší kapalné polyethylenglykoly (PEG 400) apod.. Výhodně se kombinuje také solubilizace pomocí kosolventů a tenzidů (např. polysorbátů 20 a 80), mezi kapalnými tenzidy a kosolventy ani nelze stanovit ostrou hranici.

Solubilizací vhodnými kosolventy a její kombinací lze zvýšit rozpustnost řady látek 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 léčiv***

Podání léčiv orální cestou je pacienty považováno za nejpohodlnější způsob aplikace. V současné době se farmaceutický průmysl potýká se stále rostoucím počtem špatně rozpustných léčiv s nízkou, proměnlivou nebo na potravě závislou biologickou dostupností. Hledají se nové způsoby, jak řešit problém se špatnou biologickou dostupností léčiv. Nejvíce limitujícím krokem vstřebávání těchto léčiv bývá často jejich solubilizace v gastrointestinálním traktu (GIT). To vyvolalo zájem o formulace založené na lipidech, které jsou schopné udržet léčivo v roztoku při průchodu GIT, a tím obcházejí proces rozpouštění. Jedním z možných přístupů je užití samomikroemulgujících distribučních systémů léčiv (SMEDDS z angl. self-microemulsifying drug delivery systems).<sup>64</sup>

Pevné roztoky reverzních micel (SRMS z angl. solidified reverse micellar solutions), což jsou např. směsi lecitinu a triglyceridů poskytující velkou solubilizační schopnost různým typům látek (léčiv) na rozdíl od jednoduchých systémů triglyceridů. Nanosuspenze založené na SRMS jsou připraveny homogenizací blízko bodu tání matrice SRMS. V prvním kroku je do matrice (v poměru 1:1 lecitinu a triglyceridů) vloženo léčivo a následně rozetřeno v tekutém dusíku, aby se později minimalizovala difúze léčiva. Prášek je pak dispergován v roztoku polysorbátu 80 homogenizací za vysokého tlaku. Nanosuspenze založené na SRMS byly navrženy jako slibné vodné

nosiče špatně rozpustných léčiv jako např. 17 $\beta$ -estradiol-hemihydrátu, hydrokortisonu nebo pilokarpinu.<sup>65</sup>

Cílem další studie<sup>66</sup> bylo zkoumat izotropní systém amfifilního lipidu mono- a diglyceridu (MCMDG)/olej/voda a jeho využití k přípravě potenciálních formulací bez kosurfaktantů a zjistit, zda-li by takový systém mohl solubilizovat jak hydrofilní tak lipofilní léčiva. Byly studovány solubilizace lipofilních léčiv v přítomnosti hydrofilních léčiv a i naopak ve formulacích trojkomponentního systému (MCMDG/sezamový olej/voda) a dvoukomponentního systému (MCMDG/voda) s léčivem. Hydrofilním léčivem byl levamizol hydrochlorid a lipofilním abamektin. Tato léčiva byla stanovována v izotropních formulacích pomocí HPLC analýzy. Obě léčiva mohou být solubilizována v běžných koncentracích v těchto izotropních systémech, přičemž u obou byla solubilizace v izotropním trojsložkovém systému vyšší než ve dvoukomponentním. Studie dokázala, že použité izotropní systémy se jeví jako vhodné distribuční systémy pro hydro i lipofilní léčiva.

Podstatou solubilizace je vnutit nerozpustné pevné látky pravidelnou (metastabilní) mikrostrukturu. Pokročilé přístupy k solubilizaci léčiv nerozpustných ve vodě jsou založeny na tvorbě disperze léčiva (na molekulární úrovni) v prostředí stabilizujícího média. K těmto účelům se nejnověji využívá mikrovlnami indukovaná difuze (MIND z angl. microwave induced diffusion), pomocí níž se připravují aktivovaná léčiva ve formě pevných nanostruktur. K těmto experimentům byla použita léčiva např. ibuprofen, nimesulid nebo nifedipin se solubilizačními matricemi  $\beta$ -cyklodextrinem a krosprovidonem.<sup>67</sup>

Nedávno byla vypracována studie na téma týkající se polysorbátových (Polysorbát 80) a cremophorových (Cremophor EL) micel, které deagregují a solubilizují léčivo nystatin na fázovém rozhraní micelárního jádra a obalu.<sup>68</sup> Studie určila rozsah a lokalizaci solubilizace nystatinu micelami z neionických surfaktantů.

Další pokusy týkající se snahy zlepšit biodostupnost ve vodě špatně rozpustných léčiv uskutečnili Joshi a kol.<sup>69</sup> pomocí užití pevné disperze ve směsi PEG 3350 s PS 80. Tuhé disperze léčiv byly připraveny rozpouštěním léčiva v tekutém přenašeči (65°C) a plněním taveniny do pevných želatinových kapslí. Biodostupnost po orálním podání této formulace u psů byla srovnávána s kapslemi obsahujícími mikronizované léčivo smísené s laktózou a mikrokrystalickou celulózą a kapalným roztokem ve směsi PEG 400, PS 80 a vody. Roztok ve směsi propylenglykolu, PS 80 a vody byl užit také

pro intravenózní podání. Ve studii se zjistilo, že užitím pevné disperze vzrostla několikanásobně biodostupnost léčiva v porovnání s kapslemi obsahujícími mikronizované léčivo. Navíc formulace pevných disperzí byly fyzikálně i chemicky stabilní po dobu alespoň 6 měsíců.

Sadurní a kol.<sup>70</sup> provedli studii zaměřenou na přípravu o/v nanoemulzí vhodných pro farmaceutické aplikace a solubilizaci prakticky ve vodě nerozpustného léčiva (lidokainu). Tvorba nanoemulzí byla zkoumána v systémech voda/neionogenní surfaktant/olej. Nanoemulze byly připravovány pomocí nízkoenergetických emulgačních metod. Solubilizace lidokainu byla zkoumána v nanoemulzích s vysokým obsahem vody. Maximální koncentrace lidokainu solubilizovaného v systému voda/Cremophor EL/Miglyol 812 s 90 a 95 % obsahu vody dosáhla příslušných hodnot 3,5 a 2,1 %. Tyto hodnoty se pohybují v terapeutickém rozmezí koncentrací lidokainu.

### ***Solubilizace fotosenzitizérů***

Faktory jako jsou náboj, agregace a lipofilita ovlivňují lokalizaci fotosenzitizéru. Lipofilní oktasubstituovaný senzitizer 2,3,9,10,16,17,23,24-okta(decyloxy)ftalocyanin Zn(II) byl včleněn do DMPC (dimyristoyl-L- $\alpha$ -fosfatidylcholin) liposomů, neionogenních micel z Tweenu 80 a přidán k roztoku polymeru Solutol<sup>®</sup> HS 15 (ve vodě rozpustného) za účelem prozkoumat, jak tato rozdílná prostředí ovlivní fotofyzikální vlastnosti ZnPc a fototoxicitu vůči buněčné linii lidského karcinomu hrtanu (Hep-2). Spektrální vlastnosti byly zkoumány v rozmezí vlnových délek 500-800 nm v odlišných rozpouštědlech: THF, oktanol, DMPC liposomy (2,1 mmol/l v PBS), Solutol<sup>®</sup> HS 15 (25 % m/m) a v Tween 80 (75 mmol/l). Kvantový fluorescenční výtěžek a tvorba singletového kyslíku byly zvýšené v přítomnosti Solutol<sup>®</sup> HS 15.<sup>71</sup>

V této studii byla popsána příprava roztoku polymeru Solutol<sup>®</sup> HS 15, roztoku s Tweenem 80 a unilamelárních liposomů DMPC. Roztok polymeru Solutol<sup>®</sup> HS 15 byl připravován následovně: Solutol zahřátý na 60-65°C byl smíchán s roztokem PBS (pH 7,4; 0,01 mol/l fosfát a 0,15 mol/l NaCl) za stejné teploty a tato směs byla důkladně promíchána. Směs se může zakalit, je-li první polovina vodného roztoku přidána příliš rychle. Až pak byl roztok ZnPc přidán k této směsi za protřepávání při teplotě 60-65°C.

Nejsilnější fotodynamický efekt byl pozorován při koncentraci 0,1  $\mu$ mol/l ZnPc a 15 min době ozáření viditelným světlem. Za těchto podmínek buněčná linie Hep-2 vykázala po 24 hodinách životaschopnost 53 % u DMPC liposomů a 30 % u

Solutol<sup>®</sup> HS 15. Velké množství apoptických buněk bylo možno sledovat 6 hod po fotodynamické léčbě s 15 min ozářením, zatímco nekrotické buňky až po 24 h inkubaci. Fotofyzikální a biologické studie vyhodnotily, že Solutol<sup>®</sup> HS 15 je lepším distribučním systémem než DMPC liposomy, protože ZnPc v Solutolu produkuje více aktivních agens ve stejné dávce světla a koncentraci PS než ZnPc inkorporované v liposomech. PDT studie se ZnPc v Tweenu 80 nebyly provedeny z důvodu vysokého stupně agregace barviva v tomto prostředí.

Zjistilo se, že některé faktory mohou být modulátory fototerapeutické aktivity, např. hydrofobní barviva vykazují obzvláště velkou afinitu k maligním buňkám, zatímco více hydrofilní sloučeniny jsou přednostně uvolněny do extracelulární matrix. Proto hlavním cílem poškození indukovaného fotosenzitizérem je cévní systém. V některých případech může být selektivita nádorového targetingu zdokonalena spojením PS s vhodným distribučním systémem před systémovým podáním. Přítomnost elektricky nabitých nebo objemných periferních substituentů a axiálních ligandů na centrálním kovovém iontu minimalizuje tendenci barviva podléhat agregaci, která často snižuje jeho účinnost jako PS.

Užitím emulgátorů se může někdy předejít agregaci a rozpustnost některých sloučenin se může zvýšit, což umožní snadnější podání PS.<sup>71</sup>

Sojový olej (SBO) byl užit jako prostředek k solubilizaci ftalocyaninu s centrálním atomem zinku (ZnPc), což je známý fotosenzitizér pro potenciální užití v PDT.<sup>72</sup>

ZnPc se řadí mezi slibné fotosenzitizéry, ale jeho užití v PDT je limitováno jeho hydrofobicitou a tato skutečnost vyžaduje užití vhodného dopravního systému pro jeho transport do cílové tkáně. Tímto dopravním systémem mohou být liposomy, které jsou často využívány u mnoha biomedicínských aplikací. Avšak liposomy mají tendenci být vychytávány retikuloendoteliálním systémem (RES) a proto je jejich využití limitováno v případech, kdy terapeutickým cílem zájmu není buňka RES. Dalším přístupem řešení hydrofobicity ZnPc je tvorba jeho hydrofilních derivátů - zinkových tetrasulfoftalocyaninů (ZnPcS<sub>4</sub>). Tyto sloučeniny jsou dobře rozpustné v polárních rozpouštědlech. Avšak problém nastává s jejich čistotou při získávání běžnými syntetickými postupy, kterými se tvoří směsi mono-, di- a tri- sulfonovaných derivátů. Dále ZnPcS<sub>4</sub> vykazují fototoxicitu u bílých myší, která je příčinou výskytu malformačního syndromu ocasní části.

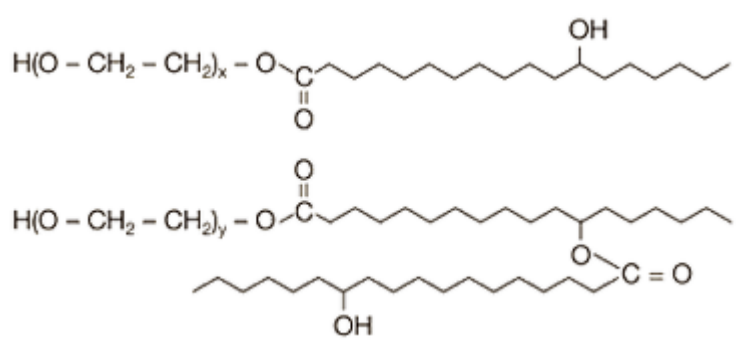
Další možností překonání solubilizačních problémů ZnPc je spojení s organickými rozpouštědly nebo mikroheterogenními povrchově aktivními látkami (surfaktanty). Ani tyto přístupy však nesplňují všechna kritéria na netoxicitu nebo dopravní kapacitu. Proto zde byla snaha najít dobrý solubilizační systém, který by nezpůsobil buněčnou toxicitu, byl relativně dostupný, levný a bezpečný. A SBO je látka, která splňuje všechny tyto podmínky. Tento olej je biodegradovatelný a skládá se z běžných lipidů a mastných kyselin, které se nacházejí v buňkách i buněčných membránách. Není známo, že by byl toxický a nyní bylo objeveno, že účinně solubilizuje ZnPc za vhodných podmínek.

Fluorescenční spektrální analýza roztoku ZnPc-SBO prováděná po 38 dní ukázala, že je roztok stabilní během tohoto časového rámce. Nebyla zaznamenána žádná toxicita při podání roztoku do kultury lidských endoteliálních buněk po 36 hod ani při injekčním subkutánním podání myším (Balb C). V obou případech došlo ke clearance ZnPc z injekční oblasti za přiměřenou dobu. Tato skutečnost spolu s jeho dobrou solubilizační schopností pro ZnPc a domnělou netoxicitou může SBO zařadit mezi možné distribuční systémy pro transport vhodných PS do cílových buněk v PDT a souvisejících aplikací.<sup>72</sup>

## 2.3. POUŽÍVANÉ SOLUBILIZÁTORY, EMULGÁTORY A LIPIDY

### *Solutol<sup>®</sup> HS 15*<sup>73</sup>

- Chemický název: polyethylenglykol-15-hydroxystearát
- Synonyma: Polyethylenglykol 660 12-hydroxystearát, Makrogol-15-hydroxystearát
- Jakostní standard: Solutol<sup>®</sup> HS 15 odpovídá požadavkům monografie „Macrogol-15-Hydroxystearat“ v Ph. Eur.
- Solubilizátor vyvinutý firmou BASF (BASF Aktiengesellschaft, Ludwigshafen, Germany) v roce 1995 jako solubilizátor s nízkou toxicitou.<sup>74</sup>
- Neiontová povrchově aktivní látka užívaná pro farmaceutické účely.
- Složení: skládá se z polyglykol mono- a di- esterů a eterů 12-hydroxy-stearové kyseliny (lipofilní část) a z asi 30-35 % volných polyethylenglykolů (hydrofilní část). Volný polyethylenglykol může být stanoven HPLC. Solubilizátor vznikne reakcí 1 molu 12-hydroxystearové kyseliny a 15 molů ethylenoxidu (EO).
- Hlavní komponenty lipofilní části mají následující chemické struktury:



Obr. 19: Struktura Solutol HS 15

- Malá část 12-hydroxy skupin může být etherifikovaná polyethylenglykolem.
- Popis: při pokojové teplotě je to žluto-bílá hmota, tekutou se stává při přibližně 30°C. Její HLB leží mezi 14-16, CMC mezi 0,005 až 0,02 %.
- Rozpustnost: Solutol<sup>®</sup> HS 15 se rozpouští ve vodě, etanolu a 2-propanolu. Rozpustnost ve vodě klesá s rostoucí teplotou a je nerozpustný v tekutém parafínu.
- Stabilita: je vysoce chemicky stabilní, dlouhodobý vliv tepla může vyvolat fyzikální oddělování tekuté a tuhé fáze po ochlazení, které se dá zvrátit následnou



homogenizací. Pokud je skladován v uzavřeném originálním obalu při pokojové teplotě (max. 25°C), je stabilní po více než 24 měsíců. Mnoho léčiv se vyrábí za aseptických podmínek, což v případě Solutolu<sup>®</sup> HS 15 není nutné, protože je možné jeho vodné roztoky podrobit sterilizaci parou (121°C/20 min). Následné testy neodhalily žádné změny vlastností, což signalizuje, že při sterilizaci nedochází k významně větší hydrolyze. Pouze by se mělo brát v úvahu, že během sterilizace může slabě klesnout hodnota pH roztoku. Po sterilizačním procesu se může objevit fázová separace, kterou lze překonat mírným protřepáváním roztoku během chladnutí. Hodnoty průměru micel zůstávají nezměněny. Vodné roztoky mohou být stabilizovány běžnými konzervačními prostředky užívanými u léčiv ve farmacii.

- Aplikace: hlavní použití jako neionogenní solubilizátor pro výrobu vodných parenterálních přípravků - injekčních roztoků vitamínů rozpustných v tucích - vit. A, D, E, K a mnoha dalších lipofilních farmaceuticky účinných látek (léčiv např. klotrimazol, mikonazol, karbamazepin, sulfathiazol, alfadolon, nifedipin, piroxikam, 17β-estradiol a dalších). Solubilizační schopnost pro některá testovaná léčiva roste téměř lineárně se zvětšující se koncentrací solubilizačního činidla v důsledku utváření sférických micel a to dokonce i při vysokých koncentracích Solutolu. Viskozita roztoků i při takových koncentracích zůstává relativně nízká. Proto je tedy možné nekomplikované podání až 30 % roztoku Solutolu<sup>®</sup> HS 15.
- Postup přípravy: nejprve se léčivo mícháním suspenduje do tekutého solubilizátoru při teplotě 65°C. Pak se po kapkách přidává fosfátový pufr (PBS) pH 7,0 o stejné teplotě. Směs se následně mícháním ochlazuje až na pokojovou teplotu. Disperze se zfiltruje skrz membránu o velikosti pórů 0,22 μm až do výsledného čirého či mírně opalizujícího roztoku.
- Toxikologie: Solutol<sup>®</sup> HS 15 je velmi dobře snášen, jak ukázalo mnoho toxikologických testů. Po jeho aplikaci je pozorováno uvolnění pouze malého množství histaminu. Toxikologické studie akutní a subakutní toxicity provedené u psů (viz. Tab. 3) zjistily, že Solutol<sup>®</sup> HS 15 je lépe tolerován než Cremophor EL (vyplavení histaminu je u něj zhruba 10x nižší než u Cremphoru EL).
- Solutol<sup>®</sup> HS 15 se díky své vysoké solubilizační schopnosti a nízké toxicitě řadí mezi efektivní moderní solubilizátory pro parenterální použití.

### ***Cremophor® EL*** <sup>74</sup>

- Neionogenní ricinový olej ethoxylovaný s 35 EO.
- Použití: pro orální, topické a injekční účely; vyvinutý před rokem 1992 (BASF).

### ***Cremophor® RH 40*** <sup>74</sup>

- Neionogenní hydrogenovaný ricinový olej ethoxylovaný s 40 EO.
- Použití: solubilizátor a emulgátor pro orální a topické použití; vyvinut před rokem 1992 po Cremophoru EL.

### ***Cremophor® EL-P*** <sup>74</sup>

- Ricinový olej ethoxylovaný s 35 EO purifikovaný.
- Je odvozený od Cremophoru EL a navíc v dalším kroku čištěný patentovaným postupem s využitím adsorpčních materiálů, aby se minimalizoval obsah volných mastných kyselin, vody a draslíku. Je určený pro preparáty, které jsou nestabilní nebo citlivé na zmíněné látky.
- Vyvinutý v roce 1995 pro onkologické preparáty (Taxol).

Po aplikaci těchto surfaktantů (povrchově aktivních látek) se můžou vyskytnout nežádoucí vedlejší účinky: uvolnění histaminu, anafylaktická reakce, pokles krevního tlaku, hemolytická reakce.

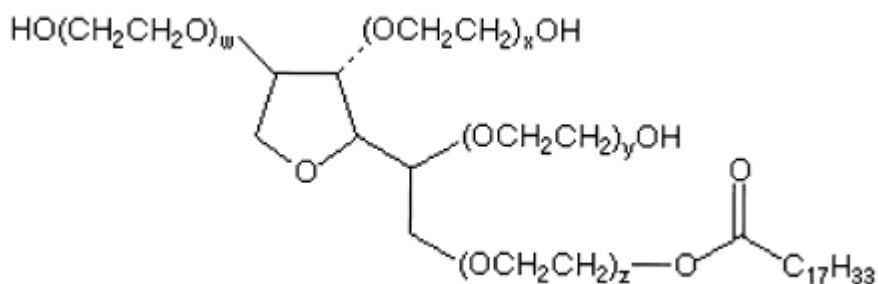
*Tab. 3: Vyplavení histaminu a pokles krevního tlaku po injekčním podání emulgátorů (u psů 100 mg/kg váhy psa)* <sup>74</sup>

produkt	pokles krevního tlaku (mmHg)	uvolnění histaminu (ng/ml)	výskyt histaminových reakcí (>10 ng/ml)
<b><i>Polysorbát 80</i></b>	115	400	8/8
<b><i>Cremophor® EL</i></b>	81	254	8/8
<b><i>Cremophor® RH40 (hydrofobní)</i></b>	90	185	8/8
<b><i>Solutol® HS 15</i></b>	60	< 10	1/8

*Zdroj: Lorenz a kol., Agents and Actions, 12, (1982)*

### ***Polysorbát 80***

- Chemický název: Polyoxyethylen-sorbitan-20-monooleát (Polysorbát 20 místo kyseliny olejové obsahuje strukturu kyseliny laurové)
- Synonymum: Tween 80
- Je neionogenní surfaktant vykazující značnou povrchovou aktivitu a relativně nízkou toxicitu, HLB 15.
- Použití: solubilizační nebo stabilizační činidlo běžně užívané ve farmaceutickém průmyslu u četných zdravotnických a farmaceutických produktů (např. vitamínových olejů, očkovacích a protinádorových látek), mastí, krémů, roztoků, také jako přísada v tabletách a velké uplatnění nalézá i v potravinářství.
- Polysorbáty a obzvláště Tween 80 je využíván dále ke zlepšení absorpce léčiv po orálním podání nebo při transdermálním neinvazivním průniku kůží.
- V současnosti se řeší závažný problém týkající se vyvolání anafylaktické reakce po podání přípravků s tímto solubilizátorem. Polysorbát 80 byl jednoznačně identifikován jako původce vážných anafylaktických reakcí neimunologického původu u pacientů.<sup>75</sup>
- Tento surfaktant slouží také k solubilizaci léčiv špatně rozpustných ve vodě. Když je surfaktant přidán do vody v koncentraci nad CMC, rozpustnost hydrofobního léčiva značně vzroste. Za účelem určení stability excipientů, takových jako je PS 80, ve formulacích léčiv je požadována rychlá chromatografická metoda. Avšak PS 80 nemá žádný silný chromofor, který by umožňoval monitorování pomocí absorpční spektrometrie. V literatuře bylo popsáno několik pokusů o kvantifikaci PS 80, některé z nich jsou založené na kolorimetrii nebo tenkovrstevné chromatografii. Pak byla vyvinuta jednoduchá a rychlá metoda pro stanovení PS 80 ve farmaceutických formulacích, která využívá vysoce účinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) s detekcí rozptylu světla (ELSD z angl. evaporative light scattering detection). Metoda je specifická pro PS 80 ve formulacích, tam kde není žádná interference léčiva ani dalšího excipientu. HPLC s UV detekcí je dnes nejběžnější analytická technika používaná k analýze surfaktantů.<sup>76</sup>
- Struktura polysorbátu 80 (součet w, x, y a z je 20), molekulová hmotnost = 1310



Obr. 20: Struktura polysorbátů

- Polysorbáty mají heterogenní strukturu, skládají se z částečně esterifikovaného polyolického cyklického éteru (odvozeného od sorbitolu modifikací OH skupin polyethylenglykolovými můstky).

### **MCT**

- Jsou to triglyceridy složené ze středně dlouhých řetězců (MCT z angl. medium chain triglycerides) s vlastnostmi napodobujícími přírodní triglyceridy.
- Chemické složení: směs triesterů glycerolu a nasycených mastných kyselin zejména kaprylové (C<sub>8</sub>) a kaprinové (C<sub>10</sub>), obsahující nejméně 95 % nasycených mastných kyselin s 8 nebo 10 uhlíkovými atomy; zbytek je tvořen triglyceridy kyselin kapronové (C<sub>6</sub>) a laurové (C<sub>12</sub>).<sup>61</sup>
- Vlastnosti: světle žlutá tekutá hmota, bez zápachu, hustota 0,95 g/cm<sup>3</sup> při 20°C<sup>77</sup>, velmi vysoká polarita, HLB 10-11.
- Řadí se mezi oleofilní rozpouštědla, MCT jsou tedy prakticky nerozpustné ve vodě, ale snadno rozpustné v organických rozpouštědlech, mísitelné s etanolem a mastnými oleji.
- MCT vykázaly netoxicitu v provedených testech akutní toxicity u několika druhů zvířat. V testech oční a dermální dráždivosti se nejevily jako potenciální alergeny, dokonce ani při delší oční a kožní expozici. MCT nevykázaly žádnou způsobilost indukovat hypersenzitivní reakci. V daných koncentracích je lze aplikovat i intramuskulárně. V testech provedených pro intravenózní aplikaci MCT u zvířecích druhů (krysa, prase) nebyl podložen žádný důkaz, že by nepříznivě ovlivňovaly reprodukivitu nebo byly toxické v těhotenství. Ani mutagenní toxicita a teratogenita nebyly odhaleny.<sup>78</sup>

- Směs kapalných nasycených triacylglycerolů se vyrábí z oleje, který se získává z tuhého a sušeného podílu endospermu *Cocos nucifera* L. anebo z oleje, který se extrahuje ze sušeného endospermu *Elaeis guineensis* JACQ.
- Použití: primárně se používají jako emulgátory ve farmaceutických přípravcích a kosmetice, jsou běžně užívané pro parenterální výživu u jedinců vyžadujících náhradní nutriční, také hojně využívané v potravinářském průmyslu.
- Jsou známé pod obchodním názvem Miglyol<sup>®</sup> 812.

### ***Abil Care 85***<sup>77</sup>

- Chemické složení: silikonový polyéter (Bis-PEG/PPG-16/16 PEG/PPG16/16 Dimetikon) s přídavkem (10-25 %) triglyceridů kyseliny kaprylové (C<sub>8</sub>) a kaprinové (C<sub>10</sub>).
- Neionogenní emulgátor použitelný pro emulze typu o/v.
- Vlastnosti: bezbarvá nebo jen slabě nažloutlá kapalina, bez zápachu, ve vodě nerozpustná. Její HLB hodnota se pohybuje okolo 10, hustota 0,98-1,01 g/cm<sup>3</sup> při 25°C. Formulace s Abil Carem 85 se vyznačují širokou tepelnou stabilitou v rozmezí teplot od -15°C až do +45°C.
- Použití: v kosmetice v emulzích, krémech a roztocích (Abil Care je užíván v těchto přípravcích obvykle v koncentraci 1,5-3 %).

### ***Polyglyceryl-3-oleát***<sup>77</sup>

- Obchodní název: ISOLAN<sup>®</sup> GO 33
- Chemické složení: lipofilní ester olejové kyseliny a polyglycerolu. Jeho molekulová struktura je podobná přírodním lipidům.
- Vlastnosti: kapalina žluté barvy, se slabým charakteristickým zápachem, ve vodě nerozpustná, HLB hodnota 5, hustota 0,9 g/cm<sup>3</sup> při 20°C. Formulace s ISOLAN<sup>®</sup> GO 33 jsou dobře teplotně stabilní.
- Použití: emulgátor vhodný pro v/o krémy (užívaný obvykle v koncentracích 2,5-4,0 %), také v potravinářství.

### ***PEG-7-glycerylcocoát***<sup>77</sup>

- Obchodní název: TEGOSOFT<sup>®</sup> GC

- Chemické složení: estery polyolické mastné kyseliny rozpustné ve vodných roztocích surfaktantů
- Vlastnosti: bezbarvá nebo slabě nažloutlá kapalina se slabým charakteristickým zápachem, HLB hodnoty 10,6, ve vodě rozpustná (tvoří slabě zakalený roztok), biodegradabilní, hustota 1,06 g/cm<sup>3</sup> při 20°C. Solubilizuje oleje a lipofilní látky (např. mentol, salicylovou kyselinu a její deriváty, kafr).
- Použití: v kosmetice hydrofilní změkčující prostředek v šamponech a koupelových přípravcích (užívaný v koncentracích 2-7 %).

#### ***Oktylpalmitát (OP)***<sup>77</sup>

- Obchodní název: TEGOSOFT<sup>®</sup> OP
- Synonymum: ethylhexylpalmitát
- Chemické složení: 2-ethylhexyl ester hexadekanové kyseliny
- Vlastnosti: nažloutlá kapalina slabého charakteristického zápachu, ve vodě nerozpustná, hustota 0,86 g/cm<sup>3</sup> při 20°C, středně polární. Univerzální zvláčňující ester s nízkou okluzivitou, dobrý solubilizátor.
- Použití: v kosmetice jako středně viskózní ester s dobrými roztíratelnými vlastnostmi, vhodný pro všechny typy krémů, roztoky a oleje.

#### ***Diethylhexylkarbonát (DEHK)***<sup>77</sup>

- Obchodní název: TEGOSOFT<sup>®</sup> DEC
- Chemické složení: bis(2-ethylhexyl)karbonát (vznik konverzí diethylkarbonátu a ethylhexanoátu)
- Vlastnosti: bezbarvá kapalina se slabým charakteristickým zápachem, hustota 0,9 g/cm<sup>3</sup> při 20°C, středně polární, ve vodě nerozpustná, rozpustná v ethanolu. Má velmi nízkou viskozitu, snadno emulguje v emulzích typu o/v a v/o.
- Použití: zlepšuje roztíratelnost emulzí typu o/v i v/o, v produktech užíván v max. koncentraci 15 %. V kosmetice jako olej pro emulze, zvláčňující přípravek ve sprejích, pěnách, krémech a roztocích.

### ***Ethylhexyloktanoát (EHO)***<sup>79</sup>

- Obchodní název: SAMODERM<sup>®</sup> OO
- Chemické složení: 2-ethylhexyl-2-ethylhexanoát
- Vlastnosti: tekutá látka, hustota 0,86 g/cm<sup>3</sup> při 20°C, špatně rozpustná ve vodě, rozpustná v nepolárních rozpouštědlech.
- Použití: v kosmetice

### ***Decyloleát (DO)***<sup>77</sup>

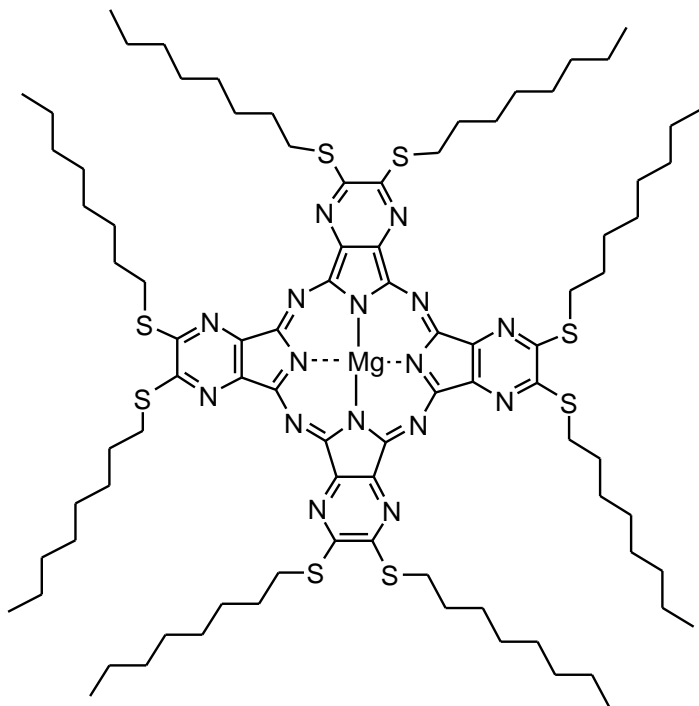
- Obchodní název: TEGOSOFT<sup>®</sup> DO
- Chemické složení: směs obsahující decylestery mastných kyselin, převážně olejové.<sup>61</sup> Po chemické stránce podobný esterům přírodních vosků a přirozeným kožním lipidům.
- Vlastnosti: nažloutlá kapalina slabého typického zápachu, hustota 0,86 g/cm<sup>3</sup> při 20°C, vysoce polární, ve vodě však nerozpustná.
- Použití: rozpouštědlo lipofilních součástí, jako lipofilní olej užíván v kosmetice v krémech, roztocích a tělových olejích.

### ***C12-C15 alkylbenzoát (C12-C15 AB)***<sup>77</sup>

- Obchodní název: TEGOSOFT<sup>®</sup> TN
- Chemické složení: ester benzoové kyseliny a mastného alkoholu s 12-15 uhlíkatým řetězcem
- Vlastnosti: kapalina, nízká viskozita, hustota 0,92 g/cm<sup>3</sup> při 25°C, vysoce polární, ve vodě nerozpustná.
- Použití: dispergující činidlo pigmentů a bentonitů, užíván v kosmetice v krémech, roztocích a olejích, šamponech a dekorativní kosmetice. Změkčující ester, který lehce rozpouští lipofilní součásti.

## 2.4. FTALOCYANINY

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



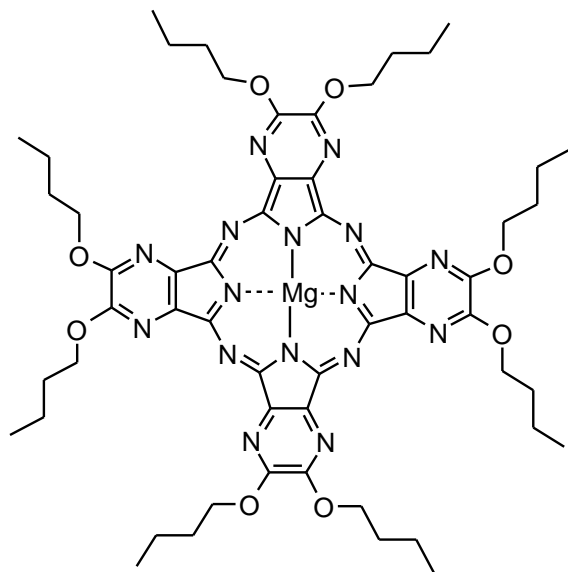
Obr. 21: Struktura barviva ZIP-T-44Mg

- Kód\*: **ZIP-T-44Mg**
- Molekulová hmotnost = 1699
- Molekulový vzorec:  $C_{88}H_{136}MgN_{16}S_8$
- Molekulové složení: C (62,21 %), H (8,07 %), Mg (1,43 %), N (13,19 %), S (15,10 %)

(\*...kód, pod kterým bude ftalocyanin dále v textu označován)



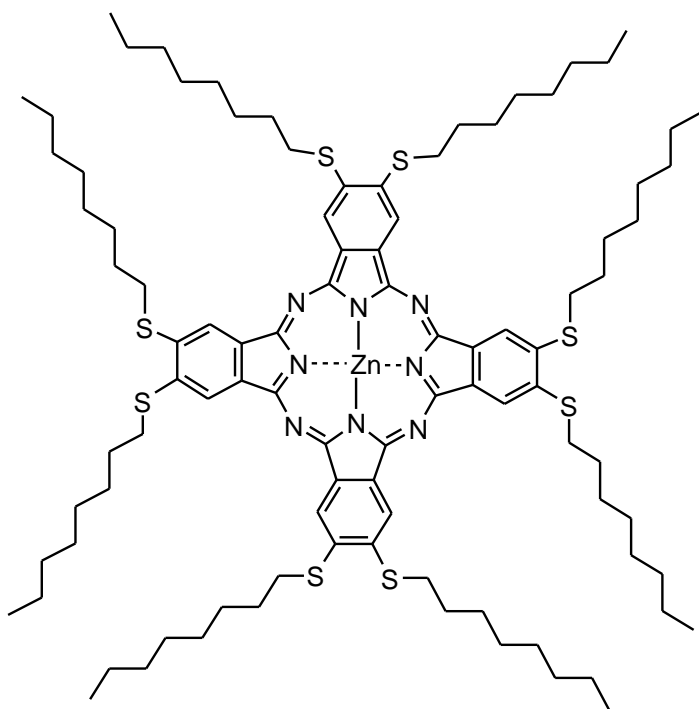
**2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(butoxy)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazafталocyaninato  
hořečnatý komplex**



Obr. 22: Struktura barviva ZIP-T-37Mg

- Kód: **ZIP-T-37Mg**
- Molekulová hmotnost = 1121,61
- Molekulový vzorec: C<sub>56</sub> H<sub>72</sub> Mg N<sub>16</sub> O<sub>8</sub>
- Molekulové složení: C (59,97 %), H (6,47 %), Mg (2,17 %), N (19,98 %), O (11,41 %)

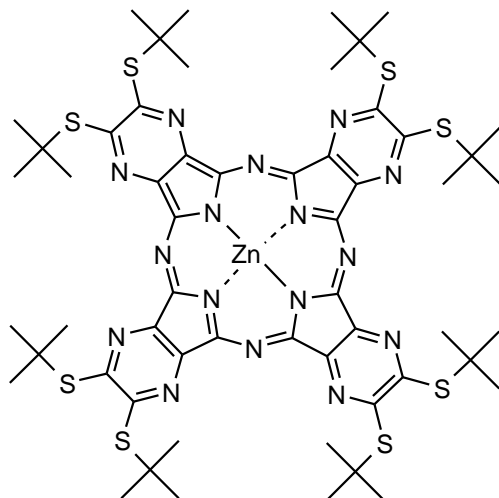
**2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(oktylsulfanyl)ftalocyaninato zinečnatý komplex**



Obr. 23: Struktura barviva 123Zn

- Kód: **123Zn**
- Molekulová hmotnost = 1732,15
- Molekulový vzorec:  $C_{96} H_{144} N_8 S_8 Zn$
- Molekulové složení: C (66,57 %), H (8,38 %), N (6,47 %), S (14,81 %), Zn (3,77 %)

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



Obr. 24: Struktura barviva ZIP-T-21Zn

- Kód: **ZIP-T-21Zn**
- Molekulová hmotnost = 1291,19
- Molekulový vzorec: C<sub>56</sub> H<sub>72</sub> N<sub>16</sub> S<sub>8</sub> Zn
- Molekulové složení: C (52,09 %), H (5,62 %), N (17,36 %), S (19,87 %), Zn (5,06 %)

## 2.5. METODIKY

### Test na fototoxicitu

Na testy fototoxicity se používají buňky 3T3 Balb/c - myší fibroblasty, které jsou doporučené v testu fototoxicity dle směrnice EU<sup>80</sup> i OECD<sup>81</sup>.

### Test na cytotoxicitu

Zkoušky cytotoxicity byly provedeny dle ČSN EN ISO 10993-5: 2005 - Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu in vitro. Zkoušky byly provedeny ve zkušební laboratoři Centra zdraví a životních podmínek akreditované ČIA č. 1206.3.

Buněčná linie: myší fibroblasty - linie Balb/c 3T3

Kultivační medium: DMEM s obsahem antibiotik (PNC 100 IU/ml, STM 100 µg/ml) s 10 % inaktivovaného telecího séra

Pozitivní kontrola: laurylsulfát sodný

Negativní kontrola: DMEM bez séra

#### Postup:

Po 24 hod. prekultivaci byla buněčná kultura exponována testovaným vzorkům v různé koncentraci DMEM bez séra po dobu 24 hod. (37°C, 7,5 % CO<sub>2</sub>). Následně byla stanovena životnost buněčné kultury na základě inkorporace vitálního barviva (neutrální červeně) fluorimetrickou metodou a pozorována životnost kultury ovlivněné testovaným vzorkem s životností negativní kontroly.

*Tab. 4: Stupeň cytotoxicity vzorku*

<b>životnost (ž)</b>	<b>hodnocení vzorku</b>
$\text{ž} \geq 80 \%$	necytotoxický
$80 \% < \text{ž} \geq 60 \%$	slabě cytotoxický
$60 \% < \text{ž} \geq 40 \%$	středně cytotoxický
$\text{ž} < 40 \%$	silně cytotoxický

### **3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

Experimentální část diplomové práce lze rozvrhnout do následujícího schématu:

Nejprve jsem připravovala pouze vodné soustavy solubilizátorů s vybranými barvivy. Pracovala jsem však s příliš lipofilními ftalocyaniny, které se přidavkem solubilizátoru do vodného roztoku nepodařilo dostatečně solubilizovat.

Poté jsem zvolila jiný postup příprav. Nejdříve jsem se pokoušela rozpustit barvivo v příslušném lipidu a sledovala, ve kterém konkrétním lipidu a v jaké koncentraci se podaří barvivo rozpustit tak, aby vytvořilo stabilní roztok, aniž by se barvivo ze soustavy agregovalo. Také samotné lipidy bylo třeba jednotlivě solubilizovat či emulgovat ve vodném prostředí. V následujícím kroku jsem spojila předešlé postupy a pokusila se solubilizovat lipidy s rozpuštěným barvivem.

Kapitola 3.1. zahrnuje postupy příprav všech zásobních roztoků barviv, se kterými jsem v pokusech pracovala. V následujících kapitolách pak vždy při práci s konkrétními roztoky barviv nalezneme pouze odkaz na její postup přípravy.

Koncentrace roztoků u následujících příprav jsou často vyjadřovány v %. Jde o procenta hmotnostní (% m/m) udávající počet gramů látky ve 100 g konečného produktu. Pro jednotnost jsem koncentraci barviva v připravených roztocích převedla na vyjádření v molární koncentraci.

### **3.1. PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ BARVIV**

#### ***3.1.1. Příprava zásobního roztoku barviva ZIP-T-44Mg v THF***

Zásobní roztok jsem připravila o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$ . Vypočítané množství navážky (0,998 mg) barviva jsem odvážila do zvlášť připravené čisté vysušené skleněné baňky. Barvivo jsem rozpustila v 11,7 ml v tetrahydrofuranu (THF). Baňku jsem poté ihned uzavřela, aby se zabránilo vytěkání THF a důkladným protřepáváním jsem barvivo v THF rozpustila.

Hodnocení: značně lipofilní barvivo ZIP-T-44Mg je dobře rozpustné v THF.

#### ***3.1.2. Příprava zásobního roztoku barviva ZIP-T-44Mg v THF***

Připravila jsem zásobní roztok o koncentraci přibližně 500  $\mu\text{mol/l}$ , navážku barviva 8,382 mg jsem odvážila do čisté suché baňky a rozpustila důkladným protřepáváním v 9,8 ml THF a baňku zazátkovala.

#### ***3.1.3. Příprava zásobního roztoku barviva ZIP-T-37Mg v THF***

Připravila jsem 10 ml zásobního roztoku barviva o koncentraci přibližně 100  $\mu\text{mol/l}$ . Navážku barviva 1,12 mg jsem rozpustila v 10 ml THF, ale pro její úplné rozpuštění bylo třeba vložit baňku na 15 min do ultrazvuku.

#### ***3.1.4. Příprava roztoku barviva ZIP-T-44Mg v MCT***

Cílem bylo vyzkoušet, zda bude možné lipofilní barvivo ZIP-T-44Mg ve zvolených koncentracích rozpustit v MCT.

- a) Připravila jsem si 3 ml zásobního roztoku barviva o koncentraci asi 1180  $\mu\text{mol/l}$ . Do baňky jsem odvážila 6 mg barviva, rozpustila jej protřepáváním v dostatečném objemu (několik ml) chloroformu, přidala 3 ml MCT, řádně protřepala a chloroform nechala následně odpařit na vakuové odparce zahřívané na teplotu 35-40°C.

Hodnocení: krátce po přípravě roztoku začalo barvivo částečně agregovat ze soustavy pravděpodobně proto, že zvolená koncentrace barviva byla příliš vysoká a barvivo se nepodařilo zcela v MCT rozpustit.

- b) Stejným postupem jako u předešlého bodu a) jsem připravila roztok barviva o čtvrtinové koncentraci (přibližně 290  $\mu\text{mol/l}$ ). Navážku 2 mg barviva jsem rozpustila v chloroformu, přidala 4 ml MCT a pak chloroform nechala odpařit na vakuové odparce.

Hodnocení: ihned po přípravě došlo k částečné precipitaci barviva z roztoku a tedy ani čtvrtinovou koncentraci barviva ZIP-T-44Mg se nepodařilo zcela úspěšně rozpustit v MCT. Z převážné části však zůstalo barvivo v roztoku rozpuštěno, proto jsem zásobní roztok po přefiltrování použila k dalším přípravám.

### **3.1.5. Příprava roztoku barviva ZIP-T-37Mg v MCT**

Připravila jsem roztok barviva o koncentraci přibližně 450  $\mu\text{mol/l}$ . Navážku barviva 2 mg jsem třepáním v baňce rozpustila v malém množství chloroformu, poté jsem do baňky přidala 4 ml MCT, důkladně protřepala a chloroform nechala následně odpařit na vakuové odparce zahřívané na teplotu 35-40°C.

Hodnocení: po přípravě se barvivo z roztoku neagregovalo, zůstalo rozpuštěno v MCT dokonce i po 3 měsících od přípravy. Barvivo ve zvolené koncentraci se podařilo v MCT rozpustit a roztok byl použitelný pro další pokusy.

### **3.1.6. Příprava roztoku barviva $^{123}\text{Zn}$ v DMSO**

Připravila jsem zásobní roztok barviva  $^{123}\text{Zn}$  o koncentraci přibližně 1160  $\mu\text{mol/l}$ . Odvážila jsem do baňky 6 mg barviva, rozpustila jej v malém množství chloroformu, přidala jsem 3 ml DMSO, důkladně protřepala a chloroform nechala odpařit na vakuové odparce zahřívané na teplotu 35-40°C.

Hodnocení: barvivo se krátce po přípravě roztoku agregovalo a jeho částičky ulpívaly na stěnách baňky. Barvivo se nepodařilo v DMSO rozpustit.

### **3.1.7. Příprava roztoku barviva $^{123}\text{Zn}$ v MCT**

Barvivo jsem se dále pokusila rozpustit v polárních lipidech (MCT). Zásobní roztok barviva jsem připravila o koncentraci přibližně 1160  $\mu\text{mol/l}$ . Navážku barviva 6 mg jsem rozpustila v chloroformu, přidala 3 ml MCT a pak chloroform nechala odpařit na vakuové odparce zahřívané na teplotu 35-40°C.

Hodnocení: barvivo se jen nepatrně vysráželo z roztoku, většina barviva zůstala v roztoku rozpuštěna, proto byl roztok přefiltrován a použit k dalším přípravám.

### **3.1.8. Příprava zásobního roztoku barviva ZIP-T-37Mg v THF**

Připravila jsem si 10 ml zásobního roztoku barviva ZIP-T-37Mg o koncentraci přibližně 210  $\mu\text{mol/l}$  v THF. Navážila jsem do baňky 2,3 mg barviva, rozpustila jej v 10 ml THF důkladným protřepáváním a baňku zazátkovala.

### **3.1.9. Příprava zásobního roztoku barviva 123Zn v MCT**

Připravila jsem si 3 ml zásobního roztoku barviva o koncentraci 2000  $\mu\text{mol/l}$ . Potřebné množství navážky (10,4 mg) jsem odvážila do baňky, rozpustila v dostatečném objemu THF a přidala 3 ml MCT. Všechny složky jsem dobře protřepala a pak nechala odpařit THF na vakuové odparce.

Hodnocení: Barvivo se pomocí MCT podařilo dobře rozpustit, roztok zůstal neagregovaný i po 3 měsících od přípravy.

### **3.1.10. Příprava zásobních roztoků barviva ZIP-T-37Mg v C12-C15 AB; DO**

Připravila jsem dva zásobní roztoky barviva ZIP-T-37Mg o koncentraci přibližně 2000  $\mu\text{mol/l}$  ve dvou zvolených esterech: C12-C15 alkylbenzoátu a decyloléátu. Postupy příprav obou zásobních roztoků se nelišily a vzhledem k tomu, že šlo o zásobní roztoky stejné koncentrace s totožným barvivem, také navážky i objemy u příprav se shodovaly. Navážku barviva (11,2 mg) jsem rozpustila v baňce v dostatečném objemu THF a roztok protřepávala až do rozpuštění barviva. Pak jsem do baňky přidala 5 ml příslušného esteru (C12-C15 AB nebo DO), důkladně protřepala a nechala THF odpařit na vakuové odparce zahříváné na teplotu 35-40°C.

Hodnocení: barvivo se nepodařilo ani v jednom ze zvolených esterů dostatečně rozpustit, pevné částičky barviva se v obou případech vysrážely na hladině a stěnách baňky.

### **3.1.11. Příprava zásobních roztoků barviva ZIP-T-37Mg v OP; DEHK; EHO**

Připravila jsem tři zásobní roztoky barviva ZIP-T-37Mg o koncentraci přibližně 2000  $\mu\text{mol/l}$  ve třech rozdílných esterech: oktylpalmitátu, diethylhexylkarbonátu, ethylhexyloktanoátu. Opět se jednalo o přípravu zásobních roztoků, v nichž je barvivo vždy obsaženo ve stejné koncentraci, tedy navážky i postupy příprav byly stejné. Barvivo (6,7 mg) jsem odvážila do skleněné baňky, rozpustila jej v potřebném objemu THF, přidala 3 ml příslušného esteru (OP, DEHK nebo EHO) a důkladně protřepávala. Následně jsem nechala THF odpařit na vakuové odparce při teplotě 35-40°C.

Hodnocení: barvivo ve všech zásobních roztocích asi po týdnu sedimentovalo na dně baňky, pravděpodobně z důvodu jeho vysoké koncentrace obsažené v roztoku. Proto byl každý roztok naředěn na poloviční koncentraci (1000  $\mu\text{mol/l}$ ) dále popsaným způsobem. K původnímu zásobnímu roztoku jsem přidala potřebný objem THF, v němž



se sedimentované částičky barviva rozpustily. Pak jsem přidala do baňky 3 ml příslušného esteru (OP, DEHK nebo EHO) a THF jsem nechala odpařit na vakuové odparce.

V nižší koncentraci barviva v zásobním roztoku již barvivo nesedimentovalo, proto jsem pro další pokusy připravila nové zásobní roztoky již o 1000  $\mu\text{mol/l}$  koncentrací barviva ZIP-T-37Mg s příslušnými estery v celkovém objemu zásobního roztoku 3 ml. Postup se až na rozdílnost navážky barviva, která nyní činila 3,3 mg, shodoval s postupem již výše popsáním.

### **3.1.12. Příprava zásobních roztoků barviva ZIP-T-21Zn v MCT; DO, C12-C15 AB**

Připravila jsem tři zásobní roztoky barviva ZIP-T-21Zn o koncentraci přibližně 2000  $\mu\text{mol/l}$  v třech rozdílných lipidech: MCT, decyloléátu a C12-C15 alkylbenzoátu. Přípravy všech těchto zásobních roztoků lze popsat následujícím obecným postupem. Navážku barviva ZIP-T-21Zn (6,7 mg) jsem v baňce rozpustila v potřebném objemu THF, přidala 2,6 ml příslušného lipidu, dobře protřepala a THF následně odpařila na vakuové odparce při teplotě 35-40°C.

Hodnocení: stejně jako u předešlé přípravy zásobních roztoků došlo k sedimentaci barviva na dně baňky, pravděpodobně opět z důvodu vysoké koncentrace barviva v roztoku. Proto jsem i v tomto případě naředila zásobní roztok na poloviční koncentraci barviva (1000  $\mu\text{mol/l}$ ) postupem totožným u předchozího bodu (3.1.11.).

V poloviční koncentraci barviva v zásobním roztoku již barvivo nesedimentovalo, proto jsem pro další pokusy připravila nové zásobní roztoky již o 1000  $\mu\text{mol/l}$  koncentrací barviva ZIP-T-21Zn s příslušnými lipidy v celkovém objemu roztoku 3 ml (navážka barviva nyní činila 3,9 mg).

## 3.2. SOLUTOL<sup>®</sup> HS 15 – VODNÉ SOUSTAVY

### 3.2.1. Vzorky disperzí solubilizátoru Solutol<sup>®</sup> HS 15 s klesající koncentrací

Připravila jsem si nejprve dostatečné množství 10% zásobního roztoku Solutolu<sup>®</sup> HS 15 ve fosfátovém pufru a pak jsem jeho postupným ředěním získala řadu vzorků s klesající koncentrací solubilizátoru (5 %, 1 %, 0,1 %) vždy o výsledném objemu 5 ml. K vzorkům Sol 5, Sol 6 a Sol 7 jsem po vychladnutí přidala vypočítaný objem THF ( $\rho = 0,89 \text{ kg/dm}^3$ ), aby v konečném objemu vzorku činil požadovanou koncentraci 1 %, 0,5 % a 0,1 %. THF byl používán jako rozpouštědlo některých barviv, proto bylo nutné zjistit, jaká jeho koncentrace je již pro buňky toxická. Následně byly vzorky Sol 1 až Sol 7 podrobeny testu cytotoxicity.

#### Postup přípravy zásobního roztoku Solutolu:

Do vyčištěné vysušené a vytárované baňky jsem navážila potřebné množství Solutolu, aby jeho výsledná koncentrace v roztoku byla 10 %. Do baňky jsem přidala magnetické míchadlo, zazátkovala ji a připevnila držákem tak, aby její spodní část byla (asi tak z 1/2) ponořena do připravené vodní lázně vytemperované na teplotu 60-65°C. Vodní lázeň byla umístěna na vyhřívání magnetické míchače. Pufr jsem vytemperovala na teplotu vodní lázně a postupně ho po ml přidávala ke směsi v baňce. Zpočátku začala směs v důsledku hydratace houstnout až dosáhla maxima asi při polovině přidaného objemu pufru. Viskozita pak začala klesat přidáváním dalšího pufru až do konečného objemu zásobního roztoku. Jestliže je první polovina pufru přidána příliš rychle, může se roztok zakalit.

Tab. 5: Vzorky pro test cytotoxicity Solutolu HS 15

Solutol <sup>®</sup> HS 15	
číslo vzorku	koncentrace
Sol 1	10%
Sol 2	5%
Sol 3	1%
Sol 4	0,1%
Sol 5	1% + 1% THF
Sol 6	1% + 0,5% THF
Sol 7	1% + 0,1% THF

Tab. 6: Výsledky testu cytotoxicity Solutolu HS 15 (+ THF)

vzorek	c <sub>1</sub> = 10%	c <sub>2</sub> = 5%	c <sub>3</sub> = 1%
Sol 1	+ cr	+ cr	+
Sol 2	+ cr	+ cr	+
Sol 3	+	+	*
Sol 4	*	*	*
Sol 5	+	+	*
Sol 6	+	+	*
Sol 7	+	+	*

Legenda:

+ toxický vzorek

\* netoxický vzorek

cr krystalky

c<sub>1</sub>, c<sub>2</sub>, c<sub>3</sub> koncentrace, na které byl naředěn původní vzorek

Vzorky podrobené testu cytotoxicity byly testovány na buněčné linii HeLa (v mediu RPMI, 10% FCS). Původní koncentrace vzorků Sol 1 - Sol 7 byly považovány za 100% a pro účely testování byly nejdříve postupně naředěny na 10% (koncentrace označená v tabulce jako c<sub>1</sub>), 5% (c<sub>2</sub>) a 1% (c<sub>3</sub>).

Hodnocení:

V provedených testech na cytotoxicitu byla zjištěna hodnota nejvyšší netoxické koncentrace solubilizátoru 0,01% Solutolu<sup>®</sup> HS 15 ve vodné disperzi. Testu byly podrobeny i vzorky, které kromě solubilizátoru navíc obsahovaly THF v různých koncentracích. Jako první netoxický se ukázal vzorek Sol 5 až po naředění na 100krát nižší koncentraci než byla původní koncentrace vzorku. Nejvyšší netoxické koncentrace obou složek tedy reprezentují hodnoty 0,01% Solutolu<sup>®</sup> HS 15 a 0,01% THF ve vodné disperzi.

**3.2.2. 25% Solutol se ZIP-T-44Mg o koncentraci 0,1 µmol/l**

Jedná se o vodnou soustavu Solutolu<sup>®</sup> HS 15 pouze se samotným barvivem. Bylo požadováno, aby v konečném objemu výsledné soustavy (5 ml) měl Solutol koncentraci 25 % a barvivo ZIP-T-44Mg koncentraci 0,1 µmol/l.

### Postup přípravy:

Do baňky jsem navázila 1,25 g Solutolu, přidala magnetické míchadlo, baňku zazátkovala a ponořila z poloviny do připravené vodní lázně vytemperované na teplotu 60-65°C. Vodní lázeň byla umístěna na vyhřívané magnetické míchačce. Potom co Solutol v baňce rozehrátím ztekutěl, jsem pipetou odebrala 10  $\mu$ l z předem připraveného zásobního roztoku barviva ZIP-T-44Mg v THF o koncentraci barviva 50  $\mu$ mol/l (příprava viz. kapitola 3.1.1.) přidala do baňky k rozehrátému solubilizátoru a pak nechala několik minut promíchávat. Pak jsem postupně do baňky přidávala fosfátový pufr (vytemperovaný též na teplotu 60-65°C). První polovinu objemu pufru je třeba přidávat pomalu po částech, přesto se na začátku ještě při vyšších koncentracích solubilizátoru stávalo, že po přidání malého podílu objemu pufru ihned „ztuhla“ a teprve po několika dalších přidávaných ml se jí podařilo magnetickým míchadlem rozmělnit a zhomogenizovat. Druhou polovinu pufru lze již přidávat do baňky rychleji. Směs je třeba nechat vždy po přidání veškerého objemu pufru dostatečně dlouho promíchávat (alespoň 5 minut), aby se vzniklá soustava dobře zhomogenizovala. Po každém kroku přidávání složek soustavy je nutné opět baňku rychle zazátkovat, aby se předešlo vytékání THF, v němž je rozpuštěno barvivo.

### Hodnocení:

Při přípravě za stálého promíchávání směsi magnetickým míchadlem jsem nepozorovala, že by se barvivo vydělovalo z disperze. Avšak po dokončení přípravy, když jsem nechala soustavu za laboratorní teploty v klidu stát, se po několika minutách začalo barvivo z disperze agregovat a ulpívat na stěnách baňky a hladině disperze.

Výše popsáním způsobem se nepodařilo barvivo ve zvolené koncentraci Solutolu dostatečně solubilizovat. Pravděpodobným důvodem agregace barviva mohlo být rychlé vytékání THF při přípravě v temperované vodní lázni na 60-65°C.

### **3.2.3. 1% Solutol se ZIP-T-44Mg o koncentraci 100 $\mu$ mol/l**

Po předešlém nezdařeném pokusu byl navržen jiný postup přípravy. Pracovala jsem již s nižší koncentrací solubilizátoru (1 %) a naopak s vyšší koncentrací barviva v soustavě (100  $\mu$ mol/l). Opět jsem si připravila zásobní roztok barviva rozpuštěného v THF, tentokrát o koncentraci 500  $\mu$ mol/l (příprava viz. 3.1.2.).

#### Postup přípravy:

Do baňky jsem navázila 0,2 g Solutolu, mírně jsem solubilizátor zahřála na vodní lázni tak, aby byla jeho konzistence jen mírně tekutá. Poté jsem k solubilizátoru v baňce již mimo vodní lázeň přidala 4 ml zásobního roztoku barviva ZIP-T-44Mg (500  $\mu\text{mol/l}$ ) a dobře protřepávala. Pak jsem nechala z baňky na vakuové odparce při teplotě asi 30°C odpařit THF. Po jeho odpaření jsem umístila baňku na vodní lázeň (60-65°C) na magnetickou míchačku a za stálého promíchávání magnetickým míchadlem přidávala nejprve po kapkách, pak již po větších podílech pufr (vytemperovaný také na teplotu vodní lázně) až do výsledného objemu soustavy 20 ml. Po doplnění pufru na příslušný objem soustavy se po pár minutách stání za laboratorní teploty začalo barvivo srážet na stěnách baňky.

#### Hodnocení:

Vzorky měly být proměřovány na UV-VIS spektrofotometru, ale vzhledem k vysrážení barviva ze soustavy se měření neprovádělo. Barvivo ZIP-T-44Mg je pravděpodobně příliš lipofilní na to, aby se ve zvolené koncentraci solubilizátoru v roztoku rozpustilo. To bylo zřejmě hlavní příčinou agregace barviva.

#### **3.2.4. 1% Solutol se ZIP-T-37Mg o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$**

Pro přípravu jsme zvolili méně lipofilní barvivo ZIP-T-37Mg. Připravila jsem si 10 ml zásobního roztoku barviva o koncentraci 100  $\mu\text{mol/l}$  v THF (příprava viz. 3.1.3.). Se soustavou jsem provedla dva odlišné postupy přípravy:

##### Postup přípravy č. 1:

Do baňky jsem navázila 0,2 g Solutolu, přidala magnetické míchadlo a temperovala solubilizátor na vodní lázni k teplotě 65°C umístěné na magnetické míchačce. Poté jsem k solubilizátoru za stálého promíchávání přidávala po kapkách opatrně 1 ml zásobního roztoku barviva (100  $\mu\text{mol/l}$ ) a ponechala ještě asi 30 min homogenizovat. Během této doby došlo ke změně zbarvení soustavy ze světle modro-zelené na tmavší zelenou. Pak jsem začala postupně ke směsi přikapávat vytemperovaný pufr, ale již při přidání 0,1 ml se barvivo vysráželo a ani po dalších přidávaných ml vodné fáze (až do konečného objemu roztoku 20 ml) za intenzivního promíchávání se stav nezlepšil. Po vychladnutí a delším stání částičky agregovaného barviva zcela pokryly hladinu připravené disperze.

#### Hodnocení k postupu č.1:

Během 30 min homogenizace došlo ke změně zbarvení soustavy ze světle modrozelené na tmavší zelenou, což bylo zřejmě způsobeno vyprcháváním THF. Barvivo se ihned po přidání malého podílu pufru vyagregovalo a nepodařilo se jej dále solubilizovat.

#### Postup přípravy č. 2:

Nejprve jsem odvážíla 0,2 g Solutolu, umístila baňku na vodní lázeň na vyhřívanou magnetickou míchačku a po vytemperování na 65°C jsem postupně po částech přidávala 19 ml na stejnou teplotu ohřátého pufru. Pak následovalo pomalé přikapávání 1 ml zásobního roztoku barviva (100  $\mu\text{mol/l}$ ) a soustavu jsem nechala ještě pár minut důkladně promíchávat. Po skončení přípravy a několika minutách stání za laboratorní teploty se však začalo barvivo z disperze agregovat a usazovat na povrchu stěn baňky.

#### Hodnocení k postupu č. 2:

Barvivo se po přípravě vzorku vysráželo a soustava po vychladnutí vykazovala při pozorování pod UV lampou jen velmi slabou fluorescenci.

### **3.2.5. 20% Solutol se ZIP-T-37Mg o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$**

#### Postup přípravy:

Připravila jsem si 12 ml 20% zásobního roztoku Solutolu v pufru (navážku Solutolu 2,4 g jsem na vodní lázni rozmíchávala v 9,6 ml ohřátého pufru (60°C), který jsem přidávala do baňky k temperovanému solubilizátoru na 60-65°C po menších podílech). Z připraveného zásobního roztoku Solutolu jsem odebrala 5 ml a přidala 0,25 ml zásobního roztoku barviva ZIP-T-37Mg o koncentraci 100  $\mu\text{mol/l}$  (příprava viz. 3.1.3.) a důkladně protřepala.

#### Hodnocení:

Barvivo se ze soustavy při jejím chladnutí částečně vyagregovalo.

### **3.3. SOLUTOL<sup>®</sup> HS 15 – SOUSTAVY S MCT**

#### **3.3.1. 5%; 2,5% Solutol s 5 % MCT**

##### Postup přípravy:

Přípravu jsem prováděla na vodní lázni (60-65°C). Do vysušené a vytárované baňky jsem si odvážíla vypočítané množství Solutolu (1 g u 5% roztoku; 0,5 g u 2,5% roztoku) a dala vytemperovat na vodní lázeň. Pak jsem do baňky dovážila 1 g MCT také vytemperovaného na teplotu vodní lázně, přidala magnetické míchadlo a baňku umístila opět na vodní lázeň. Postupně jsem do baňky přikapávala ohřátou destilovanou vodu až do výsledného objemu 20 ml. První polovinu podílu vody je třeba přidávat opatrně, přesto soustava po pár kapkách vodné fáze zvýší viskozitu (zgelovátí), ale postupným přidáváním vody opět viskozita klesá. Díky neustálému promíchávání magnetickým míchadlem je Solutol v konečném objemu 20 ml dobře emulgován a žádné gelovité části v něm nezůstanou a vznikne mléčně zbarvená emulze.

Pro lepší zpracování soustavy jsem později zvolila přípravu v nerezové třence s těrkou namísto skleněné baňky. V třence bylo možné lépe rozetřít vzniklé gelovité hrudky, které se vytvořily vždy, když se začala k rozehrátému solubilizátoru smíchanému s MCT přidávat po kapkách vodná fáze. Nevýhodou však při práci s třenkou bylo to, že se s ní hůře manipulovalo na vodní lázni a při teplotě 60-65°C se více odpařovala přidávaná destilovaná voda než při práci se zazátkovanou skleněnou baňkou.

##### Hodnocení:

Zkusila jsem dvě různé možnosti přípravy solubilizace triglyceridů (MCT) v destilované vodě. Pro lepší zpracování soustavy je vhodnější příprava v nerezové třence s těrkou, ve které jdou jednodušeji rozetřít gelovité částice tvořící se při přípravě. MCT obsažené v soustavě v 5 % se podařilo úspěšně solubilizovat v disperzi přídatkem Solutolu o obou zvolených koncentracích (5 % a 2,5 %).

#### **3.3.2. 5% Solutol, 5% MCT s různými barvivy**

U vzorků (S7, S8, S9) se jednalo o soustavu, která obsahovala 5 % Solutolu a barvivo rozpuštěné v MCT. MCT měly vždy v konečném objemu soustavy

koncentraci 5 %. Obsah barviva v konečném objemu soustavy se lišil vzhledem k tomu, že barviva byla připravena již v rozdílných koncentracích svých zásobních roztoků.

Postupy příprav roztoků barviv v MCT jsou popsány v kapitole 3.1. (zásobní roztok barviva  $^{123}\text{Zn}$  v MCT o koncentraci  $1160 \mu\text{mol/l}$  (příprava viz. 3.1.7.), roztok barviva ZIP-T-44Mg v MCT o koncentraci  $290 \mu\text{mol/l}$  (příprava viz. 3.1.4. b)) a roztok barviva ZIP-T-37Mg v MCT o koncentraci  $450 \mu\text{mol/l}$  (příprava viz. 3.1.5.).

Tab. 7: Vzorky Solutol HS 15 + MCT + barvivo

vzorek	Solutol® HS 15 % (m/m)	MCT % (m/m)	barvivo (přibližná výsledná konc. v soustavě)	hodnocení
S7	5	5	<b><math>^{123}\text{Zn}</math></b> ( $60 \mu\text{mol/l}$ )	+
S8	5	5	<b>ZIP-T-44Mg</b> ( $15 \mu\text{mol/l}$ )	-
S9	5	5	<b>ZIP-T-37Mg</b> ( $22 \mu\text{mol/l}$ )	-

Legenda

- + barvivo ze soustavy neagregovalo
- barvivo agregovalo ze soustavy na hladinu roztoku

Postup přípravy:

Vždy jsem odvážíla to nerezové třenky vypočítané množství solubilizátoru (0,5 g), přidala 0,5 ml příslušného zásobního roztoku barviva rozpuštěného v MCT a důkladně obě složky promíchala třenkou. Třenku jsem pak umístila na vodní lázeň vyhřívanou na asi  $60^\circ\text{C}$  a postupně přikapávala za stálého míchání 9 ml vodné fáze (destilované vody zahřáté na  $60^\circ\text{C}$ ).

Hodnocení:

Pouze u vzorku S7 ze všech zkoušených se barvivo při ani po přípravě soustavy neagregovalo a dokonce i v průběhu 6 měsíců od přípravy zůstávalo barvivo  $^{123}\text{Zn}$  dobře solubilizované v soustavě s MCT a Solutolem. U vzorků S8 a S9 docházelo již při přípravě ve fázi postupného přidávání destilované vody ke směsi k vysrážení barviva ze soustavy Solutolu s MCT.



### **3.4. ABIL CARE 85**

#### **3.4.1. 1%, 2% a 3% Abil Care 85 s 5% MCT**

##### Postup přípravy:

Abil Care 85 při přípravě vystupoval ve funkci emulgátoru, kterého jsem použila k emulgaci triglyceridů (MCT) ve vodě. Přípravu jsem prováděla v nerezové třence s těrkou za normální laboratorní teploty. Do třenky jsem navázila 0,1 g emulgátoru (u 1% koncentrace Abil Care 85 v soustavě), 0,2 g (u 2%) nebo 0,3 g (u 3%), postupně přidávala za neustálého míchání vodnou fází (9,4 ml, 9,3 ml nebo 9,2 ml destilované vody). Nakonec jsem pomalu vmíchávala 0,5 g olejové fáze (MCT) a všechny složky na závěr důkladně promíchala.

##### Hodnocení:

Při přípravě vzorků se zvolenými koncentracemi emulgátoru Abil Care 85 se nepodařilo lipid ani v jedné soustavě dostatečně emulgovat a krátce po přípravě soustavy se začaly MCT vždy z disperzí vydělovat.

#### **3.4.2. 3% Abil care 85 se ZIP-T-37Mg v koncentraci 100 μmol/l**

##### Postup přípravy:

Do nerezové třenky jsem si odvážíla 0,3 g Abil Care 85, postupně přimíchávala 4,8 ml zásobního roztoku barviva ZIP-T-37Mg o koncentraci 210 μmol/l v THF (příprava viz. 3.1.8.), důkladně promíchala, přelila do baňky a nechala odpařit THF na vakuové odparce při teplotě asi 40°C. Pak jsem baňku umístila na temperovanou vodní lázeň (60°C) a na magnetickou míchačku. Do baňky jsem přidala magnetické míchadlo a postupně přikapávala 9,7 ml destilované vody ohřáté na přibližně stejnou teplotu.

##### Hodnocení:

Barvivo se ihned po přípravě vysráželo ze soustavy a ulpívalo na stěnách baňky a hladině disperze.

### **3.5. POLYSORBÁT 80, POLYSORBÁT 20**

V tomto kroku příprav jsem měla za cíl připravit disperze s Polysorbátem 80 (Polysorbátem 20) v různých koncentracích a zjistit, v jaké nejnižší koncentraci je solubilizátor ještě schopný solubilizovat a přitom nebýt toxický na testované buňky. Některé připravené vzorky pak byly podrobeny testu cytotoxicity a fototoxicity.

#### **3.5.1. Různé koncentrace Polysorbátu 80 (Polysorbátu 20) s 5% MCT**

Přípravy s PS 80 i PS 20 jsem prováděla v kovové třence s třerkou na vodní lázni temperované na teplotu 40°C.

##### Postup přípravy:

Do vytárované třenky jsem si navážila potřebné množství Polysorbátu 80 (nebo PS 20) dle příslušné požadované koncentrace a k tomu jsem vždy dovážila 0,5 g MCT. Třenku jsem ponořila do vytemperované vodní lázně (40°C) a začala postupně za stálého míchání třerkou přidávat po jednotlivých ml vytemperovanou destilovanou vodu až do konečného objemu soustavy (10 ml). Při opatrném přidávání vodné fáze bylo potřeba neustále a důkladně soustavu třerkou roztírat, aby se předešlo tvorbě gelovitých shluků.

Tab. 8: Vzorky PS 80 (20) s MCT

označení vzorku	koncentrace PS 80 (20) (% m/m)	MCT (% m/m)	vzhled-sledování po přípravě				
			3.den	5.den	7.den	12.den	18.den
PS80-1	5,0	5,0	+++	+++	+++	++ (+) R	++ R
PS80-2	4,0	5,0	++ R	++ R	++ R	++ R	++ R
PS80-3	3,0	5,0	++ R	++ R	++ R	++ R	++ R
<b>PS80-4</b>	<b>2,0</b>	<b>5,0</b>	++ R	++ R	++ R	+ R	++ R
PS80-5	1,0	5,0	- r	- r	- r	- r	- R
PS80-6	0,5	5,0	-- r	-- r	-- r	-- r	-- r
PS80-7	1,5	5,0	- R	- R	- R	-- R	- R
PS20-1	5,0	5,0	+ R	+ R	+ R	+ R	+ R
<b>PS20-2</b>	<b>4,0</b>	<b>5,0</b>	+ R	+ R	+ R	- R	- R
PS20-3	3,0	5,0	-- r	-- R	-- R	-- R	-- R
PS20-4	2,0	5,0	-- r	-- r	-- r	-- r	-- r

Legenda:

- +++ stabilní
- ++ oddělená malá vrstvička na hladině
- + oddělená vrstvička na hladině, ale trvalý zákal
- oddělená vrstva na hladině, trvalý zákal
- oddělená vrstva na hladině, mírný zákal
- úplně oddělené
- R dobře roztřepatelné, po roztřepání stabilní
- r roztřepatelné, po roztřepání se odděluje

Hodnocení:

Hodnocení bylo provedeno ihned po přípravě vzorků a pak se provádělo ještě po dobu 18 dnů v různě dlouhých intervalech. Vzorek PS80-1 byl nejvíce stabilní a snadno roztřepatelný. Protože vzorek PS80-5 bezprostředně po přípravě vykazoval téměř neroztřepatelné oddělování vrstvy na hladině, dodatečně jsem připravila koncentraci PS 80 1,5 % (vzorek PS80-7). 2% koncentrace solubilizátoru PS 80 (vzorek PS80-4) se jevila jako nejnižší možná koncentrace, která je schopna solubilizovat soustavu s 5 % MCT. Při 2% hraniční koncentraci solubilizátoru PS 80 již docházelo k oddělování

vrstev po více dnech stání, ale soustava zůstávala stále roztřepatelná. U PS 20 jsem jako tuto nejnižší možnou koncentraci zvolila 4 % (vzorek PS20-2).

### **3.5.2. Test na cytotoxicitu u PS 80 a PS 20:**

Testu cytotoxicity byly podrobeny vzorky PS80-1, PS80-4, PS20-2. Vzorky byly připraveny (postupem popsáním viz. 3.5.1.) vždy v objemu 10 ml a vodnou fází v nich představovala převařená destilovaná voda p.a..

#### **Provedení:**

Test cytotoxicity byl proveden dle protokolu fototoxicity, ale bez záření. Vzorky se ředily PBS, byly vystaveny 2 hod expozici, pak následoval oplach a výměna za DMEM se sérem. Poté proběhla 24 hod kultivace a barvení.

V tabulce č. 9 v prvním sloupci hodnoty konc. % vyjadřují vzestupně jednotlivé koncentrace vzorků, které vznikly naředěním původních koncentrací vzorků PS80-1, PS80-4 a PS20-2 (které jsou zde označeny jako 100%). Hodnotám v prvním sloupci odpovídají v dalších sloupcích hodnoty, které vyčíslují procento přežití buněk (myší fibroblasty - linie Balb/c 3T3). Nejvyšší netoxické koncentrace jednotlivých vzorků jsou v tabulce zvýrazněny tučně. Vzorek je netoxický, když dosáhne životnost testovaných buněk  $\geq 80$  %.

*Tab. 9: Výsledky testů na cytotoxicitu*

<b>konc. %</b>	<b>PS80-1</b>	<b>PS80-4</b>	<b>PS20-2</b>
0,1	93,4	99,3	<b>93,1</b>
0,5	97,2	93,1	58,8
1	94,8	96,9	8,4
5	88,4	86,8	5,3
10	<b>94</b>	<b>83,2</b>	6,4
50	23,9	31,8	4
100	5,9	6,4	4,8

#### **Hodnocení:**

V provedených testech na cytotoxicitu vykazoval vzorek PS80-1 netoxické působení až při naředění na desetinu původní koncentrace vzorku. Nejvyšší netoxickou koncentraci obsažených látek ve vzorku - solubilizátoru PS 80 a MCT tedy

představovala koncentrace 0,5 %. Vzorek PS80-4 se stal netoxickým v provedeném testu také až při naředění na desetinu své původní koncentrace. Netoxické hodnoty v tomto případě vyšly pro solubilizátor PS 80 0,2 % a pro triglyceridy 0,5 %. Vzorek PS20-2 vykázal netoxicitu až při tisícinásobném naředění původní koncentrace roztoku. Netoxické hodnoty solubilizátoru PS 20 podle těchto výsledků představuje koncentrace 0,04 %, u triglyceridů koncentrace 0,05 %.

### **3.5.3. PS 80, PS 20 s 5% MCT, popř. barvivem <sup>123</sup>Zn o koncentraci 100 μmol/l**

#### Postup přípravy:

Příprava soustav s Polysorbátem 80 a 20 (vzorky PS80-1B, PS80-4B a PS20-2B) probíhala v kovové třence s těrku na vodní lázni vytemperované na 40°C. Do třenky jsem si vždy odvážila příslušné množství daného solubilizátoru (navážka se vztahovala k celkovému objemu soustavy 10 ml), k němu jsem přidala vždy 0,5 ml zásobního roztoku barviva <sup>123</sup>Zn v MCT (příprava viz. 3.1.9.), takže ve výsledném objemu soustavy mělo barvivo koncentraci 100 μmol/l. Složky jsem dobře promíchala. Za stálého promíchávání a temperování na vodní lázni jsem postupně přidávala po malých podílech vytemperovanou destilovanou vodu (na 40°C), aby vzorek dosáhl konečného objemu 10 ml.

*Tab. 10: Vzorky PS 80 (20) + MCT + <sup>123</sup>Zn*

<b>Označení vzorku</b>	<b>PS 80 (% m/m)</b>	<b>PS 20 (% m/m)</b>	<b>MCT (% m/m)</b>	<b><sup>123</sup>Zn (μmol/l)</b>
PS80-1B	5	-	5	100
PS80-4B	2	-	5	100
PS20-2B	-	4	5	100

#### Hodnocení:

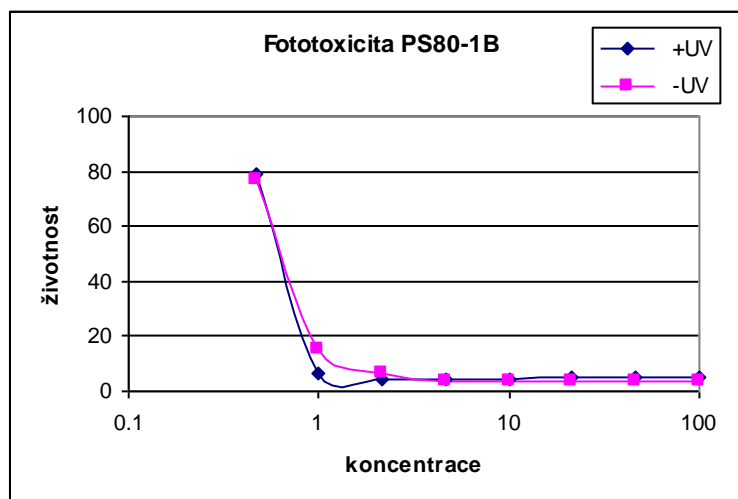
U vzorku PS80-1B zůstalo barvivo v soustavě dobře solubilizováno, barvivo se neagregovalo. U vzorku PS80-4B se již při přidání prvního podílu vodné fáze barvivo agregovalo na hladině. Po přidání veškerého objemu destilované vody a po přeplnění vzorku do zkumavky se na hladině vytvořil tmavě zelený prsteneček nesolubilizovaného barviva. Taktéž vzorek PS20-2B vytvořil na hladině podobný prsteneček agregovaného barviva tmavě zelené barvy.

### **3.5.4. Test na fototoxicitu u vzorku PS80-1B**

V tabulce č. 11 v prvním sloupci hodnoty konc. % vyjadřují vzestupně jednotlivé koncentrace vzorků, které vznikly naředěním původní koncentrace vzorku (která je zde označena jako 100%). Sloupec označený +UV značí hodnoty (v %) přežití buněk při ozáření vzorku UV světlem v provedeném testu fototoxicity. Sloupec označený -UV zobrazuje hodnotu vyjadřující procento přežití buněk ve vzorku o dané koncentraci bez ozáření UV světlem. Rozdíl těchto dvou hodnot +UV a -UV udává pravděpodobnost fototoxicity sledovaného vzorku. Čím je rozdíl těchto dvou hodnot větší, tím se zvyšuje pravděpodobnost, že je vzorek v dané koncentraci složek fototoxický. PIF = Photo Irritation Factor je faktor, který porovnává hodnoty ED50 (efektivní dávka, která vykazuje požadovaný účinek u 50 % testovaných buněk). Pokud je  $PIF < 2$ , znamená to, že vzorek nevykazuje žádnou fototoxicitu.

Tab. 11: Výsledky testu fototoxicity vzorku PS80-1B (tabulka a graf)

konc. %	+UV	-UV
0,464	78,9	76,5
1	6,7	15,5
2,15	4,7	6,7
4,64	4,1	3,4
10	4,6	3,9
21,5	4,9	3,8
46,4	4,9	3,6
100	5,2	3,3



#### Hodnocení:

V provedeném testu byla zjištěna hodnota  $PIF = 1.122$ , což značí, že studovaný vzorek nevykazuje žádnou fototoxicitu.

### **3.5.5. Různé koncentrace Polysorbátu 80 s různými lipidy**

V tomto kroku jsem připravovala celou škálu klesajících koncentrací PS 80 vždy s jedním z pěti zvolených lipidů (OP - oktylpalmitát, DEHK - diethylhexylkarbonát, EHO - ethylhexyloktanoát, C12-C15 AB - C12-C15 alkylbenzoát, DO - decyloleát). Šlo o různé estery s rozdílnou polaritou, které jsem se pokoušela pomocí polysorbátu

solubilizovat ve vodném prostředí. V každém připravovaném vzorku měl ester vždy stejnou koncentraci (5 %). Vzorky jsem připravovala o konečném objemu 10 ml.

Postup přípravy:

Do kovové třenky jsem navázila dané množství PS 80 a 0,5 g příslušného esteru (OP, DEHK, EHK, C12-C15 AB či DO) a smíchala. Třenku jsem umístila na temperovanou vodní lázeň (40°C) a postupně po malých podílech přidávala vytemperovanou převařenou destilovanou vodu (40°C). Jednotlivé podíly vodné fáze bylo třeba velmi důkladně vmíchávat do celé soustavy až do konečného objemu 10 ml.

Tab. 12: Vzorky PS 80 + lipidy

Označení vzorku	Koncentrace (% m/m)	OP (% m/m)	DEHK (% m/m)	EHO (% m/m)	Vzhled
PS80-8	5	5	-	-	+
<b>PS80-9</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	-	-	+
PS80-10	3	5	-	-	-
PS80-11	2	5	-	-	-
PS80-12	1	5	-	-	-
PS80-13	5	-	5	-	+
PS80-14	4	-	5	-	+
<b>PS80-15</b>	<b>3</b>	-	<b>5</b>	-	+
PS80-16	2	-	5	-	-
PS80-17	1	-	5	-	-
PS80-18	5	-	-	5	+
PS80-19	4	-	-	5	+
<b>PS80-20</b>	<b>3</b>	-	-	<b>5</b>	+
PS80-21	2	-	-	5	-
PS80-22	1	-	-	5	-

Legenda:

- + *stabilní soustava, popř. oddělená vrstvička na hladině, ale dobře roztřepatelná*
- *oddělená vrstvička na hladině, ale po roztřepání se ihned odděluje a zůstává nehomogenní*

Tab. 12: - pokračování

Označení vzorku	Koncentrace (% m/m)	C12-C15 AB (% m/m)	DO (% m/m)	Vzhled
PS80-23	5	5	-	+
PS80-24	4	5	-	+
PS80-25	3	5	-	+
<b>PS80-26</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	-	+
PS80-27	1	5	-	-
PS80-28	5	-	5	+
PS80-29	4	-	5	+
<b>PS80-30</b>	<b>3</b>	-	<b>5</b>	+
PS80-31	2	-	5	-
PS80-32	1	-	5	-

Legenda:

- + stabilní soustava, popř. oddělená vrstvička na hladině, ale dobře roztřepatelná
- oddělená vrstvička na hladině, ale po roztřepání se ihned odděluje a zůstává nehomogenní

Hodnocení:

Ze všech připravených vzorků PS 80 s příslušnými lipidy jsem vybrala vždy jeden vzorek o určité koncentraci solubilizátoru, kterou jsem zvolila za nejnižší možnou účinnou koncentraci, při níž solubilizátor vytváří stabilní, popřípadě roztřepatelnou emulzi ve vodě s příslušným esterem.

V soustavě PS 80 s oktylpalmitátem jsem určila jako vyhovující koncentraci solubilizátoru 4% (vzorek PS80-9), s diethylhexylkarbonátem 3% (vzorek PS80-15), s ethylhexyloktanoátem 3% (vzorek PS80-20), s C12-C15 alkylbenzoátem 2% (vzorek PS80-26) a s decyloleátem 3% (vzorek PS80-30). S těmito vybranými koncentracemi solubilizátoru jsem pak pracovala v dalším kroku při přípravě soustav s příslušnými lipidy, v nichž se podařilo příslušné barvivo rozpustit.

**3.5.6. Soustavy PS 80 s různými estery a barvivy ZIP-T-37Mg nebo ZIP-T-21Zn**

Postup přípravy pro vzorky PS 80 (PS80-33, 35, 37, 39, 41, 43):

Každý vzorek jsem připravovala v objemu 10 ml. Do kovové třenky jsem navážila vypočítané množství PS 80 (dle konkrétní požadované koncentrace ve vzorku). Šlo o



nejnižší možnou koncentraci, při níž solubilizátor vytvářel stabilní, popřípadě roztřepatelnou emulzi ve vodě s příslušným lipidem. Tyto zvolené koncentrace solubilizátoru jsem zjistila z předešlých pokusů. Pak jsem do třenky přidala navážku 0,5 g příslušného esteru (vždy se jednalo o 5% koncentraci v soustavě) a promíchala těrku. Vzorky jsem připravovala vždy s jedním ze šesti již odzkoušených esterů (OP, DEHK, EHO, MCT, DO či C12-C15 AB). Třenku jsem pak umístila na vodní lázeň temperovanou na 40°C a postupně po malých podílech (asi po 1 ml) přidávala za stálého promíchávání převařenou destilovanou vodu (vytemperovanou také na 40°C) až do konečného objemu soustavy (tedy do 10 ml).

#### Postup přípravy pro vzorky PS 80 obsahující příslušné barvivo v daném esteru:

V tabulce č. 13 je zaznamenána šestice vzorků, z nichž tři obsahují barvivo ZIP-T-37Mg o výsledné koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  rozpuštěné v příslušném esteru (OP, DEHK či EHO), jde o vzorky PS80-34, 36, 38. (K přípravě použity zásobní roztoky o 1000  $\mu\text{mol/l}$  koncentraci barviva ZIP-T-37Mg připravené viz. 3.1.11.)

V tabulce č. 14 je přehled druhé šestice vzorků, z nichž tři (PS80-40, 42, 44) obsahují barvivo ZIP-T-21Zn o výsledné koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  rozpuštěné v dalších třech lipidech (MCT, DO, C12-C15 AB). (K přípravě použity zásobní roztoky o 1000  $\mu\text{mol/l}$  koncentraci barviva ZIP-T-21Zn připravené viz. 3.1.12.)

Postup přípravy vzorků, které obsahovaly v konečném objemu (10 ml) vzorku solubilizátor PS 80 v příslušné koncentraci, barvivo o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  s 5% lipidem, lze popsat jednotně. Do kovové třenky jsem navážila dané množství PS 80, k němu jsem přidala 0,5 ml 100  $\mu\text{mol/l}$  zásobního roztoku příslušného barviva (ZIP-T-37Mg nebo ZIP-T-21Zn, přípravy viz. 3.1.11. a 3.1.12.) a důkladně promíchala. Zásobní roztok barviva byl předem připraven o koncentraci 1000  $\mu\text{mol/l}$  v příslušném lipidu. Třenku jsem umístila na vodní lázeň (40°C). Převařenou destilovanou vodu jsem zahřála na stejnou teplotu a důkladně vmíchávala po menších podílech do směsi až do celkového objemu 10 ml. Vše jsem důkladně promíchala a vzorek přelila do zkumavky a uzavřela. Všechny vzorky (PS80-33 až PS80-44) byly poslány na test cytotoxicity na SZÚ. U vzorků PS80-33, PS80-35, PS80-36, PS80-38, PS80-42, PS80-43 a PS80-44 testy prokázaly cytotoxicitu při původní koncentraci, při naředění na poloviční koncentraci již cytotoxicitu nevykazovaly. Ostatní vzorky nebyly cytotoxické již při původní koncentraci.

Tab. 13: Vzorky PS 80 + roztoky barviv v lipidech

Označení vzorku	Koncentrace (% m/m)	OP (% m/m)	DEHK (% m/m)	EHO (% m/m)	ZIP-T-37Mg (μmol/l)
PS80-33	4	5	-	-	-
PS80-34	4	5	-	-	50
PS80-35	3	-	5	-	-
PS80-36	3	-	5	-	50
PS80-37	3	-	-	5	-
PS80-38	3	-	-	5	50

Tab. 14: Vzorky PS 80 + roztoky barviv v lipidech

Označení vzorku	Koncentrace (% m/m)	MCT (% m/m)	DO (% m/m)	C12-C15 AB (% m/m)	ZIP-T-21Zn (μmol/l)
PS80-39	2	5	-	-	-
PS80-40	2	5	-	-	50
PS80-41	3	-	5	-	-
PS80-42	3	-	5	-	50
PS80-43	2	-	-	5	-
PS80-44	2	-	-	5	50

### **3.5.7. Test na fototoxicitu u vzorků PS80-34, 36, 38, 40, 42, 44**

Vzorky PS80-34, 36, 38, 40, 42, 44 byly podrobeny testu fototoxicity (3T3 NRU Phototoxicity Test, software Phototox Version 2.0).

*Tab. 15: Výsledky testu fototoxicity vzorků s PS 80*

<b>vzorek</b>	<b>ED50 (+UV)</b>	<b>ED50 (-UV)</b>	<b>MPE</b>	<b>PIF</b>
PS80-34	0,5080	1,033	0,184	2,062
PS80-36	0,3114	2,888	0,214	9,280
PS80-38	1,7710	2,888	0,179	1,635
PS80-40	0,1650	1,434	0,144	8,742
PS80-42	0,0994	1,096	0,420	11,062
PS80-44	0,09394	2,534	0,475	27,397

Legenda:

*ED50(+UV) .....efektivní dávka, která usmrtí 50% testovaných buněk po ozáření UV*

*ED50(-UV) .....efektivní dávka, která usmrtí 50% testovaných buněk bez aplikace UV*

*PIF = Photo Irritation Factor .....porovnává ED50 (poměr ED50(+UV) a ED50(-UV))*

*model MPE= Mean Photo Effect .....porovnává průběh křivek*

podle OECD Guideline 432:

*PIF < 2 nebo MPE < 0,1 .....znamená žádnou fototoxicitu*

*PIF > 2 ale < 5 a MPE > 0,1 ale < 0,15 .....znamená pravděpodobnou fototoxicitu*

*PIF > 5 nebo MPE > 0,15 .....znamená fototoxicitu*

Hodnocení:

V provedeném testu byla fototoxicita prokázána u vzorků: PS80-36, PS80-40, PS80-42 a PS80-44. Pravděpodobnou fototoxicitu vykazoval vzorek PS80-34. Výsledky testů fototoxicity u vzorku PS80-38 jsou nejednoznačné a nelze jednoduše rozhodnout, zda tento vzorek fototoxicitu vykazoval nebo ne. Podle ukazatele PIF, který nedosáhl hodnoty 2, by vzorek neměl mít žádné fototoxické účinky.

### 3.6. POLYGLYCERYL-3-OLEÁT

Emulgátor, u něhož jsem pouze orientačně volila různé koncentrace, za účelem zjištění, ve kterých koncentracích je schopný dobře emulgovat vodnou soustavu s MCT.

#### **Různé koncentrace Polyglyceryl-3-oleátu s 5 % MCT**

##### Postup přípravy:

Vzorky jsem připravovala v kovové třence s třenkou na vodní lázni vytemperované na teplotu 70°C. Do třenky jsem navázila příslušné množství solubilizátoru, pak přidala 0,5 g MCT a umístila třenku na vodní lázeň. Poté jsem postupně asi po mililitrových podílech přidávala ohřátou destilovanou vodu za neustálého míchání třenkou. Konečný objem soustavy byl 10 ml.

*Tab. 16: Vzorky polyglyceryl-3-oleátu s MCT*

<b>Označení vzorku</b>	<b>Polyglyceryl-3-oleát (% m/m)</b>	<b>MCT (% m/m)</b>
P3O-1	5	5
P3O-2	1	5
P3O-3	3	5

##### Hodnocení:

Vodná fáze šla dobře zpracovat, avšak koncentrace solubilizátoru 5 % a 3 % se jevily jako příliš vysoké, neboť vytvořily velmi viskózní emulzi. U vzorku P3O-2 viskozita výsledného produktu již byla přijatelná, šlo o tekutou soustavu, avšak došlo u ní k oddělení fází ihned při přípravě. 1% koncentrace polyglyceryl-3-oleátu byla na emulgaci nedostatečná.

### **3.7. PEG-7-GLYCERYLCOCOÁT**

#### **Soustava s 5 % PEG-7-GC, 5 % MCT**

Do třenky jsem navážila 0,5 g solubilizátoru PEG-7-GC, přidala 0,5 g MCT a umístila třenku na vodní lázeň (70°C). Poté jsem postupně asi po mililitrových podílech přidávala 9 ml ohřáté destilované vody za neustálého míchání třenkou.

#### **Hodnocení:**

Ihned při přípravě se na hladině objevily olejové kapky oddělené lipofilní fází, produkt byl však tekutý a jednoduše roztřepatelný. Po delším stání se olejová fáze zcela oddělila ve formě souvislé olejové vrstvičky na povrchu hladiny, byla sice roztřepatelná, ale po chvíli stání opět docházelo k oddělování vrstev fází.

## 4. DISKUSE

Diplomová práce byla zaměřena na hledání nových soustav pro dispergaci ftalocyaninových barviv ve vodném prostředí. Tato barviva jsou potenciálními fotosenzitizéry ve fotodynamické terapii a jsou ve vodě prakticky nerozpustná. Pro jejich využití v PDT je nutné je dispergovat ve vodném prostředí.

Byly zkoumány dispergační soustavy založené na komerčních solubilizátorech a emulgátorech (Solutol<sup>®</sup> HS 15, Polysorbát 80 (20), Abil Care 85, Polyglyceryl-3-oleát, PEG-7-glycerylcocoát) a jejich směsích s přírodními a modifikovanými lipidy (MCT, oktylpalmitát, diethylhexylkarbonát, ethylhexyloktanoát, decyloleát, C12-C15 alkylbenzoát).

Ve studovaných soustavách byla dispergována následující barviva: ZIP-T-44Mg, ZIP-T-37Mg, 123Zn, ZIP-T-21Zn.

Z výsledků experimentů byly odvozeny následující závěry:

1. Při použití samotného solubilizátoru Solutol HS 15 pro dispergaci barviv (ZIP-T-44Mg, ZIP-T-37Mg) ve vodném prostředí byly výsledné disperze nestabilní a barviva se z nich obvykle rychle agregovala. Nestabilní byla i disperze připravená pomocí solubilizátoru Abil Care 85 s barvivem ZIP-T-37Mg. Barvivo se opět rychle agregovalo. U ostatních solubilizátorů (emulgátorů) proto tento postup nebyl zkoušen. Z výsledků vyplývá, že nelze použítá barviva solubilizovat jen pomocí samotného solubilizátoru. Pro zlepšení rozpustnosti barviv byl v dalších experimentech použit kombinovaný postup solubilizace prostřednictvím různě polárních lipidů.
2. Nejprve bylo potřeba experimentálně zjistit, která barviva se v konkrétních lipidech podaří rozpustit.
  - a) Barvivo ZIP-T-44Mg se v MCT rozpustilo, po rozpuštění došlo k částečné agregaci. Po přefiltrování k další agregaci nedocházelo a roztok byl použitelný pro další experimenty.
  - b) Barvivo ZIP-T-37Mg se podařilo rozpustit v MCT. Vzniklý roztok byl velice stabilní, nedošlo k žádné agregaci. Toto barvivo bylo dále úspěšně rozpuštěno v OP, DEHK a EHO. Pouze v C12-C15 AB a DO se barvivo nepodařilo rozpustit.

- c) Barvivo 123Zn se z roztoku v DMSO úplně agregovalo. Barvivo se však podařilo rozpustit v MCT. Připravený roztok byl stabilní.
  - d) Barvivo ZIP-T-21Zn se rozpustilo v MCT, DO, C12-C15 AB. Připravené roztoky byly stabilní.
3. Dále bylo potřeba zjistit, jaké koncentrace jednotlivých solubilizátorů umožňují vytvořit stabilní disperze použitých lipidů ve vodném prostředí. Tyto experimenty byly prováděny jak s čistými lipidy, tak i s lipidickými roztoky barviv z bodu 2. Disperze čistých lipidů byly podrobeny testům na cytotoxicitu, u disperzí obsahující barviva byly testovány jejich fototoxické vlastnosti.
- a) Barvivo ZIP-T-44Mg rozpuštěné v MCT se nepodařilo solubilizovat pomocí Solutolu HS 15 (koncentrace solubilizátoru 5 %) ve vodném prostředí. Došlo k precipitaci barviva z disperze.
  - b) Barvivo ZIP-T-37Mg rozpuštěné v MCT se nepodařilo solubilizovat pomocí Solutolu HS 15 (koncentrace solubilizátoru 5 %). Při dispergaci docházelo k precipitaci barviva. Pomocí PS 80 došlo k úspěšné solubilizaci barviva rozpuštěného v OP (koncentrace solubilizátoru 4 %), DEHK (koncentrace 3 %) a EHO (koncentrace 3 %). Takto připravené disperze byly podrobeny testu fototoxicity.
  - c) Barvivo 123Zn rozpuštěné v MCT se podařilo solubilizovat pomocí Solutolu HS 15 (koncentrace solubilizátoru 5 %). Zdařil se též postup solubilizace barviva rozpuštěného v MCT pomocí PS 80 (koncentrace solubilizátoru 5 %). Neúspěšně dopadly solubilizace barviva pomocí nižší koncentrace PS 80 (2 %) a také pomocí PS 20 (koncentrace solubilizátoru 4 %).
  - d) Barvivo ZIP-T-21Zn rozpuštěné v MCT se povedlo solubilizovat pomocí PS 80 (koncentrace solubilizátoru 2 %), dále se podařilo solubilizovat roztok barviva v DO (koncentrace solubilizátoru 3 %) a C12-C15 AB (koncentrace solubilizátoru 2 %), opět pomocí PS 80.
  - e) K experimentům byly použity také polyglyceryl-3-oleát a PEG-7-glycerylcocoát. Při emulgaci MCT však s první látkou vznikaly příliš viskózní emulze nevhodné pro praktické využití. Při nižších

koncentracích polyglyceryl-3-oleátu stejně jako při použití PEG-7-glycerylcocoátu vznikající emulze nebyly stabilní a rychle se oddělovaly.

4. Některé z připravených soustav byly podrobeny testu cytotoxicity a testu fototoxicity (v případě soustav s obsaženým barvivem). Testy cytotoxicity jsou důležité pro zjištění, zda zkoumané látky i bez spolupůsobení světla nevyvolávají poškození buněk, což je pro použití v praxi nepřipustné. Byly testovány disperze Solutolu<sup>®</sup> HS 15 ve vodném prostředí, i disperze s přídavkem rozpouštědla THF. Byly stanoveny nejvyšší netoxické koncentrace Solutolu i THF (viz. Tab. 6). U vzorků solubilizovaného MCT pomocí PS 80 i PS 20 o různých koncentracích byly zjištěny nejvyšší netoxické hodnoty (viz Tab. 9). Test cytotoxicity a fototoxicity byl proveden u disperzí barviv ZIP-T-37Mg, ZIP-T-21Zn a 123Zn solubilizovaných pomocí PS 80 v kombinaci s lipidy (OP, DEHK, EHO, MCT, DO a C12-C15 AB) (viz. Tab. 11 a 15). Fototoxicitu vykazaly vzorky barviva ZIP-T-37Mg rozpuštěného v DEHK při koncentraci PS 80 3%. Dalšími fototoxicky aktivními vzorky se ukázaly disperze barviva ZIP-T-21Zn rozpuštěného v MCT (koncentrace solubilizátoru PS 80 2%), v DO (koncentrace solubilizátoru PS 80 3%) a v C12-C15 AB (koncentrace solubilizátoru PS 80 2%). Jako pravděpodobně fototoxický se projevil vzorek barviva ZIP-T-37Mg rozpuštěného v OP při koncentraci PS 80 4%. Žádné fototoxické vlastnosti nebyly prokázány u vzorku barviva ZIP-T-37Mg rozpuštěného v EHO (koncentrace solubilizátoru PS 80 3%) a u vzorku barviva 123Zn rozpuštěného v MCT při koncentraci solubilizátoru PS 80 5%.



## 5. ZÁVĚR

Experimentálně bylo zjištěno, že samotné solubilizátory nejsou vhodné pro dispergaci použitých ftalocyaninových barviv ve vodném prostředí. Barviva se z disperzí agregovala.

Jako úspěšný se ukázal postup, při kterém se barviva nejprve rozpustila v různých polárních lipidech. Při následné solubilizaci lipidických roztoků barviv ve vodném prostředí vznikaly v některých případech poměrně stabilní disperze, které by mohly mít praktické uplatnění.

Tyto disperze byly poslány na testy cytotoxicity a fototoxicity, kde se ukázalo, které kombinace solubilizačního systému a ftalocyaninového barviva nejsou nebezpečné bez spoluúčinku světla a přitom mají žádané fototoxické vlastnosti.

Další výzkum připravených disperzí, zejména z hlediska zacílení fotosenzitizéru do nemocné tkáně (nádoru) je již nad rámec této diplomové práce.

## 6. LITERATURA

- 1 ZIMČÍK, P., MILETÍN, M.: *Čes. Slov. Farm.*, **2004**, 53(6), 271
- 2 AHMAD, N., MUKHTAR, H.: *Methods Enzymol.*, **2000**, 319, 342
- 3 ZIMČÍK, P., MILETÍN, M.: *Čes. Slov. Farm.*, **2004**, 53(5), 219
- 4 BROWN, S. B., BROWN, E. A., WALKER, I.: *The Lancet Oncology*, **2004**, 5,  
497
- 5 KONAN, Y. N., GURNY, R., ALLÉMANN, E.: *Photochem. Photobiol.*, **2002**,  
66, 89
- 6 DOUGHERTY, T. J., GRINDE, Y. G. B., FIEL, R.: *Nat. Cancer Inst.*, **1975**, 55,  
115
- 7 SHARMAN, W. M., ALLEN, C. M., VAN LIER, J. E.: *Methods Enzymol.*,  
**2000**, 319, 376
- 8 FOOTE, C. S.: *Photochem. Photobiol.*, **1991**, 54, 659
- 9 CASTANO, A. P., DEMIDOVA, T. N., HAMBLIN, M. R.: *Photodiagnosis and  
Photodyn. Therapy*, **2004**, 1, 279-293
- 10 WILSON, B. C., PATTERSON, M. S.: *Phys. Med. Biol.*, **1985**, 31, 327
- 11 HILLEGERSBERG, R., KORT, J. W., WILSON, J. H. P.: *Drugs*, **1994**, 48, 510
- 12 BRANCALEON, L., MOSELEY, H.: *Lasers Med. Sci.*, **2002**, 17, 173
- 13 MARIJNISSEN, J. P. A., STAR, W. M., VERSTEEG, A. A. C. et al.: Pilot  
study on the interstitial HPD-PDT in rats bearing solid mammary carcinom or  
rhabdomyosarkom. In: JORI, G., PERRIA, C. Photodynamic therapy of tumours  
and other diseases; *Liberia Progetto*, **1985**, 387
- 14 MULLER, P. J., WILSON, B. C.: *Photochem. Photobiol.*, **1987**, 46, 929
- 15 GOMER, C. J., FERRARIO, A.: *Cancer Res.*, **1990**, 505, 3985
- 16 RONN, A. M., NOURI, M., LOFGREEN, L. A., et al.: *Laser Med. Sci.*, **1996**,  
11, 267
- 17 SHARMAN, W. M., ALLEN, C. M., van LIER, J. E.: *Drug Discov. Today*,  
**1999**, 4, 507

- 
- 18 MACDONALD, I. J., DOUGHERTY, T. J.: *J. Porphyrins Phthalocyanines*,  
2001, 5, 105
- 19 Miravant Medical Technologies (2003), (cit. 06/10/2003), [www.miravant.com](http://www.miravant.com)
- 20 BOYLE, R. W., DOLPHIN, D.: *Photochem. Photobiol.*, **1996**, 63, 469
- 21 TABER, S. W, FINGAR, V. H., COOTS, C. T., WIEMAN, T. J.: *Clin. Cancer*  
*Res.*, **1998**, 4, 2741
- 22 Light Science Corporation (2003), (cit. 06/10/2003), [www.lightsciences.com](http://www.lightsciences.com)
- 23 SIBATA, M. N., TEDESCO, J. M., MARCHETTI, J. M.: *Eur. J. Pharmac.*  
*Sciences*, **2004**, 23, 131
- 24 DEOLIVEIRA, C. A., MACHADO, A. E. H., PESSINE, F. B. T.: *Chem. Phys.*  
*Lipids*, **2005**, 133, 69
- 25 STEWART, F., BAAS, P., STAR., W.: *Radiother. Oncol.*, **1998**, 48, 233
- 26 SZEIMIES, R. M., KARRER, S., ABELS, CH. et al.: *J. Photochem. Photobiol.*,  
**1996**, 34, 67
- 27 KRÁL, V., DAVIS, J., ANDRIEVSKI, A. et al.: *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 1073
- 28 AGOSTINIS, P., VANTIEGHEM, A., MERLEVEDE, W. et al.: *Int. J.*  
*Biochem. Cell Biology*, **2002**, 34, 221
- 29 OLIVO, M., LAU, W., MANIVASAGER, V. et al.: *Int. J. Oncol.*, **2003**, 23,  
1501
- 30 BRASSEUR, N., MENARD, I., FORGET, A. et al.; *Photochem. Photobiol.*,  
**2000**, 72, 780
- 31 STERNBERG, E. D., DOLPHIN, D., BRÜCKNER, CH.: *Tetrahedron*, **1998**,  
54, 4151
- 32 VROUENRAETS, M. B., VISSER, G. W. M., SNOW, G. B., VAN DONGEN,  
G. A. M. S.: *Anticancer Res.*, **2003**, 23, 505-522
- 33 LANG, A., MOSINGER, J., WAGNEROVA, D. M.: *Coordin. Chem. Reviews*,  
**2004**, 248, 321

- 
- 34 CANDIDE, C., MORLIERE, P., GOLDSTEIN, S., SANTUS, R.,  
DUBERTRET, L., REYFTMANN, J. P., POLONOVSKI, J.: *FEBS Lett.*, **1986**,  
207, 133
- 35 SCHMIDT-ERFURTH, U., HASAN, T., GRAGOUDAS, E. S., MICHAUD, N.,  
FLOTTE, T. J., BIRNGRUBER, R.: *Ophthalmology*, **1994**, 101, 1953
- 36 REDDI, E., ZHOU, C., BIOLO, R., MENEGALDO, E., JORI, G.: *Br. J.*  
*Cancer*, **1990**, 61, 407
- 37 KOSMAS, C., LINARDOU, H., EPEMETOS, A. A.: *J. Drug Targ.*, **1993**, 1, 81
- 38 MEW, D., WAT, C. K., TOWERS, G. H. N., LEVY, J. G.: *J. Immunol.*, **1983**,  
130, 1473
- 39 KLYASHCHITSKY, B. A., NECHAEVA, I. S., PONOMARYOV, G. V.: *J.*  
*Control. Release*, **1994**, 29, 1-16
- 40 JIANG, F. N., JIANG, S., LIU, D., RICHTER, A., LEVY, J. G.: *J. Immunol.*  
*Methods*, **1990**, 134, 139
- 41 GIJSENS, A., MISSIAEN, L., MERLEVERDE, W., WITTE, P.: *Cancer. Res.*,  
**2000**, 60, 2197
- 42 BOYLE, R. V., DOLPHIN, D.: *PCT Int. Apl.*, **1996**; 16, 966
- 43 <http://www.drugdeliverytech.com/cgi-bin/articles.cgi?idArticle=213>,  
(cit. 24/01/2006). TORCHILIN, V. P.: *Mag. Drug Delivery Technology*, Vol. 4,  
No. 2, March **2004**
- 44 RICHTER, A. M., WATERFIELD, E., JAIN, A. K., CANAAN, J. A.,  
ALLISON, B. A., LEVY, J. G.: *Photochem. Photobiol.*, **1993**, 57, 1000
- 45 SELMAN, S. H., GARBO, G. M., KECK, R. W., KREIMER-BIRNBAUM, M.,  
MORGAN, A. R.: *J. Urol.*, **1987**, 137, 1255
- 46 MICHAUD, L. B.: *Ann. Pharmacother.*, **1997**, 31, 1402
- 47 GARBO, G. M., FINGAR, V. H., WIENMAN, T. J., NOAKES, E. B.,  
HAYDON, P. S., CERRITO, P. B., KESSEL, D. H., MORGAN, A. R.:  
*Photochem. Photobiol.*, **1998**, 64, 561-568
- 48 VAN NOSTRUM, C. F.: *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2004**, 54, 9-16

- 
- 49 HIOKA, N., CHOWDHARY, R. K., CHANSARKAR, N., DELMARRE, D.,  
STERNBERG, E., DOLPHIN, D.: *Can. J. Chem.*, **2002**, *80*, 1321-1326
- 50 ZHANG, J. X., HANSEN, C. B., ALLEN, T. M., BOEY, A., BOCH, R.: *J.*  
*Control. Release*, **2003**, *86*, 323-338
- 51 LE GARREC, D., TAILLEFER, J., VAN LIER, J. E., LENAERTS, V.,  
LEROUX, J. C.: *J. Drug Targ.*, **2002**, *10*, 429-437
- 52 YOO, H. S., LEE, E. A., PARK, T. G.: *J. Control. Release*, **2002**, *82*, 17-27
- 53 TAILLEFER, J., BRASSEUR, N., VAN LIER, J. E., LENAERTS, V.,  
GARREC, D., LEROUX, J. C.: *Pharm. Pharmacol.*, **2001**, *53*, 166
- 54 CHUNG, J. E., YOKOYAMA, M., YAMATO, M., AOYAGI, T., SAKURAI,  
Y., OKANO, T.: *J. Control. Release*, **1999**; *62*, 115-127.
- 55 RAPOPORT, N., PITT, W. G., SUN, H., NELSON, J. L.: *J Contr Release*,  
**2003**, *91*, 85-95.
- 56 TORCHILIN, V. P., LEVCHENKO, T. S., LUKYANOV, A. N., KHAW, B. A.,  
KLIBANOV, A. L., RAMMOHAN, R., SAMOKHIN, G. P., WHITEMAN, K.:  
*Biochem. Biophys. Acta*, **2001**, *1511*, 397-411.
- 57 TORCHILIN, V. P., IAKOUBOV, L. Z., ESTROV, Z.: *Cancer Ther.*, **2003**, *1*,  
179-190
- 58 HONE, D. C., WALKER, P. I., EWANS-GROWING, R., FITZGERALD, S.,  
BEEBY, A., CHAMBRIER, L. et al.: *Langmuir*, **2002**, *18*, 2985
- 59 MOSINGER, J., KLIMENT, V. jr., SEJBAL, J., KUBÁT, P., LANG, K.: *J.*  
*Porphyrins and Phthalocyanines*, **2002**, *6*, 513
- 60 YAMAMOTO, M., ARITOMI, H., IRIE, T., HIRAYAMA, F., UEKAMA, K. S.  
T. P.: *Pharma Sci.*, **1991**, *1*, 397
- 61 CHALABALA, M. a kol.: *Technologie léků*, nakl. Galén, **2001**
- 62 [http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/vybrane\\_kapitoly/tenzidy\\_anal.htm](http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/vybrane_kapitoly/tenzidy_anal.htm), (cit.13/03/2006)
- 63 DOLEŽAL, P. a kol.: *Technologie přípravy nesterilních léčiv*, nakl. Karolinum,  
**2003**

- 
- 64 LJUSBERG-WAHREN, H., NIELSEN, F. S., BROGARD, M., TROEDSSON,  
E., MÜLLERTZ, A.: *Int. J. of Pharm.*, **2005**, 298, 328-332
- 65 FRIEDRICH, I., REICHL, S., MÜLLER-GOYMANN, C. C.: *Int. J. of Pharm.*,  
**2005**, 305, 167-175
- 66 SARI, P., RAZZAK, M., TUCKER, I. G.: *Int. J. of Pharm.*, **2004**, 270, 287-296
- 67 BERGESE, P., COLOMBO, I., GERVASONI, D., DEPERO, L. E.: *Materials  
Science and Engineering C*, **2003**, 23, 791-795
- 68 CROY, S. R., KWON, G. S.: *J. of Pharm. Sci.*, **2005**, 94, 2345-2354
- 69 JOSHI, H. N., TEJWANI, R. W., DAVIDOVICH, M., SAHASRABUDHE, V.  
P., JEMAL, M., BATHALA, M. S. et al.: *Int. J. of Pharm.*, **2004**, 269, 251-258
- 70 SADURNÍ, N., SOLANS, C., AZEMAR, N., GARCÍA-CELMA, M. J.: *Europ.  
J. of Pharm. Sci.*, **2005**, 26, 438-445
- 71 RODRIGUEZ, M. E., MORÁN, F., BONANSEA, A., MONETTI, M.,  
FERNÁNDEZ, D. A., STRASSET, C. A. et al.: *Photochem. Photobiol. Sci.*,  
**2003**, 2, 988-994
- 72 IWUNZE, M. O., EKIKO, D. B.: *Cellular and Molecular Biology*, **2004**, 50(6),  
753-758
- 73 (cit. 18/01/2006), [http://www.pharma-  
solutions.basf.de/\(fd5arv45egr0mu55ktui2dvx\)/product\\_detail.aspx?PrID=Solut  
ol+HS+15&GrpID=60](http://www.pharma-solutions.basf.de/(fd5arv45egr0mu55ktui2dvx)/product_detail.aspx?PrID=Solutol+HS+15&GrpID=60),
- 74 *Basic Design rules for Pharma Solutions* (11/2005), (cit. 18/01/2006),  
[http://www.scirus.com/srsapp/search?q=Solutol+HS15&ds=jnl&ds=nom&ds=w  
eb&g=s&t=all](http://www.scirus.com/srsapp/search?q=Solutol+HS15&ds=jnl&ds=nom&ds=web&g=s&t=all)
- 75 COORS, E. A., SEYBOLD, H., MERK, H. F., MAHLER, V. V.: *Ann Allergy  
Astma Immunol.*, **2005**, 95(6), 593-599, (cit. 01/03/2006),  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&do  
pt=Abstract&list\\_uids=16400901&itool=iconabstr&query\\_hl=1&itool=pubmed  
\\_docsum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=16400901&itool=iconabstr&query_hl=1&itool=pubmed_docsum)
- 76 NAIR, L. M., STEPHENS, N. V., VINCENT, S., RAGHAVAN, N., SAND, P.  
J.: *J. of Chromatography A*, **2003**, 1012, 81-86

- 
- 77 Degussa Personal Care – Documentation, issue: August **2003** (CD)
- 78 TRAU, K. A., DRIEDGER, A., INGLE, D. L., NAKHASI, D.: *Food and Chemical Toxicology*, **2000**, 38, 79-98
- 79 (cit. 18/04/2006),  
[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](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)
- 80 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**, Vol. 43, L136, 98-107
- 81 OECD TG 432 : In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test (adopted 13th April, 2004)