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

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Studie interakcí azaftalocyaninů s unilamelárními lipozómy I.

Hradec Králové, 2007 Mgr. Helena Kučerová

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli Petru Zimčíkovi za trpělivé vedení mojí rigorózní práce, za jeho odbornou pomoc a rady, za veškerou ochotu a za poskytnutí všech potřebných materiálů během praktické části.
Mé poděkování patří též mým rodičům, kteří mě během této práce velmi podporovali.

OBSAH

Seznam zkratek 5
Seznam obrázků 6
Seznam tabulek 7

1 TEORETICKÁ ČÁST 8

1.1 ÚVOD 8
1.2 HISTORIE PDT A VYUŽITÍ SVĚTLA V TERAPII 10
1.3 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE 12
1.4 PROFIL IDEÁLNÍHO PDT LÉČIVA 17
1.5 GENERACE FOTOSENZITIVNÍCH LÁTEK 19
1.5.1 První generace 19
1.5.2 Druhá generace 20
1.5.3 Třetí generace 22
1.6 TRANSPORTNÍ SYSTÉMY PRO FOTOSENZITIZÉRY V PDT 23
1.6.1 Pasivní targeting 25
1.6.2 Dlouho cirkulující transportní systémy 27
1.6.3 Aktivní targeting 28
1.7 LIPOZÓMY 30
1.7.1 Chemická struktura 30
1.7.2 Fyzikální struktura 34
1.7.3 Využití lipozómů 36
1.7.4 Příprava lipozómů 37
1.7.4.1 Manipulace s lipidy 37
1.7.4.2 Metody přípravy lipozómů 39
1.7.4.3 Membránová extruze lipozómů 44
1.7.4.4 Aktivní loading 46
1.8 CÍL PRÁCE 48

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 49

2.1 MATERIÁLY 49
2.1.1 Fotosenzitizéry 49

2.1.2 Fosfolipidy a rozpouštědla 51
2.2 PŘÍSTROJE A METODIKY 52
2.3 POSTUPY PŘÍPRAVY VZORKŮ 54
2.4 VÝSLEDKY A DISKUZE 56
3 ZÁVĚR 61
4 LITERATURA 65

Seznam zkratek

AzaPc	azaftalocyaniny
CRM	Cremofor-EL (neionogenní polyethoxylovaný ricinový olej)
DAPC	diarachidoylfosfatidylcholin
DMPC	dimyristoylfosfatidylcholin
DOPC	dioleoylfosfatidylcholin
DOPS	1,2-dioleoylfosfatidylserin
DPPC	dipalmitoylfosfatidylcholin
DSPC	distearoylfosfatidylcholin
HpD	deriváty hematoporfyrinu
HPMA	*N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid
ISC	intersystémová přeměna (intersystem crossing)
IUVs	unilamelární vezikuly se střední velikostí (intermediate-sized unilamellar vesicles)
LDL	lipoproteiny s nízkou hustotou (low-density lipoproteins)
LUVs	velké unilamelární vezikuly (large unilamellar vesicles)
LUVETs	velké unilamelární vezikuly vytvořené extruzí (large unilamellar vesicles made by extrusion technique)
MFS	mononukleární fagocytární systém
MLVs	multilamelární vezikuly (multilamellar vesicles)
MoAb	monoklonální protilátka
PC	fosfatidylcholin (phosphatidylcholin)
PDT	fotodynamická terapie (photodynamic therapy)
PEG	polyethylenglykol
PGA	polyglutamová kyselina
POPC	1-palmitoyl-2-oleoylfosfatidylcholin
PS	fotosenzitizér (photosensitizer)
PVAL	polyvinylalkohol
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
SUVs	malé unilamelární vezikuly (small unilamellar vesicles)
T_C	teplota fázového přechodu

Seznam obrázků

Obr. 1 Zjednodušený princip PDT

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

Obr. 3 Modifikovaný Jablonského diagram chování typického fotosenzitizéru

Obr. 4 Schematické znázornění fotoprocesu typu I a II

Obr. 5 Oxidace cholesterolu

Obr. 6 Cykloadice singletového kyslíku na tryptofan

Obr. 7 Rozdíl mezi porfyriny, chloriny a bakteriochloriny

Obr. 8 Strukturní vzorce vybraných fotosenzitizérů druhé generace

Obr. 9 Chemické vzorce některých fosfolipidů běžně se vyskytujících v přírodě

Obr. 10 Znázornění přechodu membrány z uspořádaného stavu gelu do kapalné fáze

Obr. 11 Grafické znázornění jednotlivých typů lipozómů podle velikosti

Obr. 12 Membrána typu „klikaté cesty“ (tortuous path)

Obr. 13 Grafy vyjadřující inkorporaci barviva **2** (a) a **3** (b) do DOPC lipozómů v závislosti na koncentraci DOPC po 2 min. vortexování. Koncentrace barviva je 0,1 μM. Jednotlivé body v grafu představují reálné naměřené hodnoty, křivka vyjadřuje průběh teoretickými hodnotami vypočtenými na základě rovnice (2).

Obr. 14 UV-VIS absorpční spektrum barviva **1** (spektrum barviva zachyceného na stěnách baňky, získaného extrakcí z DOPC, zachyceného na filtru, inkorporovaného v DOPC lipozómech a rozpuštěného v čistém THF)

Obr. 15 UV-VIS absorpční spektrum barviva **2** (spektrum barviva zachyceného na stěnách baňky, získaného extrakcí z DOPC, zachyceného na filtru, inkorporovaného v DOPC lipozómech a rozpuštěného v čistém THF)

Seznam tabulek

Tab. 1 Fotosenzitizéry schválené pro terapii onkologických onemocnění

Tab. 2 Nomenklatura a terminologie vybraných mastných kyselin

Tab. 3 Hodnoty vazebných konstant barviv

Tab. 4 Množství barviva inkorporovaného do DOPC (metoda B)

Tab. 5 Spektrální data barviv v THF a LUVETs

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 ÚVOD

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

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

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

Předpokládá se, že PDT vytvořením reaktivního kyslíku rezultuje v oxidativní poškození buněčných organel. Tento typ poškození podporuje kombinaci biochemických, genetických a molekulárních změn, které mají na normální buňku destruktivní účinek. Nekróza a apoptóza jsou také významnou součástí PDT–vyvolaného procesu usmrcení buňky.[1]

PDT má oproti ostatním způsobům protinádorové terapie (chirurgie a radioterapie) několik možných výhod: je ve srovnání s těmito dvěma metodami zcela neinvazivní metodou, její účinek může být přesně zacílen na postiženou tkáň a opakované dávky mohou být podávány bez omezení celkovou limitní dávkou, běžnou při radioterapii.[3]

PDT kombinuje vysokou účinnost na nádorové buňky se selektivním zásahem na postižené místo a s minimálním výskytem vedlejších nežádoucích účinků.[2] Zvýšené

selektivity v zásahu na cílové buňky je dosaženo jednak zlepšenou kumulací fotosenzitizéru v nádorové tkáni, tak i ozářením pouze určených oblastí. Jednotlivé složky PDT jsou totiž bez přítomnosti ostatních netoxické.[4]

1.2 HISTORIE PDT A VYUŽITÍ SVĚTLA V TERAPII

Počátky využití světla jako terapeutického agens lze vysledovat několik tisíc let zpět. Již staří Egypťané, Indové nebo Číňané používali světlo k léčbě některých kožních onemocnění (např. psoriasis, vitiliga nebo dokonce i rakoviny), infekcí ricketsiemi nebo některých psychóz. Avšak rozšíření se této léčbě dostalo až na konci 19. a počátkem 20. století. Fototerapii (čili použití pouze světla k léčbě různých onemocnění) rozvinul na přelomu 19. a 20. století dánský lékař Niels Finsen, který za použití ultrafialového světla léčil kožní formu tuberkulózy, za což obdržel v roce 1903 Nobelovu cenu.[2]

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

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

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

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

Problémy s čistotou derivátů hematoporfyrinu (HpD) připravenými Schwartzem v 50. letech 20. století[5], jejich absorpční vlnovou délkou a opožděnou fototoxicitou vedly v 80. letech 20. století ke hledání nových sloučenin s lepšími vlastnostmi jak z hlediska farmakokinetiky, tak z hlediska fotodynamických vlastností.[6] Tak se dospělo k PS tzv. „druhé generace“. Také některé z nich už byly zavedeny do praxe (kyselina aminolevulinová,

verteporfin, temoporfin) a to nejen k léčbě rakoviny, ale i např. v oftalmologii (zatím jedinou oftalmologickou aplikací je léčba senilní makulární degenerace).[2]

V současné době je naprostá většina PS momentálně používaných nebo testovaných v PDT založena na tetrapyrolech[4] (porfyriny, chloriny, bakteriochloriny a ftalocyaniny) a zdá se, že budou obecně i nadále v této oblasti dominovat.

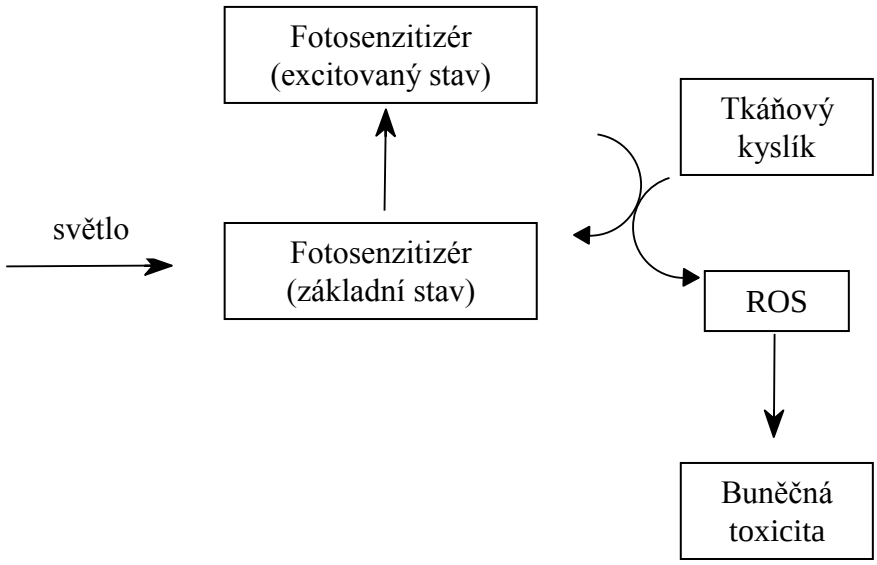
Vzhledem k tomu, že doposud nejrozšířenější a nejpoužívanější PS založený na porfyrinovém cyklu, Photofrin®, má značný počet vedlejších účinků a pro PDT nežádoucích vlastností, byl výzkum zaměřen na nové typy PS. Byly formulovány určité vlastnosti ideálního PS (viz. dále), a i když je zřejmé, že žádná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

Rozvoj PDT bude tedy vyžadovat nové účinné fotosenzitizéry s absorpcí v dalekém červeném a blízkém infračerveném spektru a vykazující minimální kožní fototoxicitu. K posílení vývoje nových látek a lepšímu porozumění jejich farmakokinetiky a biodistribuce je potřeba objevit cíleně specifické fotosenzitizéry (tzv. „targeting“).

1.3 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE

Mechanismus PDT

Základní mechanismus fotodynamické terapie zahrnuje tři základní komponenty (obr. 1). Prvním je fotosenzitizér – světlo absorbující molekula, která se aktivuje druhým elementem, světlem odpovídající vlnové délky. Třetí složkou je molekulární kyslík, který je využíván v průběhu fotochemické reakce k vytvoření singletového kyslíku – cytotoxického agens, které následně zničí neoplastickou tkáň.[7]



Obr. 1. Zjednodušený princip PDT

Fyzikálním základem PDT je aktivace PS světlem vhodné vlnové délky. Vlnová délka světla aktivujícího PS je pro použití PDT velice limitující. Světlo o nižších vlnových délkách proniká živými tkáněmi pouze do hloubky několika milimetrů a zasažená oblast je velice malá. Při nižších vlnových délkách dochází k pohlcování světla endogenními chromofory, jako je například hemoglobin. I toto je jeden z důvodů, proč se připravují nové PS. Původně do terapie zavedený HpD (Photofrin®) totiž kromě jiných nežádoucích vlastností má také velice nízkou maximální vlnovou délku vhodnou pro aktivaci – 630 nm. Optimální rozpětí vlnových délek se pohybuje v oblasti 650–800 nm. Další zvyšování nad 800 nm pak již není příliš účelné z hlediska nízké energie záření, jež nemusí dostačovat k účinné aktivaci PS.[2]

Po absorpci světelného kvanta se PS transformuje ze základního singletového stavu (PS^0) do velice krátce trvajícího (v jednotkách nanosekund) excitovaného singletového stavu (PS^*), který vede k produkci cytotoxického agens a následné nekróze tumoru.[2] Tento mechanismus může být popsán následujícím schématem (obr. 2):[3]

Fotosenzitizér (PS^0) + světlo	→	**Aktivovaný fotosenzitizér (PS^*)**
Aktivovaný fotosenzitizér + kyslík	→	**Fotosenzitizér + aktivovaný (singletový) kyslík**
Aktivovaný kyslík + cílová tkáň	→	**Oxidovaná (zničená) tkáň**

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

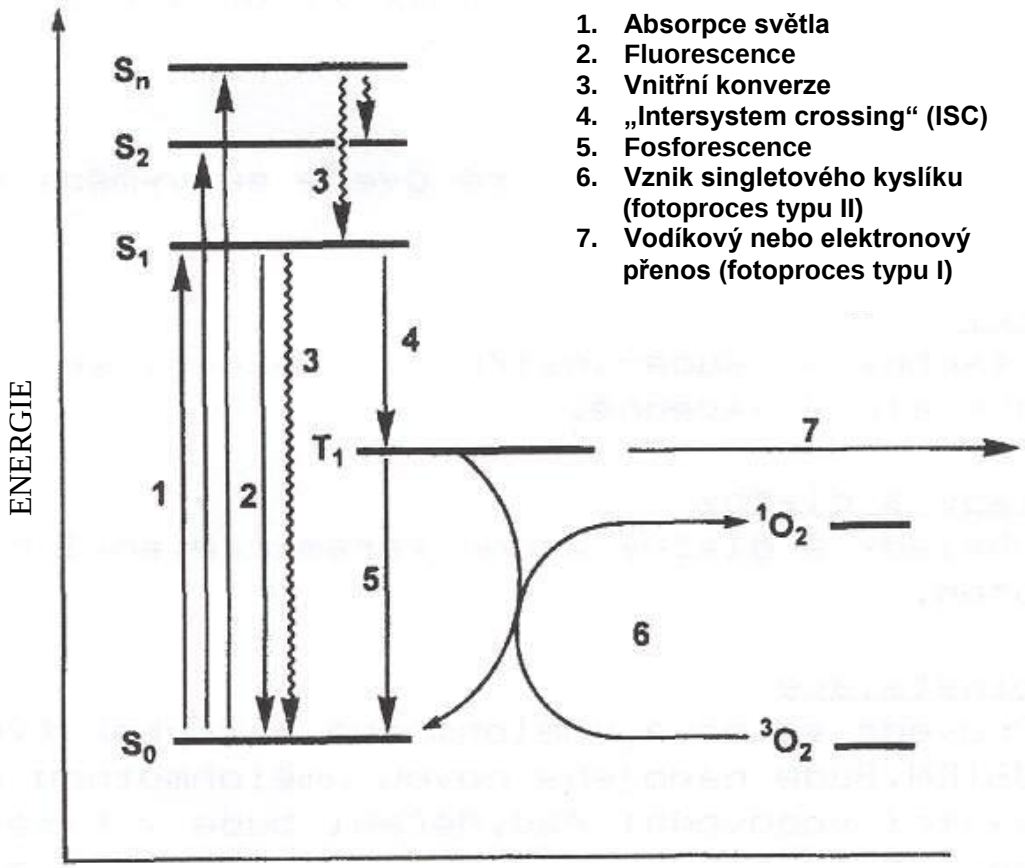
Zatímco první a poslední krok jsou známy poměrně dobře a je jasné, že excitace fotosenzitizéru povede k buněčné smrti, mezikroky nejsou tak zřetelné a jedná se pouze jen o směs dohadů a nepřímých důkazů. Obecně však mechanismus PDT zahrnuje dvě části – fotofyzikální a fotochemické vlastnosti fotosenzitizéru a jeho schopnost produkovat cytotoxické agens je první, druhou pak biologická odpověď buňky vystavené působení cytotoxického agens.[7]

Fotofyzikální základ PDT

Fyzikálním základem PDT je aktivace fotosenzitizéru světlem vhodné vlnové délky.[2] Světlo delší vlnové délky penetruje hlouběji v ozářené tkáni, proto by ideální fotosenzitizér měl být látkou, která absorbuje světlo vlnových délek blízkých infračervené oblasti spektra.[8] Pokud by totiž PS vykazoval absorpční maximum v oblasti nízkých vlnových délek, nedošlo by k jeho aktivaci kvůli minimální prostupnosti světla s nízkou vlnovou délkou tkáněmi. A navíc by tato skutečnost mohla způsobit vyšší kožní fotosenzitivitu. Naopak u fotosenzitizéru, který by vykazoval absorpční maximum při vysokých vlnových délkách ($\lambda > 800$ nm), by světlo nemělo dostatečnou energii pro aktivaci tohoto fotosenzitizéru ze základního singletového stavu do excitovaného singletového stavu. Proto se optimální rozpětí vlnových délek pohybuje v oblasti 630–800 nm.[9]

PDT je závislá na přítomnosti molekulárního kyslíku. To předpokládá, že singletový kyslík tvořený v průběhu fotosenzitizace z molekulárního tripletového kyslíku je hlavní

toxické agens působící v průběhu PDT. Modifikovaný Jablonského diagram typického fotosenzitizéru vysvětluje princip fotofyzikálního procesu (obr. 3).[8]



Obr. 3: Modifikovaný Jablonského diagram chování typického fotosenzitizéru

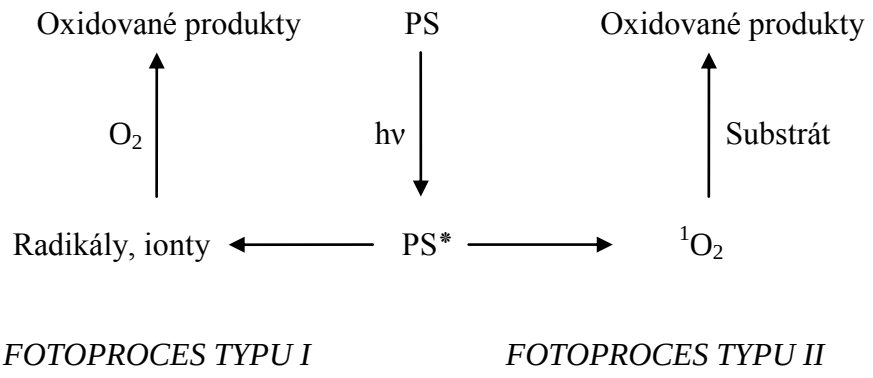
Jak už bylo řečeno, PS se po absorpci světelného kvanta dostává ze základního singletového (v tomto stavu obsahuje PS dva elektrony s opačným spinem v orbitalu s nízkou hodnotou energie) do excitovaného singletového stavu (jeden z těchto elektronů se dostává do orbitalu s vyšší energií, ale stále si zachovává svůj spin). Z této energetické hladiny se PS může uvolnit několika způsoby zahrnujícími jak procesy radiační (fluorescence – vyzáření světla), tak neradiační (vnitřní konverze – vyzáření tepla, a tzv. „intersystem crossing“ – ISC).[9]

U vnitřní konverze dochází ke srážkám s molekulami rozpouštědla a k uvolnění energie ve formě tepla. Někteří autoři považují tento proces také za jeden z důležitých při vlastním účinku na buňky.[10]

Zvláštní význam pro PDT má proces přeměny excitovaného fotosenzitizéru intersystémovou přeměnou (cesta 4 na obr. 3). Procesem „intersystem crossing“ (ISC) se PS

dostává do svého tripletového stavu (T_1). Vzhledem k tomu, že při ISC dochází k inverzi spinu jednoho elektronu (čili je to proces „spinem-zakázaný“, elektrony získávají totožný spin), je daleko méně preferovaný než tzv. „povolené“ procesy. Ovšem dobrý PS prochází tímto procesem s vysokou pravděpodobností, což je podstatné pro vlastní fotodynamickou aktivitu. Molekula pak může relaxovat z tripletového stavu T_1 dvěma způsoby: vyzářením fotonu ve formě fosforescence (cesta 5) a bez vyzařování spinovou výměnou s jinou molekulou v tripletovém stavu.[2]

Druhý způsob je již vlastním základem PDT. Zahrnuje dva procesy, které můžeme rozdělit na tzv. fotoproces typu I a fotoproces typu II (obr. 4). Oba fotoprocesy se objevují současně a poměr mezi nimi je silně ovlivněn použitým PS, substrátem a koncentrací kyslíku. Všeobecně se přijímá, že fotoproces typu II, při němž vzniká singletový kyslík, je zejména odpovědný za vlastní fotodynamický účinek.[2]



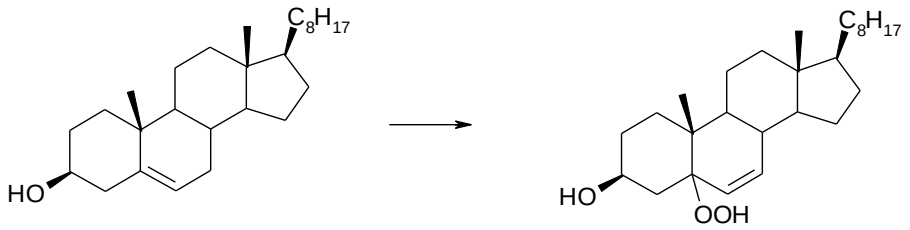
Obr. 4: Schematické znázornění fotoprocesu typu I a II[8]

<u>FOTOPROCES TYPU I</u> je proces odštěpení vodíku nebo transfer elektronu mezi excitovaným stavem fotosenzitizéru a substrátem, rozpouštědlem nebo jiným fotosenzitizérem a vytvoření radikálů a radikálových iontů. Tyto radikály jsou velmi reaktivní a mohou interagovat s molekulárním kyslíkem a vytvořit reaktivní druhy kyslíku, jako je např. superoxidový anion, nebo způsobit neopravitelné poškození. Tyto reakce způsobují oxidativní poškození a mohou eventuálně vést k cytotoxickému efektu pozorovanému v průběhu PDT.[7] K tomuto fotoprocesu dochází hlavně za podmínek snížené koncentrace kyslíku. Při úplné anoxii totiž reaguje excitovaný fotosenzitizér přímo s okolním biologickým substrátem.[2]

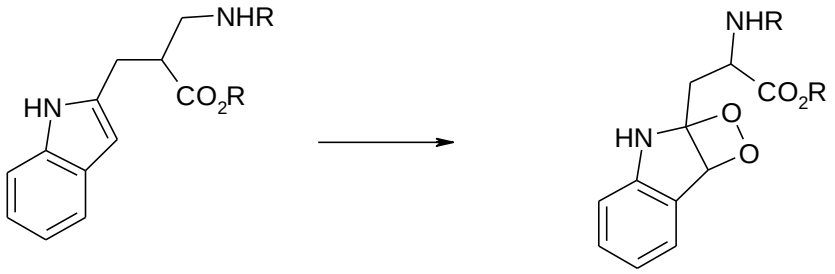
<u>FOTOPROCES TYPU II</u> je proces přenosu energie z tripletového stavu fotosenzitizéru na základní stav molekulárního kyslíku vedoucí k vytvoření excitovaného stavu kyslíku – singletový kyslík ($^1O_2$).[7] Tento singletový kyslík nemá schopnost penetrovat

hlouběji, než je přibližně šířka lipidové buněčné membrány. Tím je prakticky zaručeno, že přímým účinkem PDT budou usmrceny pouze buňky obsahující PS. Společně s určitou selektivitou kumulace v nádorové tkáni a ozářením pouze specifikovaného místa toto umožňuje velice přesně lokalizovaný zásah. Tento typ fotoprocesu převažuje při vyšších koncentracích kyslíku.[2]

Singletový kyslík je velmi reaktivní agens s poločasem existence ve vodě okolo 4 mikrosekund, které napadá okolní biomolekuly (zejména molekuly obsažené v membránách, cholesterol, nenasycené mastné kyseliny, DNA a aminokyseliny tryptofan, methionin a histidin) buď oxidací (obr. 5) nebo cykloadicí (obr. 6). Takto modifikované molekuly pak přestávají plnit svou biologickou funkci a dochází k poškození buňky, případně až k její smrti.[2,11]



Obr. 5: Oxidace cholesterolu



Obr. 6: Cykloadice singletového kyslíku na tryptofan

Role kyslíku v PDT

Kyslík hraje nejdůležitější roli v PDT a je také jedním z jejích limitujících faktorů. Tumorózní buňky jsou špatně zásobeny krví, což vede k lokální hypoxii. Navíc je hladina kyslíku ve tkáni v průběhu ozařování ovlivněna PDT–způsobeným vaskulárním poškozením a produkcí reaktivních forem kyslíku. Tyto efekty velmi limitují potenciál PDT proti solidním tumorům v místech, kde musí být zohledněna hypoxie.[12,13]

1.4 PROFIL IDEÁLNÍHO PDT LÉČIVA

Profil ideální látky pro PDT může být sestaven za použití obecných principů PDT a obecných zásad syntézy a marketingu jakéhokoliv léčiva. Jak se ukáže dále, některé aspekty profilu, jako třeba vlnovou délku absorpčního spektra, lze předpovědět poměrně snadno, zatímco jiné, např. farmakokinetický profil, je mnohem těžší odhadnout.[6]

Vlastnosti ideálního fotosenzitizéru

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

- Dobré spektrální vlastnosti – Živé tkáně jsou pro elektromagnetické záření prostupné pouze v omezené míře, přičemž hloubka dostupnosti se zvyšuje se zvyšující se vlnovou délkou. Proto je potřebná silná absorpce s vysokými extinkčními koeficienty při delších vlnových délkách (v oblasti 650–800 nm), kde penetrační schopnosti světla jsou maximální a energie je stále dostačující pro účinnou produkci singletového kyslíku.[4]

1.5 GENERACE FOTOSENZITIVNÍCH LÁTEK

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

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

1.5.1 PRVNÍ GENERACE

Typické látky této generace jsou deriváty HpD, popř. protoporphyrinu IX. Jedním z nich je např. Photofrin II® připravený Doughertym, který se po dalších úpravách dostal do klinické praxe jako Photofrin®. Je to oligomer hematoporfyrinu, ale délku oligomerního řetězce je těžké přesně určit. Touto látkou se PDT etablovala na poli léčby zhoubných nádorů hned vedle chirurgie, chemoterapie a radioterapie.

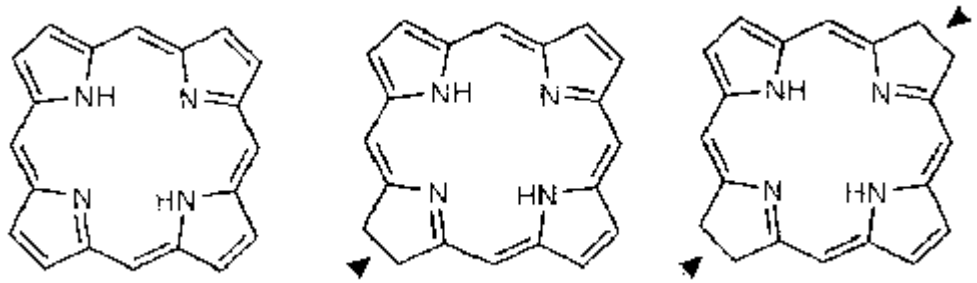
První generace fotosenzitivních látek má ale několik závažných nedostatků (nízká vlnová délka vhodná pro aktivaci PS, nejednotné chemické složení, nízká selektivita vychytávání v nádorové tkáni, kožní fotosenzitivita), které dále vedly k hledání látek jiných typů.

Photofrin® i přes veškeré výše uvedené nežádoucí vlastnosti přesto stále zůstává nejrozšířenějším PS a byl už zaveden v mnoha zemích k léčbě prekancerózních stavů (Barrettův jícen, cervikální dysplazie) i vlastních kanceróz (karcinom cervixu, jícnu, močového měchýře, žaludku a bronchiální karcinom).[4]

1.5.2 DRUHÁ GENERACE

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

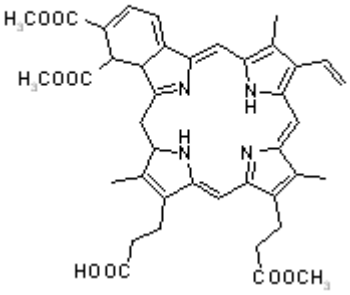
Porfyriny jsou látky přírodního původu, které mají ve své struktuře čtyři konjugovaná pyrrolová jádra a jednotlivé sloučeniny se pak vzájemně liší typem postranních řetězců. Jejich vlnová délka se pohybuje okolo 630 nm.[9] Porfyrinům jsou velice příbuzné chloriny a bakteriochloriny, které mají o jednu (chloriny), případně dvě (bakteriochloriny) konjugované vazby v makrocyklickém systému méně (obr. 7).[4] To znamená, že vlnová délka chlorinů je posunuta do oblasti 650–690 nm. U bakteriochlorinů pak dochází k posunu vlnových délek až do červené části spektra.[9]



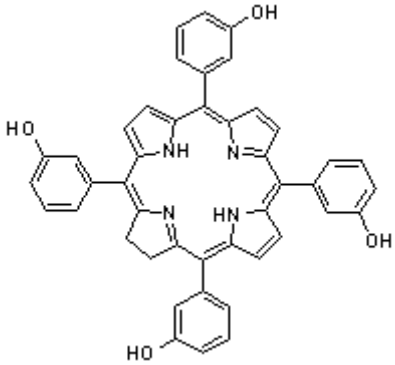
Porfyrin Chlorin Bakteriochlorin

Obr. 7: Rozdíl mezi porfyriny, chloriny a bakteriochloriny[4]

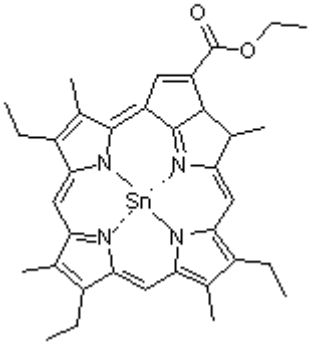
Mezi látky, které se řadí ke druhé generaci fotosenzitizérů (obr. 8), patří verteporfin (derivát benzoporfyrinu), temoporfin (zástupce skupiny chlorinů), rostaporfin (látka ze skupiny metalochlorinů), talaporfin (chloriny), motexafin lutecium (derivát texafyrinu s centrálně chelatovaným atomem lutecia), ftalocyaniny, 5-aminolevulinová kyselina a její estery, a další fotosenzitizéry přírodního či syntetického charakteru a různé chemické struktury (methylenová modř, rhodaminy, porfyceny, hypericin, safyriny).[4]



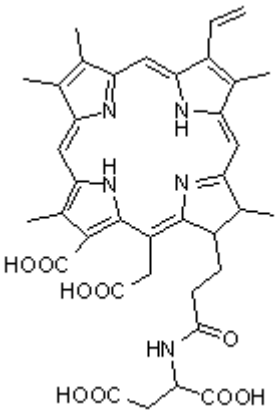
Verteporfin



Temoporfin



Rostaporfin



Talaporfin

Obr. 8: Strukturní vzorce vybraných fotosenzitizérů druhé generace

V současné době jsou do klinické praxe ve světě zavedeny (tab. 1) pouze čtyři klasické PS (HpD, verteporfin, talaporfin[14], temoporfin) a 5-aminolevulinová kyselina (a její methylester a hexylester[15]), avšak řada dalších je již v pokročilých fázích klinického testování. I přes své nevýhodné vlastnosti zůstává HpD stále dosud nejrozšířenějším a nejpoužívanějším PS vzhledem k tomu, že je dosud nejprozkoumanější. Do popředí se ovšem dostávají i novější PS druhé generace a do budoucnosti se dá předpokládat, že díky svým výhodnějším vlastnostem a často nižší toxicitou postupně vytlačí HpD z terapie a zaujmou jeho místo.[4]

Tab. 1: Fotosenzitizéry schválené pro terapii onkologických onemocnění[3,4,14,15]

Generický název	Datum a země, kde je schváleno použití	Indikace
porfimer sodný	Poprvé schváleno v roce 1995; v současnosti používán ve více než 40 zemích	Rakovina plic a močového měchýře, povrchní rakovina žaludku, jícnový adenokarcinom
verteporfin	Schváleno v roce 1999, registrován ve více než 71 zemích	Senilní makulární degenerace
talaporfin	Od roku 2004 v Japonsku (Laserphyrin)	Rakovina plic
temoporfin	Schváleno v roce 2001 v Evropské unii, Norsku a Islandu	Paliativní rakovina hlavy a krku
aminolevulinová kyselina	Schváleno v roce 1999 v USA	Aktinoidní keratóza
methyl aminolevulinát	Schváleno v roce 2001 v Evropě	Aktinoidní keratóza, rakovina bazálních buněk
hexyl aminolevulinát	Schváleno ve 27 zemích Evropy pod názvem Hexvix (2004)	Detekce rakoviny močového měchýře

1.5.3 TŘETÍ GENERACE

Jako látky třetí generace se označují konjugáty fotosenzitizérů s různými biomolekulami. Mezi látkami, které tvoří fotosenzitivní část konjugátů, dominují porfyriny zřejmě z důvodu jejich snadné přípravy. Ve farmakokinetice konjugátu dominuje afinita porfyrinové části k sérovým proteinům. Afinita biomolekul k receptorům na povrchu buňky je vyjádřena méně. Porfyriny se konjugují zejména s protilátkami, steroidy, dále se sacharidy a polynukleotidy.[6] Další možností je tvorba tzv. kontejnerových (uzávěrových) komplexů. V tomto případě se nejedná přímo o tvorbu konjugátů, ale o uzavření molekuly PS uvnitř struktur makrocyklických sloučenin, které tvoří jakousi dutinu, ve které je poutána molekula PS nekovalentními interakcemi.[16]

1.6 TRANSPORTNÍ SYSTÉMY PRO FOTOSENZITIZÉRY V PDT

PDT je velice slibná léčebná metoda pro různá onkologická, kardiovaskulární, kožní a oční onemocnění. Jedním z hlavních problémů, se kterým se PDT potýká a který značně omezuje využití fotosenzitizérů v terapii, je obtížnost přípravy farmaceutických systémů, které by byly vhodné pro parenterální aplikaci PS. Hydrofobní PS nemohou být jednoduše aplikovány intravenózně kvůli jejich velmi nízké rozpustnosti ve vodě. A proto probíhá v této oblasti rozsáhlý výzkum, který se zabývá různými metodami (např. hydrofilní polymer-PS konjugace, enkapsulace PS v koloidálních nosičích jako jsou olejové disperze, lipozómy či polymerní částice – mikro- a nanočástice) umožňujícími aplikaci hydrofobních PS do organismu. Navíc je snaha o přípravu takových systémů, které by cíleně dopravily PS do nádorové tkáně (jedná se o specifický targeting pomocí navázání monoklonálních protilátek či jiných molekul, které jsou specificky vychytávány nádorovou tkání, na molekulu PS) a následně tak snížily výskyt vedlejších nežádoucích účinků PDT (především nežádoucí vliv na okolní zdravou tkáň).[17]

Vlastnosti ideálního transportního systému

Ideální transportní systém by měl umožnit selektivní kumulaci PS poškozenou tkání tak, aby v cílových buňkách byla přítomna terapeutická koncentrace PS a minimální či nulová koncentrace v okolních zdravých buňkách. Další vlastností těchto systémů musí být schopnost inkorporovat PS bez jakéhokoliv ovlivnění nebo ztráty jeho aktivity. Vzhledem k vysoké pravděpodobnosti opakovaných aplikací PS během léčebného procesu vyvstává požadavek biodegradability systému a minimálního či žádného vyvolání imunitní reakce organismu na přítomnost transportního systému.[17]

Jiným důvodem, proč se využívají nosiče pro transport PS, je vytvoření takového prostředí, ve kterém by se PS vyskytoval ve své monomerní formě (právě v té je PS fotodynamicky aktivní). Vzhledem k jejich chemické struktuře má totiž mnoho PS sklon k agregaci ve vodném prostředí (tato agregace PS je dána snahou hydrofobní molekuly vyhnout se kontaktu s molekulami vody).[18] Agregáty (dimery i vyšší agregáty) nejsou schopné předávat absorbovanou světelnou energii dále ani ji uvolňovat ve formě fotonu

fluorescencí – absorbovaná energie je většinou uvolněna vnitřní přeměnou (obr. 3, cesta 3) ve formě tepla.

Další diskutovanou strategií v oblasti transportních systémů je využití receptorů cílové tkáně či antigenů, které by umožnily specifické vychytávání PS danými tkáněmi.[17]

1.6.1 PASIVNÍ TARGETING

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

Zvýšená permeabilita cévní stěny (vedoucí k nekompletní endoteliální bariéře) a snížené lymfatické odvodnění v tumorózní tkáni (způsobené nedostatečným vytvořením lymfatického systému nebo lymfatickou obstrukcí) patří k mechanismům, které umožňují těmto částicím dosáhnout jejich cílové tkáně pouhou pasivní difúzí.[17]

Lipozómy

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

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

Jedním z předpokladů inkorporace PS do lipozómů je zachování monomerního (neagregovaného) stavu PS. Je totiž potvrzeno, že tato monomerní forma PS zvyšuje spotřebu kyslíku a je tedy fotodynamicky mnohem účinnější než agregovaný PS. Isele a kol. vyvinuli metodu ředění pomocí organického rozpouštědla, pomocí které inkorporovali monomerní Zn-ftalocyanin (ZnPc) do stabilních lyofilizovaných lipozómů složených ze směsi 1-palmitoyl-2-oleoylfosfatidylcholinu (POPC) a 1,2-dioleoylfosfatidylserinu (DOPS) v poměru 9:1.[17]

Olejové disperze a micelární systémy

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

Disperze obsahující jako emulgátor Cremofor-EL (CRM) (neionogenní polyethoxylovaný ricinový olej) patří k dalším alternativám, které řeší problém s rozpustností hydrofobních PS. Tyto disperze jsou používány k parenterální aplikaci. Jistou nevýhodou ale je, že po parenterálním podání byla hlášena řada akutních anafylaktických reakcí. Přítomnost CRM je pravděpodobně příčinou těchto reakcí a riziko jejich výskytu souvisí s dávkou a rychlostí infuze.

Na základě těchto nežádoucích účinků CRM probíhá rozsáhlý výzkum pH-senzitivních polymerních micelárních systémů, které představují slibnou alternativu pro přenos PS místo disperzních systémů využívajících CRM.[17]

Polymerní částice

Biodegradabilní nanočástice, které jsou považovány za alternativu lipozómů, získávají v posledních letech ohromnou pozornost jako možné transportní systémy v terapii nádorových onemocnění pomocí PDT. Jejich největší výhoda tkví v přenosu velkého množství PS a v možnosti ovlivnit rychlost uvolňování PS z těchto částic. Dalšími výhodami je rozsáhlý výběr materiálů (např. poly(D,L-mléčná kyselina)) a výrobních procesů, pomocí kterých můžeme nanočástice získat.[17]

Polymer-PS konjugáty

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

Je důležité podotknout, že jedním z nejčastěji používaných polymerů pro konjugaci s PS je právě PEG. Ten má však velmi často různou délku řetězce, což způsobuje problémy s porovnáváním výsledků jednotlivých studií prováděných s tímto polymerem. Délka PEG řetězce může totiž ovlivnit farmakokinetické chování celého systému.[17]

1.6.2 DLOUHO CIRKULUJÍCÍ TRANSPORTNÍ SYSTÉMY

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

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

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

Zvýšení hydrofility povrchů koloidálních nosičů je možné několika různými způsoby: pokrytím povrchu částic pomocí hydrofilní vrstvičky tvořené např. poloxamery, poloxaminy či PEG, nebo vmezeřením gangliosidů (např. GM_1) do lipidové dvojvrstvy lipozómů.

Je dokázán vztah mezi sníženým vychytáváním částic z krevního řečiště a zvyšující se tloušťkou ochranné vrstvy. Nanočástice, které jsou potažené větším množstvím hydrofilních molekul, se také minimálně hromadí v játrech a slezině. Na druhou stranu však není zvyšující se hydrofilita vhodná, pokud jsou na povrch částice navázány skupiny, které naopak komplement aktivují (např. hydroxylové skupiny). Účinnost stérického stínění, které je dalším mechanismem zabraňující opsonizaci částic a zvyšující cirkulaci v krevním řečišti, závisí na molekulové hmotnosti, povrchové hustotě částic a na délce řetězce použitého polymeru.[17]

1.6.3 AKTIVNÍ TARGETING

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

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

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

Výše uvedeným požadavkům vyhovují dva typy systémů: lipoproteiny zprostředkovaný transport PS a konjugáty PS s monoklonálními protilátkami.[17]

Lipoproteiny zprostředkovaný transport PS

Na základě existence přímého vztahu mezi relativním počtem lipoproteinových receptorů na povrchu různých nádorů a vychytáváním PS maligními buňkami je v posledních letech soustředěna velká pozornost na klinické využití plasmatických lipoproteinů. Ze všech druhů lipoproteinů se LDL (low-density lipoproteins) zdají být těmi nejdůležitějšími v transportu a uvolňování PS do nádorových buněk. Tento mechanismus může být vysvětlen na základě skutečnosti, že nádorové buňky patří k velmi rychle se množícím buňkám a navíc se vyznačují vysokou permeabilitou. Exprese LDL receptorů na povrchu těchto buněk je regulována potřebou cholesterolu. Cholesterol získávají buňky buď de novo syntézou nebo vychytáváním LDL z okolí pomocí receptorů (Apo B/E receptory) nebo procesem, který není zprostředkovaný receptory (pasivní difúze). Navíc mnoho nádorových buněk ztratilo kontrolu nad normálními regulačními mechanismy a exprimují tak abnormálně vysoké množství LDL receptorů oproti zdravým buňkám.[17]

Lipoproteiny používané jako transportní systémy PS se vyznačují řadou následujících výhod. Díky jejich endogennímu původu se předchází rozpoznávání těchto částic MFS, což vede k delšímu setrvání v plasmě a v biologických tekutinách, a navíc nevyvolávají imunitní reakci organismu. Jejich poměrně malá velikost (v průměru 10–23 nm) umožňuje difúzi

přes cévní membránu a jejich nepolární jádro představuje významný depot pro lipofilní látky, které jsou tak dokonale chráněny před krevním prostředím během transportu. Přičemž umístění PS v lipofilním jádře lipoproteinů nemá žádný vliv na jejich rozpoznávání buněčnými receptory.[19]

Protilátkami zprostředkovaný transport

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

Přímé spojení molekul PS s MoAb je poměrně snadno proveditelné a to navíc za velmi mírných podmínek. Nicméně tato skutečnost neposkytuje dostatečné uspokojení, neboť se zvyšujícím se stupněm substituce dochází k významnému snížení antigenní specifity MoAb. Určitým způsobem, jak zvýšit množství PS transportovaného pomocí molekuly MoAb, je využití koloidálních přenašečových systémů, které jsou pokryty molekulami MoAb. Bylo prokázáno, že specifický transport látek do cílových tkání je daleko více účinný při použití koloidálních nosičů pokrytých MoAb nežli v případě systémů bez protilátky.

Přes všechny povzbuzující výsledky získané *in vitro* musí být ještě vyřešena řada problémů souvisejících s použitím těchto imunokonjugátů v klinických zkouškách. *In vivo* účinnost PS-imunokonjugátů totiž závisí na několika faktorech, které mohou ovlivnit dosažení nádoru a protilátkami zprostředkovanou lokalizaci v nádoru. Navíc nádorová tkáň nemá statický charakter, neustále dochází ke změnám v antigenním profilu nádorových buněk, což následně vede ke ztrátě specifických receptorů, snížení jejich počtu či skrytí receptorů.[17]

1.7 LIPOZÓMY

Lipozómy jsou koloidní až mikroskopické globulárně uspořádané struktury (vezikuly) jedné nebo více hydratovaných dvojvrstev amfifilních lipidů uzavírající vnitřní vodný kompartment, které se samovolně tvoří z disperze fosfolipidů ve vodném prostředí.[20] Velikost lipozómů se pohybuje v rozmezí od 10 nm do 10 μm.[21]

Stěnu lipozómů tvoří fosfolipidová dvojvrstva (lamela). Tato dvojvrstva molekul fosfolipidů je uspořádána tak, že na povrchu membrány jsou hydrofilní polární skupiny fosfolipidů, zatímco nepolární řetězce fosfolipidů tvoří lipofilní vnitřek membrány.[20] Tímto je struktura membrány lipozómů velmi podobná struktuře membrány živých buněk a tato podobnost může být vystupňována rozsáhlou chemickou modifikací lipozomální membrány, čehož lze v konečné fázi využít například při aktivním targetingu léčiv.[21]

Lipozómy vyvolaly značný zájem jako modely biologických membrán, později se začaly studovat jako nosičové systémy pro parenterálně aplikovaná léčiva cíleně usměrňovaná k určitému orgánu, tkáni či buňce.[20]

1.7.1 CHEMICKÁ STRUKTURA

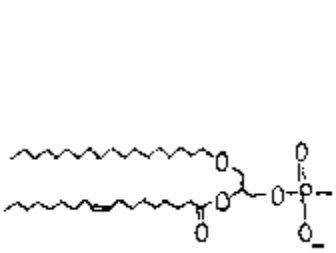
Fosfolipidy představují hlavní strukturální součást biologických membrán. Rozlišují se dvě základní skupiny fosfolipidů: fosfodiglyceridy a sfingolipidy, společně s jim odpovídajícími hydrolytickými produkty.[21]

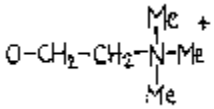
Fosfodiglyceridy obsahují ve své molekule glycerol esterifikovaný dvěma alifatickými kyselinami. Na třetí hydroxylové skupině je vázána kyselina fosforečná, která je esterifikována aminoalkoholy (cholin, ethanolamin), případně přes hydroxyl vázaným serinem, glycerolem nebo inositolem.

Sfingolipidy na rozdíl od fosfodiglyceridů neobsahují ve své molekule glycerol, ale aminoalkohol sfingosin. Sfingosin je vždy acylován vyšší alifatickou kyselinou na aminoskupině, jedná se tudíž o amidy. Na hydroxylovou skupinu sfingosinu v poloze 1 může být vázána esterifikovaná kyselina fosforečná. Pokud na kyselinu fosforečnou je dále vázán aminoalkohol cholin, jedná se o sfingomyeliny. Cerebrosidy a gangliosidy neobsahují vázanou kyselinu fosforečnou. Místo ní jsou glykosidickou vazbou poutané sacharidy.[22]

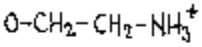
Nejčastěji se vyskytujícími fosfolipidy (obr. 9) jsou fosfatidylcholiny (PC), dále fosfatidylethanolaminy, fosfatidylseriny, fosfatidylglyceroly. PC jsou amfifilní molekuly, ve kterých tvoří glycerol spojovací most mezi molekulou fosfocholinu a zbytky mastných kyselin. Jsou nerozpustné ve vodě , a proto se ve vodném prostředí orientují do dvojvrstev tak, aby minimalizovaly nevýhodné interakce mezi vodnou fází a dlouhými uhlovodíkovými řetězci mastných kyselin. Tyto nežádoucí interakce mohou být zcela eliminovány vytvořením uzavřených vezikul, ve kterých je nepolární část molekuly orientována dovnitř vezikul a polární část směřuje vně.

Fosfatidylcholiny, známé též pod názvem lecitin, mohou být získávány jak z přírodních zdrojů, tak i syntetickými postupy. Jsou poměrně snadno extrahovány z vaječného žloutku a sojových bobů, ale poněkud hůře z hovězího srdce či míchy. Jelikož představují hlavní fosfolipidovou složku mnoha buněčných membrán, používají se fosfatidylcholiny jako základní fosfolipidy pro přípravu lipozómů. Jejich výhoda spočívá jednak v nízké ceně ve srovnání s ostatními fosfolipidy, dále v jejich neutrálním náboji a chemické inertnosti. Lecitin z přírodních zdrojů je ve skutečnosti směs fosfatidylcholinů, které se vzájemně liší délkou řetězců mastných kyselin a různým počtem násobných vazeb. Lecitin rostlinného původu má vysoký obsah polynenasycených mastných kyselin, zatímco lecitin ze zvířecích zdrojů obsahuje vysoké procento plně nasycených řetězců. Mastné kyseliny přírodního původu obsahují všechny dvojné vazby v *cis* konfiguraci.

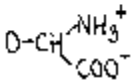




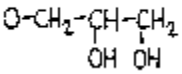
fosfatidylcholin



fosfatidylethanolamin



fosfatidylserin



fosfatidylglycerol

Obr. 9: Chemické vzorce některých fosfolipidů běžně se vyskytujících v přírodě (jednotlivé molekuly fosfolipidů se pak liší zbytkem mastných kyselin navázaných na glycerol v polohách 1 a 2)[21]

Většina přirozených fosfolipidů jsou tzv. „smíšené“, což znamená, že mastné kyseliny vázané na glycerol v polohách 1 a 2 téže molekuly fosfolipidu jsou různé. Přičemž řetězec té mastné kyseliny, který se nachází v poloze 2, je většinou nenasycený, ale zbytek mastné kyseliny v poloze 1 je nasycený.[21]

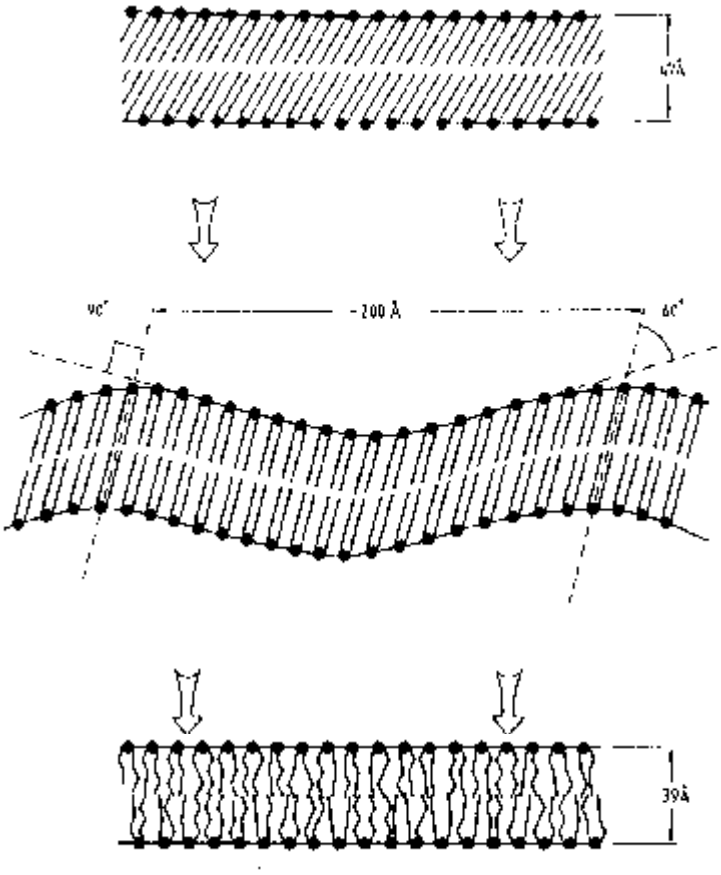
Nomenklatura a terminologie mastných kyselin, které se vyskytují jako součást fosfolipidů, je uvedena v tab. 2. Je zde uveden i jejich vzájemný poměr výskytu v molekulách fosfatidylcholinů získaných z různých zdrojů. Zkratky vyjadřují celkový počet uhlíkových atomů (první číslo) a počet dvojných vazeb (druhé číslo) v molekule mastné kyseliny.[21]

Tab. 2: Nomenklatura a terminologie vybraných mastných kyselin[21]

Zkratka	Systematický název	Triviální název	Relativní výskyt v přírodních zdrojích fosfatidylcholinů (%)		
			Sójový PC	Vaječný PC	Krysa
C12:0	dodekanová	laurová			
C14:0	tetradekanová	myristová			
C16:0	hexadekanová	palmitová	17,2	35,3	28,8
C16:1	*cis*-9-hexadecenová	palmitolejová			
C18:0	oktadekanová	stearová	3,8	13,5	18,0
C18:1	*cis*-9-oktadecenová	olejová	22,6	26,8	8,4
C18:2	*cis*,*cis*-9,12-oktadekadienová	linoleová	47,8		
C18:2	*cis*,*cis*-6,9-oktadekadienová			5,7	19,4
C20:0	eikosanová	arachidová			
C20:1	*Cis*-9-eikosenová	gadoleová			
C20:4	*cis*-5,8,11,14-eikosatetraenová	arachidonová		1,0	17,0
C22:0	dokosanová	behenová			
C24:0	tetrakosanová	lignocerová			

Fosfatidylcholinové membrány

Membrány tvořené molekulami fosfatidylcholinů mohou existovat v závislosti na teplotě v různých fázích, přičemž přechod z jedné fáze do druhé může být detekován pomocí fyzikálních metod. Nejlépe pozorovatelným fázovým přechodem je ten, který se vyskytuje při nejvyšší teplotě, kdy membrána přechází z uspořádaného stavu gelu či pevné fáze do kapalné fáze (fáze tekutého krystalu) (obr. 10). To je způsobeno zvýšenou pohyblivostí jednotlivých molekul membrány s rostoucí teplotou. Nejrozšířenější metodou používanou pro detekci teploty fázového přechodu (T_C) je mikrokalorimetrie. Bylo potvrzeno, že délka uhlovodíkového řetězce a počet dvojných vazeb v molekule mastných kyselin, ze kterých je membrána složena, má značný vliv na hodnotu T_C. Obecně platí, že rostoucí délka řetězce nebo snižující se počet dvojných vazeb zvyšuje teplotu přechodu. Například membrány vyrobené z vaječného lecitinu mají teplotu přechodu od -15°C do -7°C, zatímco membrány savčího původu mají T_C v rozmezí od 0°C do 40°C.



stav gelu („pevná“ fáze)

fáze tekutého krystalu („kapalná“ fáze)

Obr. 10: Znázornění přechodu membrány z uspořádaného stavu gelu do kapalné fáze[21]

Porozumění fázovému přechodu fosfolipidových membrán je velmi důležité jak z hlediska výroby, tak i z hlediska využití lipozómů, neboť fázové chování membrány lipozómů určuje takové vlastnosti jako jsou permeabilita, fúze, agregace, vazba proteinů. Zároveň všechny tyto vlastnosti mohou výrazným způsobem ovlivnit stabilitu lipozómů a jejich chování v biologických systémech.

Lipozomální membrány jsou semipermeabilní, přičemž rychlost difúze molekul a iontů přes membránu se významně liší. Pro molekuly vyznačující se vysokou rozpustností jak v organickém, tak i vodném prostředí představuje fosfolipidová membrána jen velmi tenkou bariéru. Naopak polární látky jako je např. glukóza, či sloučeniny s vysokou molekulovou hmotností prochází přes membránu velmi pomalu. Menší molekuly s neutrálním nábojem (např. voda, močovina) mohou difundovat přes membránu poměrně rychle, zatímco nabité ionty se chovají velmi odlišně. Protony a hydroxylové ionty prochází přes membránu docela rychle, což je pravděpodobně způsobeno přenosem vodíkových vazeb mezi molekulami vody, naopak u sodíkových a draslíkových iontů je přechod velmi pomalý.[21]

1.7.2 FYZIKÁLNÍ STRUKTURA

Nehledě na chemické složky lipozómů, které ovlivňují takové vlastnosti jako jsou membránová fluidita, hustota náboje či permeabilita, mohou být lipozómy charakterizovány též podle jejich velikosti nebo tvaru. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí od 25 nm u nejmenších vezikul až po lipozómy, které jsou pozorovatelné pod světelným mikroskopem s 1000 nm a více v průměru. Klasifikace lipozómů (obr. 11) podle velikosti je proto v dnešní době nejvhodnějším ukazatelem. Podle tohoto hlediska je dělíme do několika skupin:

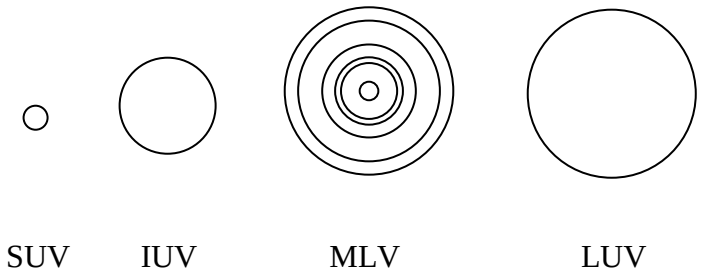
1) Multilamelární vezikuly (multilamellar vesicles, MLVs). Jejich velikost se pohybuje v poměrně širokém rozmezí od 100 nm do 1000 nm, každý měchýřek se skládá z pěti či více koncentricky uspořádaných dvojvrstev. Vezikuly, které jsou složeny jen z malého počtu koncentrických dvojvrstev, se někdy označují jako oligolamelární lipozómy.

2) Malé unilamelární vezikuly (small unilamellar vesicles, SUVs). Tyto lipozómy jsou definovány nejmenší velikostí možnou pro existenci fosfolipidových vezikul. Tato hranice se pohybuje okolo 15 nm pro čistý vaječný lecitin a okolo 25 nm

pro DPPC lipozómy. Jelikož se velikost těchto lipozómů pohybuje u spodní hranice, lze tuto skupinu z hlediska velikosti považovat za homogenní.

3) Velké unilamelární vezikuly (large unilamellar vesicles, LUVs). Velikost těchto lipozómů se pohybuje v průměru okolo 1000 nm.

4) Unilamelární vezikuly se střední velikostí (intermediate-sized unilamellar vesicles, IUVs). Tato skupina je představována lipozómy s velikostí okolo 100 nm.[21]



Obr. 11: Grafické znázornění jednotlivých typů lipozómů podle velikosti[21]

Lipozómy mohou být též klasifikovány podle metody jejich přípravy, kterými jsou např. dehydratace a rehydratace (dried-reconstituted vesicles, DRV), extruze (extrusion technique, ET), evaporace reverzní fáze (reverse-phase evaporation vesicle, REV).

Většina metod, které se dnes v praxi používají pro přípravu lipozómů, poskytuje však velmi heterogenní populaci vezikul, jejichž velikost se pohybuje v širokém rozmezí. Z tohoto důvodu je důležité přesně definovat metody přípravy.[21]

1.7.3 VYUŽITÍ LIPOZÓMŮ

Výběr určitého typu lipozómů závisí na způsobu aplikace, na účelu, k jakému chceme daný typ využít a na velikosti jejich vnitřního kompartmentu pro případ inkorporace různých látek do lipozómů.

Většina způsobů využití je založena na skutečnosti, že jsou tyto struktury tvořeny přírodními, biokompatibilními látkami. Tento fakt předpokládá jejich využití především v medicínské oblasti a přidružených oborech, avšak aplikace lipozómů se uplatnila i ve fyzikálních a dalších vědách.

Pasivní targeting

V dnešní době se lipozómy uplatňují v diagnostice, chemoterapii, imunoterapii, genové terapii a v terapii nádorů. Je však nutné podotknout, že velkou nevýhodou při aplikaci lipozómů je jejich ochota interagovat s orgány MFS (jmenovitě s játry, slezinou, plícemi, lymfatickými uzlinami a kostní dření), což následně vede k jejich rychlému vychytávání fagocytujícími buňkami, degradaci v lysozómech a tudíž velmi rychlé eliminaci lipozómů z organismu. Lipozómy mohou být využity v terapii intracelulárních nemocí makrofágů, jako je leishmanióza a mykotické infekce, nebo u onemocnění zasahující jaterní či plicní tkáně. Mohly by být rovněž účinné v terapii nádorových onemocnění, což je dáno jejich zvýšenou kumulací v oblastech postižených nádorem. Lipozómy uzavírající ve svém vodném kompartmentu různé imunomodulátory by mohly být zase využity ke stimulaci imunitní odpovědi organismu vůči antigenům.

Aktivní targeting

Aktivní targeting lipozómů spočívá v modifikaci jejich povrchu různými molekulami, které mají zajistit jejich specifické vychytávání v cílových buňkách. Lipozómy sice setrvávají po delší dobu v krevním řečišti, avšak jen malé množství je schopno dostat se do extracelulárního prostoru. Lipozómy aplikované subkutánní nebo intramuskulární cestou se zase kumulují v lymfatických uzlinách, zatímco po podání perorální cestou podléhají okamžité degradaci. V současné době proto probíhají výzkumy na úrovni optimální aplikace lipozómů do organismu a modifikace jejich povrchových vlastností.[21]

1.7.4 PŘÍPRAVA LIPOZÓMŮ

Příprava lipozómů je založena na skutečnosti, že fosfolipidové membrány se tvoří spontánně jako důsledek nepříznivých interakcí mezi fosfolipidy a vodou. Z tohoto důvodu se u přípravy lipozómů neklade důraz na vlastní tvorbu membrán, která probíhá samovolně, ale přímo na tvorbu vezikul požadované velikosti a struktury, které by byly schopné do svého vnitřního kompartmentu pojmout určité množství látek.

Veškeré metody přípravy lipozómů se v podstatě skládají ze tří, případně čtyř základních kroků: vysušení lipidů z organického rozpouštědla, rozptýlení lipidů do vodného prostředí, vyčištění výsledných lipozómů a analýza konečného produktu. Hlavní rozdíl mezi jednotlivými metodami přípravy lipozómů je ve způsobu, jakým jsou jednotlivé složky membrán rozptýleny ve vodném prostředí, než dojde k jejich sjednocení ve dvouvrstevné útvary. Metody přípravy lze tudíž rozdělit do třech skupin podle způsobu dispergace – jmenovitě se jedná o mechanickou dispergaci, dispergaci rozpouštědel a solubilizaci za pomoci detergentu.[21]

1.7.4.1 Manipulace s lipidy

Uchovávání lipidů

Lipidy lze uchovávat buď jako pevné látky nebo ve formě organického roztoku (nejčastěji chloroform), vždy však při teplotě -20°C až -70°C, aby se tak snížila pravděpodobnost jejich oxidace na minimum. V případě organického roztoku je potřeba, aby se použité rozpouštědlo vyznačovalo velmi vysokou čistotou z důvodu, že případné nečistoty by mohly být chemicky reaktivní nebo by mohly negativně ovlivnit kvalitu lipidů. Stopy vody se z rozpouštědel odstraňují přidáním molekulových sít. Všechny roztoky lipidů se musí skladovat v temnu a v baňkách s neprodyšně uzavíratelnou matnou zátkou. Obvyklým postupem před uskladněním organických roztoků lipidů je odstranění vzduchu nad roztokem v baňce pomocí inertního plynu, díky kterému se sníží pravděpodobnost oxidace lipidů. Nejčastěji používanými inertními plyny jsou dusík a argon.[21]

Odměřování lipidů

Vzhledem k těkavosti a vysoké hustotě chloroformu jsou pro přesné odměřování malých objemů organických rozpouštědel nejvhodnější kalibrované skleněné pipety a skleněné kapilární mikropipety. Během zpracovávání zásobních roztoků lipidů je důležité pracovat tak, aby se co nejvíce snížila pravděpodobnost odpařování organického rozpouštědla, a tím se zároveň minimalizovaly změny v koncentraci lipidů.

Jelikož se fosfolipidy liší molekulovou hmotností a jelikož je velmi těžké určit, zda došlo během odpařování do sucha k úplnému odstranění rozpouštědla, je upřednostňováno určení fosfolipidové koncentrace v roztoku pomocí změření obsahu fosfátu nežli vážením pevného podílu po vysušení. Každá molekula fosfolipidu obsahuje jednu fosfátovou skupinu (s výjimkou kardiolipinu, který obsahuje tyto skupiny dvě), proto je obsah fosfátu v přímém vztahu k molární koncentraci fosfolipidu, z níž může být hodnota koncentrace vypočtena.[21]

Vysušování lipidů

Na počátku celé přípravy lipozómů je organický roztok membránových lipidů. Přestože jsou lipidy v následujícím kroku přípravy potřebné v suché formě, je výhodné převést je do roztoku, čímž se zajistí kompletní a homogenní smíchání všech komponent tak, jak je to požadováno v konečné přípravě membrán.

Pro všechny metody přípravy bez výjimky platí, že sloučeniny rozpustné v tucích, které jsou inkorporovány do membrány lipozómů, se přidávají přímo do organického roztoku lipidů, zatímco sloučeniny, které jsou lokalizovány ve vodném kompartmentu lipozómů, se rozpouštějí až ve vodném roztoku.

Velké objemy organických roztoků se poměrně snadno odpařují použitím rotační vakuové odparky vybavené spirálovým chladičem a termostatem regulovanou vodní lázní. Rychlé odpařování organických rozpouštědel probíhá při mírném zahřátí vodní lázně na teplotu 20–40°C a za částečného vakua (400–700 mm Hg).

V případě velmi malých objemů organických roztoků lipidů, kde je množství lipidů v řádech miligramů a množství organického rozpouštědla menší než jeden mililitr, a kde není tak důležité vytvoření tenkého a hladkého filmu na povrchu baňky, postačí k odpaření rozpouštědla pouhý proud dusíku ze zásobní lahve. Tento postup má však za následek vytvoření poměrně silných usazenin lipidů, které obsahují rezidua chloroformu, a která mohou být následně odstraněna opětovným rozpuštěním lipidů v diethyletheru a jeho vysušením pomocí dusíku. Někdy se pro konečné vysoušení lipidů využívá benzen, kdy se

v něm lipidy nejprve rozpustí, roztok se následně nechá zmrznout a rozpouštědlo se odstraní lyofilizací.[21]

1.7.4.2 Metody přípravy lipozómů

1.7.4.2.1 Mechanická dispergace

Tato skupina metod se ve své podstatě řadí mezi ty nejjednodušší v přípravě lipozómů. Lipidy jsou nejprve vysušeny na pevném nosiči, kterým většinou bývají stěny skleněné baňky, čímž se vytvoří tenký film, a poté jsou dispergovány přidáním vodného média s následným protřepáním celého obsahu baňky. Předpokládá se, že před přidáním vody jsou lipidy ve filmu orientovány tak, aby byly od sebe odděleny hydrofilní a hydrofobní části molekul, což do jisté míry neodpovídá jejich konečnému uspořádání ve finální struktuře membrány. Po hydrataci lipidového filmu dochází k tomu, že lipidy bobtnají a odlupují se ve formě plátů, což obecně vede ke tvorbě multilamelárních vezikul. Těmito metodami se však většinou připraví lipozómy, ve kterých vodná část uzavřená lipidovou membránou představuje jen malý podíl z celkového objemu lipozómu – okolo 5–10 %. Tato metoda je tudíž velmi nehospodárná pro sloučeniny rozpustné ve vodě, které chceme rozpustit ve vodném kompartmentu lipozómu, ačkoliv absolutní výtěžek by mohl být pro praktické účely uspokojivý. Na druhé straně jsou sloučeniny rozpustné v lipidech inkorporovány se 100% účinností.

Mezi čtyři základní metody mechanické dispergace patří: příprava multilamelárních vezikul pomocí ručního třepání, příprava velkých unilamelárních vezikul bez třepání, příprava pro-lipozómů a příprava mrazovým sušením/sublimací.[21] Takto připravené vezikuly jsou většinou velké a často multilamelární. Pro jejich zmenšování a tvorbu unilamelárních vezikul je potřeba použít další následné zpracování - např. membránovou extruzi.

Příprava multilamelárních vezikul (MLVs) pomocí ručního třepání

Tento způsob přípravy lipozómů patří mezi nejjednodušší a nejvíce používané metody mechanické dispergace, během které jsou lipidy smývány ze stěn baňky do vodného media pomocí mírného ručního míchání. Výhodné je použít kulatou skleněnou baňku většího objemu, ve které pak lipidy po vysušení organického rozpouštědla vytvoří na tak velkém

vnitřním povrchu baňky velmi tenký film, což následně vede ke zvětšení vnitřního kompartmentu lipozómů. Proto se používají baňky o objemu 50–100 ml, ačkoliv celkový objem organického či vodného roztoku je pouze okolo 1 ml.

Při vyšší teplotě nebo za podmínek, kdy lipidy vytvářejí poměrně silný film, může být velmi problematické smýt jej ze skleněného povrchu baňky pomocí pouhého ručního kroužení baňkou. Rovněž se mohou tvořit shluky pevných lipidů, které se pak nesnadno rozvolňují. V tomto případě je vhodné přidat skleněné kuličky o průměru 0,5–3 mm, které jsou velmi účinnou pomůckou při rozvolňování lipidových shluků.[21]

Příprava vezikul bez třepání

Výše uvedená metoda je vhodná pro přípravu multilamelárních vezikul. Za určitých podmínek lze připravit také velké unilamelární vezikuly s mnohem větším vnitřním kompartmentem za použití stejné metody, avšak pozornost musí být věnována právě procesu bobtnání. Hydratace a bobtnání se uskutečňují ve dvou oddělených krocích. Po vysušení lipidového filmu následuje hydratace, která je zahájena vystavením filmu proudu dusíku nasyceného vodou po dobu 15 minut. Poté následuje bobtnání ve vodném mediu bez míchání.[21]

Příprava prolipozómů

Tato metoda představuje další ze způsobů přípravy MLVs, kdy je organický roztok lipidů opatrně aplikován na velmi jemně rozprostřený nosič (většinou se jedná o práškový chlorid sodný, sorbitol nebo jiné polysacharidy), který kompletně absorbuje použité organické rozpouštědlo. Po následném přidání vody k vysušenému prášku pokrytému lipidy (označované jako prolipozómy) dochází k postupnému bobtnání lipidů a okamžitému rozpuštění nosiče, čímž vzniká suspenze MLVs ve vodném roztoku. Velikost jednotlivých částic nosiče ovlivňuje velikost a různorodost vzniklých lipozómů. Během celého procesu je velmi důležité přesně dodržovat stanovenou teplotu během vysušování lipidů na nosiči kvůli zamezení tvorby shluků.[21]

Příprava lipozómů metodou mražení a sušení

Během této metody jsou lipidy nejprve rozpuštěny ve vhodném organickém rozpouštědle (jako nejlepší se jeví *terc*-butanol vzhledem k jeho teplotě tuhnutí, která je důležitá během procesu sublimace), následně je rozpouštědlo odstraněno mrazovou sublimací

a k vysušeným lipidům majícím strukturu podobnou pěně je za intenzivního míchání přidána voda. Touto metodou vznikají opět MLVs.

„Dried-reconstituted“ vezikuly

Tato metoda přípravy lipozómů patří mezi ty, ve kterých jsou lipidy před vlastním kontaktem s vodným prostředím nejprve velmi jemně rozptýleny. Opět se používá technika mražení a sušení, avšak nikoliv lipidů z organického rozpouštědla, ale zmrazení a lyofilizaci se podrobuje suspenze SUVs. Oproti klasické přípravě vezikul vysušením z organického roztoku, kde jsou lipidové molekuly náhodně a nepravidelně uspořádány, jsou SUVs významně organizovány do membránových struktur (podobně jako prolipozómy bez nosiče) a po přidání vody se hydratují a slučují. K hydrataci i poměrně velkého množství lipidů stačí poměrně malé množství vody, jelikož mají molekuly vody velmi dobrý přístup k lipidům v této formě.[21]

„Freeze-thaw sonication“ metoda

Během této metody jsou nejprve připraveny lipozómy, do jejichž vnitřního kompartmentu jsou až následně zavedeny příslušné molekuly. Využívá se procesů zmrazení a opětovného tání, které způsobí protržení a opětovné shloučení SUVs, a během kterých dochází k významnému zvětšení jejich velikosti a tedy i vnitřního kompartmentu. Za pomoci elektronového mikroskopu bylo zjištěno, že lipozómy jsou v první řadě unilamelární. Příprava prázdných lipozómů začíná jejich aplikací do ultrazvukové lázně na dobu 10–15 min., poté následuje tání a poté jsou ještě jednou podrobeny působení ultrazvuku, tentokrát ale jen na 15–30 s. Tato metoda má však řadu nevýhod, jelikož není možné připravit tímto způsobem neutrální lipozómy složené jen z čistých fosfatidylcholinů.

Vezikulace indukovaná změnou pH

Přeměna MLVs na unilamelární vezikuly může být indukována bez pomoci ultrazvuku či vysokého tlaku, a to jednoduše změnou pH. Tento proces, označovaný jako „pH-indukovaná vezikulace“, je elektrostatický fenomén. Přechodná změna pH způsobí nárůst povrchové hustoty nábojů fosfolipidové dvojvrstvy, přičemž při překročení určité prahové hodnoty (okolo 1–2 $\mu C/cm^2$) dochází ke spontánní vezikulaci.

Vzhledem k elektrostatickému charakteru tohoto procesu lze očekávat, že pH-indukovaná vezikulace nebude závislá na povaze nabitých skupin v molekule. Například lipidová disperze ve vodě (mající přibližně pH 7) složená z vaječného fosfatidylcholinu a

většího množství detergentu hexadecylaminu (více než 40 %) může být podnícena ke tvorbě vezikul přechodným snížením pH k hodnotě 2. V tomto případě je vezikulace navozena přidáním kyseliny chlorovodíkové, která způsobí tvorbu kladně nabité formy hexadecylaminu.

Tento způsob vezikulace může být využit u amfifilních molekul léčiv, které mají být inkorporovány do lipidových membrán.[21]

Kalcium-indukovaná fúze vedoucí k tvorbě velkých unilamelárních vezikul

Tato metoda je založena na skutečnosti, že se malé vezikuly složené z kyselých fosfolipidů v přítomnosti vápníku samovolně shromažďují a následně slučují ve velké unilamelární vezikuly.

Hlavní výhodou této techniky je to, že molekuly lipidů nejsou vystavovány nežádoucím chemickým či fyzikálním podmínkám. Stinnou stránkou metody však zůstává požadavek kyselých fosfolipidů a nevyhnutelná přítomnost zbytkových vápenatých iontů uvnitř lipozómů i po provedení dialýzy.[21]

1.7.4.2.2 Dispergace rozpouštědel

V této rozsáhlé skupině metod jsou lipidy tvořící membránu lipozómů nejprve rozpuštěny v organickém rozpouštědle a poté přicházejí do kontaktu s vodnou fází obsahující látky, které mají být součástí vnitřní matrix lipozómů. Na styčné ploše mezi organickou a vodnou fází se fosfolipidy vyrovnávají do jedné řady, což je základem pro tvorbu membránové dvojvrstvy lipozómů. Metody založené na dispergaci rozpouštědel spadají do jedné ze třech kategorií:

- ty, ve kterých je organické rozpouštědlo mísitelné s vodnou fází,
- ty, ve kterých je organické rozpouštědlo nemísitelné s vodnou fází, přičemž vodná fáze je ve značném přebytku,
- ty, ve kterých je organické rozpouštědlo nemísitelné s vodnou fází, přičemž organické rozpouštědlo je ve značném přebytku.

Injekce ethanolických roztoků

Tuto metodu přípravy lipozómů poprvé přednesli Batzri a Korn.[23] Ethanolický roztok lipidů se v tomto případě prudce vstříkne do nadbytku pufru nebo jiného vodného media pomocí velmi tenké jehly. Rychlost, jakou je roztok lipidů vstříknut do pufru, je dostatečná k úplnému promísení celé soustavy, poněvadž ethanol se téměř okamžitě smísí s vodou a fosfolipidové molekuly jsou tak dispergovány v celém mediu. Tímto procesem lze získat velké množství malých unilamelárních vezikul (průměr 25 nm), ačkoliv při nedostatečném míchání může docházet k agregaci lipidů a následné tvorbě lipozómů větších rozměrů.

Velkou výhodou této metody je jednoduchost provedení a velmi nízké riziko rozkladných změn u senzitivních lipidů. Hlavním nedostatkem je omezená rozpustnost lipidů v ethanolu (např. 40 mM pro PC) a objem ethanolu, který je možné vpravit do vodného media. Toto následně omezuje množství dispergovaných lipidů, takže výsledná suspenze lipozómů je většinou dost zředěná.[21]

Injekce éterových roztoků

Ačkoliv je tato metoda ve své podstatě velmi podobná té předešlé, liší se od ní v mnohém ohledu. Organický roztok lipidů je velmi pomalu vstřikován do vodné fáze pomocí velmi tenké jehly a při teplotě, během které dochází k okamžitému odpařování organického rozpouštědla (vodní lázeň 60°C). Pokud by mohlo dojít k poškození použitých sloučenin při takto zvýšené teplotě, lze místo etheru použít fluorované uhlovodíky, které se odpařují při nižších teplotách. Případně lze využít snížení tlaku a pracovat při teplotě 37°C. Touto metodou se dají připravit velké unilamelární vezikuly v rozmezí 0,1–0,5 μm.[21]

Voda v organické fázi

V této skupině metod vznikají lipozómy ve dvou krocích: nejprve je vytvořena vnitřní část membránové dvojvrstvy a až poté vnější část. Existuje mnoho různých způsobů takové přípravy, z nichž nejcharakterističtějším je tvorba emulze „voda v oleji“ vzniklá přidáním malého množství vodného media (obsahující materiál, který má být součástí vnitřního kompartmentu lipozómů) do velkého objemu organického roztoku lipidů a následované mechanickým mícháním, aby došlo k roztříštění vodné fáze na mikroskopické vodné kapénky. Tyto kapénky jsou stabilizovány přítomností fosfolipidové jednovrstvy na fázovém rozhraní. Velikost kapének je určena hodnotou mechanické energie použité k vytvoření emulze a množstvím lipidů v poměru k objemu vodné fáze, jelikož každá kapénka potřebuje

kompletní vrstvu fosfolipidů pokrývající její povrch a zabraňující splynutí s ostatními kapénkami.

Koncentrace lipidů v organickém roztoku je volena tak, aby se zajistilo dostatečné množství lipidů pro vytvoření vnější vrstvy membrány lipozómů.[21]

1.7.4.2.3 Solubilizace za pomoci detergentu

V této třetí skupině metod přípravy lipozómů se fosfolipidy dostávají do kontaktu s vodnou fází prostřednictvím detergentů, které asociují s fosfolipidovými molekulami a slouží k ochraně hydrofobních částí molekul před vodou. Výsledkem této asociace jsou struktury, které se nazývají micely. Mohou být složeny z velkého množství molekul, jejich tvar a velikost závisí na chemické povaze detergentu, na koncentraci a dalších faktorech. Taková koncentrace detergentu ve vodě, při které se začínají tvořit micely, je označována jako kritická micelární koncentrace. Pod hodnotou této koncentrace existují molekuly detergentu v roztoku volně. Pokud se koncentrace detergentu ve vodě zvýší nad tuto hodnotu, začínají se tvořit micely ve velkém množství, zatímco koncentrace volného detergentu zůstává stejná jako hodnota kritické micelární koncentrace.

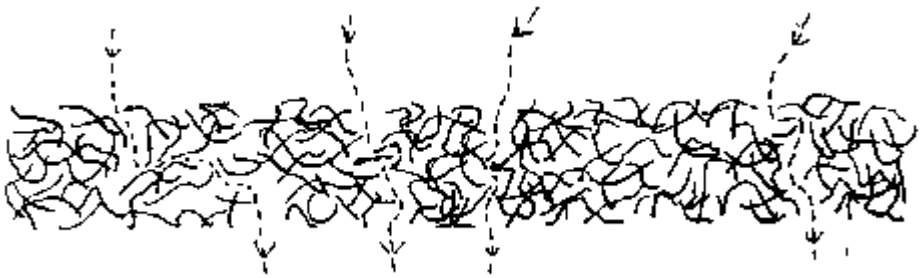
Ve srovnání s fosfolipidy jsou detergenty vysoce rozpustné jak ve vodě, tak i v organickém roztoku, a existuje rovnováha mezi molekulami detergentu ve vodné fázi a molekulami, které jsou součástí micel.[21]

1.7.4.3 <u>Membránová extruze lipozómů</u>

Membránová extruze se řadí mezi mírnější způsoby zmenšení velikosti lipozómů, během které jsou lipozómy protlačovány přes membránový filtr o definované velikosti pórů. Touto metodou se získá poměrně homogenní populace lipozómů s maximální velikostí odpovídající rozměru pórů příslušného filtru, který byl během extruze použit.

Membránové filtry používané během extruze se dělí na dva základní typy. Prvním z nich jsou membrány typu „klikaté cesty“ (tortuous path) (obr. 12), které se často používají pro sterilní filtraci. Skládají se z vláken, která jsou vzájemně různě propletena a tvoří tak základ membrány. Mezi těmito vlákny se nacházejí volné prostory, které tak dávají vznik přirozeně se vyskytujícím kanálkům. Tyto kanálky kopírují jednotlivá vlákna tak, že

na příčném řezu membránou vypadají jako klikatá cesta (odtud název tohoto typu membrán). Průměr kanálků je ovlivněn hustotou vláken v membráně.



Obr. 12: Membrána typu „klikaté cesty“ (tortuous path) (šipky naznačují průběh kanálků mezi vlákny)[21]

Druhou skupinu filtrů představují “nucleation track“ membrány, kterými dokonce projdou i ty lipozómy, které jsou větší než je průměr pórů. Tento typ membrán se skládá z velmi tenké souvislé vrstvy polymeru (nejčastěji polykarbonátu), ve které jsou pomocí laseru a chemického leptání vytvořeny póry o přesně definované velikosti procházející kolmo membránou. Jelikož póry procházejí membránou z jedné strany na druhou přímo, kladou tak mnohem menší odpor než výše uvedené filtry tvořené vlákny. Vrozená flexibilita fosfolipidových lamel umožňuje lipozómům měnit jejich konformaci, tudíž se velmi snadno protlačí póry. Nicméně lipozómy, které jsou mnohem větší než je velikost pórů, se během tohoto procesu rozbijí a opouštějí tak membránové póry mnohem menší. Po několika průchodech skrz membránu je u většiny populace lipozómů snížena velikost na takovou hodnotu, která je o něco málo menší než průměr membránových pórů. Přesto je však přítomna malá část lipozómů, která stále nepatrně převyšuje velikost pórů, což je způsobeno jejich schopností protlačit se póry bez rozpadu fosfolipidové dvojvrstvy.

Zařízení používaná pro extruzi jsou stejného typu jako ta, která byla vyvinuta pro ostatní procesy využívající membránovou filtraci pod tlakem, jako je například proteinová koncentrace či diafiltrace.

Technika membránové extruze může být použita ke zpracování jak LUVs, tak i MLVs. U obou těchto typů lipozómů je potřeba mít na paměti, že během jejich průchodu polykarbonátovou membránou dochází k rozbití a znovuvytvoření fosfolipidových dvojvrstev a zároveň k výměně původního obsahu vezikul za suspendující medium. Pokud chceme dosáhnout co možná největšího obsahu ve vodě rozpustných sloučenin uvnitř finálních vezikul, je nutné mít tyto látky přítomné na začátku extruze v suspendujícím mediu. Látky,

které se během extruze nedostanou dovnitř vezikul, mohou být následně odstraněny pomocí různých technik.

V případě MLVs dochází po opakovaných extruzích přes membránu o velikosti pórů 0,1 μm nebo menší k získání mnohem více unilamelární suspenze lipozómů, ve které se velikost vezikul pohybuje okolo průměru pórů membrány, avšak nyní se vyznačují významným vnitřním vodným kompartmentem. Téměř kompletní unilamelární populace lipozómů může být vytvořena již po 5–10 opakovaných extruzích přes dvě k sobě přiložené membrány. Lipozómy získané za použití tak vysokého tlaku se označují termínem „LUVETs“ (Large Unilamellar Vesicles made by Extrusion Techniques; velké unilamelární lipozómy získané technikou extruze) podle jejích původců, ačkoliv rozložení velikosti těchto vezikul odpovídá spíše středně velkým (IUVs) lipozómům.[21]

Rajiv Nayar a kol. studovali vliv teploty, respektive proveditelnost extruze MLVs složených z DSPC a směsi DSPC a cholesterolu (55 : 45 mol) přes dvě membrány s velikostí pórů 100 nm a při teplotě nad a pod hodnotou T_C. Hodnota T_C pro DSPC je 55°C. MLVs složené z čistého DSPC mohly být extrudovány pouze při teplotě vyšší než 55°C. Při teplotách pod 55°C nedocházelo k lipidové extruzi ani při použití extrémně vysokých tlaků (5600 kPa). Oproti tomu MLVs složené ze směsi DSPC a cholesterolu mohly být extrudovány i při teplotě nižší než 55°C, avšak daleko menší rychlostí než ta, která byla pozorována při extruzi nad hodnotou T_C. Podobné výsledky byly dosaženy i u ostatních nasycených fosfatidylcholinů (DMPC, DPPC, DAPC) a jejich směsí s cholesterolem. Z uvedeného jasně vyplývá, že lipidy ve stavu gelu nemohou být extrudovány, a že ani přítomnost cholesterolu nevede k akceptovatelným rychlostem extruze při teplotách nižších než je hodnota T_C.[24]

1.7.4.4 Aktivní loading

Ve všech výše uvedených metodách přípravy lipozómů je obsah jejich vnitřního kompartmentu určen povahou ve vodě rozpustných molekul, které jsou přítomny ve vodném roztoku již během formování membrány lipozómů. Avšak určité typy sloučenin s ionizovatelnými skupinami a ty, které se vyznačují rozpustností ve vodě i v lipidech, mohou být inkorporovány dovnitř lipozómů i po vytvoření kompaktní membrány. Tyto sloučeniny však nesetrvávají uvnitř lipozómů po delší dobu, ale díky svým lipofilním vlastnostem neustále procházejí membránou a ustanovuje se tak dynamická rovnováha mezi koncentrací

molekul uvnitř a vně lipozómů. Metoda aktivního loadingu je založena na změně podmínek uvnitř vezikul tak, že jsou sloučeniny (nejčastěji se jedná o lipofilní aminy) přítomné ve vnitřním kompartmentu ionizovány a tudíž v této formě nemohou prostoupit přes membránu zpět do roztoku. Dochází tak k postupnému hromadění molekul uvnitř lipozómů až do doby, kdy dojde k vyrovnání hodnot pH mezi vnitřní a vnější stranou membrány.[21]

1.8 CÍL PRÁCE

Použití fotosenzitizérů v terapii nádorových, ale i dalších nezhoubných onemocnění se zdá být velmi výhodné a perspektivní. V praxi však jejich využití naráží na řadu problémů týkajících se především poměrně špatné rozpustnosti těchto látek ve vodě. Toto lze ovšem překlenout jednak modifikací PS na periferii (např. zavádění velkého množství hydrofilních skupin, konjugací s ve vodě rozpustnými molekulami atd.) nebo vytvořením vhodného transportního systému (jako jsou např. lipozómy, olejové disperze, micelární systémy).

Cílem mé práce bylo inkorporovat tři druhy barviv, a to ZIP-21Zn, ZIP-44Zn a ZIP-65Zn (viz. kapitola 2.1) do lipozómů vytvořených z dioleoylfosfatidylcholinu (DOPC). U těchto systémů jsem následně počítala vazebné konstanty příslušných barviv s lipozómy tvořených DOPC.

Ve druhé části experimentální práce jsem se zabývala proměřováním absorpčních spekter vzorků obsahujících výše uvedená barviva. Cílem bylo zjistit, jaká je konečná koncentrace příslušného barviva v měřeném vzorku, tedy v lipozómech tvořených DOPC, a jaké jsou celkové ztráty barviva během přípravy vzorků, tzn. jaké množství barviva ulpělo na stěnách baňky a na ploše polykarbonátové membrány během extruze. Dalším úkolem bylo zjistit extinkční koeficient příslušných barviv v lipozómech.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

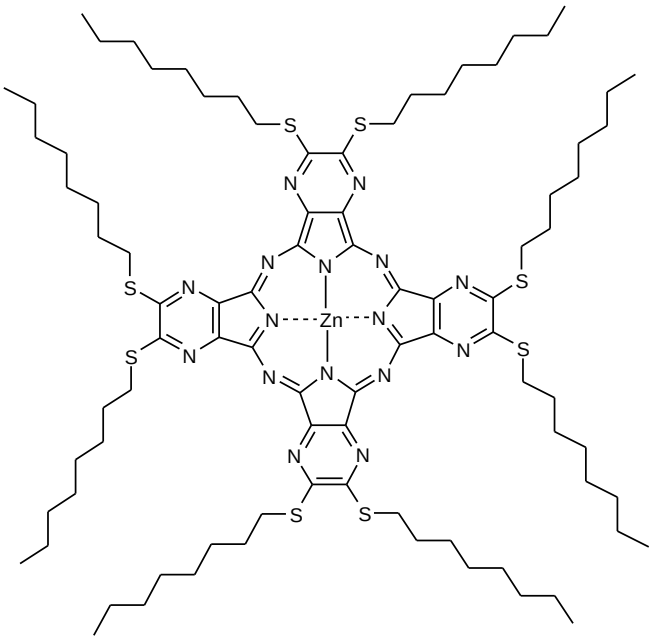
2.1 MATERIÁLY

2.1.1 FOTOSENZITIZÉRY

V následujících pokusech jsem použila níže uvedená barviva, která patří do skupiny azaftalocyaninů (AzaPc) a jež byla syntetizována na pracovišti farmaceutické chemie.[25,26] Z těchto látek jsem připravila zásobní roztoky v tetrahydrofuranu (THF) o koncentraci 100 μM, které byly uskladněny v temnu a při pokojové teplotě.

ZIP-44Zn (1)

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



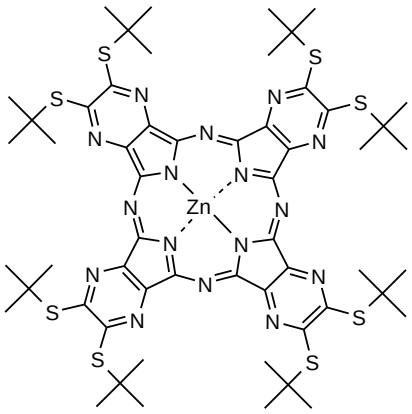
relativní molekulová hmotnost: 1740,05 g/mol

sumární vzorec: $C_{88}H_{136}N_{16}S_8Zn$

procentuální zastoupení prvků: C 60,74 %; H 7,88 %; N 12,88 %; S 14,74 %; Zn 3,76 %

ZIP-21Zn (2)

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



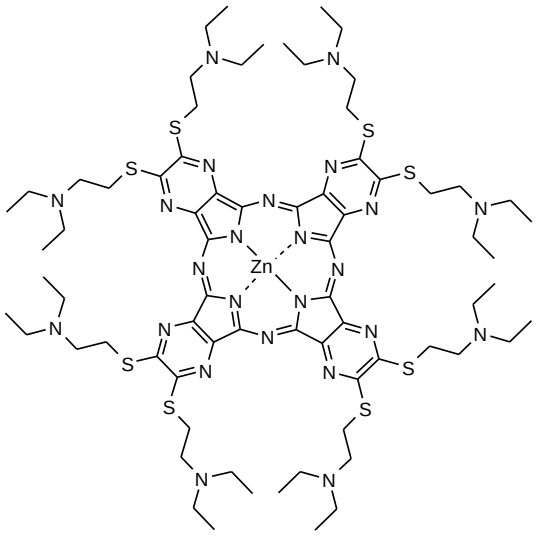
relativní molekulová hmotnost: 1291,19 g/mol

sumární vzorec: $C_{56}H_{72}N_{16}S_8Zn$

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

ZIP-65Zn (3)

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



relativní molekulová hmotnost: 1635,74 g/mol

sumární vzorec: $C_{72}H_{112}N_{24}S_8Zn$

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

2.1.2 FOSFOLIPIDY A ROZPOUŠTĚDLA

V následujících pokusech jsem použila níže uvedené fosfolipidy a rozpouštědla:

1,2-dioleoylfosfatidylcholin (DOPC) původem z firmy Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Německo) je látka bělavé barvy a voskovité konzistence. Její relativní molekulová hmotnost M_r je 786,11 g/mol. DOPC se musí uchovávat při teplotě menší než -20°C a musí být chráněn argonovou atmosférou před vlhkostí. Teplota fázového přechodu T_c ~ -18 °C.

Pro přípravu vzorků jsem používala fosfátový pufr (PBS) (0,01M; pH 7,4; NaCl 0,15M). Nejprve se připravil roztok, který obsahoval 0,01M dihydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4) a 0,01M hydrogenfosforečnanu sodného (Na_2HPO_4) v poměru přibližně 1 : 3,8 (KH_2PO_4 : Na_2HPO_4), čímž se pH nastavilo na hodnotu 7,4. K tomuto roztoku se následně přidal chlorid sodný (NaCl) v takovém množství, aby vznikl 0,15M roztok NaCl.

Rozpouštědla (jedná se o tetrahydrofuran, chloroform, aceton a toluen) byla použita v analytické čistotě a ve stavu, v jakém byla komerčně zakoupena (Penta) s výjimkou tetrahydrofuranu, který byl poté ještě redestilován.

2.2 PŘÍSTROJE A METODIKY

Přístroje

Měření absorbance bylo prováděno na UV-VIS spektrofotometru Shimadzu UV-2401PC.

Měření fluorescence bylo prováděno na fluorescenčním spektrometru AMINCO-Bowman Series 2. Vlnová délka excitace byla nastavena na 386 nm a emise byla měřena při 660 nm.

Pro míchání vzorků byly použity magnetické míchačky a pro intenzivní protřepání (vortexování) vzorků byl použit vortex Heidolph Reax Top s výkonem 100–2400 otáček za minutu.

Extruze lipidové suspenze byla prováděna pomocí malého ručního extrudéru LiposoFast Basic (Avestin, Kanada). Pro vytvoření unilamelárních lipozómů o velikosti přibližně 100 nm byla použita Avestin polykarbonátová membrána o průměru 19 mm a velikosti pórů 100 nm.

Metodika extruze

Extrudér se skládá z nerezového válce, ve kterém je pomocí dvou umělohmotných válečků uchycena polykarbonátová membrána, a ze dvou stříkaček o objemu 1 ml.[27]

Princip přípravy unilamelárních lipozómů definované velikosti pomocí této metody spočívá v opakovaném protlačování suspenze MLVs přes dvě k sobě přiložené polykarbonátové membrány z jedné stříkačky do druhé. K vytvoření lipozómů jednotné velikosti většinou postačí 11–21 průchodů přes membránu podle charakteru výchozí emulze. Takto získané lipozómy se označují termínem LUVETs.

Postup přípravy lipozómů:

Nejprve se rozpustil příslušný fosfolipid (DOPC) v chloroformu ve 100-ml destilační baňce a následně se odpařil na vakuové odparce (teplota vodní lázně je nastavena přibližně na 37°C), přičemž došlo k vytvoření tenkého lipidového filmu na stěnách baňky. Film se následně hydratoval pomocí takového množství PBS, aby vznikl výsledný roztok DOPC v PBS o koncentraci 25 mM, a mírným protřepáním a důkladným smytím celého filmu se vytvořily multilamelární lipozómy. Suspenze se poté ještě promísila na vortexu po dobu 5 minut a nechala se hydratovat další 4 hodiny při pokojové teplotě, aby došlo k důkladné hydrataci.

Následně se provedla extruze při pokojové teplotě. Jedna ze stříkaček se naplnila suspenzí MLVs a upevnila se do extrudéru. Poté se i druhá stříkačka upevnila na opačnou stranu extrudéru a začala se provádět extruze přes dvě membrány z jedné stříkačky do druhé, a to 21krát. Nakonec se výsledná suspenze LUVETs odebrala z původně prázdné stříkačky (v původní stříkačce naplněné suspenzí MLVs totiž vždy zůstane malé množství multilamelárních lipozómů neprotlačených přes membránu).

2.3 POSTUPY PŘÍPRAVY VZORKŮ

POSTUP A

Zásobní roztok unilamelárních lipozómů (LUVETs) o koncentraci 25 mM se pomocí pufru PBS zředil na sérii vzorků s koncentracemi 5–1000 μM. Z této řady se od každé koncentrace odebral objem 2,5 ml do lahviček, které se umístily na magnetické míchačky a za neustálého míchání byl přidán zásobní roztok příslušného barviva v THF (100 μM; 2,5 μl). Výsledná koncentrace barviva ve vzorku byla 0,1 μM. Bylo předpokládáno, že množství THF (0,1 % v/v) nebude mít významný vliv na fosfolipidovou dvouvrstvu LUVETs.[29] Vzorky s přidaným barvivem byly dále míchány po dobu 30 minut. Poté byla ještě suspenze intenzivně protřepána na vortexu vždy po dobu 2 minut. Po každém procesu inkorporace barviva do lipozómů bylo provedeno měření fluorescenčních spekter.

Tuto metodu lze použít pro zjišťování vazebné konstanty. Nevýhodou metody je, že lze pracovat pouze s malými koncentracemi AzaPc. Omezení vyplývá z limitovaného množství přidávaného organického rozpouštědla..

POSTUP B

V tomto případě se přímo do roztoku DOPC v chloroformu před odpařením rozpouštědla přidalo příslušné množství zásobního roztoku barviva v THF tak, aby po extruzi lipozómů vznikla suspenze LUVETs již s barvivem o koncentraci DOPC 2 mM (je to dostatečná koncentrace pro inkorporaci veškerého barviva) a koncentraci barviva 1 μM. Od okamžiku přidání barviva se všechny roztoky uchovávaly v temnu. Dále se postupovalo standardním postupem pro přípravu liposomů (viz výše), tj. odpařil se chloroform jako rozpouštědlo, provedla se hydratace a extruze. Po provedení extruze se u získaného vzorku proměřila absorbance oproti čistému PBS jako slepému vzorku. Pro určení množství barviva inkorporovaného do LUVETs po extruzi se ke známému množství suspenze přidal chloroform, čímž došlo k rozpadu lipozómů a uvolnění barviva, které bylo vytřepáno do chlorofomu. Po extrakci barviva se chloroform odpařil na vakuové odparce, k barvivu se přidal definovaný objem THF a proměřila se absorbance oproti čistému THF jako slepému vzorku. Obdobným způsobem se postupovalo i při stanovení množství barviva, které ulpělo na stěnách baňky a na polykarbonátovém filtru. Baňka a filtr se opatrně promyly vodou, poté

se kapky vody smyly acetonem a přidáním toluenu vznikla azeotropní směs, která se lépe odpařila na vakuové odparce. Po rozpuštění barviva v definovaném množství THF se opět proměřila absorbance.

Tato metoda umožňuje inkorporaci barviv ve vyšších koncentracích a navíc je výsledná suspenze lipozómů zcela bez přítomnosti organického rozpouštědla. Tento fakt je velice důležitý z hlediska biologických testů, které budou uskutečněny v budoucnosti. Nevýhodou této metody je právě to, že se některá barviva mohou nachytat na stěnách baňky nebo ulpět na povrchu polykarbonátové membrány během extruze, což vede ke snížení jejich koncentrace v konečné suspenzi LUVETs.

INKORPORACE BARVIV DO LIPOZÓMŮ – VAZEBNÁ KONSTANTA K_L

Po injikování (metoda A) roztoku barviva do suspenze liposomů (L) dojde po krátké chvíli k ustavení rovnováhy[28,29,30] mezi barvivem ve vodné fázi (X) a inkorporovaných do lipidové dvojvrstvy (XL):

$$X + L \leftrightarrow XL$$

Rovnovážný stav této rovnice je pak charakterizován tzv. vazebnou konstantou K_L. Vazebná konstanta K_L byla pro jednotlivá barviva vypočtena na základě měření fluorescenční intenzity F pro různé koncentrace DOPC od hodnoty 0 do 1000 μM (nejméně 20 různých koncentrací).[29] Při konstantní koncentraci barviva můžeme vazebnou konstantu K_L vypočítat pomocí rovnice

$$F = F_0 + (F_{DOPC} - F_0)\frac{K_L[DOPC]}{1 + K_L[DOPC]} \qquad (1),$$

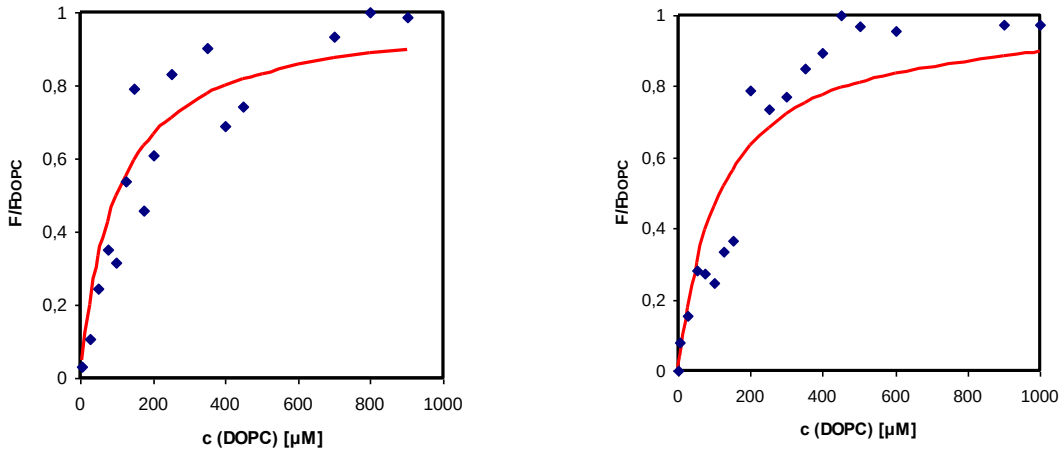
kde [DOPC] je molární koncentrace lipidů a F_0 a F_{DOPC} jsou intenzity fluorescence odpovídající nulové a úplné inkorporaci barviva do vezikul. Jelikož však použitá barviva ve vodném prostředí bez přítomnosti lipidů silně agregují a neposkytují tudíž žádný fluorescenční signál (tzn. $F_0 = 0$), může být rovnice (1) zjednodušena na rovnici:

$$\frac{F}{F_{DOPC}} = \frac{K_L[DOPC]}{1 + K_L[DOPC]} \qquad (2).$$

2.4 VÝSLEDKY A DISKUZE

INKORPORACE BARVIV DO LIPOZÓMŮ

Během přípravy vzorků určených pro měření intenzity fluorescenčních signálů a následný výpočet vazebné konstanty příslušných AzaPc v lipozómech byly dodržovány jednotné podmínky, neboť stupeň inkorporace barviva do LUVETs překvapivě silně závisel na intenzitě míchání a třepání vzorku. Tato skutečnost byla zjištěna na základě postupného získávání informací o testovaných vzorcích, které po intenzivním či dlouhodobém protřepávání vykazovaly daleko vyšší intenzitu fluorescenčního signálu nežli neprotřepané vzorky. Mícháním a třepáním tedy docházelo ke změnám fluorescenční intenzity, avšak tvar fluorescenční křivky ani hodnota vlnové délky, při které vykazovala barviva maximální fluorescenci, zůstávaly konstantní. Tento jev byl pravděpodobně způsoben zvýšenou inkorporací barviv do vezikul. Díky zvýšené inkorporaci se měnily i hodnoty vazebné konstanty. Typická závislost inkorporace barviv do lipozómů v závislosti na koncentraci lipidů je na obr. 13.



a) b)

Obr. 13: Grafy vyjadřující inkorporaci barviva **2** (a) a **3** (b) do DOPC lipozómů v závislosti na koncentraci DOPC po 2 min. vortexování. Koncentrace barviva je 0,1 μM. Jednotlivé body v grafu představují reálné naměřené hodnoty, křivka vyjadřuje průběh teoretickými hodnotami vypočtenými na základě rovnice (2).

Vazebné konstanty byly vypočteny na základě nelineární regrese z naměřených hodnot fluorescence a pomocí rovnice (2) pro koncentraci barviv 0,1 μM. Hodnoty vazebných konstant jsou pro ZIP-44Zn 5,97 × 10^4 M^{-1} po 2 min. vortexování, pro ZIP-21Zn 9,13 × 10^4 M^{-1} po 30 min. míchání, 9,18 × 10^4 M^{-1} po 1 min. vortexování a 9,90 × 10^4 M^{-1} po 2 min. vortexování a pro ZIP-65Zn 5,98 × 10^4 M^{-1} po 30 min. míchání a 8,68 × 10^4 M^{-1} po 2 min. vortexování (viz. tab. 3).

Tab. 3: Hodnoty vazebných konstant barviv

Barvivo	K_L po 30 min. míchání [M^{-1}]	K_L po 1 min. vortexování [M^{-1}]	K_L po 2 min. vortexování [M^{-1}]
1	–	–	5,97 × 10^4
2	9,13 × 10^4	9,18 × 10^4	9,90 × 10^4
3	5,98 × 10^4	–	8,68 × 10^4

Barvivo **1** vykazovalo navíc ve vzorcích během měření fluorescence mnohem nižší intenzitu signálů nežli ostatní dvě barviva. Intenzity fluorescence (kvantové výtěžky) barviv **1** a **2** v organických rozpouštědlech jsou ovšem takřka shodné. Dá se proto předpokládat, že barvivo se inkorporovalo do liposomů v daleko menší míře (fluorescenci poskytuje pouze ta frakce, která je inkorporována do lipidů).

Dle logické úvahy by vazebné konstanty měly růst se zvyšující se lipofilitou látek. Také na základě již získaných poznatků[30] o vztahu mezi hodnotou vazebné konstanty a lipofilitou platí, že vazebná konstanta se zvyšuje s rostoucí lipofilitou inkorporovaných sloučenin. Hodnota vazebné konstanty je ale v našem případě ovlivněna i jinými faktory než je pouze lipofilita. Z dalších provedených měření na naší katedře později vyplynulo, že daleko větší vliv na vazebnou konstantu má agregace barviv ve vodném prostředí.[31]

VLASTNOSTI BARVIV V DOPC LIPOZÓMECH

Vlastnosti barviv v lipozómech byly studovány na vzorcích připravených postupem B. Sloučeniny **2** a **3** se poměrně dobře inkorporovaly do vezikul, což potvrzuje množství barviva detekovaného po extrakci z LUVETs, přičemž jejich ztráta na filtru a stěnách baňky byla relativně malá (tab. 4).

Procentuální množství barviva inkorporovaného do lipozómů a množství, které se nachytalo na stěnách baňky a na filtru je uvedeno v tab. 4.

Tab. 4: Množství barviva inkorporovaného do DOPC (metoda B)

Barvivo	Zůstalo na filtru	Zůstalo v baňce	V liposomech
1[a]	80,2 % (14,1 %)	12,6 % (78,4 %)	7,1 % (7,5 %)
2	8,7 %	2 %	89,3 %
3	18,3 %	45,9 %	35,8 %

[a] V závorce jsou uvedeny výsledky druhého měření.

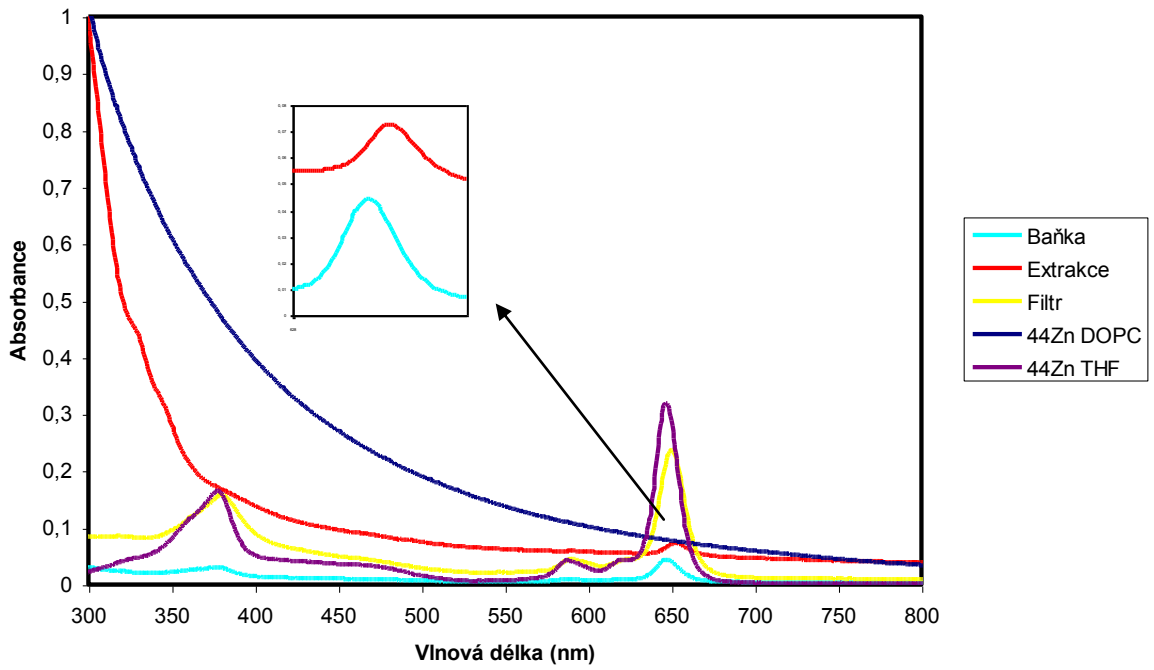
Naopak barvivo **1** bylo velmi těžké inkorporovat do LUVETs. Většina této látky se totiž zachytila na filtru během extruze nebo zůstala na stěnách baňky a pouze nepatrné množství bylo přítomné v lipozómech po provedení extruze (experiment byl proveden dvakrát). Z tohoto důvodu nebylo možné vypočítat jeho extinkční koeficient v LUVETs vzhledem k nedetekovatelné hodnotě absorbance (tab. 5).

Pro měření absorbance (viz obr.14 a 15) všech vzorků bylo použito rozpouštědlo THF, protože v něm dochází pouze k minimální agregaci použitých barviv a výsledky pak lze jednoduše spočítat dle Lambert-Beerova zákona (extinkční koeficient není ovlivněn agregací při vyšších koncentracích). Během extrakce barviv do chloroformu ovšem přešly z vodné vrstvy také lipidy. Barviva tak zůstala po odpaření rozpuštěna také ve zbytku těchto lipidů. Naneštěstí není THF úplně ideálním rozpouštědlem pro DOPC, a proto v roztoku zůstala suspenze lipidů, ve kterých bylo barvivo pravděpodobně i částečně rozpuštěno. Lze to pozorovat i z naměřených hodnot λ_{max} v THF po extrakci (viz tabulka 5). Po extrakci jsou hodnoty λ_{max} barviv v THF bližší spíše hodnotám v lipidech než hodnotám v čistém THF. Výsledky mohou být proto tímto faktorem ovlivněny. V dalších studiích[31] byla proto zvolena jiná rozpouštědla (chloroform, dimethylformamid), která jsou schopna rozpustit barvivo i lipozómy, aby tak došlo k úplné extrakci.

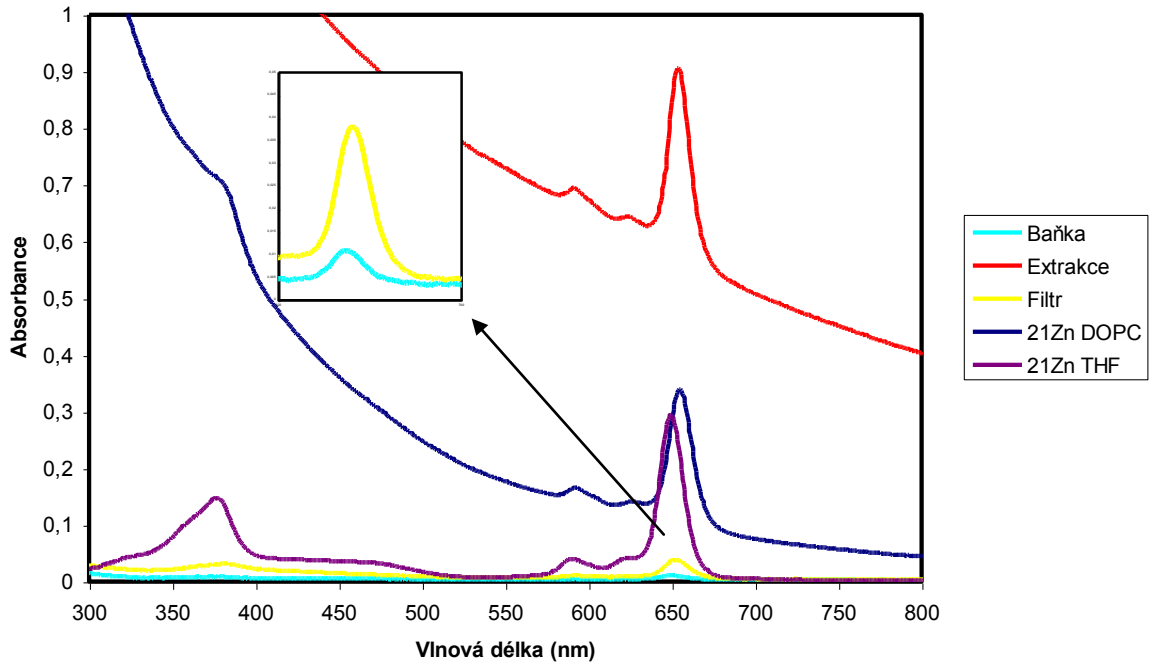
Hodnoty zjištěných extinkčních koeficientů barviv v THF a v LUVETs společně s maximální vlnovou délkou jsou uvedeny v tab. 5.

Tab. 5: Spektrální data barviv v THF a LUVETs

Barvivo	λ_{max} (THF)	ε (THF)	λ_{max} (LUVETs)	ε (LUVETs)	λ_{max} (THF) po extrakci
1	646,8	315 800	–	–	653,0
2	649,4	290 800	655,0	243 200	653,8
3	650,0	259 200	655,8	302 100	654,4



Obr. 14: UV-VIS absorpční spektrum barviva **1** (spektrum barviva zachyceného na stěnách baňky, získaného extrakcí z DOPC, zachyceného na filtru, inkorporovaného v DOPC lipozómech a rozpuštěného v čistém THF)



Obr. 15: UV-VIS absorpční spektrum barviva **2** (spektrum barviva zachyceného na stěnách baňky, získaného extrakcí z DOPC, zachyceného na filtru, inkorporovaného v DOPC lipozómech a rozpuštěného v čistém THF)

3 ZÁVĚR

Moje práce měla charakter pilotního projektu při práci s lipozómy. V průběhu experimentální práce se objevilo několik problémů, které, jak se později ukázalo, měly vliv na hodnotu vazebných konstant příslušných barviv. Jednalo se o inkorporaci barviv do lipozómů, kdy jsem dospěla k poznatku, že doba míchání a intenzita vortexování mají významný vliv právě na míru inkorporace do vezikul a tudíž i na hodnoty K_L. Dalším problémem bylo ulpívání barviva (v případě barviva **1**) na stěnách baňky a především na filtru během extruze (příprava metodou B), čímž se nezanedbatelně snížila jeho koncentrace v měřeném roztoku a nebylo tedy možné vypočítat jeho extinkční koeficient v LUVETs vzhledem k nedetekovatelné hodnotě absorbance. Určitou nevýhodou bylo také použití rozpouštědla THF pro extrakci barviv, jelikož část barviv zůstala inkorporována v lipidech, což mohlo vést k částečnému zkreslení výsledků.

Výsledky experimentální části nebylo možno v době ukončení práce rozumně vyhodnotit a objasnit, avšak i přes výše zmíněné problémy posloužily jako základ pro další studie chování barviv při interakci s lipozómy. Následující pokusy[31] (viz přiložený článek na konci rigorózní práce) odhalily významný poznatek vlivu agregace ve vodě nerozpustných AzaPc na inkorporaci do lipozómů. O tomto vlivu na inkorporaci AzaPc a ftalocyaninů do lipozómů se do této doby nezmiňovala žádná práce, a proto jsem v době mých experimentů neměla pro určité chování látek žádné vysvětlení. Experimentálně získané hodnoty vazebných konstant těchto ve vodě nerozpustných AzaPc více odpovídaly jejich tendenci agregovat nežli lipofilitě jednotlivých sloučenin, která byla považována za nejdůležitější faktor (ne-li jediný) ovlivňující inkorporaci a vazebnou konstantu do té doby[32].

Na základě všech zjištěných poznatků je nutné při přípravě transportních systémů ve vodě nerozpustných AzaPc, které jsou založeny na principu lipozómů, věnovat pozornost jejich sklonu k agregaci. Molekuly těchto barviv s dlouhým alkylovým řetězcem (jako je např. **1**) se vyznačují nezanedbatelnou agregací v biologickém prostředí způsobenou velkými agregačními silami, což omezuje jejich inkorporaci do vezikul. I když se zdá být agregace těchto látek v organických rozpouštědlech relativně malá, v biologickém prostředí nabývá velkého významu. Naopak barviva, která obsahují ve své molekule *terc*-butyl navázaný na makrocyklický kruh AzaPc, jsou schopna inkorporovat se v poměrně vysoké koncentraci do fosfolipidové dvouvrstvy lipozómů ve formě monomerů.

V budoucnosti tedy můžeme předpokládat využití tohoto typu barviv v PDT, neboť lipidová dvojvrstva lipozómů je strukturně podobná membránám lidských buněk a tudíž lze očekávat i zde jejich existenci v podobě monomerů (aktivní forma) ve vysoké koncentraci.

Studie interakcí azaftalocyaninů s unilamelárními lipozómy I.

Helena Kučerová

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Heyrovského 1203, Hradec Králové, 50005, Česká Republika

Abstrakt:

Do lipozómů vytvořených z dioleoylfosfatidylcholinu (DOPC) byly inkorporovány tři druhy barviv charakteru azaftalocyaninů. Jedná se o různě oktasubstituované zinečnaté tetrapyrazinoporfyraziny, jmenovitě ZIP-44Zn (*n*-oktylsulfanyl), ZIP-21Zn (*terc*-butylsulfanyl) a ZIP-65Zn (diethylaminoethylsulfanyl). Tato barviva byla inkorporována do LUVETs (large unilamelar vesicles made by extrusion technique), jež byly získány postupnou hydratací DOPC a následnou extruzí vzniklé suspenze multilamelárních lipozómů. U těchto soustav byla proměřena fluorescenční spektra a na jejich základě vypočteny vazebné konstanty pro jednotlivá barviva v LUVETs. Rovněž byla proměřena absorpční spektra vzorků a na jejich základě vypočteny extinkční koeficienty barviv v lipidové dvojvrstvě a hodnoty výsledných koncentrací barviv v lipozómech. Bylo zjištěno, že barvivo ZIP-44Zn bylo přítomno v DOPC lipozómech jen v nepatrném množství, zatímco zbylá dvě barviva byla v lipozómech v poměrně vysoké koncentraci. Toto souviselo s mírou agregace ve vodě nerozpustných AzaPc, kdy barvivo ZIP-44Zn mající ve své molekule dlouhé alkylové řetězce podléhalo ve vodném prostředí značné agregaci. Druhá dvě barviva obsahující *terc*-butyl, jenž snižuje intenzitu působení agregačních sil, byla naopak inkorporována ve vysoké koncentraci do fosfolipidové dvojvrstvy lipozómů ve formě monomerů.

The study of azaphthalocyanines interactions with unilamellar liposomes I.

Helena Kučerová

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Heyrovskeho 1203, Hradec Kralove, 50005, Czech Republic

Abstract:

Three types of different octasubstituted zinc azaphthalocyanines (ZIP-44Zn, ZIP-21Zn and ZIP-65Zn) were incorporated into liposomes made from dioleoylphosphatidylcholine (DOPC). These dyes were incorporated into LUVETs (large unilamellar vesicles made by extrusion technique) which were obtained from suspension of multilamellar vesicles. Fluorescence spectra of the dyes in LUVETs were measured. The binding constants of azaphthalocyanines with LUVETs were calculated. Absorption spectra of the dyes in LUVETs were also measured and extinction coefficients were calculated. We found out that ZIP-44Zn (*n*-octylsulphanyl substituents) was present in DOPC liposomes only in very small amount while the other two dyes were incorporated in high concentration into LUVETs. This fact was connected with the level of aggregation of water insoluble AzaPc. ZIP-44Zn contains long alkyl chains as substituents on periphery. These substituents do not inhibit sufficiently the aggregation in water medium or in lipid bilayer. On the other hand, ZIP-21Zn and ZIP-65Zn contain bulky substituents on periphery and they were incorporated in large amount in phospholipid bilayer of liposomes.

4 LITERATURA

[1] Ahmad, N., H. Mukhtar (2000) Mechanisms of photodynamic therapy – induced cell death. *Methods Enzymol*. **319**, 342–358.

[2] Zimčík, P., M. Miletín (2004) Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění I. Historie, základní princip. *Čes. Slov. Farm*. **53**, 219–224.

[3] Brown, S.B., E.A. Brown, I. Walker (2004) The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.* **5**, 497–508.

[4] Zimčík, P., M. Miletín (2004) Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění II. Přehled fotosenzitizérů. *Čes. Slov. Farm*. **53**, 271–279.

[5] Schwartz, S., *Minnesota university's Medical Bulletin* (1955) **7,** 27.

[6] Sternberg, E.D., D. Dolphin, Ch. Brűckner (1998) Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron* **54**, 4151–4202.

[7] Sharman, W.M., C.M. Allen, J.E. van Lier (2000) Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods Enzymol*. **319**, 376–400.

[8] Foote, C. S. (1991) Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol*. **54**, 659.

[9] Castano, A.P., T.N. Demidova, M.R. Hamblin (2004) Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagn. Photodyn. Ther*. **1**, 279–293.

[10] Jori, G., J.D. Spikes (1990) Photothermal sensitizers: possible use in tumor therapy. *J. Photochem. Photobiol. B:Biol.* **6**, 93–101.

[11] Magda, D., M. Wright, R.A. Miller, J.L. Sessler, P.I. Sansom (1995) Sequence-specific photocleavage of DNA by an expanded porphyrin with irradiation above 700 nm. *J. Am. Chem. Soc*. **117**, 3629–3630.

[12] Fuchs, J., J. Thiele (1998) The role of oxygen in cutaneous photodynamic therapy. *Free Radic. Biol. Med*. **24**, 835–847.

[13] Dougherty, T.J., C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng (1998) Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst*. **90**, 889–905.

[14] Usuda, J., H. Kato, T. Okunaka, K. Furukawa, H. Honda, Y. Suga, T. Hirata, T. Ohira, M. Tsuboi, T. Hirano (2006) Photodynamic therapy using Laserphyrin for centrally located early stage lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, **24** (18S), 7229

[15] Drugs.com [online] (2007), posl.revize 31.8.2007 [cit. 2007-10-09]. Dostupné z: www.drugs.com/nda/hexvix_060420.html

[16] Lang, A., J. Mosinger, D.M. Wagnerova (2004) Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. *Coord. Chem. Rev.* **248**, 321–350.

[17] Konan, Y.N., R. Gurny, E. Allémann (2002) State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*. **66**, 89–106.

[18] Rosenthal, I. (1991) Phthalocyanine as photodynamic sensitizers. *Photochem. Photobiol*. **53**, 859–870.

[19] Van Berkel, Th.J.C. (1993) Drug targeting: application of endogenous carriers for site-specific delivery of drugs. *J. Control. Release* **24**, 145–155.

[20] Chalabala, M. et al., Technologie léků (druhé vydání) (2001) Galén Praha, 193–225.

[21] New, R.R.C. (editor), Liposomes – a practical approach (1990) Oxford University Press, New York, 1–104.

[22] Waisser, K., K. Palát, Bioorganická chemie (2001) Karolinum, 79.

[23] Batzri, S., E.D. Korn (1973) Single bilayer liposomes prepared without sonication *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 1015–1019.

[24] Nayar, R., M.J. Hope, P.R. Cullis (1989) Generation of large unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidylcholines by extrusion technique. *Biochim. Biophys. Acta* **986**, 200–206.

[25] Zimčík, P., M. Miletín, Z. Musil, K. Kopecký, L. Kubza a D. Brault (2006) Cationic azaphthalocyanines bearing aliphatic tertiary amino substituents – Synthesis, singlet oxygen production and spectroscopic studies. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem*. **183**, 59–69.

[26] Kostka, M., P. Zimčík, M. Miletín, P. Klemera, K. Kopecký a Z. Musil (2006) Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem*. **178**, 16–25.

[27] MacDonald, R.C., R.I. Mac Donald, B.Ph.M. Menco, K. Takeshita, N.K. Subbarao, L. Hu (1991) Small-volume extrusion apparatus for preparation of large unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1061**, 297–303.

[28] Rodriguez, M.E., J. Awruch, L. Dicelio (2002) Photophysical properties of Zn(II) phthalocyaninates incorporated into liposomes. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **6**, 122–129.

[29] Kuzelová, K., D Brault (1994) Kinetic and equilibrium studies of porphyrin interactions with unilamellar lipidic vesicles. *Biochemistry* **33**, 9447–9459.

[30] Bronshtein, I., M. Afri, H. Weitman, A.A. Frimer, K.M. Smith a B. Ehrenberg (2004) Porphyrin depth in lipid bilayers as determined by iodide and parallax fluorescence quenching methods and its effect on photosensitizing efficiency. *Biophys. J*. **87**, 1155–1164.

[31] Zimčík, P., M. Miletín, K. Kopecký, Z. Musil, P. Berka, V. Horáková, H. Kučerová, J. Zbytovská, D. Brault (2007) Influence of aggregation on interaction of lipophilic, water insoluble azaphthalocyanines with DOPC vesicles. *Photochem. Photobiol*. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00193.x

[32] Kępczyński, M, R.P. Pandian, K. M. Smith, B. Ehrenberg (2002) Do liposome-binding constants of porphyrins correlate with their measured and predicted partitioning between octanol and water? *Photochem. Photobiol.* **76**, 127–134.