

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv



**SOLUBILIZAČNÍ SYSTÉMY PRO POTENCIÁLNÍ
FOTODYNAMICKY AKTIVNÍ LÁTKY IV.**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D.

Hradec Králové, 2010

Petra Hlavinková

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové, 2010

Petra Hlavinková

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat svému školiteli PharmDr. Miroslavu Miletínovi, Ph.D.
za odborné vedení při zpracovávání diplomové práce.

1. ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá přípravou solubilizačních systémů pro potenciálně fotodynamicky aktivní látky. Cílem bylo zjistit rozpustnost lipofilních fotosenzitizérů typu azaanalogů ftalocyaninů v několika olejích. Jako vhodné se ukázaly MCT pro ZIP21Zn a MUZ21Zn a ricinový olej pro P9Zn, se kterými se podařilo připravit mikroemulze (jako emulgátor jsme použili Cremophor® EL). Následně jsme měřili molární extinkční koeficienty fotosenzitizérů s vybranými oleji. U fotosenzitizéru ZIP21Zn v MCT byl naměřen molární extinkční koeficient $354400 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ při vlnové délce 653 nm, pro MUZ21Zn v MCT $416000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (746 nm) a u P9Zn v ricinovém oleji $352200 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (703 nm). U vybraných předem připravených roztoků byly změřeny absorbance a stanoveny koncentrace fotosenzitizéru. MUZ21Zn a ZIP21Zn v MCT byly převedeny na mikroemulze, u kterých byly poté měřeny absorbance a sledována stabilita barviva v mikroemulzi. Fotosenzitizér MUZ21Zn není v mikroemulzi ani krátkodobě stabilní. U mikroemulze se samotným ricinovým olejem byla změřena velikost částic.

ABSTRACT

The presented thesis deals with development and preparation of solubilisation systems for potentially photodynamically active substances. The aim was to determine the solubility of lipophilic photosensitizers of phthalocyanines azaanalogues type in several oils. MCT have been found suitable for ZIP21Zn and MUZ21Zn, and castor oil for P9Zn. These PS-in-oil solutions were incorporated into microemulsions using Cremophor[®] EL as the emulsifier. Molar extinction coefficients of photosensitizers in selected oils were also measured. For photosensitizer ZIP21Zn in MCT was found molar extinction coefficient $354400 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ at the wavelength of 653 nm; for MUZ21Zn in MCT was found the coefficient $416000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (746 nm), and for P9Zn in castor oil $352200 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (703 nm). For selected solutions, prepared beforehand, the absorbance was determined and the concentration of photosensitizers counted. At the MUZ21Zn and ZIP21Zn after conversion to microemulsions the absorbances in the microemulsions were also established and the stability of dyes in these microemulsions studied. The photosensitizer MUZ21Zn is not even short-time stable in microemulsion. The particles size was measured at microemulsion with castor oil.

OBSAH

1.	ABSTRAKT	4
2.	TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1.	ÚVOD.....	7
2.2.	FOTOSENZITIZÉRY.....	9
2.3.	KOLOIDNÍ TRANSPORTNÍ SYSTÉMY LÉČIV	15
3.	CÍL PRÁCE	34
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
4.1.	POUŽITÉ SUROVINY	35
4.2.	POUŽITÉ FOTOSENZITIZÉRY	37
4.3.	PŘÍSTROJE	38
4.4.	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ S BARVIVY	39
4.5.	STANOVENÍ MOLÁRNÍCH EXTINKČNÍCH KOEFICIENTŮ VE VYBRANÝCH LIPIDECH.....	42
4.6.	MĚŘENÍ ABSORBANCE A STANOVENÍ KONCENTRACE ROZTOKŮ	49
4.7.	PŘÍPRAVA MIKROEMULZÍ SAMOTNÝCH OLEJŮ BEZ BARVIV	54
4.8.	PŘÍPRAVA MIKROEMULZÍ S BARVIVY V MTC	56
4.9.	MĚŘENÍ STABILITY BARVIV V MIKROEMULZÍCH.....	57
5.	DISKUZE	60
6.	ZÁVĚR.....	62
7.	SEZNAM ZKRATEK	63
8.	LITERATURA.....	64

2. TEORETICKÁ ČÁST

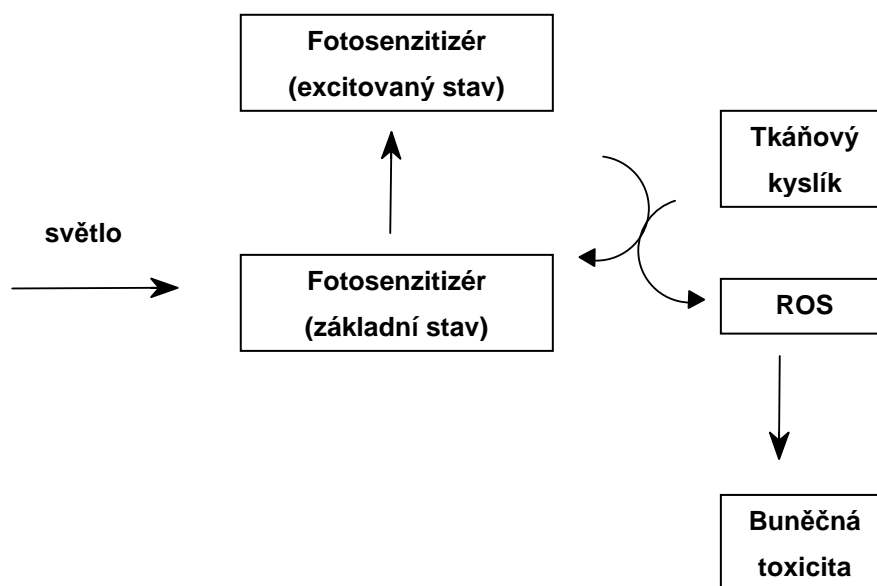
2.1. ÚVOD

Terapie solidních zhoubných nádorů je v počátečním stádiu především chirurgická, v dalších stádiích hraje významnou roli radioterapie a internistická léčba, tedy chemoterapie, hormonální léčba a v posledních letech tzv. cílená léčba. Klinická onkologie se v posledních 15 letech rozvíjí mimořádně rychle. Je to především díky poznatkům z oblasti molekulární biologie a pokrokům v biotechnologiích. Onkologická onemocnění jsou trvalou hrozbou. Jejich počet u nás trvale narůstá a jsou v naší republice na druhém místě v příčině úmrtí hned za onemocněním srdce a cév.

Na rozdíl od protinádorové chemoterapie, která zasahuje DNA společnou pro všechny buňky, tedy i zdravé, je cílená protinádorová léčba zaměřena na molekuly či procesy typické pro nádorové buňky. Tím se zvyšuje nejen účinnost protinádorové zásahu, ale současně se snižuje riziko výskytu závažných nežádoucích účinků, které tak dobře známe při použití protinádorové chemoterapie. Ani cílená protinádorová léčba není samozřejmě zcela bez nežádoucích účinků, ale přesto představuje významný nový léčebný potenciál¹.

Mezi nové metody pro léčbu nádorových onemocnění patří fotodynamická terapie (photodynamic therapy, PDT). Je založená na podání fotosenzitivní látky, jež se po aplikaci hromadí přednostně v nejrychleji prolifерujících buňkách a po ozáření světlem určitého spektra způsobí smrt odpovídajících buněk².

PDT zahrnuje spolupůsobení tří složek, které samy o sobě nejsou toxické a neprojevují žádné biologické efekty. Jedná se o kombinaci fotosenzitizující látky (photosensitizer, PS), světla a kyslíku³. PDT pracuje na principu předání energie absorbované PS molekulárnímu kyslíku, z něhož vytváří reaktivní formy kyslíku (angl. reactive oxygen species, ROS) jako např. volné radikály a singletový kyslík (obr. 1)⁴. ROS následně napadají okolní biomolekuly, dochází k jejich oxidaci a porušení funkce v buňce, což vede ke smrti zasažené buňky⁵. Na konečném zničení maligní tkáně a nádorových buněk se také podílí cévní poškození znemožňující zásobení tkáně krví a živinami s následnou ischemií tumoru, fagocytární imunita a záněť³.



Obr. 1. Zjednodušený princip PDT

Výhodou fotodynamické terapie je téměř nulová toxicita použité látky bez přístupu světla, proto ve srovnání například s chemo- či radioterapií ji lze v krátkém časovém intervalu mnohokrát opakovat. Další výhodou u některých PS je určitá poměrně přesná selekce nádorových buněk, která je založena na rozdílu v koncentraci senzitizeru mezi normální a cílovou tkání. Metoda tedy zničí především nádorové buňky a okolní zdravé zůstanou neporušeny. Za zmínku také stojí asi nejzřejmější výhoda, a to že se řadí mezi neinvazivní metody.

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

Nejvýznamnější uplatnění nalézá fotodynamická terapie při léčbě různých druhů tumorů, a to jak maligních (zhoubných), tak benigních (nezhoubných). Většinou se zatím jedná o léčbu paliativní nebo doplňkovou, nejčastěji chirurgického zásahu. Jak již bylo zmíněno výše, největším

omezením fotodynamické terapie je průchod aktivizujícího světla nejvýše 1cm do hloubky tkáně. Přesto byla s úspěchem použita pro léčbu nádorů žaludku, tlustého střeva, hlavy a krku, ústní a nosních dutin, hrtanu, hltanu, jícnu, plic, močového měchýře, jater, prsu, genitálií i mozku. Nejčastěji se ovšem používá pro léčbu nejrůznějších kožních tumorů a lézí; za všechny zmiňme např. aktinickou keratózu, basaliom či T-lymfom. V kožním lékařství se používá také k léčbě lupénky, bradavic, nebo v estetické medicíně k vyhlazení jizev po akné či vrásek, kdy aktivuje fibroblasty k novotvorbě kolagenu. Využití nachází metoda také při léčbě senilní degenerace makuly (AMD). Velmi nadějnou aplikací je čištění kostní dřevě od leukemických buněk, kdy se pacientovi odebere kostní dřevě, vyčistí se metodou fotodynamické terapie a coby autologní štěp vrátí zpět pacientovi².

PDT je tedy velice slibná metoda pro různá onkologická, kardiovaskulární, kožní a oční onemocnění. Jedním z hlavních problémů, s kterými se PDT potýká a který značně omezuje využití fotosenzitizérů v terapii, je obtížnost přípravy farmaceutických formulací, které by byly vhodné pro parenterální aplikaci PS. Hydrofobní PS nemohou být jednoduše aplikovány intravenózně kvůli jejich velmi nízké rozpustnosti ve vodě. A proto probíhá v této oblasti rozsáhlý výzkum, který se zabývá různými metodami umožňující aplikaci hydrofobních PS do organismu. Navíc je snaha o přípravu takových systémů, které by cíleně dopravily PS do nádorové tkáně a následně tak snížily výskyt vedlejších nežádoucích účinků PDT (především nežádoucí vliv na okolní zdravou tkáň).

2.2. FOTSENZITIZÉRY

Fotosenzitizéry jsou látky schopné absorbovat světlo specifické vlnové délky a transformovat jej na užitečnou energii. Jedna z nejdůležitějších vlastností PS je schopnost výrazněji se kumulovat v nemocné tkáni s následnou produkcí cytotoxických agens a indukci požadovaných biologických efektů⁶.

Fotosenzitizér (PS) se obvykle podává intravenózně a rychle se distribuuje do tělesných tkání. Asi za 48 – 72 hod po podání mohou fotosenzitizující látky dosáhnout znatelně vyšší koncentrace v tumorózní tkáni než v okolní zdravé tkáni. Ačkoliv přesný mechanismus selektivního vychytávání fotosenzitizéru není dosud zcela pochopen, lze tento proces alespoň částečně objasnit.

Je pravděpodobné, že důvodem je abnormální fyziologie samotného nádoru, jako je např. nedostatečná lymfatická drenáž, zvýšená fagocytóza, větší propustnost cévní stěny v nádorové tkáni, kyselější pH v oblasti nádoru. K selektivnímu vychytávání PS také přispívá zvýšené množství receptorů pro LDL (lipoproteiny s nízkou hustotou) na buněčné membráně, které jsou schopny navázat fotosenzitizér a v neposlední řadě také abnormální složení stroma nádorové tkáně⁷.

Většina fotosenzitizérů dnes používaných nebo testovaných v PDT vychází z porfyrinového cyklu. Dosud nejrozšířenější a nejpoužívanější PS je Photofrin[®], ale z důvodu výskytu velkého počtu nežádoucích účinků a vlastností se výzkum zaměřil na nové typy PS.

Postupem času se třídily a formulovaly určité vlastnosti ideálního PS. Zatím žádnou z dosud známých a používaných látek nemůžeme považovat za ideální, ale novější látky se alespoň tomuto ideálnímu PS v mnohém přibližují¹⁰.

2.2.1. VLASTNOSTI IDEÁLNÍHO FOTOLENIZITIZÉRU^{8,9}

- Chemická čistota, známé složení a stabilita – u starších látek byl problém, neboť se jednalo o směsi špatně separovatelných mono-, di- a oligomerů (např. u derivatizovaného hematoporfyrinu). Novější látky jsou většinou lépe charakterizovatelné.
- Optimální spektrální vlastnosti – silná absorpce v červené oblasti viditelného spektra (650 – 800 nm), kdy je penetrační schopnost světla maximální a přitom má dostačující energii pro účinnou excitaci PS. Světlo nižších vlnových délek méně proniká do tkáně a zvyšuje se také pravděpodobnost výskytu kožní fotosenzitivity. Zvyšování nad 800 nm není příliš účelné z hlediska nízké energie záření a proto nemusí docházet k účinné aktivaci PS.
- Minimální toxicita ve tmě – jak u člověka, tak i u pokusných zvířat má být PS toxický jen po ozáření světlem odpovídající vlnové délky, která vede k jeho aktivaci. Fotosenzitizér by neměl vykazovat ani zprostředkovanou toxicitu (např. hypotenzi, alergickou reakci).

- Vyhovující fotochemické vlastnosti – má být produkováno velké množství tripletového stavu PS, který má mít tak dlouhé trvání, aby došlo k dostatečné produkci singletového kyslíku, hlavního cytotoxického agens.
- Ideální rozpustnost ve vodě nebo ve směsi hydrofilních rozpouštědel. PS by také neměl nadměrně agregovat v biologickém prostředí, protože by se tím snížila jeho fotochemická účinnost.
- Selektivní kumulace PS především v nádorové tkáni oproti jiným tkáním.
- Rychlé vyloučení z těla pacienta – zbylý PS by neměl zůstat dlouho v krvi, jinak by mohl způsobit systémovou toxicitu. Pokud je PS eliminován do jednoho dne po léčbě, nehrozí problém dlouhodobé kožní fotosenzitivity a pacient se nemusí chránit před světlem.
- Snadná dostupnost a modifikovatelnost – syntéza PS by měla být relativně snadná a taktéž modifikace např. postranních řetězců, pro zlepšení farmakokinetických vlastností.
- Cenová dostupnost a snadná aplikace do průmyslové výroby.
- Fluorescence PS pro možnost vizuální kontroly.

2.2.2. ROZDĚLENÍ FOTOLENITIZÉRU

PS mohou být rozděleny do tří generací. Do první generace patří deriváty hematoporphyrinu, které mají mnoho nevýhodných vlastností (nejsou přesně chemicky definovány, aktivují se při nízké vlnové délce – 630 nm). Do druhé generace PS řadíme různé látky odvozené od porfyrinů a také látky jiných chemických struktur. Jsou excitovány po použití světla delších vlnových délek (670 – 800 nm). Jako látky třetí generace se označují fotosenzitizéry druhé generace spojené s různými biomolekulami (např. protilátkami), které umožňují cílené směřování léčiva do příslušných struktur¹⁰.

2.2.2.1. 1. GENERACE PS¹⁰

HpD (porfimer sodium, Photofrin[®], Photohem[®], Photosan[®])

HpD (z angl. hematoporphyrin derivative) je směs dimerů a oligomerů spojených etherovými nebo esterovými vazbami, která se připravuje z hematoporphyrinu. Hematoporphyrin je získáván z hemu (barevné části hemoglobinu), který je samotný fotodynamicky neúčinný, působením kyseliny borité v kyselém prostředí. Po reakci s kyselinou sírovou a následnou hydrolyzou s hydroxidem sodným a neutralizací získáme HpD. Vzniklá směs je dále čištěna gelovou chromatografií a stala se základem pro Photofrin[®].

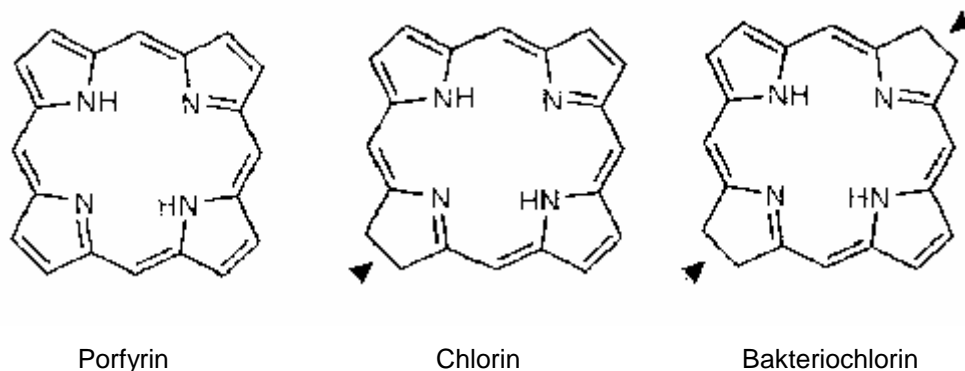
Photofrin[®] má několik nevýhodných vlastností. Jednou z nich je nízká vlnová délka vhodná pro aktivaci – 630 nm a nízký extinkční koeficient $1170 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, proto je potřeba vysokých dávek PS i světla. Další nevýhodou je obtížné stanovení jeho přesného složení (po vyčištění se stále skládá ze směsi asi 60 látek). Také vychytávání v nádorech není příliš selektivní a jeho vysoké koncentrace lze nalézt v játrech, ledvinách, slezině a zejména kůži¹¹. V kůži pak přetrvává až 6 týdnů, což způsobuje dlouhodobou fotosenzitivitu, proto se pacient musí vyvarovat kontaktu s ostrým světlem.

I přes veškeré výše uvedené nežádoucí vlastnosti 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)^{6,12}.

2.2.2.2. 2. GENERACE PS

Látky druhé generace se vyznačují především nižší kožní fotosenzitivitou po léčbě. Jsou chemicky jednotné a snadno charakterizovatelné. Absorpční maximum mají v rozmezí 670 – 800 nm, proto lze tyto PS aktivovat světlem pronikajícím hlouběji do tkání.

Používané látky patří do skupiny porfyrinů nebo např. ftalocyaninů, texafyrinů, porfycenů a dalších. Porfyrinům jsou velice příbuzné chloriny a bakteriochloriny, které mají o jednu (chloriny) případně dvě (bakteriochloriny) konjugované vazby v makrocyclickém systému méně (obr. 2)¹⁰.



Obr. 2. Rozdíl mezi porfyriny, chloriny a bakteriochloriny.

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 nm¹³. Vlnová délka chlorinů je posunuta do oblasti 650 – 690 nm. U bakteriochlorinů dochází k posunu vlnových délek až do červené části spektra.

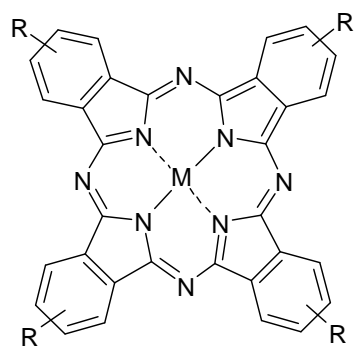
Ftalocyaniny (Pc4, Photosense)

Ftalocyaniny (obr. 3) jsou syntetické látky obsahující porfyrinový kruh, k němuž je kovalentní vazbou připoután kov nebo polokov (např. Zn, Al, Si), jenž zvyšuje fototoxicitu látky a tím i účinnost fotodynamické terapie. Mají posunutou maximální vlnovou délku absorpce směrem k červené oblasti spektra (670 – 700 nm). Jsou velice obtížně rozpustné ve vodě a organických rozpouštědlech, z toho vyplývají problémy s aplikací. Zvýšení rozpustnosti ve vodě lze dosáhnout např. sulfonací na periferii nebo inkorporací do micel či lipozomů^{10,2}.

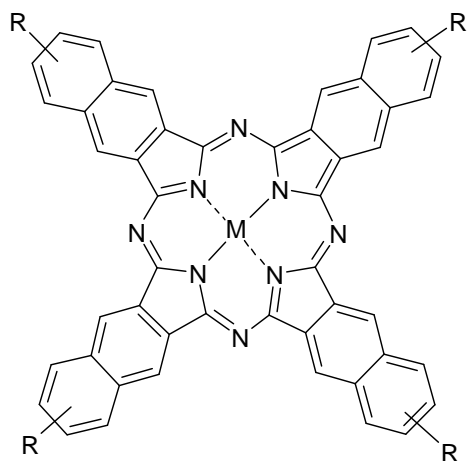
Naftalocyaniny

Naftalocyaniny jsou deriváty ftalocyaninů získané připojením benzenových kruhů na periferii. Díky prodlouženému chromoforovému systému absorbují při 740 – 800 nm. Protože světlo, potřebné k jejich aktivaci penetruje hlouběji do tkáně a jelikož jejich absorpční maxima jsou vyšší než absorpční pás melaninů, lze je s výhodou použít na pigmentované léze^{14,15}.

Jejich nevýhodou je poměrně nízká chemická a fotochemická stabilita, také vyšší tendence k agregaci než u ftalocyanů, i horší rozpustnost¹⁶.



Ftalocyanin



Naftalocyanin

Obr. 3. Struktura ftalocyaninů a naftalocyaninů.

2.2.2.3. 3. GENERACE PS

Jako látky třetí generace se označují konjugáty fotosenzitizérů s různými biomolekulami (protilátkami, steroidy, cukry, mono- a polynukleotidy)¹⁷.

2.3. KOLOIDNÍ TRANSPORTNÍ SYSTÉMY LÉČIV

V posledních letech je věnována velká pozornost koloidním systémům, které mohou pojmout různé typy léčiv. Obsáhnou tedy hydrofilní, lipofilní, malé nebo velké molekuly a mohou být podány perorální, parenterální i lokální cestou. Jsou také vhodné pro aplikaci do oka i nosu. Koloidní systémy umožňují překonat různé biomedicínské a farmaceutické problémy. Především mohou zlepšit rozpustnost špatně rozpustných léčiv ve vodě a jejich distribuci, dále vyřeší některé problémy se stabilitou, vytvoří formy s prodlouženým uvolňováním a poskytnou cílené směřování léčiva do místa terapeutického působení (tzv. targeting). Mnoho studií ukázalo, že selektivní kumulace nosičů léčiv v nádorové tkáni je dána pouhou pasivní difuzí díky např. zvýšené permeabilitě cévní stěny tumorózní tkáně.

Mezi tyto systémy řadíme např. mikroemulze (ME), lipozomy, micely a dendrimery. Jejich společnými rysy jsou malá velikost částic (mají větší povrchovou část ve srovnání s objemem) a tvar částic související se specifickým povrchem a určujícím přítomnost přitažlivých sil v disperzní a dispergované fázi, ovlivňující různé fyzikální vlastnosti jako např. osmotický tlak a sedimentaci.

Koloidní systémy můžeme rozdělit do dvou kategorií: lyofilní (voda je disperzní prostředí) a lyofobní (hydrofobní). U lyofilních koloidů dochází k malé nebo žádné agregaci částic, zatímco lyofobní jsou termodynamicky nestabilní a agregují kvůli nedostatku solvatace a vysoké mezipovrchové volné energii.

Mikroemulze, lipozomy, micely a dendrimery mohou zvýšit rozpustnost léčiv a biologickou dostupnost, chrání labilní léčiva jako proteiny a peptidy a působí jako zobrazovací a diagnostické nástroje. Každý systém má své zvláštnosti, např. mikroemulze jsou úspěšně užívány k řízenému uvolňování po parenterálním podání, ale díky své fyzikálně – chemické struktuře nemohou být jednoduše spojeny se specifickými ligandy, které umožní cílené směřování léčiva (tzv. aktivní targeting). Mikroemulze mají univerzální využití a to díky skutečnosti, že ME existují jak ve formě O/V, tak V/O a pojmu různá léčiva, bez ohledu na jejich typ. Používají se pro všechny cesty podání, včetně intravenózní v případě ME O/V. Na druhé straně micely, lipozomy a dendrimery jsou velmi podobné systémy z pohledu targetingu. Na jejich povrch mohou být

připojeny specifické ligandy a tím získáme přesné směřování léčiv do cílových struktur¹⁸.

Od těchto koloidních forem se očekává především účinnější a bezpečnější farmakoterapie nádorových onemocnění, která spočívá v tom, že se léčivo dostane do postižené tkáně nebo orgánu a bude tam efektivněji působit na zhoubné buňky, čímž se výrazně sníží jeho nežádoucí účinky na zdravou tkáň. Je to právě subcelulární velikost těchto lékových mininosičů, která umožňuje transport léčiv do orgánů, tkání, buněk a nemocných částí těla, které zůstávají jiným lékovým formám nedostupné. Volbou metody přípravy a aktivací povrchu částic je možné nasměřovat je na různé cíle¹⁹.

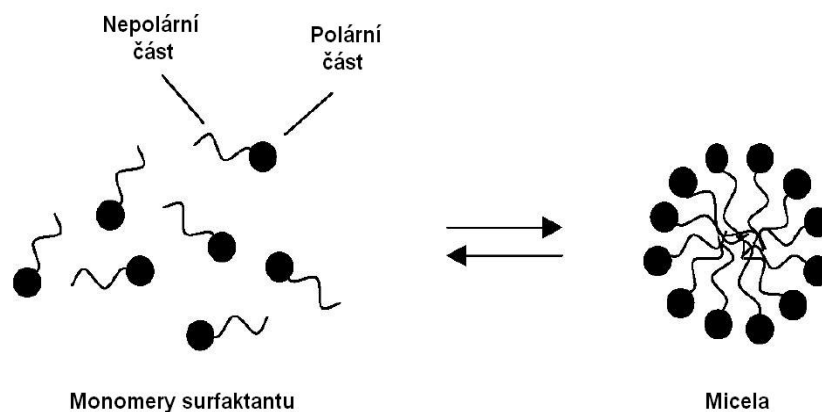
ZPROSTŘEDKOVANÉ ROZPOUŠTĚNÍ (SOLUBILIZACE)

Solubilizací málo rozpustné látky rozumíme podstatné zlepšení rozpustnosti přidáním další látky (solubilizátoru) do roztoku. Jedná se hlavně o zlepšení rozpustnosti ve vodě, o způsoby, jak připravit vodné roztoky látek, které se samy ve vodě nedostatečně rozpouštějí nebo se prakticky nerozpouštějí²⁰.

2.3.1. MICELY

Využití micel jako nosičů léčiv poskytuje mnoho výhod, např. zvyšují biologickou dostupnost obtížně rozpustných léčiv solubilizací, zůstávají dostatečně dlouhou dobu v krvi a tím umožní postupnou kumulaci v konkrétní oblasti, díky své velikosti se shromažďují v oblastech se zvýšenou propustností stěny. Další důležitou výhodou je ochrana enkapsulovaných léčiv před možnou inaktivací biologickými činiteli¹⁸.

Micely mohou být považovány za amfifilní koloidy, které mají průměrnou velikost částic 5 – 10 nm²¹, resp. 5 – 100 nm²². Jsou tvořeny amfifilními nebo povrchově aktivními látkami (surfaktanty) při určité koncentraci a teplotě. Tyto amfifilní molekuly existují při nízké koncentraci v roztoku jako monomery, při zvýšení koncentrace se shlukují a tvoří agregáty (micely) často charakterizované sférickým tvarem (obr. 4).

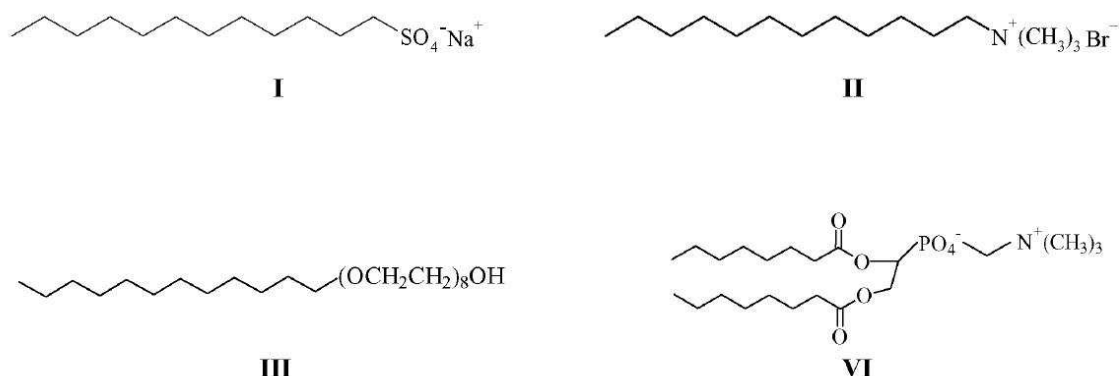


Obr. 4. Schematické znázornění reverzibilní termodynamické rovnováhy monomer-micela²³.

2.3.1.1. SURFAKTANTY

Surfaktanty (tenzidy) dnes hrají důležitou roli ve farmaceutické biotechnologii. Jsou široce využívány v mnoha lékových formách a kontrolují např. stabilitu a biologickou dostupnost²⁴.

Surfaktanty jsou amfifilní molekuly složené z hydrofilní/polární části a hydrofobní/nepolární části. Polární část může být nabitá (aniontová, kationtová), dipolární nebo nenabitá. Příkladem aniontového surfaktantu je dodecylsírán sodný, dodecyltrimethyl bromid kationtového, n-dodecyltetraethylenoxid jako neionogenní a dioktanoyl fosfatidylcholin jako dipolární (obr. 5). Nepolární část je většinou dlouhý uhlovodíkový řetězec, někdy halogenovaný nebo oxygenovaný^{25,26}.



Obr. 5. Příklady aniontového (I), kationtového (II), neionogenního (III) a dipolárního (IV) surfaktantu²³.

Pokud je surfaktant v systému přítomen v malé koncentraci adsorbuje se na povrch nebo mezifázi a výrazně mění povrchovou nebo mezipovrchovou volnou energii. Obvykle ji snižuje, ale jsou i případy kdy ji zvyšuje²⁶. Jakmile jsou molekuly surfaktantu rozpuštěny ve vodě v koncentraci přesahující kritickou micelární koncentraci (KMK) tvoří micely.

V micelle je hydrofobní část orientovaná do středu, aby se minimalizoval její kontakt s vodou, a hydrofilní část zůstává na povrchu, aby se maximalizoval kontakt s vodou.

Proces micelizace ve vodě vyplývá z citlivé rovnováhy intermolekulárních sil včetně hydrofobních, stérických, elektrostatických, van der Waalsových interakcí a vodíkových vazeb^{27,28}.

Kapacita surfaktantu pro solubilizaci léčiv závisí na chemické struktuře surfaktantu a léčiva, teplotě, pH, iontové síle a dalších faktorech²⁹. Např. solubilizační kapacita pro hydrofobní léčiva vzroste s prodloužením délky hydrofobního řetězce surfaktantu.

Pro hydrofilní léčiva jsou lepšími solubilizátory neionogenní surfaktanty, protože mají nižší hodnotu KMK. U polárních léčiv je obtížnější vytvořit vztah mezi stupněm solubilizace a chemickou strukturou surfaktantu, protože se solubilizují jak ve vnější části micely, tak ve vnitřní.

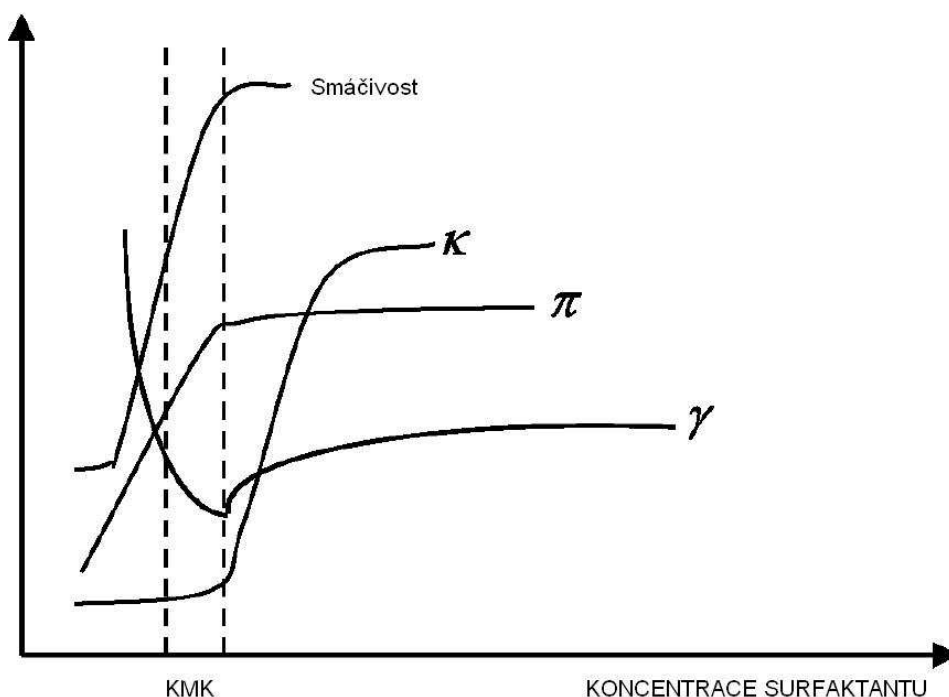
Micely jsou labilní entity tvořené nekovalentním seskupením jednotlivých monomerů surfaktantu. Proto mohou být sférické, válcovité nebo planární (např. dvojvrstva). Tvar a velikost může být ovlivňována změnou chemické struktury surfaktantu, teplotou roztoku, celkovou koncentrací surfaktantu, složením surfaktantu (v případě smíšených systémů), iontovou silou a pH. V závislosti na typu surfaktantu a podmínkách v roztoku sférické micely mohou růst v cylindrické a ty pak do dvojvrstev nebo disků^{30,31}.

2.3.1.2. MICELÁRNÍ SOLUBILIZACE

Jednou z důležitých vlastností micel je zvyšování rozpustnosti ve vodě špatně rozpustných léčiv. Micelární solubilizace představuje vstup solubilizované látky do koloidních micel tenzidu. Vytvoří se termodynamicky stabilní izotropní roztok s redukovanou termodynamickou aktivitou solubilizované látky²⁶.

Přesáhne-li koncentrace surfaktantu KMK, solubilizace se zvyšuje lineárně se zvyšující se koncentrací surfaktantu. Z farmaceutického hlediska je výhodná nižší hodnota KMK daného surfaktantu, protože se tvoří stabilnější micely. Po intravenózním podání dojde ke zředění velkým množstvím krve a pouze micely s nízkou hodnotou KMK stále existují, zatímco micely s vysokou koncentrací disociují do monomerů a jejich obsah může precipitovat v krvi³².

KMK lze stanovit využitím některých fyzikálních vlastností jako povrchového napětí, vodivosti (u iontových micel), osmotického tlaku, smáčivosti a dalšími. Pokud jsou tyto vlastnosti vyjádřeny jako funkce koncentrace surfaktantu, v určitém bodě je pozorován ostrý zlom u těchto křivek, což odpovídá KMK (obr.6). Další důležitá charakterizace micel je číslo agregace, které odpovídá průměrnému množství monomerů surfaktantu v každé micelle v micelárním roztoku³³.

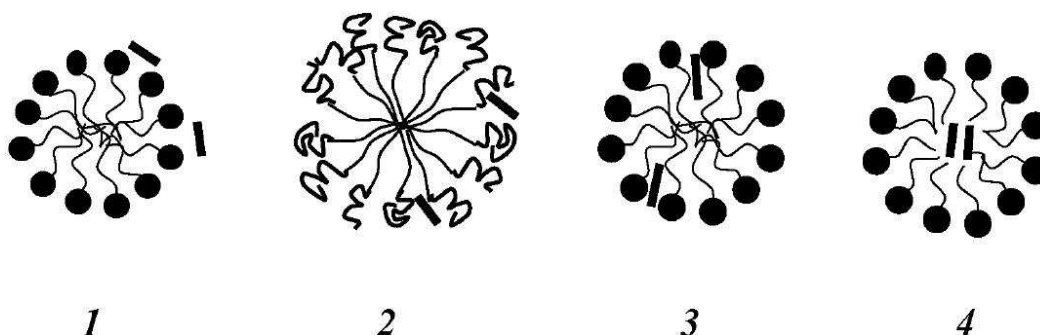


Obr. 6. Změny ve fyzikálních vlastnostech smáčivosti, vodivosti (κ), osmotickém tlaku (π), povrchového napětí (γ) vodného roztoku surfaktantu znázorněném jako funkce koncentrace surfaktantu. Zlom v křivce každé vlastnosti ukazuje kritickou micelární koncentrací²³.

2.3.1.3. UMÍSTĚNÍ LÉČIV V MICELE

Existuje několik možných míst pro umístění léčiv v micely (obr. 7), vše záleží na povaze léčiva. Hydrofilní léčivo je adsorbováno na povrchu micely (1), středně rozpustné mezi hydrofilními skupinami PEO (polyethylen oxidu) na povrchu micely (2) nebo v palisádové vrstvě mezi hydrofilními skupinami a prvními uhlíkovými atomy hydrofobních skupin (vnější jádro) (3) a nakonec nerozpustná léčiva jsou umístěna ve vnitřním jádře (4)^{29,26}.

Přítomnost různých míst při solubilizaci v micely vyplývá ze skutečnosti, že fyzikální vlastnosti jako mikroviskozita, polarita, stupeň hydratace nejsou stejné ve všech částech micel³⁴.



Obr. 7 Možná místa solubilizovaných léčiv v micely. (—) představuje léčivo²³.

Speciální pozornost si zaslouží neionogenní surfaktant Cremophor EL (CrEL), který je používán pro solubilizaci široké škály hydrofobních léčiv jako anestetik, fotosenzitizérů, sedativ, imunosupresiv a léků proti rakovině³⁵. Formulace obsahující CrEL je dobře snášena, po podání ústy nebo na kůži nebyly pozorovány žádné patologické změny. Po nakapání 0,05 ml CrEL do spojivkového vaku králíka, způsobil lehké zčervenání spojivky, které odeznělo během několika hodin. Aplikace 50 % vodného roztoku způsobila mírné podráždění a slzení, které rychle odezněly; použití 30 % roztoku nezpůsobilo žádné podráždění. Nebyl pozorován teratogenní nebo embryotoxický efekt u myši po orální aplikaci 10 a 5 ml/kg denně od šestého do patnáctého dne post coitum jícnovou sondou. Po injekčním podání lidem byla vyvolána ojediněle anafylaktická reakce³⁶.

Podle Kabanova a kol.³⁷ ideální transportní systém samovolně vzniká z molekul léčiva, komponentů nosiče a targeting částí; jeho velikost by měla být okolo 10 nm, aby byl schopen procházet různými tkáněmi a buňkami; měl by být stabilní in vivo po dostatečně dlouhou dobu a nevyvolávat biologické reakce; měl by uvolnit léčivo po kontaktu s cílovou tkání/buňkou a komponenty nosiče (surfaktantu) by měly být jednoduše odstraněny z těla, zatímco je plněna terapeutická funkce.

2.3.1.4. POLYMERNÍ MICELY

Polymerní micely zasluhují zvláštní pozornost. Jsou tvořeny kopolymery obsahující jak hydrofilní, tak hydrofobní monomerní jednotky jako PEO (polyethylenoxid) a PPO (polypropylenoxid). Micelární jádro obsahuje hydrofobní bloky a obal se skládá z hydrofilních bloků³⁸. Díky PEO plášti nedochází k opsonizaci a následnému rozpoznání makrofágy retikuloendoteliálního systému (RES), dochází tak k prodloužení cirkulace a léčiva jsou transportována efektivněji a do požadovaných míst³⁹. Polymerní micely mohou být sterilizovány filtrací³⁸.

Po intravenózním podání micely podléhají velkému zředění. Nicméně pomalá disociace kineticky stabilních micel poskytuje udržení jejich celistvosti a obsahu léčiva v krevním oběhu a tím dodání léčiva do cíleného místa před rozložením micely na monomery^{40,41}. Navíc polymerní micely mají vyšší solubilizující kapacitu než micely ze surfaktantu díky jejich vyššímu počtu a/nebo většímu jádru⁴².

Léčiva jsou klasicky enkapsulována nebo kojugována s polymerní kostrou. Při uvolňování léčiva v případě kojugovaného léčiva musí být rozštěpena kovalentní vazba mezi léčivem a polymerem. Proto je uvolnění závislé na rychlosti micelární disociace. Difúze vody do micelárního jádra je omezená, proto dochází k pozvolnému uvolňování^{43,44}. Bylo provedeno několik studií s blokovými kopolymery, kde bylo léčivo kojugováno. Bylo zjištěno, že fyzická enkapsulace léčiva je lepší alternativou, protože kojugace vedla ke změně biologických vlastností léčiva, na druhou stranu klasická enkapsulace poskytuje menší kapacitu a rychlejší uvolnění léčiva⁴⁰.

Ačkoliv jsou micely vhodné pro nejrůznější farmaceutické použití, jejich hlavní využití je při parenterálním podání protirakovinných léčiv. Vykazují lepší schopnost akumulace v nádorové části ve srovnání s obyčejným léčivem a malou distribuci do ostatních částí.

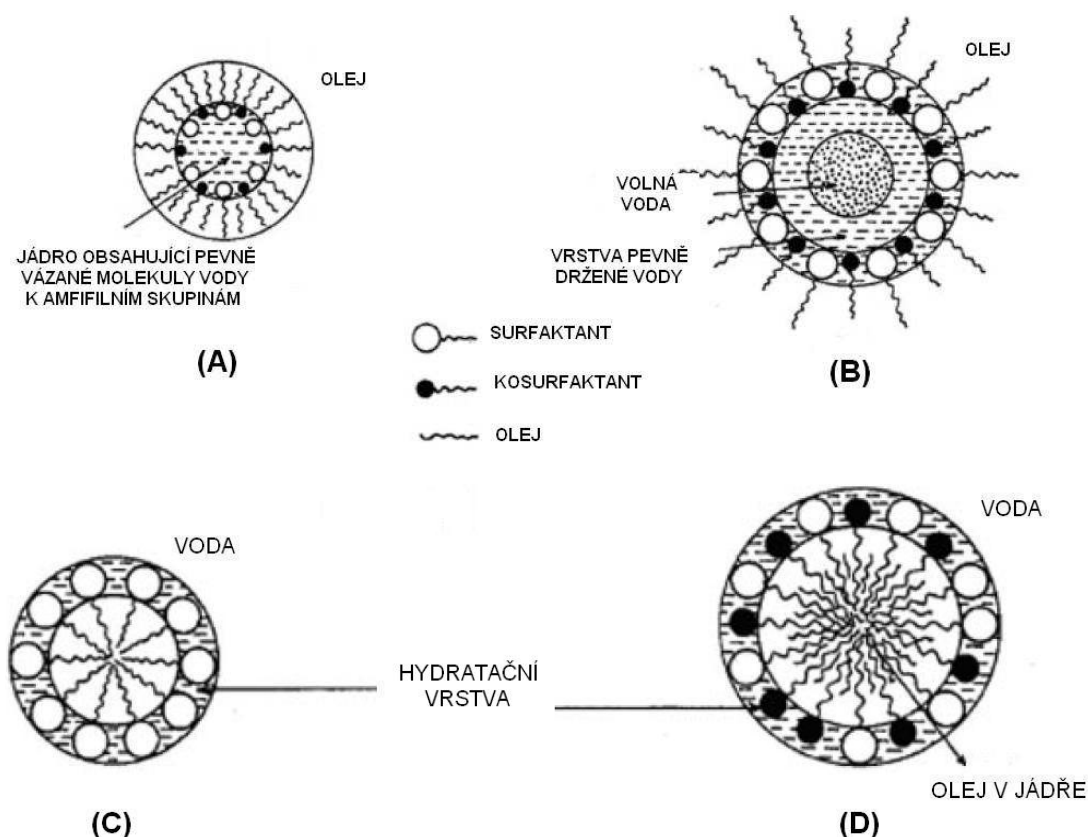
Mnohé studie a použití jsou uváděny na bázi blokových kopolymerů PEO a PPO bloků, komerčně známých pod názvem Pluronic^{®45}. Další možností jsou polyiontové komplexní micely formované z některých polyelektrolytů a opačně nabitých biologicky aktivních molekul (např. enzymů a oligonukleotidů)¹⁹. Opačně nabité makromolekuly (jako peptidy a DNA) mohou tvořit s náboji vedlejších řetězců některých PLAA (poly (*L*-aminokyselin)) bloky, mající za následek požadovaný amfifilní charakter pro micelizaci a to vede ke stabilizaci proti trávicím enzymům (nukleáz)⁴⁰. Byly vytvořeny polyiontové komplexní micely, které se skládaly z porfyrinového dendrimera a PEG-*b*-poly(asparagové kyseliny). Jsou hodnoceny jako nové fotosenzitizéry pro PDT u plicního tumoru, pravděpodobně díky biokompatibilitě PEG obalu micel byla snížena toxicita kationtového dendrimera porfyrinu⁴⁶.

Jednou ze stinných stránek polyiontových komplexních micel je senzitivita ke změnám prostředí jako zředění a iontová síla. Aby byl překonán tento nedostatek, jsou polymerní micely připravovány z PEG-poly(α,β - asparagové kyseliny) a kationtový protein trypsin byl vázán s glutaraldehydem Schiffovou bází, tím se udržuje stabilita koncentráту a zvýší se stabilita proteinu⁴⁷.

2.3.2. MIKROEMULZE

Koncept mikroemulzí byl poprvé představen Hoarem a Schulmanem v roce 1943⁴⁸. Tyto systémy se jeví jako transparentní a mohou být definovány jako systém vody, oleje a amfifilu, který je opticky izotropní a termodynamicky stabilní⁴⁹. Jsou obvykle stabilizovány surfaktantem a kosurfaktantem a tvořeny částicemi menšími než $0,1 \mu\text{m}$ ⁵⁰.

Mikroemulze se liší od makroemulzí (nebo prostých emulzí), ty mají menší stabilitu, větší velikost částic, nejsou transparentní a k vytvoření vyžadují značnou vstupní energii. Navíc se liší od reverzních micel. Ačkoliv je mikroemulze V/O považována za topologicky podobnou reverzním micelám (vzhledem k orientaci polárních a nepolárních částí surfaktantu), liší se přítomností volné vody v jádru mikroemulze (obr. 8). Další rozdíl je ve velikosti, reverzní micely mají rozměr okolo 5 nm, zatímco částice mikroemulze jsou větší, z důvodů přítomnosti určitého množství volné vody⁵¹.



Obr. 8 Reverzní micela (A), mikroemulze V/O (B), normální micela (C) a mikroemulze O/V(D)⁵¹.

Tvorba mikroemulze je závislá na poměru olej – voda – surfaktant a oblast existence je dána fázovým diagramem. Při tvorbě ME bychom měli zvážit tři podmínky. Za prvé musí být pečlivě vybrán surfaktant, abychom dosáhli ultra nízkého mezipovrchového napětí na mezifázi olej/voda ($<10^{-3}$ mN/m). Velmi nízké mezipovrchové napětí vede k samovolné emulzifikaci oleje ve vodě nebo vody v oleji. Druhý požadavek je dostatečně vysoká koncentrace surfaktantu, kterou se stabilizuje nově vzniklý povrch v ME a třetí je flexibilita nebo tekutost mezifáze, která podporuje formování ME. Kosurfaktanty s krátkými řetězci (C4 – C7) mohou být přidány k posílení mezipovrchových interakcí⁵².

Díky nízkému mezipovrchovému napětí vzniká v těchto systémech široké spektrum struktur jako pravé emulze, anizotropní lamelární krystaly, hexagonální nebo kubické útvary⁵³.

Struktura a vlastnosti ME poskytuje mnoho výhod. Termodynamická stabilita umožňuje samovolnou emulzifikaci v širokém rozmezí teplot a umožní snadnou přípravu. Přítomnost velkého množství surfaktantu a kosurfaktantu může způsobit problémy s biokompatibilitou, ale zároveň ME mohou zvýšit rozpustnost různých druhů léčiv, dokonce i těch, které jsou jinak nemísitelné s hydrofilními i hydrofobními rozpouštědly. Rychlost uvolňování léčiv závisí na struktuře ME, složení a pH prostředí. Dalšími vlastnostmi jsou nízká viskozita a možnost sterilizace filtrací na rozdíl od klasických emulzí⁵⁰.

Uvolňování látek z mikroemulzí ovlivňuje více faktorů jako hydrofilita/lipofilita léčiva, velikost, cesta podání. Rozlišujeme dva mechanismy. Olejová fáze se chová jako rezervoár v případě O/V ME nebo jako difúzní prostředí (V/O). V obou případech se mikroemulze chovají jako retardované formy. Naopak při ústním podání může být vychytávání léčiva urychleno, protože olejové částičky jsou fagocytovány některými biologickými strukturami. Toto může ovlivnit farmakokinetický profil zvýšením biodostupnosti ve vodě těžko rozpustných látek⁵⁴. Lipofilní léčivo musí projít před vstupem do tkání vodným prostředím a tento krok zpomaluje transport léčivých látek se sníženou rozpustností ve vodě.

ME nabízí významné výhody při p. o. podání léků, protože zvýší biodostupnost zvýšením rozpustnosti ve vodě špatně rozpustných látek v olejové fázi. V závislosti na druhu oleje, mikroemulze mohou zvýšit mízní zaměřenost a zabránit first pass efektu v játrech⁵⁵.

Navíc, surfaktant způsobí změny v prostupnosti a přítomnost malých částec podpoří širokou distribuci v gastrointestinálním traktu a zlepší absorpci⁵⁶.

Parenterální ME zahrnují O/V nebo V/O systémy. O/V ME bývají používány jako nosiče lipofilních léčiv k získání kontrolovaného uvolňování po intravenózním, intramuskulárním nebo subkutánním podání. V/O systémy podávány subkutánně nebo intramuskulárně jsou využity k získání prodlouženého uvolňování hydrofilních léčiv⁵⁰.

Navzdory problémům spojených s vysokým obsahem surfaktantu a druhu olejové fáze, které mohou způsobit problémy s toxicitou, jsou ME považovány za atraktivní nosiče léčiv.

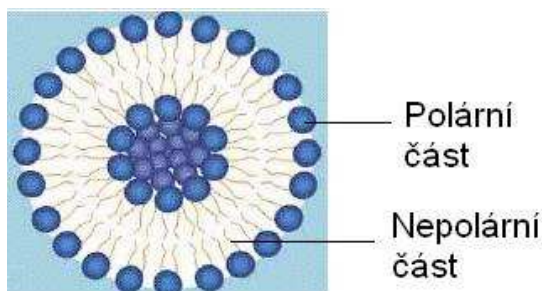
Byla připravena ME na bázi lecitinu s obsahem Amfotericinu B, ke snížení toxických účinků léčiva ve srovnání s komerční formulací (Fungizone[®]). Výsledky ukázaly, že ME je lepší nosič díky jejímu pH, viskozitě, velikosti částic a nízkým toxickým vlastnostem⁵⁷.

Pokud jde o perkutánní a topické podání, mikroemulze prokázaly významné zvýšení biologické dostupnosti ve srovnání s emulzemi, gely a roztoky. Tento jev je připisován rozšířené a trvalé absorpci díky efektu uložení léčiva ve vnitřní fázi. V úvahu přichází také snížení difúzní bariéry ve stratum corneum surfaktantem⁵⁸. Mnohé studie jsou prováděny i u očního podání. Byla vyvinuta formulace pilokarpinu s prodlouženým uvolňováním o nízké viskozitě, která se skládala z lecitinu, propylenglykolu, PEG 400 a isopropyl myristátu. Vykazovala pozoruhodný rezervoárový efekt a zvýšení oční biodostupnosti⁵⁹. ME lze využít i pro nosní podání, na příklad při nosním podání diazepamu u status epilepticus, kdy bylo dosaženo rychlého nástupu účinku⁶⁰.

2.3.3. LIPOZOMY

Lipozomy byly objeveny v roce 1961 A. D. Banghamem⁶¹, který popsal spolu se svými spolupracovníky jejich strukturu na základě elektronmikroskopických studií. Vlastní název lipozomy pochází od G. Weismanna, jenž takto pojmenoval fosfolipidové vezikuly⁶².

Lipozomy jsou sférické částice vezikulární morfologie vznikající smíšením lipidových komponent biologických membrán s vodou. Jedná se o váčky (vezikuly) se stěnou složenou nejčastěji z fosfolipidů, případně z jiných amfifilních látek. Termínem lipozomy se označují v první řadě vezikuly obalené dvojitou membránou, jejíž podstatnou část tvoří fosfatidylcholin (syn. lecitin) nebo směsi obsahující různé druhy fosfatidylcholinu (např. dipalmitoylfosfatidylcholin) a se zbytky mastných kyselin o různé délce řetězců (nad C14) a s rozdílným stupněm nasycení. Mohou obsahovat i jiné fosfolipidy, jako je fosfatidylglycerol, fosfatidyletanoamin a sfingomyelin^{63,64}. Cholesterol je přidáván pro snížení fluidity a tím i permeability lipozomálních membrán. Průměr lipozomů se pohybuje od 20 nm do několika μm ⁶⁵. Tloušťka dvojmembrány je přibližně 5 nm a odděluje vnitřní (vodní kompartment) od vnější vodní fáze. Membrány lipozomů jsou složeny z lipidové dvojvrstvy amfifilních lipidů orientovaných svou hydrofilní částí na vnější stranu membrány, lipofilní části molekul jsou obráceny proti sobě a tvoří tak hydrofobní vnitřní vrstvu membrány (obr. 9). Přirozené biologické membrány buněk mají stejnou strukturu^{61,66}.



Obr. 9 Stěna lipozomu tvořena lipidovou dvojvrstvou⁶⁷.

Do lipozomů mohou být uzavírána léčiva ve vodě rozpustná i nerozpustná. Hydrofilní molekuly léčiv mohou být enkapsulovány do vnitřního vodního prostoru, lipofilní molekuly se mohou inkorporovat do dvojvrstev lipidů tvořících stěny lipozomů. Amfifilní molekuly a molekuly s elektrickým nábojem se mohou adsorbovat na membrány lipozomů⁶⁸.

2.3.3.1. KLASIFIKACE LIPOZOMŮ

Lipozomy mohou být klasifikovány podle jejich struktury (počtu dvojvrstev), velikosti a způsobu přípravy⁶⁹. Podle počtu dvojvrstev a velikosti rozlišujeme⁶⁸:

Malé unilamelární vezikuly (small unilamellar vesicles, SUV)

Jsou to vezikuly tvořené jednou lipidovou dvojvrstvou o průměru < 50 nm, lišící se od jiných lipozomů vysokým membránovým napětím vyplývajícím ze značného zakřivení membrány.

Jsou schopny unikat z cévního řečiště extravaskulárně přes endotel kapi-lár do okolních tkání (příkladem mohou být jaterní fenestrace , které mají póry o velikosti 50 – 60 nm). Tyto malé vezikuly jsou po fyzikálně-chemické stránce relativně nestabilní pro vysoký stupeň deformace membrán. Jejich využití může být omezeno zvýšenou náchylností k interakcím i fúzi s velkými molekulami.

Velké unilamelární vezikuly (large unilamellar vesicles, LUV)

Tento typ vezikul má vzhledem k většímu průměru (> 50 nm) nízké membránové napětí a větší stabilitu.

Velké oligolamelární vezikuly (oligolamellar large vesicles, OLV)

Jsou to vezikuly s několikavrstevnatými membránami, u nichž je uvolňování léčiva zpomaleno díky silnější vrstvě lipidů. Vznikají obvykle jako vedlejší produkt při přípravě LUV.

Velké multilamelární vezikuly (multilamellar large vesicles, MLV)

Obsahují velký počet lipidových dvouvrstev, které zapříčiňují zpomalené uvolňování enkapsulovaného léčiva, zajišťují tak výrazný depotní účinek. Přípravují se o velikosti 100 – 1000 nm.

Multivezikulární vezikuly (multivesicular vesicles, MVV)

V tomto typu lipozomů je v jedné větší vezikule enkapsulováno více menších vezikul.

Lipozomy mohou mít pozitivní, negativní nebo neutrální povrch. Neutrální povrch uděluje přítomnost lecitinu, stearylamin a fosfát poskytují pozitivní a negativní⁶⁶. Lipozomy s negativně nabitými lipidy rychleji podlehnou endocytóze než s neutrálními lipidy⁷⁰.

Rychlost uvolňování léčiv z lipozomů je ovlivňována velikostí, počtem lamel a druhem fosfolipidů v lipozomu. Z unilamelárních se léčivo uvolňuje rychleji. Mastné kyseliny s delšími řetězci⁷¹ a vyšší stupněm nasycení⁷² zpomalí vytékání molekul z lipozomů.

Uvolňování závisí také na velikosti a druhu léčiva, kationtové se uvolňují pomaleji než aniontové⁷³.

2.3.3.2. Možnosti využití lipozomů

Lipozomy mají mnohostranné uplatnění ve farmaceutickém, kosmetickém a potravinářském průmyslu. Ve farmacii slouží především jako nosiče léčiv. Léčiva z lipozomálních přípravků lépe pronikají do nitra cílových buněk díky vysokému obsahu fosfolipidů.

Po intravenózní aplikaci jsou „klasické“ lipozomy (složené pouze z fosfolipidů) velmi rychle, tj. v průběhu několika minut, vychytávány makrofágy retikuloendoteliálního systému a kumulují se zejména v játrech a slezině. Rychlé mizení lipozomů z cirkulace je zapříčiněno tím, že na povrch lipozomů se adsorbují sérové proteiny, tzv. opsoniny, které jsou pak rozpoznávány imunokompetentními buňkami jako cizorodé částice, a jako takové eliminovány endocytózou⁶⁸.

Ochrana lipozomů před vychytáváním do makrofágů může být zajištěna např. modifikací povrchu lipozomů přidáním hydrofilních polymerů, např. polyetylen glykolu (PEG) do jejich povrchových struktur⁷⁴. Takto upravené částice se stávají více hydrofilními, nejsou z krve tak snadno vychytávány do buněk retikuloendoteliálního systému a setrvávají v cirkulaci po značně dlouhou dobu. Jsou proto označovány jako „dlouhodobě cirkulující“ nebo „stealth“ lipozomy^{75,76}. Tyto dlouhodobě cirkulující lipozomy o velikosti do 120 nm jsou schopny procházet nedokonale vyvinutými endoteliálními výstelkami krevních kapilár zásobujících tumor, difundovat přes extracelulární matrix a kumulovat se v nádorové tkáni. Tento jev se nazývá pasivní targeting⁶⁸. Další příklad dlouhodobě cirkulujících lipozomů jsou lipozomy modifikované glukuronátem. Kumulují se v nádorové tkáni a zvýší účinnost protirakovinných léků (jako adryamicin, vinkristin). Tyto modifikované lipozomy jsou využity i u fotodynamické terapie⁷⁷.

V poslední době je velký zájem o imunolipozomy. Mají na povrchu vázány monoklonální protilátky, které umožní přesné navázání na antigen nebo receptor rakovinné buňky. Zlepšení targetingu a zároveň snížení vychytávání RES je dosaženo navázáním protilátek na distální konec již navázaného PEG^{78,79}.

Lipozomy jsou po vazbě na povrchové receptory buňky pohlceny buněčnou membránou. Po endocytoze jsou doručeny do lysozomů, kde jsou degradovány peptidázami a hydrolázami. Abychom se vyhnuli této degradaci, byly vytvořeny pH-senzitivní lipozomy. Tyto lipozomy uvolní svůj obsah přímo do cytosolu a tím se zvýší biologická dostupnost léčiv v cytoplazmě. Uvolnění léčiv do cytosolu je možné jedním nebo kombinací více mechanismů.

Lipozomy pH-senzitivní mohou podstoupit pH-indukovanou fúzi mezi endosomální a lipozomální membránou a lipozomální obsah je uvolněn přímo do cytosolu. V některých případech jsou lipozomy destabilizovány a uvolní obsah výhradně do endozomu a amfifilní léčiva difundují přes endozomální membránu zatímco jiné molekuly (nukleosidové analogy) mohou být přemístěny membránovými transportéry⁸⁰. Existuje mnoho různých tříd pH-senzitivních lipozomů. Jedna z nejnověji studovaných tříd využívá pH-titrující polymery k destabilizaci membrány, což poskytne rychlé uvolnění léčiva⁸¹. Dále jsou zkoumány pH-senzitivní lipozomy skládající se z kombinace

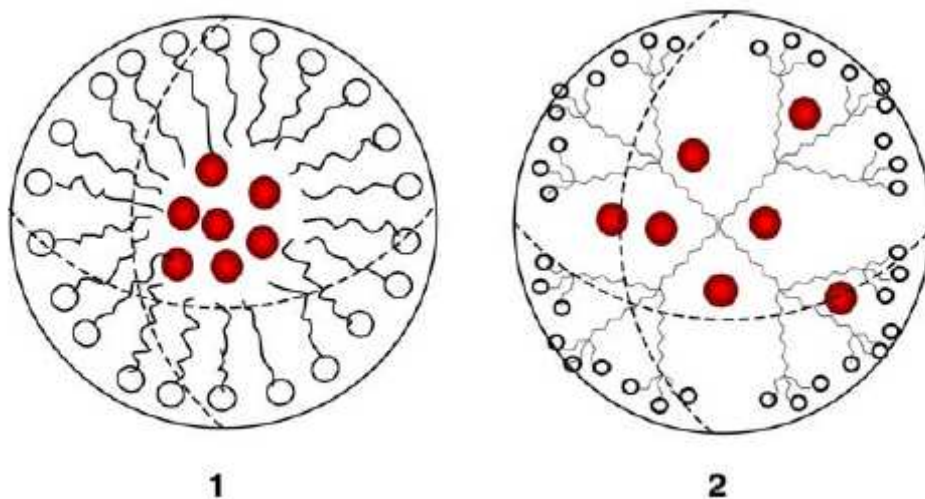
kationtových / aniontových lipidů a obsahující ligand pro receptor kyseliny listové. Je tak získána destabilizace závislá na pH v nádorových buňkách, které mají zmnožené receptory pro kyselinu listovou⁸².

2.3.4. DENDRIMERY

Dendrimery můžeme považovat za unimolekulární micely, protože jsou tvořeny z nepolárního jádra a polárního obalu. Termín dendrimery (z řeckého slova *dendros* = strom) byl vytvořen na počátku osmdesátých let minulého století⁸³, ačkoliv dendritická struktura byla identifikována v roce 1978⁸⁴.

Z hlediska makromolekulární architektury představují zcela ojedinělé nové typy polymerů, jejichž složení, velikost a funkce jsou přesně kontrolovány během jejich vzniku.

Globulární trojrozměrná struktura dendritických makromolekul vede přirozeně k jejich srovnání s tradičním idealizovaným konceptem micelárních struktur. Z tohoto pohledu jsou micely strukturně blízké organizaci dendrimerů. Oba systémy jsou si podobné v tom, že snadno vytváří hydrofilní sférický povrch obalený kolem lipofilního jádra (Obr.10). Samozřejmě, je také možné zcela opačné uspořádání s hydrofilním vnitřkem a lipofilním povrchem (tzv. inverzní micely).



Obr.10. Srovnání struktury micely (1) a dendrimeru (2) s uzavřenými molekulami léčiva⁸⁵.

Oba systémy se neliší pouze svojí architekturou, ale také podobnými vlastnostmi, pokud jde o organizaci a stabilizaci látek uvnitř neutrálního vnitřního prostředí⁸⁵. Je možné do nich uzavřít molekuly aktivních látek, které se k nim poutají nekovalentními vazbami (iontovými, vodíkovými, hydrofobními), a

mohou tak tvořit vhodný mezičlánek ke kovalentním polymerním konjugátům s léčivými na jedné straně⁸⁶ a k fyzikálně uzavřeným léčivům v částicích na druhé straně⁸⁷. Další výhodou je možnost speciální úpravy dendrimerové molekuly na míru různými ligandy.

2.3.4.1. SYNTÉZA DENDRIMERŮ

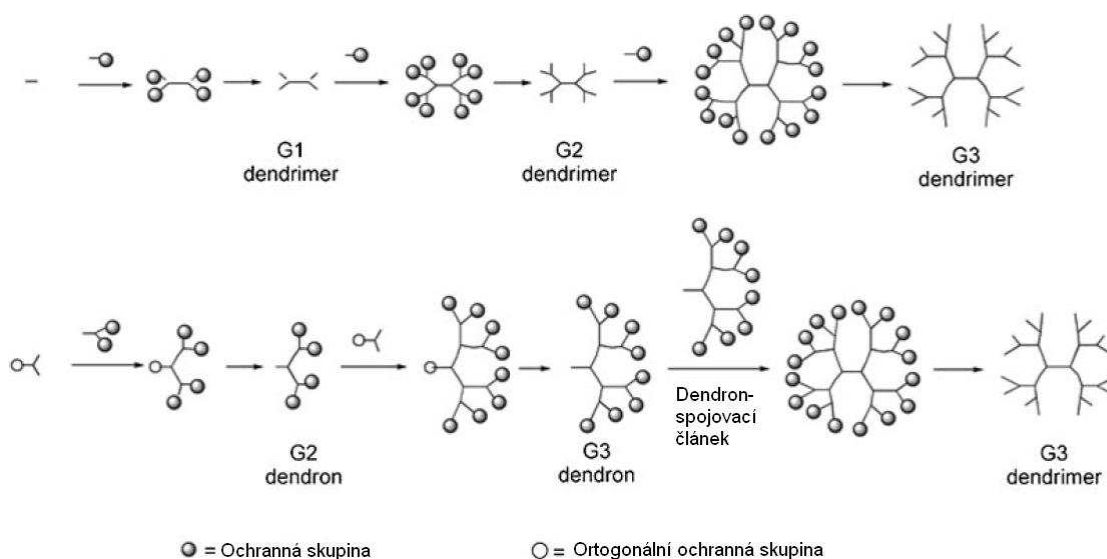
Od roku 1979 jsou pro syntézu dendrimerů používány dvě hlavní metody: divergentní a konvergentní (obr. 12.).

1. DIVERGENTNÍ METODA

Při tomto postupu dochází k růstu dendrimeru od jádra směrem k periférii a v každém dalším kroku se „nabaluje“ jedna vrstva větvících segmentů za vzniku dendrimeru n-té generace. Tímto způsobem lze připravit velké množství dendrimerů, molární hmotnost se při každém kroku zdvojnásobí^{88,89}.

2. KONVERGENTNÍ METODA

Směr růstu je od povrchu k jádru postupným spojováním povrchových jednotek dohromady s více monomery. Tímto způsobem vznikají dendrony, které poté v místě přípojného bodu reagují s multifunkčním jádrem za vzniku dendrimeru⁹⁰.



Obr. 11 Syntéza dendrimerů, nahoře-divergentní metoda, dole-konvergentní⁹¹.

Jsou zkoušeny další metody přípravy dendrimerů, aby se zjednodušila příprava. Jedna z nejnovějších je „click“ chemie, kde je využívána Cu(I) katalyzovaná syntéza 1,2,3-triazolů z azidů a alkynů k produkci dendrimerů s různými povrchovými skupinami o vysoké čistotě⁹².

2.3.4.2. POUŽITÍ VE FARMACII

Dendrimery jsou díky své struktuře atraktivní vezikuly k cílenému transportu léčiv.

Jádro dendrimerů může pojmout molekuly léčiv⁹³, zatímco volné funkční skupiny tvoří komplexy popřípadě konjugují s molekulami léčiv nebo ligandy⁹⁴. Jak již bylo zmíněno výše enkapsulovaná léčiva jsou vázána nekovalentními vazbami, léčiva na povrchu se poutají kovalentními vazbami.

V současné době jsou dendrimery využívány ke zvyšování rozpustnosti a biologické dostupnosti léčiv, kontrolovanému uvolňování a targetingu⁹⁵.

Byly navrženy dendrimery obsahující různé fotosenzitizéry. Například dendrimery obsahující kyselinu 5-aminolevulinovou, prekurzor PS pro fotodynamickou terapii tumorozních keratinocytů. Dále dendrimery na základě polyaryletheru derivatizovány fotosenzitizérem protoporphyrinem jako kandidát pro PDT solidních nádorů⁹⁶.

K získání specifické buněčné terapie byly navrženy speciální dendritické vezikuly, např. dendrimery derivatizované kyselinou listovou, důležitým substrátem pro buňky. Receptory pro kyselinu listovou jsou výrazně zmnoženy u rakovinných buněk, a proto jsou tyto dendrimery vychytávány více rakovinnými buňkami než normálními⁹⁷.

Přestože dendrimery nabízí mnoho výhod a možností, musíme brát v úvahu i problémy spojené s biokompatibilitou a toxicitou. Cytotoxicita u nemodifikovaných dendrimerů ke Caco-2 buňkám byla výrazně vyšší pro kationtové ve srovnání s aniontovými dendrimery a pro oba se zvyšovala s rostoucí velikostí a koncentrací. Pozoruhodný pokles v cytotoxicitě kationtového PAMAM (polyamidoamin) dendrimeru byl získán modifikací povrchu, který způsobil snížení pozitivního náboje⁹⁸.

3. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo zjistit rozpustnost lipofilních fotosenzitizérů typu ftalocyaninů a jejich azaanalogů v některých olejích, změřit molární extinkční koeficienty PS v těch olejích, které se ukázaly jako vhodné pro následnou přípravu mikroemulzí, připravit mikroemulze roztoků PS ve vybraných olejích za použití Cremophoru[®] EL jako surfaktantu a následná charakterizace vlastností připravených mikroemulzí.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. POUŽITÉ SUROVINY

CREMOPHOR® EL

Cremophor® EL (Polyoxyethylenglyceroltriricinoleat 35) je syntetický neionogenní emulgátor. Získává se reakcí ethylenoxidu s ricinovým olejem, kde na 1 mol ricinového oleje připadá 35 mol ethylenoxidu (CAS No. 61791-12-6)⁹⁹. Estery vyšších mastných kyselin tvoří hydrofobní část. Hydrofilní je tvořena polyethylenglykolethery hydroxylových skupin ricinoolejové kyseliny a v menší míře etoxylovaným glycerolem. Jedná se o žlutou olejovitou kapalinu se slabým charakteristickým zápachem s teplotou tání 26°C. Hydrofilní-lipofilní rovnováhu (HLB) má mezi 12 a 14. Je rozpustný ve vodě, etanolu, isopropylalkoholu, etylacetátu, chloroformu, toluenu, xylenu. S rostoucí teplotou vody se rozpustnost Cremophoru® EL snižuje, proto se za určité teploty roztok zakalí. Za tepla je mísitelný s mastnými kyselinami, mastnými alkoholy, určitými živočišnými a rostlinnými oleji. Používá se jako emulgátor v mnoha odvětvích průmyslu³⁶.

TRIACYLGLYCEROLY STŘEDNÍ NASYCENÉ

Jedná se o směs triacylglycerolů se střední délkou řetězce mastných kyselin (medium chain triglycerides, MCT, ČL 2009 *Triglycerida saturata media*). Je to bezbarvá nebo slabě nažloutlá olejovitá tekutina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s ethanolem 96%, s dichlormethanem, s petroletherem a s mastnými oleji. Obsahuje nejméně 95 % nasycených mastných kyselin s 8 a 10 atomy uhlíku. Získává se z oleje extrahovaného z tvrdého sušeného podílu endospermu druhu *Cocus nucifera* L. nebo ze sušeného endospermu druhu *Elaeis guineensis* JACQ. Používá se jako rozpouštědlo pro aktivní lipofilní sloučeniny a UV filtry. Slouží též jako univerzální změkčovadlo všech typů krémů, pleťových vod a olejů, koupelových olejů, balzámů na rty, šampónů či různých prostředků na opalování, přičemž má velmi dobrý vliv na pokožku. Pro rozpouštění PS byl vybrán, protože je to jeden z nejvíce polárních triglyceridů.

RICINOVÝ OLEJ

Ricinový olej (ČL 2009 *Ricini oleum virginale*) je mastný olej získávaný ze semen druhu *Ricinus communis* L. Je to bezbarvá nebo velmi světle žlutá hygroskopická tekutina se slabou nebo žádnou chutí a pachem. Skládá se z triacylglycerolů, kde přibližně 90 % tvoří kyselina ricinoolejová. Dalšími významnými mastnými kyselinami jsou kyseliny olejová a linolová. Je těžce rozpustný v petroletheru, mísitelný s ethanolem 96% a s kyselinou octovou ledovou. Ricinový olej má silně promašťující a hojivý efekt, proto je vhodný k ošetření suché a citlivé pokožky. Po vnitřním užití působí jako laxativum. Kromě léčebného a kosmetického využití se ricinový olej používá k výrobě mýdel, inkoustů či parfémů. Přidává se do svíček, brzdových kapalin i do různých druhů plastů.

Pro rozpouštění PS byl vybrán, protože vzhledem k přítomnosti hydroxylových skupin na lipofilních alifatických řetězcích mastných kyselin je dobrým rozpouštědlem pro některé organické látky.

MAKADAMOVÝ OLEJ

Získává se lisováním z makadamových ořechů stromu *Macadamia ternifolia*, které původně pochází z Austrálie. Skládá se z velké části z kyseliny olejové (60 %) a kyseliny palmitoolejové (19 %). Je to světle žlutá tekutina při pokojové teplotě kapalná. Využívá se především v potravinářství a kosmetice. Pro rozpouštění PS byl vybrán jako představitel méně polárních triglyceridů.

BRUTNÁKOVÝ OLEJ

Je to mastný olej získaný ze semen druhu *Borago officinalis* L. extrakcí a/nebo lisováním. Brutnákový olej je čirá světle žlutá nebo žlutá kapalina prakticky nerozpustná ve vodě a ethanolu 96%, mísitelná s petroletherem. Pro rozpouštění PS byl vybrán pro velmi vysoký obsah polynenasycených mastných kyselin.

DIETHYLHEXYLKARBONÁT

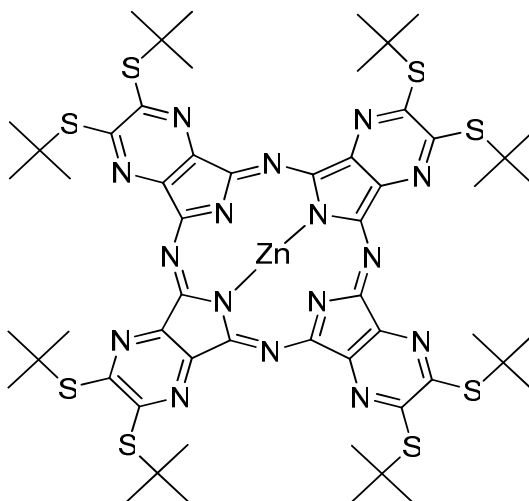
Je to syntetický lipid, diethylhexylester kyseliny uhličitě. Pro rozpouštění PS byl vybrán jako představitel polárních lipidů, strukturně odlišných od triglyceridů.

4.2. POUŽITÉ FOTOLENIZIZÉRY

ZIP21Zn

Relativní molekulová hmotnost = 1288,32 g/mol

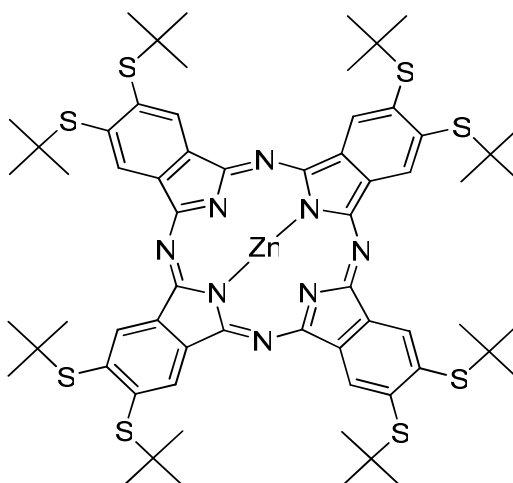
Molekulární vzorec = $C_{56}H_{72}N_{16}S_8Zn$



P9Zn

Relativní molekulová hmotnost = 1280,36 g/mol

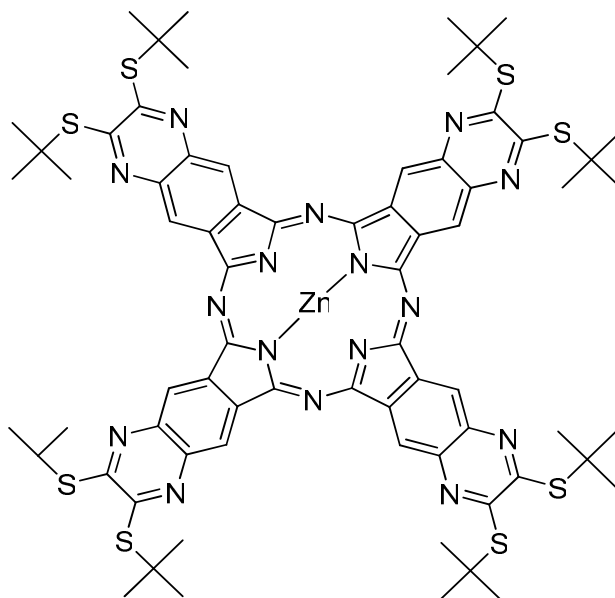
Molekulární vzorec = $C_{64}H_{80}N_8S_8Zn$



MUZ21Zn

Relativní molekulová hmotnost = 1488,38 g/mol

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



4.3. PŘÍSTROJE

Spektrofotometr Shimadzu UV-2401PC.

Centrifuga CL31R Multispeed

Vakuová odparka LABOROTA 4000

4.4. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ S BARVIVY

Postup:

Barvivo bylo naváženo do suché baňky a rozpuštěno ve 2 ml chloroformu, pak byl přidán 1 g příslušného oleje. Chloroform byl odpařen na vakuové odparce. Roztok byl přelit do zkumavky, uzavřen zátkou, obalen alobalem a ponechán ve tmě.

Po dvou měsících byl vizuálně hodnocen vzhled roztoků.

Následně byly zkumavky dány do centrifugy (na 5 minut při 3000 otáčkách), kde byla oddělena usazená část, poté byla odebrána rozpuštěná část, která byla opět uchována v uzavřených zkumavkách a ve tmě.

4.4.1. ZIP21Zn s různými oleji

Tab. 1 ZIP21Zn rozpuštěný v různých olejích

Vzorek	ZIP21Zn (mg)	Ricinový olej (g)	Brutnákový olej (g)	Makadamový olej (g)	MCT (g)
R-32	2,6	1,0			
R-33	2,6		1,0055		
R-34	2,5			1,0214	
R-35	2,5				1,0129
R-50	5,2				2,0075

Vizuální hodnocení:

U všech vzorků bylo barvivo usazené u dna. Roztoky zůstaly barevné i po delším stání (kontrola po roce od přípravy): R-32 zelený průhledný, R-33, R-34 a R-35 tmavě zelený.

Dále jsem pracovala s R-34 a R-35, u kterých byla stanovena koncentrace (tab. 16). Vzorek R-50 byl připraven dodatečně, byla u něj také vypočítána koncentrace (tab. 17).

Současně byly připravovány mikroemulze se samotným makadamovým olejem (4.7., tab. 21). Na základě vyhodnocení stability těchto mikroemulzí byl potom do mikroemulze převeden jen vzorek č. R-35 (4.7., tab. 24).

4.4.2. P9Zn s různými oleji

Tab. 2 P9Zn rozpuštěný v různých olejích

Vzorek	P9Zn (mg)	Ricinový olej (g)	Brutnákový olej (g)	Makadamový olej (g)	MCT (g)
R-36	2,6	1,0048			
R-37	2,6		1,0073		
R-38	2,6			0,9924	
R-39	2,6				1,0198
R-44	2,6	0,504			
R-52	5,2				2,0179

Vizuální hodnocení:

Roztok R-36 byl rozpuštěný. R-37, R-38, R-39 nebyly plně rozpuštěny.

Roztoky zůstaly barevné (kontrola po roce od přípravy).

Dále jsem pracovala s R-36, R-38, R-39 a vzorky R-44 a R-52, které byly připraveny později.

R-37 byl vyřazen vzhledem k nízké dlouhodobé stabilitě brutnákového oleje, způsobené extrémně vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin.

4.4.3. MUZ21Zn s různými oleji

Tab. 3 MUZ21Zn rozpuštěný v různých olejích

Vzorek	MUZ21Zn (mg)	Ricinový olej (g)	Brutnákový olej (g)	Makadamový olej (g)	MCT(g)
R-40	3	0,9991			
R-41	2,9		1,0102		
R-42	2,9			1,003	
R-43	2,9				1,0177
R-45	2,9			0,5161	
R-46	2,9				0,502
R-51	5,9				2,0318

Vizuální hodnocení:

Ve všech vzorcích nebylo barvivo plně rozpuštěno, bylo usazené u dna. Roztoky zůstaly barevné (kontrola po roce od přípravy): R-40 nejtmaší, R-41 zeleno-žlutý, průhledný, R-42 tmavší, průhledný. U vzorků R-45 a R-46, které byly připraveny později, byl kontrolován vzhled po 9 měsících: R-45 světlý, R-46 tmavý. MUZ21Zn v lipidech není zcela stabilní, roztoky byly po delším stání světlejší. Na základě vizuálního hodnocení jsem dále pracovala s roztoky R-43, R-46.

Vzorek R-51 byl připraven dodatečně, byla u něj měřena absorbance a vypočítána koncentrace PS v roztoku (tab. 18).

4.4.4. Barviva s diethylhexylkarbonátem

Tab. 4 Barviva s diethylhexylkarbonátem

Vzorek	Barviva	Navážka barviva (mg)	Chloroform (ml)	Diethylhexylkarbonát (g)
R-47	ZIP21Zn	3	2	1,0118
R-48	P9Zn	2,9	2	1,016
R-49	MUZ21Zn	3	2	1,0102

Paralelně byla zkoušena rozpustnost barviv v oleji (tab. 4) a připravovány mikroemulze samotného oleje (tab. 22).

Vzorky dále nebyly použity, protože olej tvořil pouze zakalené emulze.

4.5. STANOVENÍ MOLÁRNÍCH EXTINKČNÍCH KOEFICIENTŮ VE VYBRANÝCH LIPIDECH

4.5.1. 1. Metoda – měřením objemu roztoku

Molární extinkční koeficienty byly stanoveny u barviv v MCT, makadamovém oleji, ricinovém oleji.

Postup:

Byl připraven 100 μM zásobní roztok (ZR) barviva v chloroformu, pak byl převeden do oleje a zředěný na 1 μM koncentraci.

Chloroform byl odpařen na vakuové odparce a následně byla měřena absorbance. Porovnávací roztok byl vždy příslušný olej.

Tab. 6 Zásobní roztoky barviv o koncentraci 100 μM

Zásobní roztok č.	Barvivo	Navážka (mg)	Chloroform (ml)
1	ZIP21Zn	1,164	9,7
2	P9Zn	1,261	10,51
3	P9Zn	0,501	4,175
4	MUZ21Zn	1,217	10,14

Tab. 7 Absorbance ZIP21Zn v makadamovém oleji a MCT

Číslo měření	Absorbance v makadamovém oleji	Molární extinkční koeficient ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
1	0,37771	377710
2	0,3288	328800

Výsledky:

Průměrný molární extinkční koeficient ZIP21Zn v makadamovém oleji byl stanoven z naměřených hodnot: $353255 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Absorbance ZIP21Zn v MCT byla poměrně rozdílná u dvou různých měření, později byla přesněji měřena metodou vážením.

Tab. 8 Absorbance P9Zn v makadamovém oleji a MCT

Číslo měření	Absorbance v makadamovém oleji	Absorbance v MCT
Zásobní roztok č. 2		
1	0,1935 (po 7 dnech)	0,3118
2	0,1599	0,2564
Zásobní roztok č. 3		
3	0,3119	0,3635
4	0,2812	
5	0,2677	

Výsledky:

Absorbance zásobního roztoku č. 2 byla měřena po 7 dnech od přípravy (roztok byl uchován ve tmě a v chladu), proto byly naměřené hodnoty nízké. S novým zásobním roztokem bylo měřeno hned po přípravě, pak po 30 minutách. Naměřená absorbance se postupně snižovala.

Průměrný extinkční koeficient u makadamového oleje byl vypočítán z hodnot měření č. 3 a 4: $296550 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ a u MCT $337650 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (z hodnot měření č. 1 a 3).

Tab. 9 Absorbance MUZ21Zn v makadamovém oleji a MCT

Číslo měření	Absorbance v makadam.oleji	Absorbance v MCT
1	0,2502	0,246
2	0,2548	

Absorbance byla měřena po 7 dnech od přípravy roztoku barviva v chloroformu (roztok byl uchován ve tmě a v chladu).

Výsledky:

Průměrný molární extinkční koeficient u makadamového oleje z naměřených hodnot byl $252500 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Naměřené hodnoty absorbance byly oproti očekávání poměrně nízké, proto byly později u roztoků v MCT měřeny metodou vážením.

4.5.2. 2. Metoda – vážením

Molární extinkční koeficienty byly stanoveny pro ZIP21Zn v MCT, MUZ21Zn v MCT a pro P9Zn v ricinové oleji.

Postup:

Byl připraven 100 μM zásobní roztok barviva v chloroformu, pak byl převeden do oleje a zředěný na 1 μM koncentraci.

Protože MUZ21Zn se v chloroformu velmi rychle rozkládal, byl připraven i zásobní roztok tohoto PS v tetrahydrofuranu.

Chloroform (tetrahydrofuran) byl odpařen na vakuové odparce a následně byla měřena absorbance. Porovnávací roztok byl vždy příslušný olej.

Tento postup je stejný jako u metody 1, ale místo objemů bylo pracováno s hmotnostmi jednotlivých složek. Pomocí hustoty byly jednotlivé složky přepočítány na hmotnost.

Tab. 10 Hustota použitých surovin

	MCT	Ricinový olej	Chloroform	Tetrahydrofuran
Hustota (kg/m ³)	945	960	1 489	890

Tab. 11 Zásobní roztoky barviv o koncentraci 100 μM

Zásobní roztok č.	Barvivo	Navážka (mg)	Chloroform (g)	Tetrahydrofuran (g)
1	ZIP21Zn	0,515	5,95	
2	P9Zn	0,496	5,77	
3	MUZ21Zn	0,549	5,49	
4	MUZ21Zn	0,605		3,62
5	MUZ21Zn	0,590		3,50

4.5.2.1. Měření absorpance a stanovení molárního extinkčního koeficientu ZIP21Zn v MCT

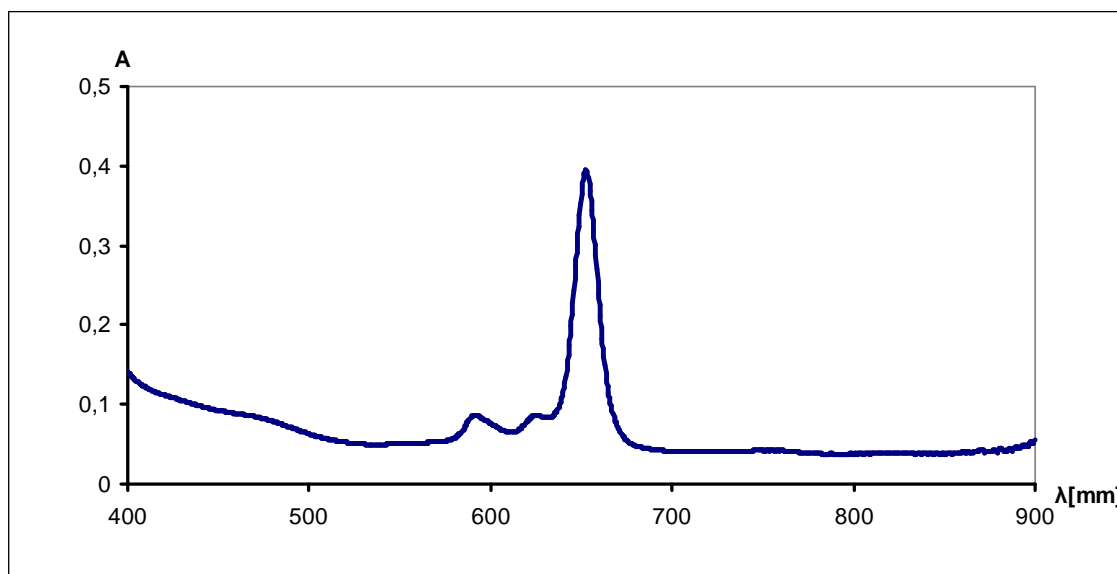
Tab. 12 Absorbance ZIP21Zn v MCT

Vzorek	Navážka MCT (g)	Navážka zásobního roztoku (mg)	Absorbance
A1	5,398	86	0,3577
A2	5,152	81,8	0,3536
A3	4,836	77	0,3518

Výsledek:

Průměrná absorpance: **A = 0,3544**

Molární extinkční koeficient: **$\xi = 354400 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$**



Obr. 12 UV/VIS spektrum ZIP21Zn v MCT (1 μM), vzorek A1

4.5.2.2. Měření absorbance a stanovení molárního extinkčního koeficientu MUZ21Zn v MCT

Tab. 13 Absorbance MUZ21Zn v MCT (zásobní roztok č. 3)

Vzorek	Navážka MCT (g)	Navážka ZR (mg)	Absorbance	Doba, po které byly vzorky měřeny od přípravy ZR
A4	4,677	74,4	0,416	hned po přípravě
A5	4,67	74,4	0,3262	po 1 hod
A6	4,67	74,4	0,3132	po 90 min
A7	5,023	80	0,2339	po 24 hod
A8	4,69	75	0,1898	po 24 hod

Tab. 14 Absorbance MUZ21Zn v MCT (zásobní roztok č. 4 a 5)

Vzorek	Zásobní roztok číslo	Navážka MCT (g)	Navážka ZR (mg)	Absorbance	Doba, po které byly vzorky měřeny od přípravy ZR
A11	5	4,67	45	0,467	hned po přípravě
A9	4	4,675	45	0,1985	po 60 min
A10	4	4,68	45	0,1673	po 90 min

Výsledky:

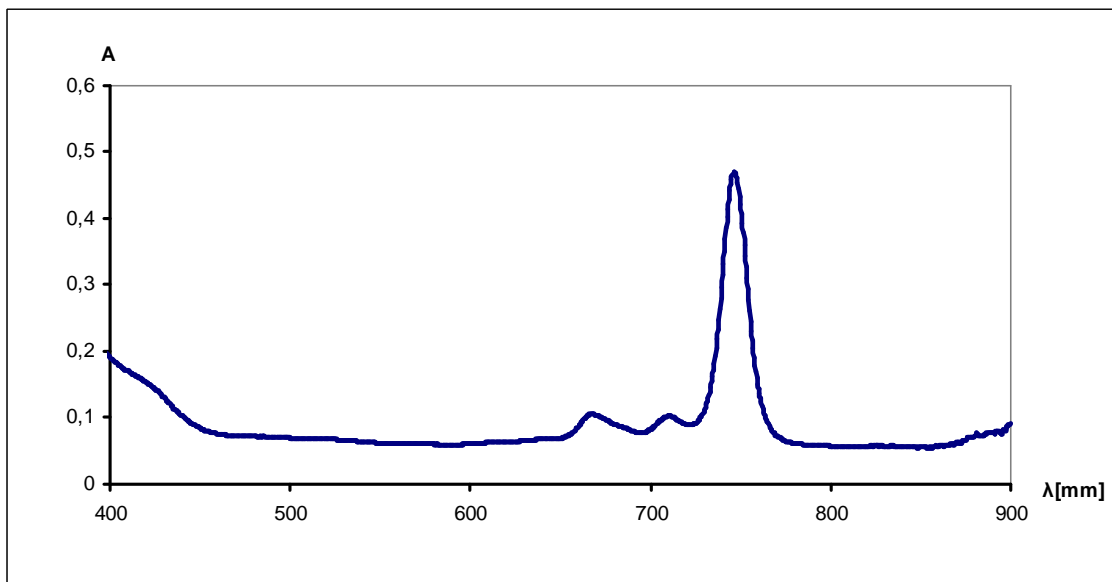
Při měření vzorků hned po přípravě zásobního roztoku s chloroformem a zředění na 1 μM koncentraci byla absorbance 0,416 (vzorek A4, tab. 13), při dalším měření cca po hodině byly hodnoty nižší. V chloroformu je MUZ21Zn značně nestálý, proto byly naměřené hodnoty velmi odlišné.

Abychom získali přesnější hodnoty, připravili jsme následně zásobní roztoky s tetrahydrofuranem, v němž je MUZ21Zn stabilnější, proto byla provedena další měření s tímto zásobním roztokem (tab. 14). Naměřené absorbance tomu neodpovídaly, hodnoty byly opět rozdílné.

Při dalších výpočtech byla použita absorbance vzorku A4, která byla naměřena ihned po přípravě zásobního roztoku s chloroformem:

Absorbance: **A = 0,416**

Molární extinkční koeficient: **$\xi = 416\ 000\ \text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$**



Obr. 13 UV/VIS spektrum MUZ21Zn v MCT (1 μM), vzorek A4

4.5.2.3. Měření absorpance a stanovení molárního extinkčního koeficientu P9Zn v ricinovém oleji

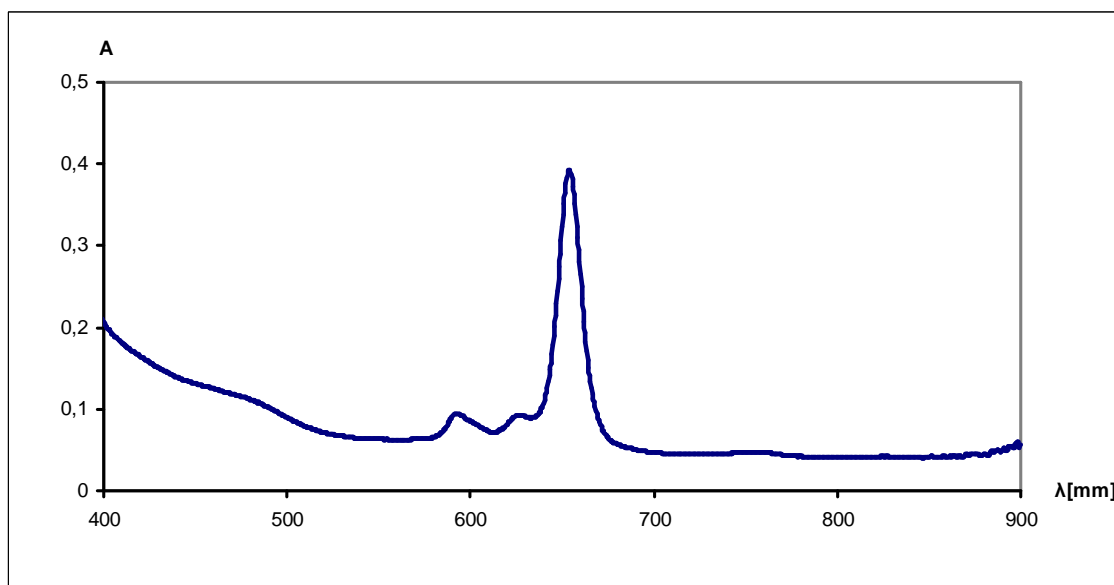
Tab. 15 Absorbance P9Zn v ricinovém oleji

Vzorek	Navážka MCT (g)	Navážka zásobního roztoku (mg)	Absorbance
A12	5,051	80,4	0,3525
A13	4,76	74,4	0,3520

Výsledek:

Průměrná absorpance: **A = 0,3522**

Molární extinkční koeficient: **$\xi = 352200 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$**



Obr. 14 UV/VIS spektrum P9Zn v ricinovém oleji (1 μM), vzorek A12

4.6. MĚŘENÍ ABSORBANCE A STANOVENÍ KONCENTRACE ROZTOKŮ

Postup:

Pomocí navážky barviva a objemu oleje byla vypočítána teoretická výchozí koncentrace roztoku. Pak bylo odměřeno 50 μl z původního roztoku a zředěno na přibližně 100 μM roztok a následně opět 50 μl z připraveného roztoku a 4950 μl oleje a byl připraven přibližně 1 μM roztok, u kterého byla měřena absorbance. Koncentrace byla vypočítána z naměřené absorbance a extinkčního koeficientu, násobená zředěním.

4.6.1. Měření absorbance u vybraných roztoků – měřením objemů roztoků

Tab. 16 Absorbance a koncentrace roztoků

Vzorek	Teoretická výchozí koncentrace (mM)	Absorbance	Molární ex. koeficient ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	Koncentrace roztoku (mM)
R-34	2,25	0,1492	353255	0,95
R-35	2,33	0,1561	354400	1,026
R-36	2,48	0,0572	352200	0,403
R-38	2,41	0,1437	296550	0,13
R-39	2,43	0,0548	337650	0,3937
R-43	2,69	0,117	416000	0,756
R-46	5,46	0,0815	416000	1,069
R-52	2,43	0,0827	337650	0,6335

Koncentrace R-35 (ZIP21Zn v MCT) byla 1,026 mM.

Koncentrace R-43 (MUZ21Zn v MCT) byla 0,756 mM.

R-39 a R-52 (P9Zn v MCT) – v roztoku se rozpustilo malé množství barviva. V makadamovém oleji se také rozpustilo malé množství barviva (R-34, R-38).

Vzorky R-35, R-43 byly převedeny na mikroemulze (tab. 24).

4.6.2. Měření absorbance u vybraných roztoků – vážením

4.6.2.1. Měření absorbance u vzorku R-50 (ZIP21Zn v MCT)

Postup:

Bylo naváženo přibližně 50 mg R-50 a zředěno olejem 100x na koncentraci 25 μM , pak bylo odváženo 200 mg a zředěno na 1 μM koncentraci, u které byla měřena absorbance.

Jako porovnávací roztok byl použit MCT.

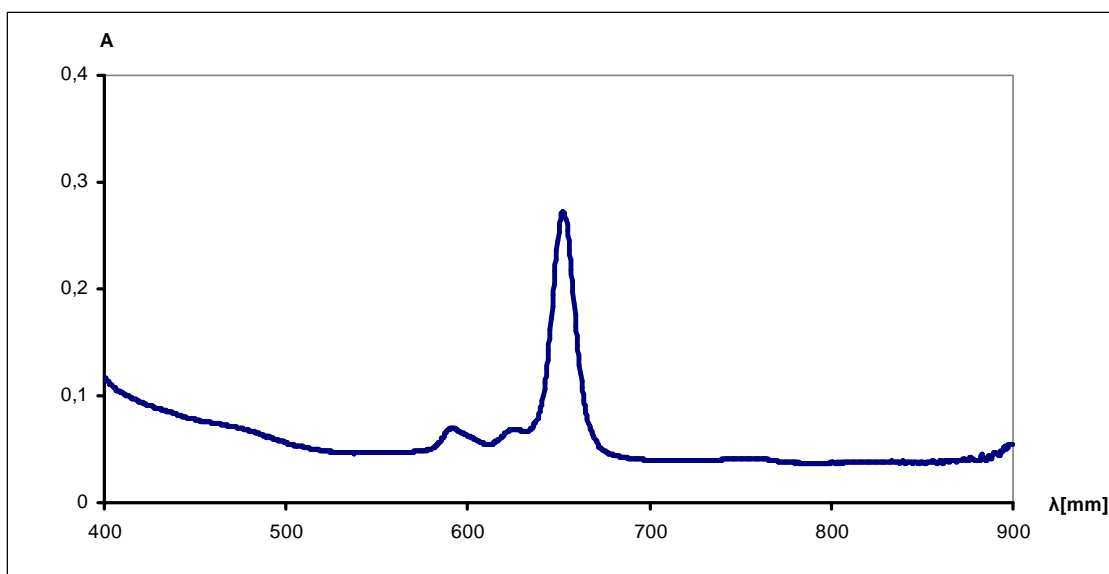
Tab. 17 Absorbance a koncentrace roztoků ZIP21Zn v MCT

Číslo měření	Teoretická výchozí konc. (mM)	Absorbance	Molární ex. koeficient ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	Koncentrace roztoku (mM)
1	2,45	0,2372	354400	1,637
2		0,2312		
3		0,2279		
Měření po 6 měsících				
4		0,0965		0,667

Výsledek:

Průměrná absorbance ZIP21Zn v MCT: **A = 0,2321**

Koncentrace ZIP21Zn v MCT: **c = 1,637 mM**



Obr. 15 UV/VIS spektrum ZIP21Zn v MCT, měření č. 1 (tab. 17)

4.6.2.2. Měření absorpance R-51 (MUZ21Zn v MCT)

Postup:

Bylo naváženo přibližně 50 mg R-51 a zředěno olejem 100x na koncentraci 27 μM , pak bylo odváženo 200 mg a zředěno na 1 μM koncentraci, u které byla měřena absorpance.

Jako porovnávací roztok byl použit MCT.

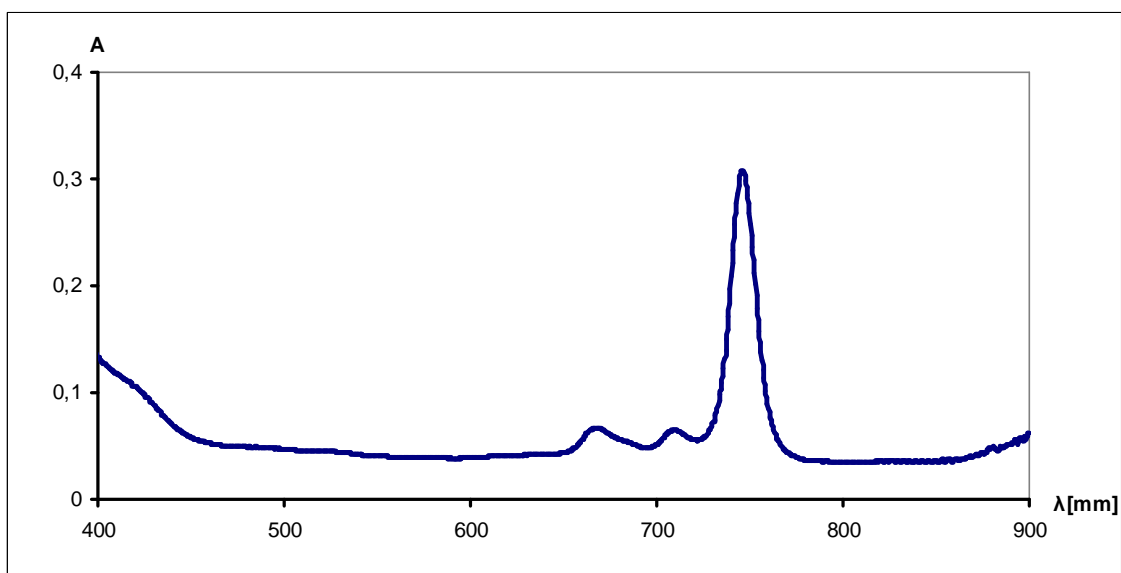
Tab. 18 Absorbance a koncentrace roztoků MUZ21Zn v MCT

Číslo měření	Teoretická výchozí konc. (mM)	Absorbance	Mol. extinkční koef. ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	Koncentrace roztoku (mM)
1	2,74	0,2872	416000	1,82
2		0,2743		
3		0,2801		

Výsledky:

Průměrná absorpance MUZ21Zn v MCT: **A = 0,2805**

Koncentrace MUZ21Zn v MCT: **c = 1,82 mM**



Obr. 16 UV/VIS spektrum MUZ21Zn v MCT, měření č. 1 (tab. 18)

4.6.2.3. Měření absorpance R-44 (P9Zn v ricinovém oleji)

Postup:

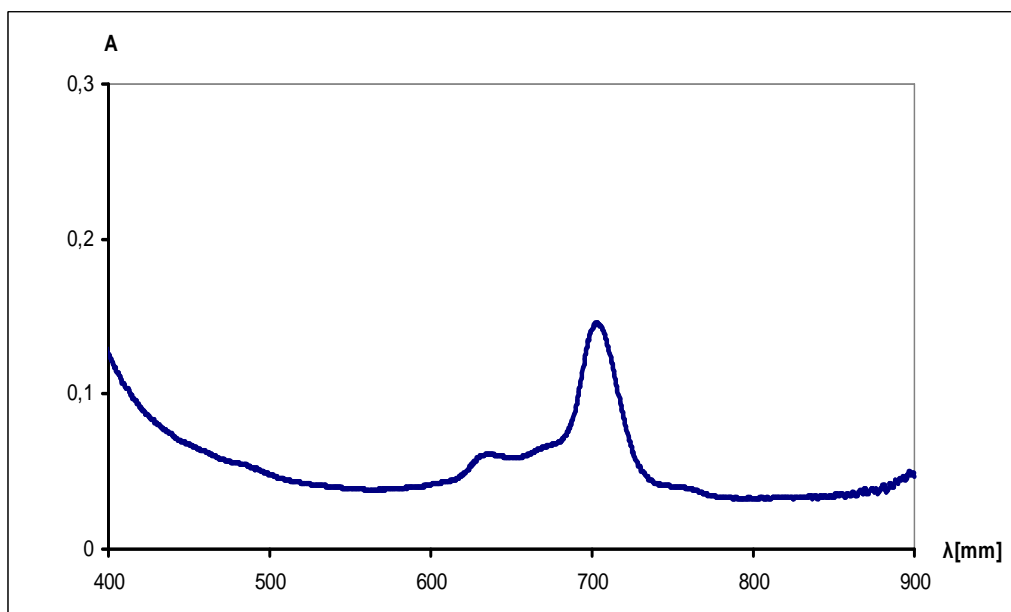
Bylo naváženo 52,2 mg R-44 a dováženo olejem na 2,568 g (100 μM).
Následně byl roztok zředěn na 1 μM (19 mg + 1,9 g).
Jako porovnávací roztok byl použit ricinový olej.

Tab. 19 Absorbance a koncentrace roztoku P9Zn v ricinovém oleji

Vzorek	Teoretická výchozí konc. (mM)	Absorbance	Mol. ex. koef. ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	Koncentrace roztoku (mM)
R-44	4,9524	0,1162	352200	1,633

Výsledek:

Koncentrace P9Zn v ricinovém oleji: **c = 1,633 mM**



Obr. 17 UV/VIS spektrum P9Zn v ricinovém oleji, vzorek R-44 (tab. 19)

**4.6.2.4. Měření absorbance u nově připravených roztoků
ZIP21Zn v MCT, MUZ21Zn v MCT**

Tab. 20 Absorbance a koncentrace ZIP21Zn v MCT, MUZ21Zn v MCT

Vzorek	Barvivo	Zředění	Absorbance	Molární ex. koef. ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	Koncentrace roztoku (mM)
1	ZIP21Zn	1:99 1:19	0,2822	354400	1,59
2	MUZ21Zn	1:99 1:19	0,2933	416000	1,41

Výsledky:

Koncentrace ZIP21Zn v MCT: **$c = 1,59 \text{ mM}$**

Koncentrace MUZ21Zn v MCT: **$c = 1,41 \text{ mM}$**

4.7. PŘÍPRAVA MIKROEMULZÍ SAMOTNÝCH OLEJŮ BEZ BARVIV

Postup:

Do kádinky byla navážena olejová fáze a přidán Cremophor[®] EL, součásti byly důkladně promíchány tyčinkou, následně po malých částech byla přidávána destilovaná voda a intenzivně míchána.

Vzniklá ME byla přelita do zkumavky, uzavřena a ponechána při laboratorní teplotě.

Tab. 21 Mikroemulze s makadamovým olejem

Vzorek	Makadamový olej (g)	Cremophor [®] EL (g)	Destilovaná voda (g)	Vzhled
Ma-1	1	2,5	6,5	bílá, neprůhledná
Ma-2	1	3	6	bílá, neprůhledná
Ma-3	1	3,5	5,5	bílá, hustší

Výsledky:

Vzniklé emulze byly bílé, neprůhledné. Po delším stání vzhled stejný. S makadamovým olejem jsem dále nepracovala.

Tab. 22 Mikroemulze s diethylhexylkarbonátem

Vzorek	Diethylhexylkarbonát(g)	Cremophor [®] EL (g)	Destilovaná voda (g)	Vzhled
DEH-1	1	2,5	6,5	zakalená, prstenec u hladiny
DEH-2	1	2	7	3 vrstvy, více čirá

Výsledky:

Vzniklé emulze se nepodařilo homogenizovat. I po delším stání fáze zůstaly rozdělené. Dále jsem s olejem nepracovala.

Tab. 23 Mikroemulze s ricinovým olejem

Vzorek	Ricinový olej (g)	Cremophor [®] EL (g)	Destilovaná voda (g)	Vzhled
Ric-1	1	2,5	6,5	průhledná, opalescence
Ric-2	1,2	2,2	6,6	mléčně zakalená
Ric-3	1	2,2	6,8	průhledná
Ric-4	1	2,1	6,9	více průhledná
Ric-5	1	2	7	průhledná, jemně mléčná

Výsledky:

Ric-1 po delším stání vytvořila u povrchu zakalený prstenec, ostatní zůstaly stejné. Nejlepší byla Ric-4.

4.8. PŘÍPRAVA MIKROEMULZÍ S BARVIVY V MTC

Na základě zkušeností z předchozí diplomové práce¹⁰⁰ byly připraveny ME s MCT v poměru surovin 1 : 2,5 : 6,5 (MCT : surfaktant : destilovaná voda).

Postup:

V kádince byla dobře rozmíchána olejová fáze s Cremophorem[®] EL a za intenzivního míchání byla postupně po malých částech přidávána destilovaná voda.

Tab. 24 ME se ZIP21Zn (ME-35) a ME s MUZ21Zn (ME-43)

Vzorek	Barvivo v oleji	Hmotnost olejového roztoku barviva (g)	Cremophor [®] EL (g)	Destilovaná voda (g)
ME-35	R-35	0,7307	1,827	4,75
ME-43	R-43	0,726	1,815	4,719

Měření absorbance mikroemulzí:

Postup:

Mikroemulze byly zředěny destilovanou vodou přibližně na 1 μ M koncentraci. Jako porovnávací roztok byla použita destilovaná voda.

Tab. 25 Absorbance ME

Vzorek	Koncentrace ME 10% (mM)	1. měření	2. měření	3. měření
ME-35	0,16	0,1206	0,2911	0,2539
ME-43	0,0756	0,2616	0,2131	0,2012

Ke stanovení koncentrace u ME-35 byly použity hodnoty absorbance z 2. a 3. měření, byly přesnější, protože byl použit větší objem ME-35. Výpočet koncentrace: naměřená A \div A 1 μ M \times zředění: $0,2725 \div 0,3544 \times 205,1 = 0,157$

Koncentrace ZIP21Zn v ME-35: **c = 0,157 mM**

Ke stanovení koncentrace u ME-43 byla použita průměrná hodnota absorbance 0,2253. Výpočet koncentrace: $0,2253 \div 0,4160 \times 169,5 = 0,0918$

Koncentrace MUZ21Zn v MR-43 **c = 0,0918 mM**

4.9. MĚŘENÍ STABILITY BARVIV V MIKROEMULZÍCH

4.9.1. Měření absorbance u mikroemulze ME-35 (ZIP21Zn v MCT) v závislosti na čase.

Postup:

Do kádinky bylo odměřeno 0,5 ml ME-35 a 102,05 ml destilované vody, vše dobře promícháno a měřena absorbance po 30 minutách.

Jako porovnávací roztok byla použita destilovaná voda.

Tab. 26 Absorbance ME-35 v závislosti na čase

Číslo měření	Čas (min.)	Absorbance
1	0	0,2929
2	30	0,2927
3	60	0,2869
4	90	0,2878
5	120	0,2895
6	150	0,2882

Výsledek:

ZIP21Zn v mikroemulzi je na světle krátkodobě relativně stálá.

4.9.2. Měření absorbance u ME-43 (MUZ21Zn v MCT) v závislosti na čase.

Postup:

Do kádinky bylo odměřeno 29,5 μ l ME-43 a 4970,5 μ l destilované vody, vše dobře promícháno a měřena absorbance po 30 minutách.

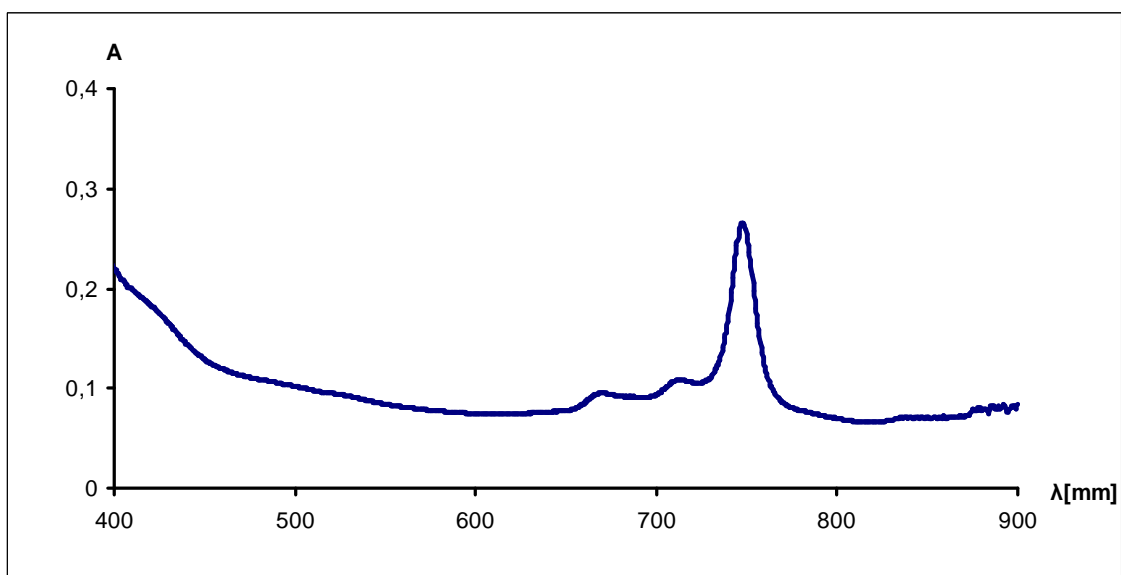
Jako porovnávací roztok byla použita destilovaná voda.

Tab. 27 Absorbance ME-43 v závislosti na čase

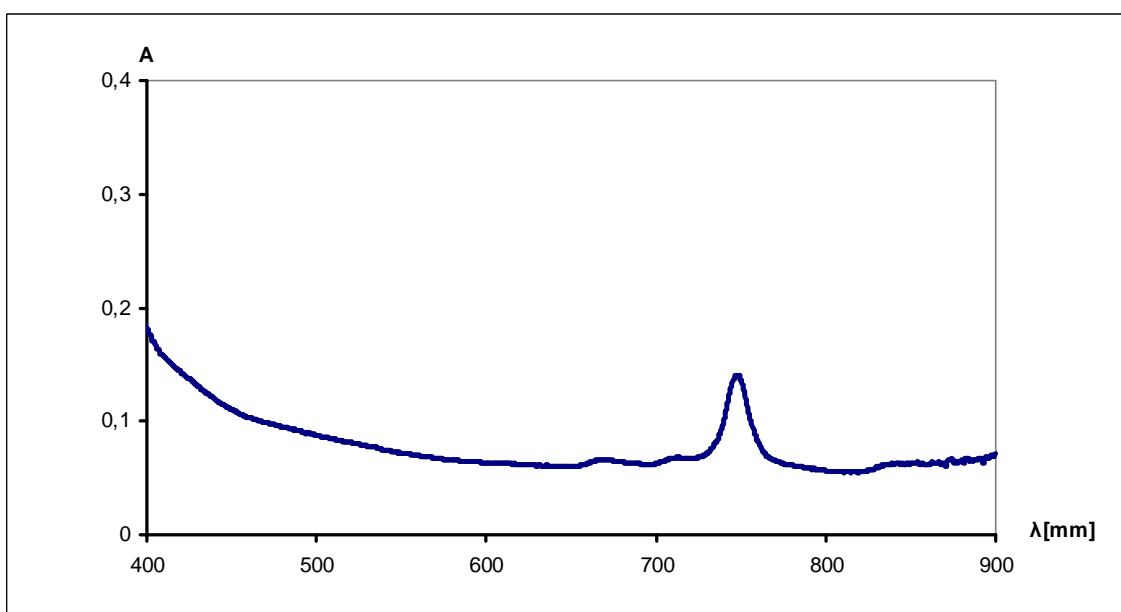
Číslo měření	Čas (min.)	Absorbance
1	0	0,2625
2	30	0,2265
3	60	0,2083
4	90	0,1880
5	120	0,1733
6	150	0,1556
7	180	0,1407
8	210	0,1304

Výsledek:

MUZ21Zn v mikroemulzi je na světle i krátkodobě poměrně málo stálá.



Obr. 19 UV/VIS spektrum MUZ21Zn v ME, měření č. 1 (tab. 27), hned po přípravě



Obr. 20 UV/VIS spektrum MUZ21Zn v ME, měření č. 7 (tab. 27), měřeno po 3 hod. od přípravy

5. DISKUZE

Cílem mé diplomové práce bylo zjistit rozpustnost lipofilních fotosenzitizérů typu azaanalogů ftalocyaninů v některých olejích a následně stanovení extinkčních koeficientů u vybraných vhodných systémů.

Pracovala jsem s fotosenzitizéry ZIP21Zn, MUZ21Zn a P9Zn. Nejprve jsem připravila olejové roztoky těchto fotosenzitizérů a sledovala rozpustnost. ZIP21Zn a MUZ21Zn nebyly plně rozpuštěny, barvivo bylo usazené u dna, navíc MUZ21Zn není v lipidech zcela stabilní. P9Zn byl uspokojivě rozpustný jen v ricinovém oleji.

Současně jsem zkoušela připravovat mikroemulze se samotnými oleji, jako emulgátor jsem používala Cremophor[®] EL. S makadamovým olejem ani s diethylhexylkarbonátem se mikroemulze nepodařilo připravit. S ricinovým olejem mikroemulze vznikla a to v poměru jednotlivých složek 1 : 2,1 : 6,9 (olej : emulgátor : voda). U samotné mikroemulze s ricinovým oleje byla měřena velikost částic. Mikroemulze s MCT byla připravena v poměru 1 : 2,5 : 6,5.

Pro fotosenzitizéry ZIP21Zn a MUZ21Zn byl ze zkoušených lipidů jako nejvhodnější rozpouštědlo nalezen MCT a pro P9Zn ricinový olej.

Následně jsem měřila absorbanci a počítala molární extinkční koeficient barviv v makadamovém oleji a v MCT metodou č. 1 (odměřováním objemů jednotlivých složek připravovaných roztoků). Touto metodou jsem získala navzájem poměrně rozdílné hodnoty absorbancí. Protože lipidy byly viskozní, nepodařilo se odebrat přesné množství, také chloroformový roztok barviv se pomocí mikropipety nedařilo přesně odměřit (díky vysoké relativní hustotě chloroformu). Protože s makadamovým olejem se nedařilo připravit stabilní ME, dále jsem ho nepoužívala. Pro MCT a ricinový olej jsem stanovila molární extinkční koeficienty 2. metodou a to vážením jednotlivých součástí roztoků. Pro ZIP21Zn v MCT jsem naměřila extinkční koeficient $354400 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ při vlnové délce 653 nm. Pro MUZ21Zn v MCT $416000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (při 746 nm) a u P9Zn v ricinovém oleji $352200 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (při 703 nm).

Dále jsem měřila koncentraci fotosenzitizérů v předem připravených roztocích, opět se osvědčila metoda vážením jednotlivých složek. Pro ZIP21Zn v MCT jsem získala hodnoty 1,637 mM (tab. 17, vzorek č. R-50) a 1,59 mM

(tab. 20, vzorek č. 1), pro MUZ21Zn v MCT 1,82 mM (tab. 19, vzorek R-51) a 1,41 mM (tab. 20, vzorek č. 2), u P9Zn 1,633 mM (tab. 19, vzorek R-44).

ZIP21Zn a MUZ21Zn v MCT (tab. 24) jsem převedla na mikroemulze a měřila jsem u nich absorbanci. Pro mikroemulzi ZIP21Zn v ME jsem vypočítala koncentraci 0,157 mM (pro 10% roztok) a pro MUZ21Zn 0,0918 mM. Nakonec jsem měřila stabilitu fotosenzitizérů ZIP21Zn a MUZ21Zn v ME. Z výsledků vyplývá, že MUZ21Zn je v ME i krátkodobě velmi málo stabilní, ZIP21Zn byl relativně stálý.

6. ZÁVĚR

Pro fotosenzitizéry ZIP21Zn a MUZ21Zn jsme zvolili jako vhodný solubiliizační systém MCT a pro P9Zn ricinový olej, se kterým jsme připravili mikroemulzi v poměru 1 : 2,1 : 6,9 (jako emulgátor byl použitý Cremophor® EL). S makadamovým olejem a diethylhexylkyrbonátem vznikly pouze zakalené mikroemulze (tab.21, 22).

U vybraných systémů jsme stanovili molární extinkční koeficienty. Dále jsme měřili absorbanci u jednotlivých vzorků a počítali koncentraci. ZIP21Zn a MUZ21Zn jsme převedli na ME a sledovali stabilitu barviv v ME. MUZ21Zn byl v ME i krátkodobě nestálý.

Naměřené hodnoty:

Molární extinkční koeficienty:

ZIP21Zn v MCT (při 653 nm): **$\xi = 354400 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$**

MUZ21Zn v MCT (při 746 nm): **$\xi = 416\ 000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$**

P9Zn v ricinovém oleji (při 703 nm): **$\xi = 352200 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$**

Koncentrace fotosenzitizérů v lipidech:

ZIP21Zn v MCT: **$c = 1,637 \text{ mM}$** (vzorek R-50, tab. 17)

$c = 1,59 \text{ mM}$ (vzorek č. 1, tab. 20)

MUZ21Zn v MCT: **$c = 1,82 \text{ mM}$** (vzorek R-51, tab. 18)

$c = 1,41 \text{ mM}$ (vzorek č. 2, tab. 20)

P9Zn v ricinovém oleji: **$c = 1,633 \text{ mM}$** (vzorek R-44, tab. 19)

Koncentrace ZIP21Zn a MUZ21Zn v připravené mikroemulzi:

ZIP21Zn (10%, vzorek ME-35): **$c = 0,157 \text{ mM}$**

MUZ21Zn (10%, vzorek ME-43): **$c = 0,0918 \text{ mM}$**

7. SEZNAM ZKRATEK

AMD	senilní degenerace makuly
CrEL	Cremophor [®] EL
HpD	derivát hematoporphyrinu
LDL	lipoproteiny s nízkou hustotou
KMK	kritická micelární koncentrace
LUV	velké unilamelární vezikuly
MCT	triacylglyceroly střední nasycené
MLV	velké multilamelární vezikuly
MVV	multivezikulární vezikuly
OLV	velké oligolamelární vezikuly
O/V	olej/voda
PDT	fotodynamická terapie
PEG	polyethylenglykol
PEO	polyethylenoxid
PLAA	poly (<i>L</i> -aminokyselina)
PPO	popyprophylenoxid
PS	fotosenzitizér
RES	retikuloendoteliální systém
ROS	reaktivní formy kyslíku
SUV	malé unilamelární vezikuly
V/O	voda/olej
ZR	zásobní roztok

8. LITERATURA

- ¹ Vorlíček, J.: Perspektivy protinádorové léčby. *Remedia*, 2008, 18, 4-5.
- ² http://cs.wikipedia.org/wiki/Fotodynamick%C3%A1_terapie
- ³ Zimčík, P., Miletín, M.: Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění I. Historie, základní princip. *Čes. Slov. Farm.*, 2004, 53, 219-224.
- ⁴ Henderson, B. Dougherty, T. J.: How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.*, 1992, 55, 145-157.
- ⁵ Dougherty, T. J.: Photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, 1993, 58, 895.
- ⁶ Sharman, W. M., Allen, C. M., van Lier, J. E.: Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov. Today*, 1999; 4, 507-517.
- ⁷ Brown, S. B., Brown, E. A., Walker, I.: The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The Lancet Oncology*, 2004, 5, 497-508.
- ⁸ Dummin, H., Cernay, T. and Zimmermann, H. W.: Selective photosensitization of mitochondria in HeLa cells by cationic Zn(II) phthalocyanines with lipophilic sidechains. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, 1997, 37, 219-229.
- ⁹ Martin, D.: Porphyrins. In: Martin D., Mayes, P. and Rodwel, V. editors. *Harper's Review of Biochemistry*. Los Altos, CA: Lange Medical Publications; 1983: pp. 317-333.
- ¹⁰ Zimčík, P., Miletín, M.: Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění II. Přehled fotosenzitizérů. *Čes. Slov. Farm.*, 2004, 53, 271-279.
- ¹¹ Gomer, C. J., Ferrario, A.: Tissue distribution and photosensitizing properties in mono-L-aspartyl chlorin e6 in a mouse tumor model. *Cancer Res.*, 1990; 50, 3985-3990.
- ¹² Dolmans, D. E. J. G. J., Fukumura, D., Jain, R. K.: Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2003; 3, 380-387.
- ¹³ Castano, A. P., Demidova, T. N., Hamblin, M. R.: Mechanism in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2004, 1, 279-293.
- ¹⁴ Shopova, M., Woehrle, D., Mantareva, V. and Mueller, S.: Naphthalocyanine complexes as potential photosensitizers for photodynamic therapy of tumors. *J. Biomed. Opt.*, 1999, 4, 276-285.

-
- ¹⁵ Biolo, R., Jori, G., Soncin, M., Pratesi, R., Vanni, U., Rihter, B., Kenney, M. E. and Rodgers, M. A. J.: Photodynamic Therapy of B16 Pigmented Melanoma with Liposome-Delivered Si(IV)-Naphthalocyanine. *Photochem. Photobiol.*, 1994, 59, 362-365.
- ¹⁶ Ali, H. and van Lier, J. E.: Metal complexes as photo- and radiosensitizers. *Chem. Rev.*, 1999, 99, 2379-2450.
- ¹⁷ Sternberg, E. D., Dolphin, D., Brückner, Ch.: Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron*, 1998, 54, 4151-4202.
- ¹⁸ Bonacucina, G., Cespi, M., Misici-Falci, M., Palmieri, G. F.: Colloidal soft matter as drug delivery system. *Journal of pharmaceutical science*, 2009, 98, 1-42.
- ¹⁹ Rabišková, M.: Nanočástice pro léčivé formy. *Remedia*, 2007, 17, 495-501.
- ²⁰ Chalaba, M. et al.: *Technologie léků*, 2. přepracované vydání, Galén Praha, 2001.
- ²¹ Bagwe, R. P., Kanicky, J. R., Palla, B. J., Patanjali, P. K., Shah, D. O.: Improved Drug Delivery Using Microemulsions: Rationale, Recent Progress, and New horizons. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2001, 18, 77-140.
- ²² Mittal, K. L., Lindman, B., editors: *Surfactants in solution*. Vols. 1–3. New York: Plenum Press, 1991.
- ²³ Rangel-Yagui, C. A., Pessoa-Jr, A., Costa Tavares, L.: Micellar solubilization of drugs. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 2005, 8, (2), 147-163.
- ²⁴ Martin, A. *Physical Pharmacy*, 4ed., Williams and Wilkins, Baltimore, USA, 1993, 396–398.
- ²⁵ Jones, M. N., Chapman, D.: *Micelles, monolayers and biomembranes*. Wiley-Liss, New York, 1995.
- ²⁶ Rosen, M.J.: *Surfactants and interfacial phenomena*, 2ed., John Wiley & Sons, New York, 1989.
- ²⁷ Chevalier, Y., Zemb, T.: The structure of micelles and microemulsions. *Rep Prog Phys*, 1990, 53, 279-371.
- ²⁸ Tanford, C.: *The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes*. Wiley, New York, 1980.
- ²⁹ Torchilin, V. P.: Structure and design of polymeric surfactant-base drug delivery systems. *J Control Rel*, 2001, 73:137-172.
- ³⁰ Chevalier, Y., Zemb, T.: The structure of micelles and microemulsions. *Rep Prog Phys*, 1990, 53:279-371.

-
- ³¹ Puvvada, S., Blankschtein, D.: Molecular-thermodynamic approach to predict micellization, phase behavior, and phase separation of micellar solutions. I. Application to nonionic surfactants. *J Chem Phys*, 1990, 92(6):3710-3724.
- ³² Yokoyama, M.: Block copolymers as drug carriers. *CRC Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1992, 9, 213-248.
- ³³ Hiemenz, P. C., Rajagopalan, R.: Principles of colloid and surface chemistry, 3ed. Marcel Decker, New York, 1997.
- ³⁴ Dutt, G. B.: Rotational diffusion of hydrophobic probes in Brij-35 micelles: Effect of temperature on micellar internal environment. *J Phys Chem B*, 2003, 107, 10546-10551.
- ³⁵ Gelderblom, H., Verweij, J., Nooter, K., Sparreboom, A.: Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur J Cancer*, 2001, 37, 1590-1598.
- ³⁶ Cremophor® EL. Technical Leaflet. ME 074 e. (888) July 1997 (Bn).
- ³⁷ Kabanov, A. V., Batrakova, E. V., Melik-Nubarov, N. S., Fedoseev, N. A., Dorodnich, T. Y., Alakhov, V. Y., Chekhonin, V. P., Nazarova, I. R., Kabanov, V. A.: A new class of drug carriers; micelle poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene) block copolymers as microcontainers for drug targeting from blood to brain. *J Contr Rel*, 1992, 22, 141–158.
- ³⁸ Kwon, G. S., Kataoka, K.: Block copolymer micelles as long-circulating carriers for delivery of therapeutic and diagnostic agents. *Adv Drug Deliv Rev*, 1995, 16, 295-309.
- ³⁹ Lee, J. H., Lee, H. B., Andrade, J. D.: Blood compatibility of polyethylene oxide surfaces. *Prog Polym Sci*, 1995, 20(6), 1043-1079.
- ⁴⁰ Lavasanifar, A., Samuel, J., Kwon, G. S.: Poly(ethylene oxide)-block-poly(L-amino acid) micelles for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54, 169-190.
- ⁴¹ Adams, M. L., Lavasanifar, A., Kwon, G. S.: Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *J Pharm Sci*, 2003, 92(7), 1343-1355.
- ⁴² Gadelle, F., Koros, W. J., Schechter, R. S.: Solubilization of aromatic solutes in block copolymers. *Macromolecules*, 1995, 28, 4883–4892.
- ⁴³ Kataoka, K., Harada, A., Nagasaki, Y.: Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47, 113–131.

-
- ⁴⁴ Li, Y., Kwon, G. S.: Methotrexate esters of poly(ethylene oxide)-block-poly(2-hydroxyethyl-aspartamide). Part I: effects of the level of methotrexate conjugation on the stability of micelles and on drug release. *Pharm Res*, 2000, 17, 607–611.
- ⁴⁵ Mortensen, K.: PEO-related block copolymer surfactants. *Coll Surf A*, 2001, 183-185, 277-292.
- ⁴⁶ Zhang, G. D., Harada, A., Nishiyama, N., Jiang, D. L., Koyama, H., Aida, T., Kataoka, K.: Polyion complex micelles entrapping cationic dendrimer porphyrin: effective photosensitizer for photodynamic therapy of cancer. *J Control Rel*, 2003, 93(2), 141-150.
- ⁴⁷ Jaturanpinyo, M., Harada, A., Yuan, X. F., Kataoka, K.: Preparation of bionanoreactor based on core-shell structured polyion complex micelles entrapping trypsin in the core cross-linked with glutaraldehyde. *Bioconjugate Chem*, 2004, 15(2), 344-348.
- ⁴⁸ Hoar, T. P., Schulman, J. H.: Transparent water-in-oil dispersions: The oleophobic hydro-micelle. *Nature*, 1943, 152, 102–103.
- ⁴⁹ Danielsson, I., Lindman, B.: The definition of microemulsion. *Colloids Surf*, 1981, 3, 391–392.
- ⁵⁰ Gasco, M. R.: Microemulsions in the pharmaceutical field: Perspectives and applications. In: Solans C, Kunieda H, editors. *Industrial application of microemulsions*. New York: Marcel Dekker Inc., 1997, pp 97–122.
- ⁵¹ Moulik, S. P., Paul, B. K.: Structure, dynamics and transport properties of microemulsions. *Adv Colloid Interface Sci*, 1998, 78, 99–195.
- ⁵² Attwood, D.: Microemulsions, In: Kreuter, H., editor. *Colloidal drug delivery systems*. New York: Marcel Dekker; 1994, 31.
- ⁵³ Kreilgaard, M.: Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54, 77–98.
- ⁵⁴ Thiele, L., Rothen-Rutishauser, B., Wunderli-Allenspach, H., Merkle, H. P., Walter, E.: Particle-uptake by monocyte derived dendritic cells in vitro: Evaluation of particle size and surface characteristics. *Proc Int Symp Control Rel Bioact Mater*, 1999, 24, 163–164.
- ⁵⁵ Araya, H., Tomita, M., Hayashi, M.: The novel formulation design of O/W microemulsion for improving the gastrointestinal absorption of poorly water soluble compounds. *Int J Pharm*, 2005, 305, 61–74.
- ⁵⁶ Kim, C-K., Cho, Y-J., Gao, Z-G.: Preparation and evaluation of biphenyl dimethylidicarboxylate microemulsions for oral delivery. *J Control Release*, 2001, 70, 149–155.

-
- ⁵⁷ Brime, B., Moreno, M. A., Frutos, G., Ballesteros, M. P., Frutos, P.: Amphotericin B in oil-water lecithin-based microemulsions: Formulation and toxicity evaluation. *J Pharm Sci*, 2002, 91, 1178–1185.
- ⁵⁸ Delgado Charro, M. B., Iglesias-Vilas, G., Blanco-Me´ndez, J., Lo´pez-Quintela, M. A., Marty, J-P., Guy, R. H.: Delivery of a hydrophilic solute through the skin from novel microemulsion system. *Eur J Pharm Biopharm*, 1997, 43, 37–42.
- ⁵⁹ Haße, A., Keipert, S.: Development and characterisation of microemulsions for ocular application. *Eur J Pharm Biopharm*, 1997, 43, 179–183.
- ⁶⁰ Li, L., Nandi, I., Kim, K. H.: Development of an ethyl laurate-based microemulsion for rapid-onset intranasal delivery of diazepam. *Int J Pharm*, 2002, 237, 77–85.
- ⁶¹ Bangham, A. D., Horne, R. W.: Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J Mol Biol*, 1964, 8, 660–668.
- ⁶² Weismann, G.: Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J Lipid Res*, 1968, 9, 310–318.
- ⁶³ Schubert R.: Lipozomy v léčích. In: Žabka, M, Müller, R. H., Hildebrandt, G. E.: Moderní lékové formy ve farmaceutické technologii. SAP – Slovak Academic Press, Bratislava 2001, (22), 235–257.
- ⁶⁴ Yokohama, S., Inagaki, A., Imura, T., et al.: Membrane properties of cationic liposomes composed of dipalmitoylphosphatidylcholine and dipalmitylmethylammonium bromide. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2005, 44, 204–210.
- ⁶⁵ Šentjerc, M., Vrhovnik, K., Kristl, J.: Liposomes as a topical delivery system: the role of size on transport studied by the EPR imaging method. *J Controlled Release*, 1999, 59, 87–97.
- ⁶⁶ Meisner, D., Mezei, M.: Liposome ocular delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 1995, 16, 75–93.
- ⁶⁷ Lasic, D. D.: Liposomes and Niosomes. In surfactants in cosmetics. New York: Marcel Dehher, Inc. 1997, 263-283
- ⁶⁸ Hadašová, E.: Lipozomální lékové formy. *Remedia*, 2006, 16, 433-437.
- ⁶⁹ Vemuri, S., Rhodes, C. T.: Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: A review. *Pharm Acta Helv*, 1995. 70, 95–111.
- ⁷⁰ Lee, K-D, Hong, K., Papahadjopoulos, D.: Recognition of liposomes by cells: In vitro binding and endocytosis mediated by specific lipid headgroups and surface charge density. *Biochim Biophys Acta*, 1990, 1024, 336–352.

-
- ⁷¹ Szoka, F. Jr., Papahadjopoulos, D.: Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annu Rev Biophys Bioeng*, 1980, 9, 467–508.
- ⁷² Abra, R. M., Mihalko, P. J., Schreier, H.: The effect of lipid composition upon the encapsulation and in vitro leakage of metaproterenol sulfate from 0.2 mm diameter, extruded, multilamellar liposomes. *J Control Release*, 1990, 14, 71–78.
- ⁷³ Bangham, A. D., Standish, M. M., Watkins, J. C.: Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol*, 1965, 13, 238–252.
- ⁷⁴ Allen, T. M., Redemann, C., Martin, F., Hansen, C.: Liposomes containing synthetic lipid derivatives of polyethylene glycol show prolonged circulation half-lives in vivo. *Liposomes in Drug Delivery, 21 Years on. 12–15 Dec 1990, London 1990.*
- ⁷⁵ Papahadjopoulos, D.: Stealth liposomes: prolonged circulation time in blood, improved accumulation in tumors and increased therapeutic index. *Liposomes in Drug Delivery, 21 Years on. 12–15 Dec 1990, London 1990.*
- ⁷⁶ Blume, G., Cevc, G.: Liposomes for the sustained drug release in vivo. *Biochim Biophys Acta*, 1990, 1029, 91–97.
- ⁷⁷ Oku, N.: Anticancer therapy using glucuronate modified long-circulating liposomes. *Adv Drug Deliv Rev*, 1999, 40, 63–73.
- ⁷⁸ Maruyama, K., Takizawa, T., Yuda, T., Kennel, S. J., Huang, L., Iwatsuru, M.: Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipathic poly(ethylene glycol)s conjugated at their distal terminals to monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1234, 74–80.
- ⁷⁹ Ng, K-Y, Zhao, L., Liu, Y., Mahapatro, M.: The effects of polyethylene glycol (PEG)-derived lipid on the activity of targeted-sensitive immunoliposomes. *Int J Pharm*, 2000, 193, 157-166.
- ⁸⁰ Drummond, D. C., Zignani, M., Leroux, J-C.: Current status of pH-sensitive liposomes in drug delivery. *Prog Lipid Res*, 2000, 39, 409–460.
- ⁸¹ Zignani, M., Drummond, D. C., Meyer, O., Hong, K., Leroux, J-C.: In vitro characterization of a novel polymeric-based pH-sensitive liposome system. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1463, 383–394.
- ⁸² Shi, G., Guo, W., Stephenson, S. M., Lee, R. J.: Efficient intracellular drug and gene delivery using folate receptor-targeted pH-sensitive liposomes composed of cationic/anionic lipid combinations. *J Control Release*, 2002, 80, 309–319.
- ⁸³ Tomalia, D. A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J., Smith, P.: A new class of polymers: Starburst-dendritic macromolecules. *Polym J (Tokyo)*, 1985, 17, 117–132.

-
- ⁸⁴ Buhleir, E., Wehner, W., Vögtle, F.: "Cascade" - and "nonskyd-chain-like" syntheses of molecular cavity topologies. *Synthesis*, 1978, 55, 155–158.
- ⁸⁵ www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2005/2_Lhotak.pdf
- ⁸⁶ Rabišková, M.: Od Galéna k lékovým systémům. *Remedia*, 2006, 16, 427–431.
- ⁸⁷ Stiriba, S. E., Frey, H., Haag, R.: Dendritische polymere für medizinische Anwendungen: Auf dem Weg zum Einsatz in Diagnostik und Therapie. *Angew Chem*, 2002, 114, 1385–1390.
- ⁸⁸ Velpandian, T., Gupta, S. K., Gupta, Y. K., Biswas, N. R., Agarwal, H. C.: Ocular drug targeting by liposomes and their corneal interactions. *J Microencapsul*, 1999, 16, 243–250.
- ⁸⁹ Svenson, S., Tomalia, D. A.: Dendrimers in biomedical applications-reflections on the field. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57, 2106–2129.
- ⁹⁰ Hawker, C. J., Fréchet, J. M. J.: Preparation of polymer with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *J Am Chem Soc*, 1990, 112, 7638–7647.
- ⁹¹ Boas, U., Heegaard, P.M.H.: Dendrimers in drug research. *Chem Soc Rev*, 2004, 33, 43–63.
- ⁹² Wu, P., Feldman, A. K., Nugent, A. K., Hawker, C. J., Scheel, A., Voit, B., Pyun, J., Fréchet, J. M. J., Sharpless, K.B., Fokin, V. V.: Efficiency and fidelity in a click-chemistry route to triazole dendrimers by the copper(I)-catalysed ligation of azides and alkynes. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2004, 43, 3928–3932.
- ⁹³ Kojima, C., Kono, K., Maryama, K., Takagishi, T.: Synthesis of polyamidoamine dendrimers having Poly(ethylene) glycol graft and their ability to encapsulate anticancer drugs. *Bioconjug Chem*, 2000, 11, 910–917.
- ⁹⁴ Liu, M. J., Fréchet, J. M. J.: Designing dendrimers for drug delivery. *Pharm Sci Technol Today*, 1999, 2, 393–401.
- ⁹⁵ D'Emanuele, A., Attwood, D.: Dendrimer-drug interactions. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57, 2147–2162.
- ⁹⁶ Nishiyama, N., Stapert, H. R., Zhang, G. D., Takasu, D., Jiang, D. L., Nagano, T., Aida, T., Kataoka, K.: Light-harvesting ionic dendrimer porphyrins as new photosensitizers for photodynamic therapy. *Bioconjug Chem*, 2003, 14, 58–66.
- ⁹⁷ Quintana, A., Raczka, E., Piehler, L., Lee, M., Inhan, A., Majoros, I., Patri, A. K. T., Thommey, M. J., Baker, J. R. Jr.: Design and function of a dendrimer-based therapeutic nanodevice targeted to tumor cells through the folate receptor. *Pharm Res*, 2002, 19, 1310–1316.

-
- ⁹⁸ Jevprasesphant, R., Penny, J., Jalal, R., Attwood, D., McKeon, N. B., D'Emanuele, A.: The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *Int J Pharm*, 2003, 252, 263–266.
- ⁹⁹ http://en.wikipedia.org/wiki/Cremophor_EL
- ¹⁰⁰ Grandová, M.: Solubilizační systémy pro potenciálně fotodynamicky aktivní látky III. Hradec Králové, 2009, Diplomová práce na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy na katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv. Vedoucí diplomové práce Pharm.Dr. Miroslav Miletín, Ph.D.