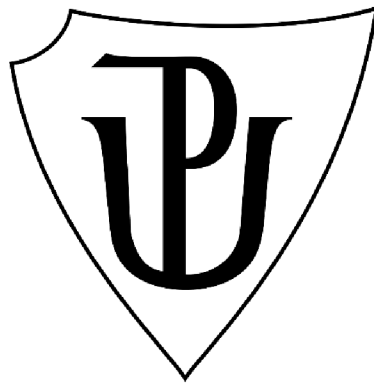


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



Lipidové vezikuly jako nosiče látek s řízeným uvolňováním s pomocí vysokofrekvenčního ultrazvuku

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Petr Skopal**
Studijní program: B0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství
Specializace: Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **MUDr. Mgr. Robert Bajgar, Ph.D.**
Rok: 2024

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením MUDr. Mgr. Roberta Bajgara, Ph.D. s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto si přeji srdečně poděkovat panu MUDr. Mgr. Robertu Bajgarovi, Ph.D. za odbornou asistenci a trpělivé vedení, poskytnuté rady, dodaný materiál včetně prvotní literatury, vstřícnost, a především nespočetné hodiny strávené v laboratoři, kde mi byl zaopatřen patřičný prostor a zázemí pro vypracování této práce. Současně si taktéž dovoluji poděkovat kolektivu Ústavu lékařské biofyziky za naskytnutí této příležitosti. Experimentální část práce byla uskutečněna za finanční podpory grantového projektu NU21J-03-00062 agentury Ministerstva zdravotnictví České republiky AZV.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Petr Skopal

Název práce: Lipidové vezikuly jako nosiče látek s řízeným uvolňováním s pomocí vysokofrekvenčního ultrazvuku

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Ústav lékařské biofyziky; Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Vedoucí práce: MUDr. Mgr. Robert Bajgar, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2024

Abstrakt:

Role distribučních systémů v biomedicině spočívá primárně ve schopnosti cíleného transportu léčiva do tkáně, kde dojde k jeho uvolnění a navození terapeutického účinku. Tento princip se uplatňuje především v oblasti výzkumu léčby onkologických onemocnění. Jedním z nejznámějších a komerčně nejúspěšnějších nosičů tohoto typu jsou nepochybně liposomy, tedy sférické vezikuly tvořené z lipidové lamelární dvojvrstvy imitující přirozené buněčné membrány. Z tohoto důvodu se jedná o vysoce biokompatibilní a účinný způsob přenosu enkapsulovaných látek. Lipidové vezikuly je možné jednak pasivně či cíleně navést k místu určení, ale také na základě rozličných stimulů narušit, čímž dojde k eluci nákladu. V současnosti rutinně využívané postupy zahrnují ozvučení s pomocí ultrazvuku, a to především nízkofrekvenčního, jenž indukuje mechanický efekt kavitace. Ačkoliv své využití nachází i ultrazvuk vysokofrekvenční (především v oblasti sonografie), z hlediska permeabilizace liposomů jej lze ve srovnání s nízkofrekvenčním ultrazvukem označit jako méně popsáný. Cílem této práce je tedy vzájemně srovnat účinky obou typů ultrazvuku s důrazem na ultrazvuk vysokofrekvenční. Vyjma základních liposomálních formulací byly také provedeny jejich úpravy s pomocí inkorporace membránových konstituentů. Současně byla experimentálně navržena metodika měření pro uvolňování látek z liposomů a následně ověřena.

Klíčová slova: Lipidy, liposomy, ultrazvuk, uvolňování, luciferáza, kalcein, nanočástice, enkapsulace

Počet stran: 92

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Petr Skopal
Title: Lipid vesicles as carriers of controlled release substances by high-frequency ultrasound
Type of thesis: Bachelor
Department: Department of Medical Biophysics; Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc
Supervisor: MUDr. Mgr. Robert Bajgar, Ph.D.
The year of presentation: 2024

Abstract:

The role of distribution systems in biomedicine primarily lies in the ability of targeted drug delivery to tissues, where its release and therapeutic effect are initiated. This principle is applied primarily in the field of research into the treatment of oncological diseases. One of the most well-known and commercially successful carriers of this type are undoubtedly liposomes, which are spherical vesicles formed from a lipid bilayer mimicking natural cell membranes. For this reason, they are considered to be highly biocompatible and effective means of transferring encapsulated substances. Lipid vesicles can be passively or actively directed to the target site, but can also be disrupted based on various stimuli, leading to cargo elution. Currently, routinely used procedures include sonication using ultrasound, being primarily low-frequency, which induces a mechanical cavitation effect. Although high-frequency ultrasound also finds its use (primarily in the field of sonography), concerning liposome permeabilization, it can be described as less well-described compared to low-frequency ultrasound. As such, the aim of the thesis is therefore to compare the effects of both types of ultrasound, with an emphasis being put on high-frequency ultrasound. In addition to basic liposomal formulations, modifications were conducted using the incorporation of membrane constituents. At the same time, a methodology for measuring the controlled release of substances from liposomes was experimentally designed and subsequently verified.

Keywords: Lipids, liposomes, ultrasound, release, luciferase, calcein, nanoparticles, encapsulation
Number of pages: 92
Number of appendices: 0
Language: Czech

Obsah

1	ÚVOD.....	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	4
2.1	Systemy pro cílenou distribuci látek	4
2.1.1	Klasifikace distribučních systémů	5
2.2	Liposomy.....	8
2.2.1	Definice	8
2.2.2	Historický výzkum a vývoj	8
2.2.3	Charakterizace lipidových vezikul	10
2.2.4	Chemická struktura:.....	15
2.2.5	Membránové modifikace a funkcionalizace.....	18
2.2.6	Formulace liposomů a metody jejich přípravy	20
2.2.7	Obecná farmakokinetika lipidových vezikul	23
2.3	Mechanismy řízeného uvolňování látek z lipidových vezikul	29
2.3.1	Exogenní mechanismy uvolnění.....	30
2.3.2	Endogenní mechanismy uvolnění.....	34
2.4	Ultrazvuk.....	35
2.4.1	Obecné vlastnosti ultrazvuku.....	35
2.4.2	Metody generování ultrazvuku.....	39
2.4.3	Biologické účinky	40
2.5	Řízené uvolňování látek z liposomů pomocí ultrazvuku	42
2.5.1	Fyzikální princip a metodika provedení	43
2.5.2	Liposomální systémy senzitivní k ultrazvuku	44
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	47
3.1	MATERIÁLY	47
3.1.1	Chemické látky:.....	47
3.1.2	Instrumentace:	48
3.1.3	Ostatní laboratorní vybavení:	48
3.1.4	Software:.....	48

3.2	METODY	49
3.2.1	Příprava multilamelárních vezikul.....	49
3.2.2	Příprava unilamelárních vezikul	51
3.2.3	Modifikace liposomů	53
3.2.4	Odstranění extravezikulární značky:	53
3.2.5	Měření uvolňování ATP z liposomů pomocí ultrazvuku:	54
3.2.6	Měření uvolňování kalceinu z liposomů pomocí ultrazvuku	56
4	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	57
4.1	Komparace účinků LFUS a HFUS	57
4.2	Vliv koncentrace cholesterolu na sonosenzitivitu liposomů	63
4.3	Vliv koncentrace PEG-8000 na sonosenzitivitu liposomů.....	66
4.4	Modulace intenzity US s pomocí fokusace nástavce	68
4.5	Modulace intenzity US s pomocí odražeče v měřící komůrce	71
4.6	Měření fluorescenčního signálu při uvolnění kalceinu z liposomů.....	73
5	ZÁVĚR	76
6	REFERENCE.....	79
6.1	Literatura	79
6.2	Hypertextové odkazy	88
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	89

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

1. Provedení literární rešerše v oblasti různých mechanismů řízeného uvolňování látek/léčiv se zaměřením na lipidové vezikuly.
2. Zhodnocení současného stavu znalostí v uvedené problematice.

Praktická část

1. Navržení metodiky experimentálního měření pro uvolňování nízkomolekulárních látek z liposomů pomocí vysokofrekvenčního ultrazvuku *in vitro*.
2. Ověření experimentálně navržené metodiky.
3. Provedení statistického vyhodnocení měření s následnou diskusí získaných výsledků.

1 ÚVOD

Moderní technologie distribuce léčiv umožňují zlepšení terapeutického indexu přenášené látky na základě omezení vedlejších účinků, prodloužení doby cirkulace v oběhu či cílené přepravy látky do specifické tkáně. Jejich vznik byl podmíněn negativy tradičních, dnes již zcela běžných systémů, kam řadíme například klasické tablety, tinktury, sirupy či tobolky, které nedokáží reflektovat mnohdy komplexní charakter mnohých onemocnění, mezi něž patří neurologické, infekční, genetické a především maligní nádorové nemoci (Adepu & Ramakrishna, 2021; Nsairat et al., 2022).

Onkologická onemocnění jsou složitá, vícefaktorová onemocnění, jež lze obecně charakterizovat jako narušení běžného stavu proliferace, který ústí v nekontrolovaný růst, neschopnost diferenciaci a typicky i přerušování apoptotické signalizace, tedy „nesmrtelnosti“. Mezi běžné metody používané při léčbě těchto onemocnění se typicky řadí chirurgické výkony, radioterapie, chemoterapie nebo jejich kombinace. Vzhledem k vysoce toxickému účinku cytostatik i na zdravé buňky a nespecifickému působení se však nejedná o příliš efektivní způsob odstranění nádorových buněk (Ahmadi *et al.*, 2020). Ideálním způsobem, jak se vyhnout potenciálně negativním účinkům chemoterapie, by byl design systému, jenž umožňuje kontrolované uvolňování léčiva do tkáně, či případně reguluje toxicitu dané látky.

V posledních letech došlo ke značnému pokroku v této oblasti. Kromě experimentů s uhlíkovými nanočásticemi či magneticky upravenými nosiči na bázi oxidů železa se další výzkum zaměřuje především na využití liposomů jakožto potenciálních nosičů léčiv a jiných látek. Jedná se o sférické lipidové vezikuly tvořené dvojitou fosfolipidovou membránou s eventuálně navázanými konstituenty v rámci různorodých modifikací. Obsahují hydrofilní i hydrofobní oblasti udávající jejich interakce s ostatními molekulami. Jejich vlastnosti umožňují překonat mnohé biologické překážky, neboť svou strukturou napodobují přirozené biomembrány. V závislosti na složení liposomů též nedochází k zásadní interakci s imunitním systémem pacienta. Využití vysoce purifikovaných složek a činidel je naprosto nezbytné k dosažení tohoto efektu. Nenasycené lipidy, získané například z vaječného žloutku či kravského séra (kupříkladu lecitin), jsou poměrně náchylné k oxidaci způsobující limitaci životnosti liposomu (Zahednezhad *et al.*, 2019).

Vhodné liposomové formulace lze docílit volbou patřičné kombinace lipidů (tedy chemickou strukturou, velikostí, a poměrem komponent), jejich funkcionalizací, ale i

metodikou doručení látek na určené místo. Zpravidla se užívají glycerofosfolipidy disponující glycerolem jakožto hlavní molekulou, na kterou je navázána fosfátová skupina a dva nasycené či nenasycené řetězce mastných kyselin. Nenasycené lipidy existují v přírodní formě s konformací *cis*, která je však méně stabilní než syntetické lipidy disponující konformací *trans*, které bývají dále modifikovány v oblasti fosfátové skupiny i alifatických řetězců (Guimaraes *et al.*, 2021).

Kategoricky lze liposomy řadit v závislosti na množství dvojitéch membrán na unilamelární či multilamelární. Unilamelární vezikuly dosahují menších rozměrů, typicky pod 100 nm, zatímco multilamelární jsou tvořeny ze dvou a více koncentrických dvojvrstev o celkových rozměrech větších než 500 nm. Nejběžnějším a nejstarším způsobem jejich přípravy je takzvaná Banghamova metoda (Bangham *et al.*, 1967) zahrnující tenkovrstevnou emulzifikaci lipidů prostřednictvím jejich rozpuštění v organickém rozpouštědle, odpařením a následnou hydratací ve vodném roztoku (pufru). Takto lze docílit tvorby vezikul o různé velikosti, kterou lze následně upravovat extruzí či jinými technikami.

Vzhledem k jejich příznivým biologickým vlastnostem umožňujícím výskyt *in vivo* podmínkách, relativní termostabilitě (závisí na složení) představují vhodný systém k doručení látek se značnou flexibilitou a potenciálem v mnoha rozličných oblastech výzkumu (Maurer *et al.*, 2001). Mezi možné způsoby uvolnění enkapsulovaného nákladu patří tepelné působení (liposomy obsahující oxidy železa), fotodynamické uvolnění, dále pak elektricky či enzymaticky vyvolané uvolňování (Franco *et al.*, 2021). Za zmínku též stojí využití ultrazvuku, jenž v medicíně nachází celou řadu uplatnění, a to konkrétně v rámci zobrazovacích metod, zubním lékařství, a terapeuticky například při dezintegraci ledvinových kamenů a mnoho dalších.

Ultrazvuk lze charakterizovat jako oscilující elastické mechanické vlny o frekvenci mimo rozsah lidského sluchu (>20 kHz). V medicíně se pak tyto vlny na základě frekvence rozdělují na vysokofrekvenční (HFUS, ≥ 1 MHz) a nízkofrekvenční LFUS (Schroeder *et al.*, 2009), velice důležitá je také intenzita akustického vlnění. Mezi vlastnosti umožňující natolik rozšířené využití patří například biokompatibilita, značná penetrace tkání (v závislosti na frekvenci), ovladatelnost a široká dostupnost. Již v minulém století byly zjištěny mechanismy interakce ultrazvuku s biologickými membránami, které mohou být využity k uvolnění látek z lipidových vezikul. Tento mechanický efekt je odvozen od stabilní kavitace vyvolané konstantní oscilací mikrobublin či nestabilní kavitací způsobenou rapidním zvětšením objemu bublin a jejich

následným prasknutím a kolapsem. Stabilní kavitace lze docílit použitím ultrazvuku s nízkou intenzitou (běžné pro vysoké frekvence), jenž indukuje tvorbu střižných sil v kapalině, které v konečném důsledku vedou k narušení struktury nosiče za následného uvolnění enkapsulované látky. Současně dochází k tvorbě pórů v membráně.

K nestabilní kavitaci naproti tomu dochází při aplikaci ultrazvuku o vysoké intenzitě (a typicky nižších frekvencích), kdy vzniklý tlakový gradient vede k rozpadu membrány vlivem kolapsu mikrobublin (Ahmadi *et al.*, 2020).

Tohoto efektu lze využít kupříkladu při stimulaci endotelu krevních cév a zvýšení jejich permeability. Kromě mechanického působení, tedy kavitace, může vlivem ultrazvuku dojít též ke změnám nestabilních vazeb v nosiči a navýšení teploty (Tu *et al.*, 2021). Míru uvolňování látek z liposomů lze posléze prověřit. Například Huang a MacDonald (2004) měřili efektivitu uvolnění kalceinu prostřednictvím fluorescenčního signálu.

V rámci této práce budou zhodnoceny obecné principy uvolňování látek z různých nosičů s důrazem na lipidové vezikuly. Jako uvolňovací mechanismus v praktické části poslouží primárně vysokofrekvenční ultrazvuk, jehož působení na liposomy bude kvantifikováno s pomocí dvou detekčních systémů a následně vyhodnoceno. Vysokofrekvenční ultrazvuk byl zvolen primárně z důvodu malého množství publikací, které se jím zabývají, a to navzdory jeho relativně nižší tkáňové destruktivitě ve srovnání s nízkofrekvenčním ultrazvukem.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Systémy pro cílenou distribuci látek

Distribuční systémy jsou souhrnným označením pro metody, technologie a formulace umožňující překonání biologických překážek a omezení konvenčních léčiv, respektive jejich účinných látek (Tewabe *et al.*, 2021). Podání a dávkování se mnohdy setkává s komplikacemi, a to obzvláště v případě vysoce potentních léčiv vyžadujících přesné navážky v řádu mg a μg . Také mnohé způsoby aplikace bývají nepraktické či neefektivní z hlediska uplatnitelnosti. Při orálním podání léčiv může dojít k jejich degradaci působením nízkého žaludečního pH, nebo mohou zapříčinit lokální iritace či přímo poranění tkáně v místě aplikace z důvodu nerovnoměrného uvolnění léčiva ve vysokých koncentracích. Mezi další faktory omezující efektivitu léčiv patří jejich inherentní chemická nestabilita, suboptimální organoleptické vlastnosti (tedy chuť či pach), a v neposlední řadě taktéž náchylnost k nežádoucím interakcím s okolním prostředím, primárně tedy imunitním systémem (Adepu & Ramakrishna, 2021).

Vzhledem k výše uvedeným faktorům byly vyvinuty metody cílené distribuce, jež navyšují terapeutický index léčiv prostřednictvím jejich účinné aplikace v místě určení za současného uvolnění během určitého časového období a v požadovaných koncentracích, čímž se předchází projevu potenciálně cytotoxických a jiných vedlejších účinků (Nsairat *et al.*, 2021). Jedná se o technologické systémy, které zprostředkovávají formulaci a uložení terapeutické látky do snadněji aplikovatelné a účinnější podoby. Zcela elementárním a nejranějším typem takového systému jsou dnes již obvyčejné potahované tablety či tobolky, avšak v současnosti existuje nespočet pokročilejších způsobů distribuce látek, jejichž specifika umožňují vysoce efektivní uplatnění v konkrétní oblasti. Současně lépe reflektují potřeby moderní medicíny a problematiky léčby rozličných komplexních onemocnění (Ezike *et al.*, 2023).

Vzhledem k rozvoji poznatků v oblasti molekulární biologie, bioinženýrství, nanomateriálů a farmacie vznikly systémy a terapeutika schopná zacílit na specifickou tkáň či buňky. Léčiva na bázi proteinů, peptidů, monoklonálních protilátek (mAb), nukleových kyselin, nanomateriálových a membránových systémů signifikantně modifikují farmakokinetiku přidružených látek a rozšiřují možnosti terapie (Vargason *et al.*, 2021).

Jako typický příklad populárního tématického zaměření se velmi často uvádějí onkologické choroby, které doposud představují pro vědecký výzkum v mnohých ohledech ne zcela překonanou výzvu. Mezi běžně dostupné metody léčby se řadí chirurgická excize nádoru či chemoterapie založená na intravenózní aplikaci cytostatik, která však nespécificky působí cytotoxickým účinkem i na zdravé buňky, což s sebou nese negativní důsledky pro recipienty tohoto typu terapie (Ahmadi *et al.*, 2020).

Využití distribučních systémů se však neomezuje pouze na oblast nádorových onemocnění. Například relativně nedávno byly experimentálně prověřovány inhalovatelné liposomální a polysacharidové mikročástice ve formě suchého prášku pro léčbu infekčních plicních chorob (Mehta *et al.*, 2020; Pěšťálová *et al.*, 2023). Dále lze uvést umělé nosiče pro genové editace rostlinného genomu, které představují vylepšení původně velice zdlouhavého a neúčinného procesu transformace rostlin s pomocí biolistických metod, PEG-zprostředkované transfekce či floral-dip protokolu (Yan *et al.*, 2022).

2.1.1 Klasifikace distribučních systémů

Obecně lze distribuční systémy rozdělit do několika generačních skupin. V první generaci vystupují především konvenční či klasické metody podání léčiv, tedy například kapsle, tablety a emulze. Druhá generace již inkorporuje určité modifikace, například speciální potahy upravující mechanismus uvolnění. V třetí generaci se setkáváme s distribučními systémy, jejichž vlastnosti lze aktivně měnit a ovládat. Řadí se sem především osmoticky aktivní nosiče a difuzní systémy. Čtvrtá a zároveň současná generace umožňuje cílený přenos léčiv do místa určení. Jejich parametry jsou zcela modulární a regulovatelné, přičemž mechanismus transportu se rozděluje na pasivní a aktivní (vysvětleno v následujících kapitolách). Pátá generace se prozatím nachází v konceptuální fázi s teprve prvotními dílčími úspěchy a studii. Jedná se o nanorobotické, syntetické biologické systémy schopné autonomní distribuce látek v širokém časovém rozpětí trvajícím v řádu měsíců i let. Mimo jiné se zde naplno uplatňují principy genové terapie (Tewabe *et al.*, 2021).

V současnosti se rozlišuje několik základních skupin distribučních vektorů v rámci čtvrté generace. Jedná se primárně o vezikulární koloidní nosiče a nanočásticové vektory na bázi syntetických i přírodních polymerů. Určitou roli hrají v neposlední řadě také imunokonjugáty a virové vektory. Vezikulární nosiče se vyznačují především biokompatibilitou, relativní metastabilitou, rozsáhlými variantami možného uplatnění a

regulovatelného podání, a v neposlední řadě také schopností pozitivně ovlivnit farmakokinetické vlastnosti enkapsulovaného léčiva. Po eluci nákladu dochází k jejich rychlé degradaci nebo vyloučení z organismu, což přispívá k nízké imunogenicitě. Strukturně je utvářejí zpravidla lamelární lipidické struktury o velikosti několika desítek až stovek nanometrů (Martinho *et al.*, 2011).

2.1.1.1 Vezikulární nosiče

Nejznámějším příslušníkem této skupiny jsou bezpochyby liposomy, jimiž se zbytek práce bude detailně zabývat. Existují však i relativně podobné analogické systémy, jež z lipidových vezikul vycházejí. Například takzvané niosomy fungují na identickém principu jako liposomy. Zásadně se však liší vazbou neiontových surfaktantů ke svému povrchu, které představují nemalou procentuální složku z hlediska celkové stavby. Základní skelet tvoří polyoxyethylenové alkylové estery (POE) nebo také sacharózové diestery. Povrchově aktivní látky postrádající elektrický náboj, bývají v zásadě relativně netoxické. Současně zlepšují terapeutický index léčiva skrze omezení nežádoucích interakcí s okolním prostředím. Oproti liposomům také není nutné následovat specifické postupy a podmínky skladování, neboť niosomy vynikají chemickou stabilitou, což z nich činí finančně nenáročnou a atraktivní volbu nosiče pro distribuci látek. Nicméně nelze opomenout několik zásadních negativ, jež by měla být brána v potaz. Na rozdíl od následujících vezikulárních systémů je prakticky vyloučena jejich transdermální aplikace z důvodu slabé permeability kůže vůči těmto strukturám. Současně společně s liposomy dochází ke vzájemné agregaci vezikul a spontánní difuzi enkapsulovaného nákladu (Martinho *et al.*, 2011; Yadav *et al.*, 2016; Tewabe *et al.*, 2021).

Transferosomy a ethosomy jsou přímými deriváty liposomů, jelikož se strukturně taktéž zakládají na lipidových dvojrstvách. Jejich vlastnosti jsou však optimalizovány pro transdermální podání a transport proteinů, peptidů a také protizánětlivých léčiv typu Ibuprofen či Diclofenac (Elsayed *et al.*, 2007). Co se specifík týče, transferosomy se vyznačují vysoce flexibilní povahou membrán, která se projevuje výjimečnou deformovatelností. Ta je zprostředkována povrchově aktivními látkami, kam se řadí např. Tween 80 a cholát sodný. Jejich druhotná funkce také umožňuje narušení buněčných membrán, čímž zásadně zlepšují permeabilitu. Ethosomy obsahují především ethanol a izopropylalkohol, přičemž pro účely topického podání nahrazují liposomy (Laffleur & Keckeis, 2020; Tewabe *et al.*, 2021). Jmenovitě lze také zmínit tzv. sfingosomy, aquasomy, bliosomy a další (Kamboj *et al.*, 2013).

2.1.1.2 Distribuční systémy na bázi polymerů

Polymerní nosiče vyjma vezikulárních systémů tvoří zdaleka nejrozsáhlejší skupinu částic vhodných k enkapsulaci a uvolnění látek a následné eluci. Především biodegradabilní polymery jako např. polylaktáty představují vysoce biokompatibilní systémy, které rapidně navyšují rozpustnost hydrofobního nákladu a poločas cirkulace v krevním oběhu.

Jedná se jmenovitě o polymery na přírodní bázi, tedy např. cyklodextriny, chitosan, albuminové konjugáty, argininové deriváty, kyselinu hyaluronovou a polysacharidy. Na závěr jako zástupci syntetických polymerů poslouží PLA (polylaktáty), PACA (polyalkylcyanoakryláty), rozličné polyamidy, PVA (polyvinyl alkohol) a další (Martinho *et al.*, 2011; Sung & Kim, 2020; Tewabe *et al.*, 2021).

2.1.1.3 Mikro/nanočásticové anorganické systémy

Některé anorganické nanočástice, především kvantové tečky (QD=quantum dots), koloidní zlato nebo magnetické nanopartikelky o rozměrech pod 100 nm projevují schopnost selektivního transportu skrze buněčné membrány, a to především při konjugaci s RGD peptidem (arginyl-glycyl-aspartát) a PEG (Chen *et al.*, 2008; Martinho *et al.*, 2011). Magnetické nanočástice je současně možné navádět jejich umístěním do externího magnetického pole a selektivně indukovat hypertermii. Silikonové porézní materiály mohou inkorporovat léčiva a působit tak jako nosiče (Paolino *et al.*, 2006).

2.1.1.4 Emulzní systémy

Tento druh nosičů je charakteristický především svým složením z isotropních směsí vody a olejů stabilizovaných surfaktanty. Jejich výhoda spočívá v příznivých termodynamických vlastnostech (stabilitě), vysoké rozpustnosti a schopnosti průniku tkáněmi, především tedy pokožkou (Martinho *et al.*, 2011).

2.1.1.5 Imunoglobulinové a virové vektory

Spojením protilátek s léčivem prostřednictvím linkeru umožňuje cílené navázání daného imunoglobulinu v místě určení. Vhodnou volbou konjugátu tak lze docílit léčby širokého spektra onemocnění. Za tímto účelem se používají především humanizované monoklonální protilátky (mAb), jejichž prostřednictvím se snižují nežádoucí imunogenní účinky v organismu. Dalšími možnými strategiemi k dosažení tohoto efektu je taktéž PEGylace nebo vazba albuminu (Wu & Senter, 2005).

Použití virových vektorů není ani zdaleka specifické pouze pro oblast biomedicíny, neboť především retrovirální nosiče nalézají již mnoho let uplatnění v oboru rostlinných biotechnologií pro genový transfer rekombinantní DNA do rostlin. Přehledově se v medicíně používají lentiviry, retroviry a adenoviry, nicméně představují určité riziko v podobně potenciální aktivace protoonkogenů a silné imunitní odezvy (Martinho *et al.*, 2011).

2.2 Liposomy

2.2.1 Definice

Liposomy lze definovat jako singulární či vícenásobné koncentrické lipidové dvojvrstvy tvořící umělý obal, v němž se nachází intravezikulární vodná fáze či složka, eventuálně i enkapsulovaná léčiva a jiné vybrané látky jako např. peptidy a proteiny. Zvláště v moderní medicíně se jedná o značně všestranné a pokročilé systémy napodobující přirozené biomembrány, což umožňuje jejich aplikaci při léčbě tkáňově specifických onemocnění vyžadujících poměrně přesné doručení požadovaného léčiva na místo určení bez negativní odpovědi imunitního systému v lidském organismu (Edwards & Baeumner, 2005). Samotný pojem „liposom“ vychází z řeckého jazyka, kde předpona „lipo-“ znamená tuk, a „soma-“ značí tělo či korpus. Zprvu však žádný specializovaný název pro lipidové vezikuly nebyl stanoven, což se změnilo teprve až koncem 60. let minulého století, kdy Weissmann k takzvaným fosfolipidovým sférolím přiřadil označení liposomy (Sessa & Weissmann, 1968). Avšak v návaznosti na činnost dr. Banghama (viz následující kapitola) se tyto vezikuly také označují pojmy „kapalný krystal“, „Banghasomy“ nebo jako takzvané „smektické mesofáze“ (Kim, 2016).

2.2.2 Historický výzkum a vývoj

Byť k produkci prvních liposomů docházelo v laboratořích bezděčně již od roku 1847, poprvé byly tyto struktury řádně objeveny a popsány roku 1961, respektive roku 1964, a to zásluhou dr. Aleca Banghama v rámci jeho působení na Univerzitě v Cambridge, konkrétně Babraham Institute. Zde zformuloval základní tezi popisující stav rovnováhy, ve kterém každá lipidová dvojvrstva utváří souvislou membránu umožňující vznik diskrétního vnitřního kompartmentu izolovaného od vnějšího prostředí (Bangham & Horne, 1963). Mimo jiné tak došlo k potvrzení dřívější studie (Robertson, 1960)

teoretizující o existenci fosfolipidové struktury intracelulárních a plasmatických membrán.

Prvotní výzkum se zaměřoval spíše na roli liposomů v podobě modelu pro studium fyzikálně-chemických vlastností biomembrán, kupříkladu jejich permeability vůči rozličným iontům, dále též membránové fúze či vazby enzymů. Teprve až o několik let později došlo k upření pozornosti vůči potenciálnímu biomedicínskému využití lipidových vezikul. dr. George Gregoriadis ve studii z roku 1971 uvádí metodu enkapsulace aminoglukosidázy a albuminu ve vezikulách tvořených z vaječného lecithinu (fosfatidylcholinu), cholesterolu a dihexadecyl fosfátu prostřednictvím jejich hydratace (viz kapitola „Metody přípravy liposomů“) a následné pasáže skrze sefárovou kolonu (Gregoriadis *et al.*, 1971).

Jednalo se tak o prvotní impulz, jenž odkryl možnosti uplatnění liposomů v lékařství a inspiroval budoucí výzkum v této oblasti. I samotný dr. Gregoriadis se dále této problematice věnoval v jeho navazujících člancích, kde rozváděl absenci specificity farmakologicky aktivních látek a s tím související potřebu tato léčiva selektivně dopravit do cílové tkáně oproti tehdejšími tradičním postupům. Současně upozornil na potenciální využití liposomů jako nosičů látek. Tato myšlenka vedla ke zjištění, že liposomy o rozdílných vlastnostech lze prakticky uplatnit *in vitro* v savčích buňkách, respektive jejich buněčných kulturách, kde díky enkapsulaci dochází k prodloužení doby cirkulace léčiv, což vede k jejich zvýšené účinnosti (Gregoriadis, 1976). Již zmíněný vědec však nebyl ani zdaleka jediným, kdo se podílel na další charakterizaci liposomů a jejich konkrétním uplatnění.

Za posledních 40 let došlo díky intenzivnímu výzkumu v této sféře ke značným pokrokům, jednak například v rámci syntézy liposomů s pomocí extruze skrze sérii polykarbonátových membrán a dalších metod (Olson *et al.*, 1979; Hope *et al.*, 1985), ale také v oblasti rozličných povrchových modifikací. Kupříkladu Klibanov a kolektiv roku 1990 úspěšně inkorporovali dioleoyl N-(monomethoxy-polyethylenglykolsukciny) fosfatidylethanolamin do membrán objemných unilamelárních liposomů složených z kombinace vaječného lecithinu a cholesterolu v poměru 1:1, čímž byl signifikantně prodloužen poločas cirkulace v krevním oběhu z méně než 30 minut na 5 hodin (Klibanov *et al.*, 1990). Tato modifikační strategie v polovině 90. let umožnila vznik Doxil, prvního schváleného léčiva na bázi nanopartikulí (Barenholz, 2012). Vyjma povrchové funkcionalizace vezikul probíhaly experimenty také v rámci samotné enkapsulace různorodých látek včetně cytostatik při léčbě onkologických onemocnění (např.

metotrexát – Kimelberg *et al.*, 1976), v jejichž kontextu je možné o liposomech slyšet z hlediska publicity v současné době zdaleka nejvíce.

Z hlediska interakce s nádory lze považovat za významné zjištění dr. Maedy, jenž pojmenoval takzvaný EPR efekt, tedy zlepšenou permeabilitu a retenci molekul v tkáních s poškozenou, nebo i dokonce destruovanou či obliterovanou vaskulaturou (Maeda & Matsumura, 1986). To samozřejmě platí i pro liposomy s enkapsulovanými léčivy, jež se tedy v tumorech uvolňují, a tudíž se jedná o pasivní způsob distribuce látek (viz dále). Vlivem funkcionalizace povrchu liposomů s pomocí vhodných ligandů (např. peptidy, protilátky) se však v současnosti výzkum ubírá spíše směrem aktivního transportu jakožto alternativy k tradiční chemoterapii, neboť liposomy mohou zvyšovat průchodnost léčiv buněčnými membránami. Zároveň platí, že cílený přenos limituje nespecifickou distribuci enkapsulované fáze. Ačkoliv léčba onkologických onemocnění představuje značnou část celkového výstupu, co se publikací týče, neméně významné aplikace liposomů zahrnují i terapii fungálních infekcí, genovou terapii, vektorovou transformaci rostlinného genomu v rámci biotechnologií, a v neposlední řadě také vakcíny (Riaz *et al.*, 2018).

Ohledně genové terapie i transfekce stojí za zmínku fakt, že prvotní pokusy koncem 70. let nepřinesly významné úspěchy z důvodu velmi náročného laboratorního provedení, což vyústilo v praktickou nepoužitelnost *in vivo*. Avšak se zavedením elektroporačních metod a optimalizací protokolů se podařilo komplexovat kationtové polymery či lipidy s DNA a vznikly tak tzv. genosomy (Lasic & Barenholz, 1996).

2.2.3 Charakterizace lipidových vezikul

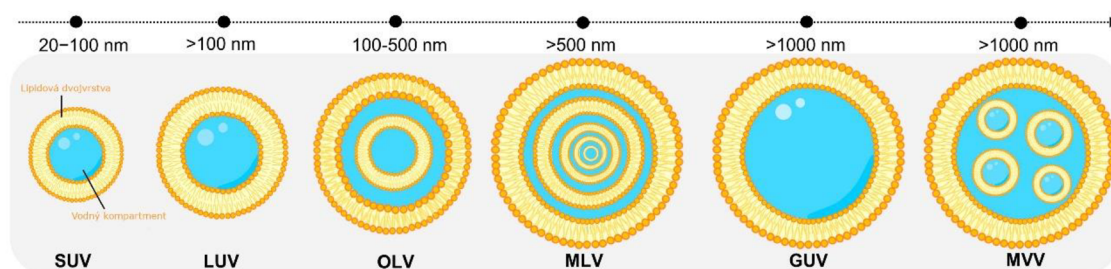
Jak již bylo v předešlých kapitolách uvedeno, liposomy jsou nanoskopické útvary v podobě koncentrických sférických vezikul složených z lipidové dvojité membrány a vnitřního kompartmentu. Z hlediska komplexity a počtu membrán se kategoricky rozlišují malé unilamelární vezikuly (SUV – small unilamellar vesicles), velké unilamelární vezikuly (LUV – large unilamellar vesicles), multilamelární vezikuly (MLV – multilamellar vesicles) a multivezikulární vezikuly (MVV – multivesicular vesicles). Toto rozdělení je znázorněno na Obr. 1.

Samotný název napovídá, že unilamelární vezikuly jsou tvořeny pouze z jediné lipidové dvojvrstvy a ve srovnání s ostatními typy liposomů jsou také zdaleka nejkompaktnější ($d_{SUV} < 100$ nm; $d_{LUV} > 100$ nm), což ale znamená také sníženou enkapsulační kapacitu, tedy takzvaný packing parametr (PP). PP lze definovat jako podíl obsahu polární a objemu nepolární části amfifilní molekuly, kde V značí objem a l délku

hydrofobních řetězců, a A označuje průřezovou plochu hydrofilní hlavičky (Schroeder *et al.*, 2009), viz vzorec níže:

$$PP = \frac{V}{l \times A}$$

SUV a LUV typicky vznikají zmenšením MLV a MVV, které mohou dosahovat velikosti až několika stovek nm. Nespornou výhodou LUV je jejich příznivý poměr lipidů nutných k enkapsulaci větších objemů požadované látky, avšak vzhledem k jejich rozměrům poměrně snadno podléhají fagocytóze makrofágy retikuloendoteliálního systému (RES) na základě jejich předchozí opsonizace, stejně je tomu tak i v případě MLV a MVV. Pojem MVV označuje shluk většího množství SUV uvnitř koncentrických lamel, naproti tomu MLV můžeme popsat jako SUV o více dvojvrstvách lipidů. Metoda jejich výroby je velice jednoduchá a poskytuje vysoce stabilní liposomy oproti SUV, které ale ve srovnání s objemnějšími vezikulami déle odolávají působení imunitního systému Hydratací v pufru a následnou sonikací spontánně vznikají MLV, které se posléze extruzí unifikují na unilamelární vezikuly stejných rozměrů. Tyto liposomy lze ale vytvořit i jinými metodami, např. fluidními mikročipy (viz kapitola „Metody přípravy liposomů“). Multilamelární vezikuly sice disponují daleko větším PP, avšak na druhou stranu naopak klesá enkapsulační účinnost látek, která je zpravidla vyšší u SUV a LUV (Sharma *et al.*, 2018).



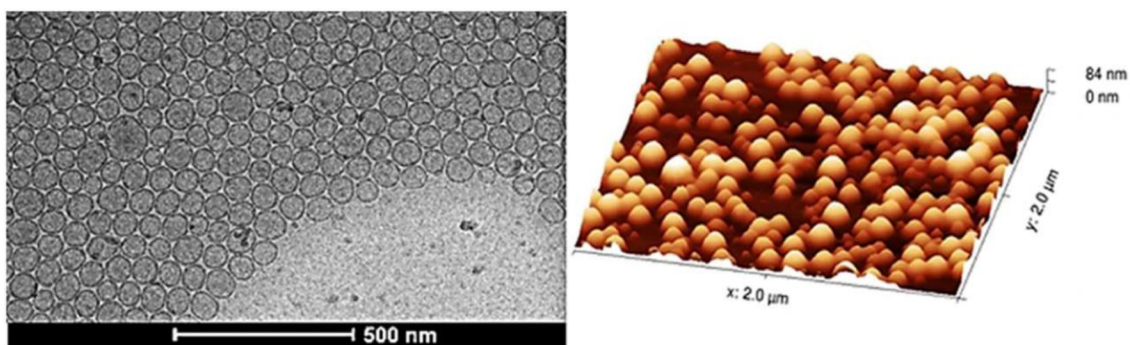
Obrázek 1: Grafické znázornění rozličných typů liposomů dle rozměrů a lamelarity; SUV: Malé unilamelární vezikuly; LUV: Velké unilamelární vezikuly; OLV: Oligolamelární vezikuly; MLV: Multilamelární vezikuly; GU: Obří unilamelární vezikuly; MVV: Multivezikulární vezikuly; Upraveno a přežato od: Luiz *et al.*, 2023

Tuto účinnost lze stanovit např. fluorometricky, kdy F_{tot} značí celkovou fluorescenci liposomové suspenze s detekčním činidlem, F_{in} značí fluorescenci po přidání zhášedce a F_{totq} znamená fluorescenci při rovnovážné koncentraci uvolněného detekčního činidla. Na závěr zde vystupuje i faktor ředění „ r “ pro koncentraci fluorescenčního činidla po přidání detergentu, jenž dezintegruje membrány (Oku *et al.*, 1982). Vzniká tak následující vzorec:

$$\text{Účinnost enkapsulace [\%]} = \frac{[F_{in} - (F_{totq} \times r)]}{[F_{tot} - (F_{totq} \times r)]} \times 100$$

Rozměry lipidových vezikul a počet membránových lamel současně ovlivňují i farmakokinetickou charakteristiku enkapsulovaných léčiv. Bylo zjištěno, že rozsah 50 nm až 150 nm typicky představuje žádoucí dimenze liposomů a dramaticky při této velikosti částic narůstá jejich cirkulační poločas v krevním řečišti a tkáních. V podstatě se jedná o kompromis mezi velikostí, počtem lamel a stabilitou vezikul. Vícevrstvé vezikuly projevují rigidnější a obecně stabilnější povahu, avšak utrpí tím jejich biokompatibilita, jak již bylo výše naznačeno (Nsairat *et al.*, 2022).

Velikost liposomů a jejich distribuci lze analyzovat s pomocí různorodých technik. Mezi typické příklady patří transmisní elektronová mikroskopie (TEM), kryo-TEM (viz Obr. 2), skenovací/rastrovací elektronová mikroskopie (SEM), mikroskopie atomárních sil (AFM), a v neposlední řadě také rozptylové techniky (Sharma *et al.*, 2018), především dynamický rozptyl světla (DLS – dynamic light scattering), též známý pod názvem fotonová korelační spektroskopie (PCS). DLS zkoumá difuzní vlastnosti makromolekul v roztocích, respektive jejich difuzní koeficient, jenž závisí na velikosti a tvaru částic (Stetefeld *et al.*, 2016).

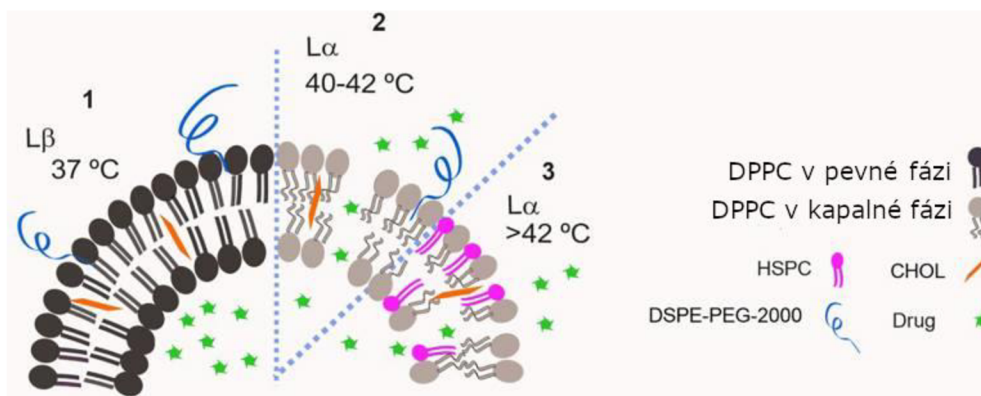


Obrázek 2: (vlevo) Liposomální struktura zachycená s pomocí kryoelektronové transmisní mikroskopie (TEM) a AFM (vpravo); Přejato od: Kotouček *et al.*, 2020

V souvislosti s velikostními rozměry liposomů lze také zmínit jejich eventuální tvar a lamelaritu, neboť tyto vlastnosti nejsou v žádném případě konstantní a závisí na způsobu přípravy vezikul. Počet lipidových dvojvrstev se zpravidla určuje pozorováním v elektronovém mikroskopu, nebo také prostřednictvím nukleární magnetické resonance (NMR ^{31}P , ^1H).

Dalším faktorem, jenž zásadním způsobem ovlivňuje vlastnosti lipidových vezikul a celou řadu jejich parametrů, je nepochybně také chemická struktura a kompozice membrán (viz v následující kapitole). Konkrétně podoba hydrofobních řetězců, polární hlavičky lipidů a asociovaných ligandů se podílí na celkovém náboji liposomů, který se souhrnně nazývá ζ (zeta) potenciál. Jedná se o hodnotu sloužící k určení stability koloidních systémů v okolním médiu, neboť elektrický náboj molekul do značné míry určuje jejich vzájemné interakce. Jsou-li částice navenek elektroneutrální nebo dosahuje-li jejich ζ -potenciál nízkých hodnot, v takovém případě dochází k jejich postupné agregaci z důvodu absence odpudivých sil, jež by flokulaci zabraňovaly. Tento parametr lze stanovit s pomocí elektroforetických metod (především kapilární elektroforéza), přičemž náboj částice je přímo úměrný jejich mobilitě v elektrickém poli (Guimaraes *et al.*, 2021). Liposomy s hodnotami ζ -potenciálu odpovídající v absolutních hodnotách více jak 30 mV jsou považovány za stabilní. S pomocí iontových surfaktantů či jiných modulátorů (např. stearylamin, diacetylfosfát) jej lze upravit. Ionizace karboxylových skupin zapříčiňuje velmi nízké hodnoty v oblasti -80 mV, přičemž se jedná o velmi stabilní částice (Dymek & Sikora, 2022).

Vliv chemické struktury se také promítá do fluidity lipidové dvojvrstvy, která sama o sobě představuje důležitý parametr ve vztahu ke stabilitě vezikuly a její permeabilitě vůči enkapsulovaným látkám. S rostoucí fluiditou současně stoupá i propustnost (Craig *et al.*, 1990). Primárně souvisí s hodnotou transientní, neboli přechodové teploty T_t , která je specifická pro příslušné lipidy dle jejich složení. Ovlivňuje ji délka hydrofobních uhlovodíkových řetězců, řád chemických vazeb mezi atomy uhlíku, elektrický náboj a typ polární hlavičky. S narůstající délkou řetězců zesilují vzájemné intramolekulární interakce (van der Waalsovy síly), vlivem čehož úměrně vzrůstá i disociační energie potřebná k narušení těchto vazeb. Lze tak zároveň objasnit i rozdíly mezi stabilitou syntetických a přírodních lipidů (viz dále), neboť konfigurace *cis* na dvojně vazbě utváří ohyb, díky němuž je energetický požadavek v podobě dodaného tepla oproti konfiguraci *trans* podstatně nižší (Avanti Polar Lipids, z webu avantilipids.com).



Obrázek 3: Základní schéma fázových přechodů lipidové membrány; 1) T_t pro DPPC odpovídá 41 °C, tudíž se při 37 °C nachází v pevné fázi, přičemž permeabilita dvojvrstvy je nízká; 2) Navýšení teploty nad T_t vede k rozvolnění vazeb, navýšení permeability a uvolnění enkapsulované látky z lipidové membrány v kapalně fázi; 3) Modifikace membrány pomocí lipidů s vyšším T_t (kupříkladu HSPC) umožňuje modulaci T_t dvojvrstvy; Upraveno a přejato od: Franco *et al.*, 2021

T_t lze tudíž definovat jako teplotu nutnou k indukci vnitřní konverze mezi fázovými stavy lipidů (viz Obr. 3), které díky své polymorfní povaze dokáží v závislosti na prostředí utvářet řadu strukturních fází či forem v rámci termodynamického systému.

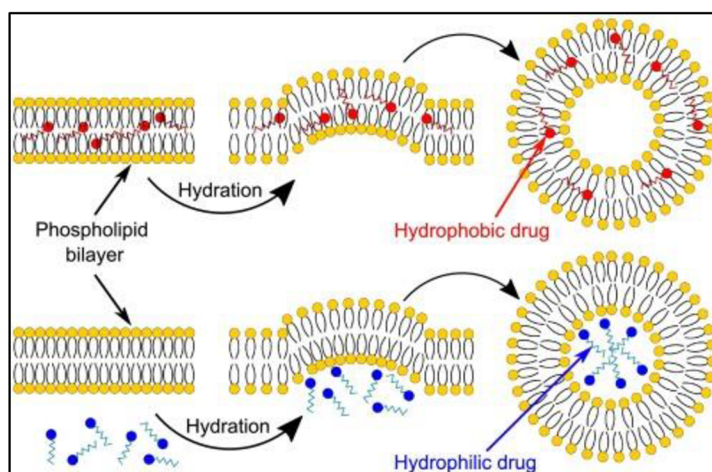
Tyto formy se vzájemně odlišují na bázi relativní laterální mobility lipidů uvnitř dvojvrstvy, jejich molekulární konformace a topologické struktury. Lze je rozdělit na fázi L_α (kapalná neuspořádaná/smectická A), L_β (gelová uspořádaná), L_0 (kapalná uspořádaná), P_β (zvlňená) a L_c (pseudokrystalická), přičemž pro tvorbu liposomů jsou relevantní přechody mezi fází L_β a L_α . T_t tedy odpovídá teplotě, při níž se lipidy vyskytují v obou stavech současně, kdy mezi nimi vznikají vysoce permeabilní interfaciální oblasti. Při nižších teplotách se membrána vyznačuje nízkou propustností a fluiditou v rámci gelové fáze. Naopak při překročení T_t lipidy přecházejí do fáze L_α , kde dochází k relativně rychlému laterálnímu přesunu lipidových molekul (Guimaraes *et al.*, 2021; Faller, 2024), což vede ke zvýšené permeabilitě membrány, avšak na úkor stability. Lipidy zde utvářejí lamelární struktury orientované kolmo k membránovému povrchu. Jednotlivé fáze a přechody mezi nimi lze charakterizovat s pomocí Ginzburg-Landauovy teorie o volné energii. Experimentálně lze tento aspekt zkoumat pomocí 2D rentgenové difrakce a „freeze-fracture“ krystalografie (Benalcazar, 2012). Samotnou T_t je pak možné stanovit s pomocí elektronové paramagnetické rezonance (EPR), FTIR (infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací) či NMR (Pentak, 2014).

Volba lipidů při výrobním procesu liposomů je do značné míry ovlivněna kýženými vlastnostmi, jimiž mají výsledné vezikuly disponovat. Liposomy obsahující lipidy s hodnotami T_t nižšími než 37 °C jsou značně náchylné jednak vůči působení RES

(retikuloendoteliální systém), ale taktéž k úniku enkapsulované složky při fyziologických podmínkách. Z tohoto důvodu se jako praktičtější jeví aplikace liposomů s obsahem lipidů, jejichž T_t se pohybují nad fyziologickými hodnotami, a jsou tudíž strukturně rigidnější (Sharma *et al.*, 2018).

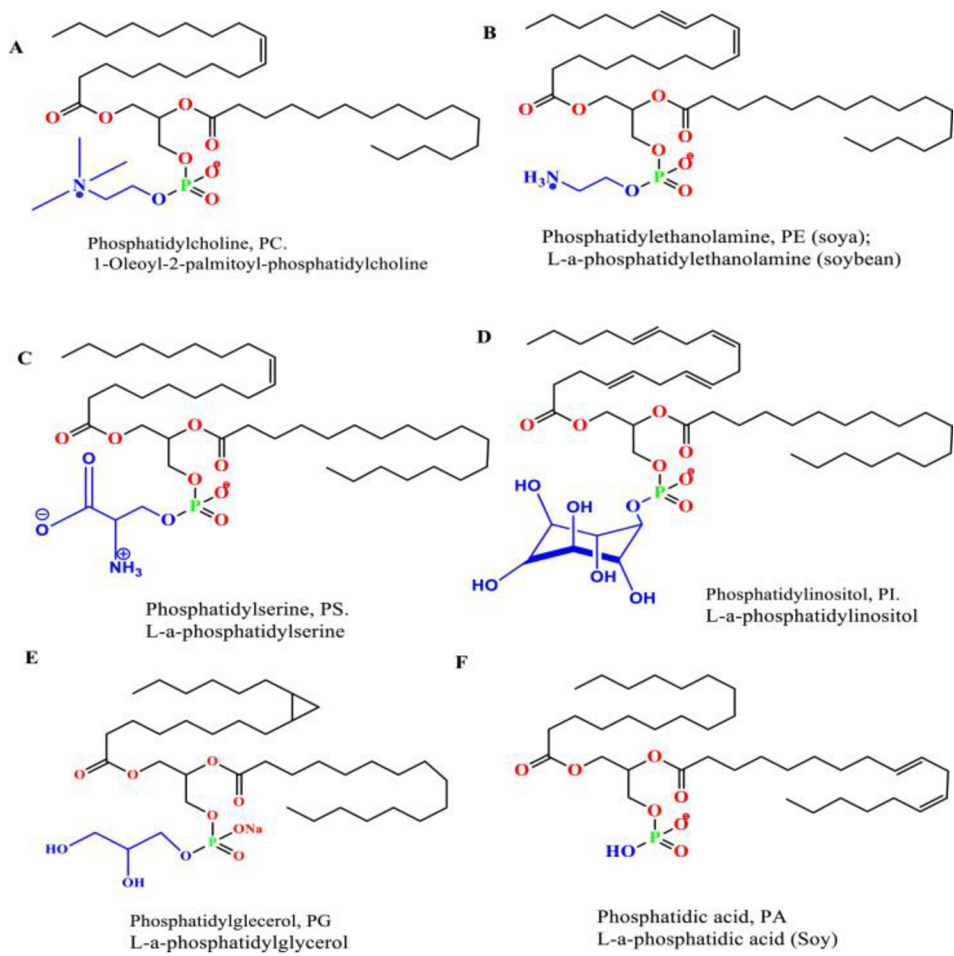
2.2.4 Chemická struktura:

Z pohledu strukturního lze liposomy popsat jako syntetické sférické útvary tvořené z molekul (di)acylových fosfolipidů ve vodném prostředí, disponujících hydrofobní a hydrofilní doménou, na základě čehož se tedy jedná o amfifilní částice. Tento dvojitý charakter přispívá k formaci vezikul schopných nést jednak hydrofilní látky uvnitř centrálního kompartmentu liposomu, ale také hydrofobní náklad v lipidové



Obrázek 4: Základní struktura liposomálních nosičů; Ve vodném prostředí se lipidové dvojvrstvy reorganizují do kulovitých útvarů, v nichž je možno enkapsulovat hydrofobní či hydrofilní látky; Přejato z: Dymek & Sikora, 2022

dvojvrstvě. Současně prostřednictvím vzájemné interakce molekul vody a hydrofobního řetězce fosfolipidů dochází při dosažení kritické koncentrace k agregaci a skládání lipidů do kulovitého tvaru (Alavi *et al.*, 2017), což lze vidět na Obr. 4. Hydrofobní řetězce v liposomu k sobě přiléhají a formují tak oddělený vnitřní prostor, přičemž van der Waalsovy síly slouží jako stabilizační faktor celé struktury.



Obrázek 5: Znázornění běžně používaných fosfolipidových struktur pro formaci liposomů; A) fosfatidylcholin, B) fosfatidylethanolamin, C) fosfatidylserin, D) fosfatidylinositol, E) fosfatidylglycerol, F) kyselina fosfatidová; **Přejato od:** Nsairat et al., 2022

Charakter hydrofobní skupiny konkrétního lipidu je ovlivněn délkou acylového řetězce, jeho symetrií a saturací, tedy přítomností dvojných vazeb (Large *et al.*, 2021). Onen acylový zbytek představují mastné kyseliny (MK), tedy monokarboxylové kyseliny s dlouhým uhlovodíkovým řetězcem (příklady uvedeny na Obr. 5), a to v rozmezí 12 až 24 uhlíků, mezi nimiž se mohou vyskytovat dvojně vazby. Takové MK se označují jako nenasycené, tedy nesaturované, přičemž se dále klasifikují na základě konformace na dvojných vazbách. Konfigurace *cis* je typická pro přirozeně se vyskytující MK (rigidní 30° ohyb v místě dvojně vazby), zatímco *trans* je výsledkem industriálního ztužování tuků. Pokud dvojná vazba přítomna není, hovoříme o satureovaných MK (Franková *et al.*, 2014).

Hydrofobní řetězec je esterovou vazbou typicky napojen na 3-fosfoglycerol, kde fosfátová skupina slouží jako polární, a tedy hydrofilní část lipidu. Hovoříme zde o takzvaných glycerolfosfolipidech. Vodíkové vazby a polární interakce mezi molekulami

vody a polárními hlavičkami se stejně jako van der Waalsovy síly v případě hydrofobního řetězce podílejí na stabilizaci vezikuly. Obecné vlastnosti lipidů tedy ovlivňuje jednak kvalitativní zastoupení MK, ale současně jejich množství, tedy kvantitativní charakter. Na zbytek kyseliny fosforečné (respektive kyslík) se může navázat jedna či dvě MK, přičemž vazba dvou kyselin v rámci lipidů utváří celkově stabilnější a méně toxickou strukturu oproti vazbě jen jediné MK (Li *et al.*, 2019). Současně se na tento zbytek mohou s pomocí další esterové vazby napojit jiné molekuly, jako například hydroxylová skupina (kyselina fosfatidová=PA), inositol (fosfatidylinositol=PI), dále pak glycerol (fosfatidylglycerol=PG), ethanolamin (fosfatidylethanolamin=PE), serin či cholin (fosfatidylserin=PS, fosfatidylcholin=PC). Tyto funkční skupiny spolu s různými mastnými kyselinami (např. palmitová, stearová, margarová, olejová, linoleová a další) a glycerolem společně tvoří přírodní lipidy, které lze získat z různých zdrojů, například vaječného žloutku či sójových bobů (Monteiro *et al.*, 2014).

Vyjma výše popsané skupiny se v rámci fosfolipidů rozlišují i takzvané sfingofosfolipidy, též zvané sfingomyeliny. Odlišují se na základě rozdílné základní struktury. Namísto glycerolu zde figuruje aminoalkohol sfingosin s navázanou aminovou skupinou v pozici 2, přičemž celkově obsahuje 18 uhlíků. Vazbou nenasycených MK na tuto pozici vzniká tzv. ceramid, z něhož sfingomyeliny vycházejí (Franková *et al.*, 2014). Mezi typické zástupce patří látky na obr. X. Přirozeně se vyskytující lipidy, ať už glycerofosfolipidy či sfingomyeliny, bývají méně stabilní než lipidy syntetické, které vznikají modifikacemi v polárních a nepolárních regionech přírodních fosfolipidů, významnou roli také hrají rozličné lipidové směsi či formulace (Nsairat *et al.*, 2022). Jako příklad lze uvést dipalmitoylfosfatidylcholin (DPPC), dimyristoylfosfatidylcholin (DMPC), dioleoylfosfatidylcholin (DOPC), distearoylfosfatidylcholin (DSPC) a další (Luiz *et al.*, 2023).

Stabilitu vezikuly ovlivňuje délka acylového řetězce, saturace lipidů i přítomnost etherové vazby v molekule lipidů. Delší, satureované acylové řetězce zpravidla zajišťují rigiditu dvojvrstvy, zatímco krátké nenasycené vyústí ve fluiditu a zdánlivě neuspořádanosti membrán.

Funkční skupiny nahrazující atomy kyslíku na fosfátu však mohou současně zásadně ovlivňovat celkový náboj molekuly, což má konsekutivně dopad na interakci s potenciální cílovou tkání. Jestliže je zbytek kyseliny fosforečné záporně nabitý, dalším navázáním (případně kompletní substitucí fosfátu) primárních a sekundárních aminů můžeme tuto povahu změnit a vzniká tak kladně nabitý lipid, jenž napomáhá při interakci liposomu se záporně nabitou plasmatickou membránou buňky. Mimo jiné po takto usnadněném průniku přes membránu slouží jako protektivní skupina bránící lysosomální degradaci.

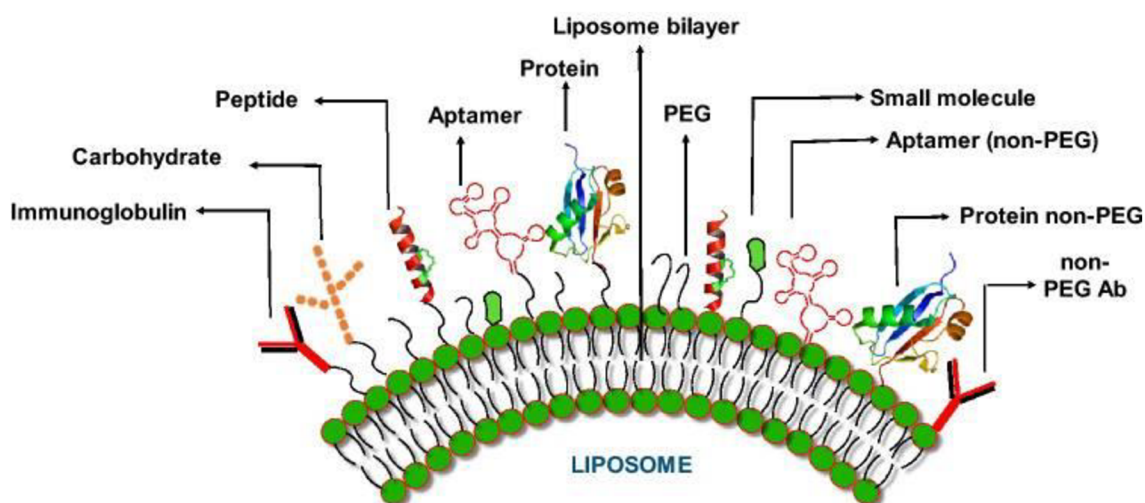
Další vlastností této hydrofilní oblasti je také potenciál vázat záporně nabitě částice ke svému povrchu, čímž lze uměle navýšit kapacitu liposomu, byť za cenu větších rozměrů, což může mít za následek zhoršenou biokompatibilitu a životnost celého systému, popřípadě může takto zvětšená molekula představovat stérickou bariéru.

Například CTAB (cetrimoniumbromid, též cetyltrimethylamoniumbromid) a DOTAP [(2,3-dioleoyl-propyl)-trimethylamin], deriváty sloučeniny DOTMA [2,3-dioleoyl-propyl)trimethylaminbromid], představují zástupce kationtových lipidů, které současně působí jako transfekční detergenty při přenosu záporně nabitých molekul, jako například nukleové kyseliny a oligonukleotidy, s čímž souvisí značná cytotoxicita. Tento negativní aspekt je ovšem možné obejít sestrojením lipidových molekul za použití endogenních aminokyselin (Li *et al.*, 2019), kupříkladu argininu, lysinu a histidinu (Jiang *et al.*, 2016).

2.2.5 Membránové modifikace a funkcionalizace

Ačkoliv konvenční lipidové vezikuly složené z přírodních či syntetických fosfolipidů a sfingomyelinů samy o sobě představují úspěšný systém pro přenos látek *in vivo*, jednoduché formulace založené na jediném lipidu v praxi narážejí na celou řadu překážek omezujících jejich použití. Primárně se jedná o chemickou nestabilitu a náchylnost vůči fagocytóze prostřednictvím RES. Současně není realistické, aby takto jednoduché nosiče vyhověly veškerým potenciálním aplikacím. Nízká rozpustnost, chabá rezponzivita k externí stimulaci, nevhodné pH optimum a odolnost nebo též nespecifická vazba s plasmatickými proteiny jsou pouze krátkým výčtem obtíží, které od počátku 80. let opodstatnily intenzivní výzkum vedoucí k vývoji rozsáhlé série konceptuálních i experimentálně prověřených modifikací, které lze elementárně rozdělit do dvou hlavních kategorií, a to na kovalentní modifikace lipidové dvojvrstvy a iontovou adsorbci ligandů/konjugátů k povrchu (Lima *et al.*, 2021; Abbasi *et al.*, 2023).

Mezi nejběžnější úpravy tohoto typu (viz Obr. 6) patří rozličné směsi glycerofosfolipidů v různém poměru, a příměsi cholesterolu, kardiolipinu, PEG a jiných polymerů rámci dvojvrstvy (jednotlivé úpravy a formulace jsou uvedeny v příslušných kapitolách dále) V současnosti je komerčně dostupné široké spektrum lipidů, avšak zdaleka ne všechny jsou vhodné pro aplikaci *in vivo*. Například PC je zcela běžnou komponentou vezikulárních membrán, avšak jeho kvartérní amoniová skupina neumožňuje kovalentní vazbu dalších molekul. Z řady zástupců nejběžnějších lipidů lze uvést také PS, PI a PE. V případě PS jsou z hlediska možných reakcí zajímavé karboxylové a aminové skupiny, díky nimž se mohou utvářet fosfolipidové konjugáty či dimery. Jedná se o záporně nabitý lipid. PI poskytuje tvorbu etherových a esterových vazeb na volných hydroxylových skupinách, kde se mohou navázat molekuly obsahující karboxylové skupiny. Zajímavý je z hlediska derivatizace také PE, jenž disponuje aminovou skupinou umožňující vazbu dalších molekul na bázi nukleofilní substituce a tvorby amidové vazby (Lima *et al.*, 2021).



Obrázek 6: Různé strategie povrchových modifikací liposomů s pomocí ligandů; Na obrázku jsou uvedeny imunoglobuliny, uhlovodíky, peptidy, aptamery, proteiny, PEG, aptamery a další konjugáty; **Přejato od:** Khan *et al.*, 2020

2.2.6 Formulace liposomů a metody jejich přípravy

Vzhledem k široké sféře uplatnění lipidových vezikul, včetně specifických potřeb laboratorních experimentů či klinických aplikací, je nutno brát v potaz kýžené fyzikálně-chemické vlastnosti, jimiž má produkt disponovat, což následně musí reflektovat i konkrétní výrobní protokol. Současně má také značný vliv charakter enkapsulované látky, primárně její reaktivita. Dále požadovaný poločas cirkulace, stabilita, cena a reprodukovatelnost výrobního procesu (Bozzuto & Molinari, 2015). V současné době jsou stále velmi rozšířeny tzv. konvenční metody, které se vyznačují relativní jednoduchostí, nízkými nároky na instrumentaci a prověřeností v rámci vědecké komunity. Zahrnují 4 základní kroky:

1. Rozpuštění lipidů a jejich směsí v organickém rozpouštědle.
2. Odstranění organického rozpouštědla.
3. Purifikace a izolace liposomů.
4. Konečná analýza vezikul.

Typicky se k nim řadí metody jako např. již letmo zmíněná tenkovrstevná hydratace, odpaření reverzní fáze, ethanolové/etherové vstřikování, disperze rozpouštědla a další. Uvedené postupy však mnohdy neodpovídají požadavkům pro enkapsulační účinnost, stanovené rozměry vezikul, nebo také časové nároky (Guimaraes *et al.*, 2021). Z tohoto důvodu se často kombinují s rozličnými modifikačními, respektive homogenizačními metodami, jako je například lyofilizace, sonikace či extruze (Nsairat *et al.*, 2022) k dosažení optimálních rozměrů. Extruzní metoda umožňuje získání zcela homogenní směsi lipidových vezikul prostřednictvím průtlaku suspenze MLV skrze sérii polykarbonátových či polyethersulfonových membrán s pevně definovanými velikostmi pórů. Částice jsou tak mechanicky stlačeny do požadované podoby, avšak je nutné po celou dobu vzorky udržovat nad transientní teplotou obsažených lipidů. Zpravidla se nejprve používají filtry s většími póry, a až posléze se přechází ke stále menším membránám, dokud nedosáhneme cílových rozměrů (Dymek & Sikora, 2022). Lze takto připravit např. i velice malé liposomy o velikosti 30 nm obsahující nanočástice stříbra s antimikrobiálními účinky (Liu *et al.*, 2021).

Sonikací a lyofilizací dosáhneme rozbití větších částic na SUV bez použití toxických rozpouštědel. Za stejným účelem lze využít i rapidní nárůst pH během krátkého časového úseku, teda takzvaný „pH jumping“ (Gutman, 1984). Vzniklé liposomy však

nejsou zcela homogenní, ba naopak heterogenita zde představuje značnou komplikaci, a proto je vhodné metody kombinovat.

Vyjma výše zmíněných negativ konvenčních metod jsou tyto již poněkud starší postupy taktéž značně ztrátové a nešetrné z hlediska použitých reagentů a materiálů, což vylučuje jejich implementaci v průmyslovém měřítku.

Z tohoto důvodu byly relativně nedávno vyvinuty nové postupy při výrobě liposomů, které buď vycházejí z metod konvenčních, anebo zavádějí zcela novou technologii výroby. Zmínit lze např. mikrofluidní techniky či superkritickou fluidní metodu (SCF).

2.2.6.1 Konvenční metody:

Jednou z nejrozšířenějších a jednoznačně nejstarších metod je tenkovrstevná hydratace, též zvaná jako Banghamova metoda, kterou poprvé popsal již zmíněný vědec (Bangham et al., 1965). Vyznačuje se jednoduchou suspenzí lipidové směsi v organickém rozpouštědle, následnou evaporací tohoto rozpouštědla za vzniku tenké vrstvy (ideálně v inertní atmosféře), a následnou hydratací ve vodném médiu. Možnosti enkapsulace zahrnují hydrofilní i lipofilní látky, nicméně účinnost tohoto procesu je poměrně mizivá, neboť dosahuje pouhých 5-15 %. Současně vznikají objemné, heterogenní MLV, které vyžadují následnou úpravu prostřednictvím sonikace a extruze, čímž získáme homogenní směs SUV. Při sonikaci však hrozí oxidativní poškození liposomů, které ale lze do jisté míry omezit použitím vhodného pufru (např. HEPES).

Modifikaci tohoto postupu představuje evaporace reverzní fáze, kdy se k lipidové suspenzi v solventu kontinuálně přidává hydratační roztok, jenž se opakovaně spolu s rozpouštědlem odpařuje, dokud nedojde k jeho kompletnímu odstranění.

Další úpravou přecházíme k ethanolovému či etherovému vstříkovaní. Zde se připraví směs lipidů s obsahem ethanolu/etheru, která se manuálně injekční stříkačkou nebo s pomocí automatické pumpy vpraví do vodní fáze při nahřátí nad transientní teplotu lipidů, načež se tyto látky odpaří na vakuové rotační odparce. Tento postup zajišťuje vznik heterogenní směsi SUV bez nutnosti použití toxických organických rozpouštědel a dalších úprav za cenu nízké enkapsulační účinnosti (Dymek & Sikora, 2022).

2.2.6.2 Moderní metody

Jak již bylo zmíněno, starší protokoly syntézy lipidových vezikul neumožňují šetrnou a přesnou kontrolu podmínek a samotných vzniklých produktů v kontextu jejich rozměrů a lamelarity. Současně je mnohdy žádoucí výsledné vezikuly dále upravovat extruzí či sonikací, což vyžaduje nezanedbatelnou časovou alokaci.

Jako možné řešení se nabízejí relativně nově vyvinuté metody, z nichž jako první lze uvést mikrofluidní čipy, které umožňují axiální mísení organické fáze, tedy rozpuštěných lipidů stabilizovaných surfaktanty, s vodným roztokem uvnitř mikroskopického kanálku (Nsairat *et al.*, 2022). Konkrétněji se jedná o střet dvou k sobě kolmých proudů kapalin, které jsou pod tlakem přinuceny putovat úzkým centrálním kanálkem, kde dochází k jejich smísení. Celý mikročip tedy utváří laminární průtokový systém ve tvaru písmene Y. Parametry jako rychlost a objem průtoku, poměr organické ku vodné fázi či koncentrace lipidů zásadním způsobem ovlivňují výslednou směs (např. směs ethanolu a PC o koncentraci 5 mg/ml v poměru 1:3 vůči vodě). Celá procedura se vyznačuje nízkými nároky z hlediska použitých chemikálií, neboť se v planární destičce mísí objemy v řádu mikrolitrů, mnohdy i méně. Zmenšení výrobního procesu je tedy ekonomicky výhodné, umožňuje scale-up na průmyslovou úroveň a současně lze přesně kontrolovat podmínky, za kterých k formaci liposomů dochází. V důsledku tak vznikají uniformní populace lipidových vezikul (Abbasi *et al.*, 2023; Dymek & Sikora 2022; Lamparelli *et al.*, 2022). Limitujícím faktorem však stále zůstává cena samotných mikročipů, jejich kalibrace a koordinace výroby (Filipczak *et al.*, 2020).

Modifikací postupu či destičky z mikrofluidní techniky vycházejí přidružené metody jako například hydrodynamická fokusace, transientní membránová ejakce a další (obdobných subtypů a modifikací existuje více). Hydrodynamickou fokusaci aplikovali Jahn a kolektiv (2003), kdy byl skrze úzký centrální kanálek nahnán lipidový roztok obsahující interkalační fluorescenční barvivo DiIC₁₈, zatímco kolmo k tomuto kanálku byly nasměrovány dva protilehlé proudy s pufrům. K formaci liposomů zde dochází v místech, kde koncentrace isopropylalkoholu (IPA) s rozpuštěnými lipidy a pufru dosahuje kritické koncentrace, při níž je rozpustnost lipidů nízká (Jahn *et al.*, 2004).

Naproti tomu transientní membránová ejakce využívá mikrofluidní destičky k formaci lipidové dvojvrstvy a jejího rozrušení s pomocí laseru, jenž nahřívá vodné médium, což způsobí tvorbu a oddělení bublin ve formě liposomů (Ota *et al.*, 2009).

Použití organických rozpouštědel se nicméně lze vyhnout jejich náhradou superkritickým oxidem uhličitým, k jehož směsi s lipidy skrze výkonnou pumpu proudí hydratační roztok umožňující fázový přechod fosfolipidů. K formaci vezikul dochází náhlým poklesem tlaku odstraněním CO₂. S pomocí SCF lze dosáhnout vysoké enkapsulační účinnosti, avšak za cenu nízkého výtěžku a vysokých finančních nároků, nehledě na environmentální aspekt (Bigazzi *et al.*, 2020).

2.2.7 Obecná farmakokinetika lipidových vezikul

Všeobecný princip a samotné opodstatnění enkapsulace léčiv v liposomech spočívají v poskytnutí izolovaného kompartmentu od okolního prostředí, v klinických podmínkách jsou tím myšleny tkáně ať už zvířecího či lidského organismu. Tento princip v teoretické rovině zajišťuje přepravu nákladu na určené místo, kde se z vezikuly léčivo uvolňuje buď do extracelulární matrix či rovnou intracelulárně, načež dojde k jeho internalizaci buňkami a navození specifického účinku. Bylo zjištěno, že eluce látek z vezikul následuje kinetiku prvního řádu (Schroeder *et al.*, 2007). Současně liposom slouží jako modulátor farmakokinetických vlastností enkapsulovaného léčiva do doby, než je uvolněno z vezikuly. V ideálním případě prodlužuje jeho životnost v krevním řečišti, navyšuje terapeutický index, omezuje případné cytotoxické účinky, nežádoucí interakce s imunoglobuliny a proteiny komplementu, dále pak navyšuje biologickou stabilitu léčiva a zprostředkovává jeho vstřebání do buňky. Vzhledem k výše zmíněné charakteristice lipidové vezikuly nacházejí široké uplatnění v oblasti terapie onkologických onemocnění, oftalmologie, antimikrobiální léčby, genové terapie, diagnostických testů a nově i vakcín (Allen *et al.*, 1995; van der Koog *et al.*, 2021).

Navzdory zjevným výhodám tohoto systému se vývoj liposomů setkává s celou řadou biologických bariér v podobě 5 hlavních výzev, a to jmenovitě aktivitou fagocytů v rámci retikuloendoteliálního systému (RES), zánětlivými procesy, stimulací imunitního systému (hypersenzitivita, aktivace komplementu a další), a naopak nežádoucí liposomálně indukovanou inhibicí elementů imunitního systému, v neposlední řadě také komplikacemi při samotném uvolnění léčiva v místě určení (Zahednezhad *et al.*, 2019).

2.2.7.1 Vliv fyzikálně-chemických vlastností a kompozice lipidové dvojvrstvy

Vyjma obecných imunologických interakcí (podrobněji popsány níže) s povrchem lipidových membrán mají značný vliv na aktivitu a životnost liposomu také fyzikálně-chemické vlastnosti a složení. Intravenózně aplikované lipidové vezikuly typicky

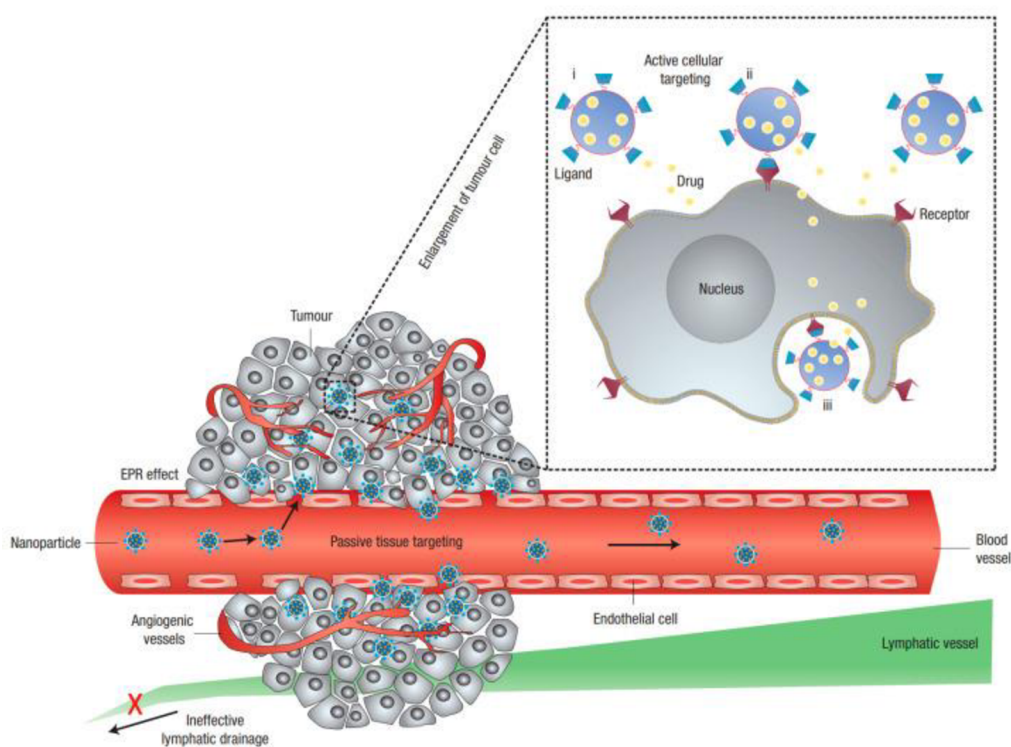
podléhají rapidní sekvestraci z krevního řečiště a koncentrují se primárně ve slezině a játrech (van der Koog *et al.*, 2022). Například Smyth a kolektiv došli k závěru, že konvenční extracelulární liposomy složené z kombinace PC a cholesterolu v poměru 67:33 byly z buněk MCF-7 a PC-3 po 3 hodinách z 95 % eliminovány (Smyth *et al.*, 2015). Na základě dalších relativně nedávných studií bylo taktéž určeno, že cirkulační poločas liposomálních vezikul při intravenózní aplikaci u myši dosahuje necelých 10 minut (Lazaro-Ibanez *et al.*, 2021).

Úpravou liposomálního složení lze tento poločas navýšit skrze omezení působení RES a pasivní akumulace ve výše zmíněných orgánech. Strategie k dosažení tohoto cíle jsou značně různorodé a výsledky variabilní. Lipidové vezikuly složené ze záporně nabitých lipidů, tedy např. PE a PG jsou značně náchylné k makrofagické fagocytóze, zatímco v případě PC nikoliv, což naznačuje roli celkového membránového náboje. Jako řešení se tedy naskýtá formulace vezikul s pomocí vhodnějších lipidů (např. PC), nebo použití prázdných vezikul saturovaných PE jako návnady před aplikací samotných terapeutických liposomů. Matsumoto a kolektiv poukázali na tuto možnost a její potenciální efekt (Matsumoto *et al.*, 2017).

Nevýhodou tohoto postupu je však možná imunokompromitace organismu, neboť použití tzv. kontrolních, respektive prázdných vezikul by mohlo vést k omezené funkci RES prostřednictvím jeho saturace. Vliv elektrického náboje se projevuje především při interakci s buněčnými membránami, k nimž vezikuly adherují. Neutrálně nabitě liposomy disponují delším cirkulačním poločasem a lépe obcházejí RES, avšak jejich účinnost transferu enkapsulované látky *in vitro* je oproti nabitým vezikulám nižší. Kladný náboj, podobně jako v případě náboje záporného, vede k lepší interakci s membránami a zároveň sekvestraci skrze RES. Současně ale dochází k endogenní generaci ROS (reaktivních forem kyslíku) a následné apoptóze. Tento cytotoxický efekt je však možné mitigovat pokrytím povrchu vezikul s pomocí PEG, případně gangliosidů, BSA (bovinní sérový albumin), CD47 (peptidový ligand) a sfingomyelinu, které zároveň slouží jako protektivní vrstva vůči makrofágům a vedou k navýšení cirkulačního poločasu (van der Koog *et al.*, 2022). Stejněho efektu lze dosáhnout imitací kompozice erytrocytů, tedy formulací fosfatidylcholin: sfingomyelin: cholesterol: gangliosid GM1 v molárním poměru 1:1:1:0,14 (dle Allen *et al.*, 1989). Zajímavý *in-situ* postup představil Arias-Alpizar s kolegy, kdy liposomy složené z DOPC a cholesterolu byly napojeny k fotoaktivnímu cholesterylaminu, což umožňuje změnu celkového náboje částice z neutrálního na pozitivní při iradiaci UV zářením (Arias-Alpizar *et al.*, 2020).

Dalším důležitým faktorem, jenž zásadně ovlivňuje farmakokinetické vlastnosti liposomů, je nepochybně jejich velikost, jak již bylo několikrát naznačeno. Ačkoliv ideální rozměry vezikul závisí především na oblasti jejich uplatnění, všeobecně platí přímá úměra mezi velikostí a mírou fagocytózy RES. Vezikuly dosahující rozměrů >100 nm jsou dříve opsonizovány a odstraněny oproti menším liposomům. Při extravazaci malé částice lépe prostupují skrze narušenou vaskulaturu nádorové tkáně, a tudíž představují účinnější způsob přepravy léčiv (Sharma *et al.*, 2018).

Jev EPR (vizualizace na Obr. 7) je obzvláště zřetelný v maligních tkáních, kde proběhla angiogeneze, v jejímž důsledku došlo ke vzniku diskontinuit endotelu. Fenestrace umožňuje průchod objemných molekul do intersticiálního prostoru, a to přibližně do 500 nm (nebo 4000 kDa). Současně existuje i teoretický spodní limit rozměrů lipidových vezikul, neboť při velikostech částic <50 nm dochází k náhodné penetraci cév i ve fyziologickém stavu (Bozzuto & Molinari, 2015).



Obrázek 8: Nanočástice, liposomů nevyjímaje, pasivně pronikají skrze krevní cévy prostřednictvím mezer vzniklých mezi buňkami endotelu vlivem efektu EPR, jenž je následován endocytózou vezikuly v maligní buňce; **Přejato od:** Peer *et al.*, 2020 a Cao *et al.*, 2022

2.2.7.2 Klasifikace transportu v tkáních

Na první pohled lze usoudit, že většina lipidových vezikul výše zmíněný horní rozměrový požadavek splňuje. Pokud se na jejich povrchu nevyskytuje navázaný ligand, jenž by umožnil cíleně interagovat s požadovanou tkání na receptorech, hovoříme o takzvaném pasivním transportu.

Naproti tomu transport aktivní spoléhá na vazbu mezi nadměrně exprimovanými specifickými receptory či látkami syntetizovanými maligními či angiogenními endoteliálními buňkami (např. EGF-epidermální růstový faktor, FGF-fibroblastový růstový faktor, integriny, HER2-lidský epidermální receptor 2) s částicemi modifikujícími povrch liposomů. Dochází tak k akumulaci vezikul v nově zpřístupněné cílové tkáni a následnému uvolnění léčiva. Typickým příkladem jsou protilátky (obzvláště mAb), případně konjugáty s PEG zprostředkujícím endocytózu, tedy tranferin, kyselina listová či aptamery nebo sacharidy (manóza). Bylo zjištěno, že rakovinné buňky nadměrně exprimují integriny $\alpha\beta 1$, $\alpha\beta 3$ a $\alpha\beta 5$, k nimž se silně váže cRGD, tedy cyklický arginylglycylaspartát (Abbasi *et al.*, 2023). Například PEGylované liposomy s navázaným cRGD byly použity u buněk prsního karcinomu (Vakhshiteh *et al.*, 2020), nebo také folát pro přepravu rapamycinu při léčbě rakoviny močového měchýře (Yoon *et al.*, 2019). Další strategie zahrnují využití receptoru HER2, IL-4R, dále pak VEGF nebo VEGFR2 spolu s příslušnými protilátkami (van der Koog *et al.*, 2022).

Vyjma receptorové vazby lze liposomy navádět i s pomocí pH responzivních modifikací (viz Mechanismy uvolňování látek z lipidových vezikul) a magnetických nanočástic, typicky oxidů železa (Fe_3O_4). Umístěním cílové tkáně do sféry působení magnetického pole lze indukovat pohyb modifikovaných liposomů. Strategii lze uplatnit při nádorové léčbě v kombinaci s magnetickou hypertermií, a také v rámci genové transfekce, kdy lze použít například kationické lipidové vezikuly obsahující luciferázový reportérový gen ve formě plasmidové DNA (Zheng *et al.*, 2009).

2.2.7.3 Interakce imunitního systému s liposomy

Za imunologickou interakci s liposomy zodpovídá v první řadě vrozený, nespecifický imunitní systém, a až eventuálně systém získaný. V rámci nespecifického imunitního systému se do interakce s liposomy zapojuje především mononukleární fagocytární systém (MPS), též známý jako RES (tedy retikuloendoteliální systém) a proteiny komplementu. Z hlediska zapojených buněčných elementů se jedná především o makrofágy, monocyty, dendritické buňky a neutrofilů (Zahednezhad *et al.*, 2019).

Systém RES se skládá z roztroušené soustavy makrofágů sleziny, jater, lymfatických uzlin, plic, peritoneálních prostor a kostní dřeně (Kume *et al.*, 1991). Zvláštní význam mají jaterní Kupfferovy buňky, jež se podílejí na fagocytóze liposomů o rozměrech menších než 100 nm. Jak již bylo řečeno v předešlých podkapitolách, proces fagocytózy postihuje především částice disponující povrchoým elektrickým nábojem, ať už záporným či kladným, zatímco neutrální částice odolávají podstatně déle. Současně narůstajícím rozměrům vezikul úměrně odpovídá míra fagocytózy RES. Tomuto jevu lze předejít tvorbou tzv. „stealth“ liposomů, jejichž povrch je pokryt navázaným PEG. Tento dvojsytný alkohol představuje hydrofilní stérickou bariéru zamezující makrofágům v přístupu k vezikule, čímž dochází k razantnímu prodloužení její životnosti v oběhu.

S rostoucí koncentrací PEG, jeho denzitou na povrchu liposomů a délkou řetězce klesá množství pohlcených částic. Nevýhodou tohoto způsobu protekce je však existence jistého rizika hypersensitivních reakcí (CARPA = c activation related pseudo-allergy) a výskytu takzvaného „hand-foot syndromu“, tedy palmoplantární erytrodysézie vedoucí k otokům a bolestem distálních částí končetin (Zahednezhad *et al.*, 2019). I přesto však PEGylované liposomy dosáhly komerčního úspěchu. V současnosti se v klinické praxi využívá přinejmenším desítka léčebných formulací tohoto typu. Úspěchy byly zaznamenány konkrétně v oblasti distribuce oligonukleotidů (Onpattro, Onivyde) a také při vývoji vakcín Comirnaty proti viru SARS-CoV-2 (Park *et al.*, 2022).

Impulz k zahájení činnosti RES obvykle udává opsonizace prostřednictvím plasmatických imunoglobulinů či proteinů komplementu (opsoniny). Sérové proteiny a fibronectiny se váží k povrchu cizorodých částic a „označují“ je k rozpoznání a likvidaci fagocyty. Aktivace komplementu je součástí vrozené lidské humorální odpovědi, přičemž ji do určité míry vyvolávají všechny typy liposomů. Současně HDL (high density lipoproteins=vysokodenzitní lipoproteiny) a LDL (low density lipoproteins=nízkodenzitní lipoproteiny) obsažené v krevním řečišti cizorodé látky destabilizují prostřednictvím transferu a reorganizace lipidových membrán vezikul, což vede k exkreci enkapsulovaného nákladu (Bozzuto & Molinari, 2015).

Interakci komplementu s liposomy lze rozdělit do tří možných drah. První z nich je klasická vazba na IgM, IgG, C1q nebo CRP protein (c-reactive). Druhou pak tzv. alternativní cesta skrze vazbu na C3b, IgG nebo C4b2a3b (komplex modulující substrátovou specificitu neboli C5 konvertáza). Třetí a poslední způsob je popsán lektin-vazebnou dráhou.

Aktivaci komplementu vyvolávají především objemnější vezikuly, zatímco v případě menších, neutrálních vezikul k tomuto jevu nedochází tak často. Současná přítomnost některých glykolipidů a kladného náboje způsobí aktivaci CRP, kdežto náboj záporný (v rámci liposomů obsahujících PA, PI, kardiolipin, PG a PS) spouští klasickou kaskádu. K aktivaci alternativní cesty dochází za přítomnosti polyaniontových makromolekul (agaróza, virové částice) navázaných na membráně (Zahednezhad *et al.*, 2019). Komplementové kaskády lze obecně inhibovat prostřednictvím faktoru H (Moghimi & Hamad, 2008) a s pomocí monosialogangliosidu GM1, nebo také sulfogalaktosylceramidovými liposomy (Wassef *et al.*, 1991).

Získaný, tedy adaptivní imunitní systém, se skládá z humorální a buněčné složky. Zodpovídá za vysoce specifickou odpověď vůči cizorodým antigenům prostřednictvím T a B-lymfocytů. K jeho aktivaci dochází při prezenci antigenů skrze MHC (major histocompatibility complex = hlavní histokompatibilní komplex) glykoproteiny na povrchu buněčných membrán. U člověka je také nazýván jako HLA (human leukocyte antigen). Třída MHC-1 na sebe náhodně váže různorodé fragmenty a částice, které posléze prezentuje na svém povrchu pro cytotoxické T-lymfocyty. Její exprese není specifická pro žádný určitý typ jaderných buněk, jedná se tedy o jistou formu všeobecné kontroly v organismu. Pokud dojde k detekci antigenu T_c-lymfocyty prostřednictvím vzájemné vazby přes TCR receptor, stimulovaný lymfocyt započne proliferaci a indukuje apoptózu antigen prezentující buňky (APC). MHC-2 se ve srovnání s přechozí třídou exprimuje pouze ve specializovaných fagocytech, které tak slouží jako APC. Případné antigeny rozpoznávají pomocné T_h-lymfocyty, které následně aktivují specifickou imunitní odpověď stimulací B-lymfocytů, které proliferují na plasmatické buňky tvořící protilátky vůči detekovanému antigenu. Protilátky, podobně jako opsoniny, slouží jako označení k likvidaci fagocyty (Fellnerová, 2022).

Jako spojka s vrozenou imunitou slouží dendritické (DC) a NK buňky (natural killer cells), jejichž aktivace zapříčiní činnost adaptivní imunity díky detekci PAMPS a DAMPS (pathogen-associated molecular patterns a damage-associated molecular patterns) na PRR (pattern-recognition receptors), TLL (toll-like receptors), CLR (c-type lectin receptors) a dalších typech receptorů.

Význam výše uvedených mechanismů spočívá v interakci s lipidovými vezikulami na základě jejich elektrického náboje a potenciálního využití jako adjuvans vakcín. Například kladně nabitě liposomy složené z DOTAP vyvolávají aktivaci DC se záporným nábojem a produkci ROS (Chen *et al.*, 2008). Aktivace NK buněk s pomocí

liposomů složených z DPPC a inkorporovaného glykosfingolipidu s enkapsulovaným doxorubicinem vede ke zvýšenému účinku léčby nádorových onemocnění (Khan *et al.*, 2014). Jako další příklad lze uvést i koenkapsulaci antigenu a adjuvans v liposomů pro navození odpovědi pomocných T_H-lymfocytů subpopulace CD4+(Slütter *et al.*, 2011), dále cílená léčba infekci HIV (Gunaseelan *et al.*, 2010), nebo také aktivace NK buněk liposomy pokrytými polysacharidovými antigeny (Bai *et al.*, 2013).

2.3 Mechanismy řízeného uvolňování látek z lipidových vezikul

Metody aktivního transportu lipidových vezikul na bázi konjugovaných ligandů umožňují přenos a akumulaci nosiče léčiva na požadované místo (například nádor nebo infikovanou tkáň). Současně představují první krok ve sledu tkáňově specifické terapie, avšak již se nevztahují k neméně důležité problematice samotného mechanismu uvolnění enkapsulovaného nákladu. Neregulované uvolnění látek závisí téměř exkluzivně na vlivu EPR efektu a degradace lipidové dvojvrstvy působením RES či proteinů komplementu, případně přirozené nescifické ztrátě strukturální integrity s postupem času, nebo spoléhá na pasivní difuzi léčiva skrze membránu (Franco *et al.*, 2021; Ta & Porter, 2013).

Tímto způsobem by však k uvolnění terapeutik došlo buď příliš náhle a ve vysokých koncentracích, nebo naopak neúměrně pomalu. Při aplikaci také mohou nastat problémy během fúze vezikuly s plasmatickou membránou, anebo s endosomálním systémem po internalizaci. V určitých situacích je tento princip výhodný, neboť například účinek cytostatika vinkristinu lze navodit i při nižších koncentracích léčiva, jelikož inhibuje buněčný cyklus (Allen *et al.*, 1995). Charakter personalizované léčby především v oblasti onkologických onemocnění ovšem typicky vyžaduje stabilní, cílené a přesně dávkované uvolnění cytostatika pro dosažení pokud možno minimálního nescifického účinku na okolní tkáň při současném zachování cytotoxicity vůči tumoru (Tu *et al.*, 2021). Pasivní mechanismy zpravidla neposkytují dostatečné uvolnění léčiva v patřičných koncentracích, jako je tomu v případě cisplatinu a doxorubicinu - DOX (Bandak *et al.*, 1999).

Jak již bylo v minulých kapitolách popsáno, lipidové vezikuly disponují poměrně širokým potenciálem pro různorodé modifikace. Některé z nich lze navrhnout takovým způsobem, aby synergicky při působení příslušného exogenního či vnitřního podnětu zapříčinily uvolnění nákladu z liposomu. Rozdělují se na vnější a vnitřní stimuly, a následně dle konkrétního principu (uvedeno níže).

2.3.1 Exogenní mechanismy uvolnění

Vnější způsoby indukce uvolnění látek z lipidových vezikul přímo navyšují míru eluce. Současně mohou sloužit jako spouštěče endogenních mechanismů (Ahmadi *et al.*, 2020). Lze je všeobecně kategorizovat dle příslušného mechanismu. Rozlišuje se uvolnění hypertermní, magnetické, ultrazvukové (této sekci je dedikována vlastní kapitola, viz „Řízené uvolňování látek z liposomů pomocí ultrazvuku“), fotosenzitivní, elektrické a chemické (Franco *et al.*, 2021).

2.3.1.1 Termosenzitivní lipidové vezikuly

Vysoké teploty lze uplatnit při eluci enkapsulovaných látek z takzvaných termosenzitivních liposomů, jejichž struktura je modifikována tak, aby vezikula optimálně reagovala na působení mírné či extrémní hypertermie, která zároveň slouží jako doprovodná terapeutická metoda k chemoterapii. Teplotní hodnoty mírné hypertermie se pohybují mezi 39-43 °C. Její účinky zahrnují lokální navýšení oxygenace, průtoku krve, permeability tkání a perfuze, čímž dochází ke zlepšení farmakokinetických vlastností léčiva. Extrémní hypertermie (>43 °C) vede k denaturaci proteinů a lýze buněk (viz. kapitola „Ultrazvuk“). Lze ji navodit působením ultrazvuku o vysoké intenzitě (HIFU), případně mikrovln a laserových paprsků (Dou *et al.*, 2017).

Design termosenzitivních liposomů (TSL) zahrnuje použití lipidů, které si udržují stabilitu za fyziologických podmínek (37 °C), ale současně se jejich T_i pohybuje v mezích mírné hypertermie, aby došlo k fázovému přechodu do permeabilní kapalné fáze, tedy z L_β do L_α . Rané formulace se zakládaly na přírodních fosfolipidech s přidávkou cholesterolu a PEG-2000 v příslušném molárním poměru. Koncentrace cholesterolu (Chol) převyšující 30 % vedou ke ztrátě termosenzitivity, neboť slouží jako stabilizační element membrán. Jako optimální byla stanovena směs DPPC: HSPC: Chol: DSPE-PEG2000 v poměru 50:25:15:3 (Gaber *et al.*, 1996).

Tato raná generace vedla k vývoji ještě efektivnější formulace, jež obsahovala kromě výše uvedených reagens i lysolipid MPPC (1-myristoyl-2-palmitoyl-sn-glycero-3-fosfatidylcholin), jenž dramaticky navýšil permeabilitu membrány (Needham *et al.*, 2000). V současnosti jako standard slouží formulace zvaná ThermoDox[®], jež úspěšně prošla několika fázemi klinických testů. Jedná se o směs DPPC: MSPC: DSPE-PEG2000 v poměru 86:10:4 (MSPC=1-myristoyl-2-stearoyl-sn-glycero-3-fosfatidylcholin). Relativně nedávno proběhla 1. fáze testování ThermoDox[®] v kombinaci s fokusovaným

ultrazvukem při nádorové léčbě (Lyon *et al.*, 2018). Dále například Regenold a kolektiv tuto směs srovnali s kontrolními liposomy k uvolnění vinorebinu. Termosenzitivní liposomy projevily dvojnásobně účinnější efekt oproti kontrole (Regenold *et al.*, 2023).

Navzdory relativnímu úspěchu formulace ThermoDox[®] neustále probíhá výzkum v této oblasti. Mezi další nedávné strategie pro formulaci TSL patří taktéž modifikace struktury membrán s pomocí poly-N-substituovaných akrylamidů, poly-N-vinyletherů, poloxamerů (Pluronic[®]), elastinu podobných peptidů a surfaktantů, např. Brij78 (Ta & Porter, 2013; Franco *et al.*, 2021; Bi *et al.*, 2019).

2.3.1.2 Magnetosomy

Význam paramagnetických a superparamagnetických nanočástic (NP), jmenovitě například oxidu železa (Fe₃O₄), titanu (TiO₂) a křemíku (SiO₂), spočívá v jevech nastávajících ve střídavém elektromagnetickém poli (Blasiak *et al.*, 2013). První strategie se zaměřuje na atrakci nanočástic k externímu magnetickému poli (ACMF – alternating current magnetic field), které je lokalizováno v místě nádoru. Nanopartikule mohou být buď přímo enkapsulovány v liposomálním lumenu, popřípadě inkorporovány v lipidové dvojvrstvě jako typ příměsí, nebo konjugovány k povrchu vezikul (Abbasi *et al.*, 2023).

Co se však týče samotného uvolňování z vezikul, rozlišují se dva základní způsoby, a to vyvolání eluce v termicky inertních/nesenzitivních systémech, a spuštění uvolnění na základě indukované hypertermie obdobně jako v případě klasických TSL. V prvním případě se jedná o strukturní změny v lipidové dvojvrstvě vyvolané působením nízkofrekvenčního ACFM. Vezikuly se výrazně zvětšují za současné eluce enkapsulované látky. Jako příklad lze uvést DPPC/Chol liposomy upravené přidávkou CMD (karboxymethyl dextran), jejichž expozice účinkům ACFM nevede ke zvýšení teploty (Guo *et al.*, 2015).

Druhý způsob lze označit za pouhou modifikaci TSL poskytující zvýšený hypertermický účinek, jenž ale vzhledem k inkluzi NP neovlivní okolní struktury. Přítomnost oxidů železa o rozměrech <5.5 nm, inkorporovaných do lipidové membrány stabilizovaných pomocí palmityl-nitroDOPA (běžně se používá kyselina olejová, což má však za následek agregaci NP a chabou membránovou inkorporaci), po nahřátí zapříčiní lokalizovaný nárůst teploty za uvolnění enkapsulované látky, a to dokonce pod T_l lipidů (Amstad *et al.*, 2011).

2.3.1.3 Fotosenzitivní lipidové vezikuly

K uvolnění látek z liposomů je v tomto případě nutné aplikovat poznatky fotodynamické terapie. Jedná se o lokální distribuci fotosensitizeru, tedy látky responzivní vůči ozáření, která se váže pouze na patologickou tkáň. Ozářením dochází k aktivaci absorbcí světla, a následnou selektivní destrukci buněk prostřednictvím tvorby ROS (primárně singletního kyslíku), které v lipidové membráně indukují oxidační stres mechanismem peroxidace, formaci pórů a následnou rupturu a lýzi buňky. Identického principu lze využít i při práci s lipidovými vezikulami. Jako příklad lze uvést několik nedávných studií. Lem a kolektiv experimentovali s liposomy ukotvenými v celulósově nanofibrilární matrix obsahující fotosensitizer. K uvolnění enkapsulovaného kalceinu došlo s pomocí excitace fotosensitizeru prostřednictvím dalekočerveného (far red) světla (Lem *et al.*, 2023). Všeobecná využitelnost těchto principů spočívá v podpůrné léčbě onkologických onemocnění, např. uvolnění doxorubicinu s pomocí ftalocyaninů jako fotosensitizerů (Zheng *et al.*, 2020).

Inkorporace fotosensitizerů v liposomech zpočátku sloužila pouze ke zlepšení jejich rozpustnosti a biokompatibility, avšak s postupem času došlo ke konvergenci oboru biomedicíny s nanotechnologiemi. Výsledkem je jejich dnešní široké uplatnění v rámci fluorescenčních zobrazovacích metod, modulace vaskulatury, fotochemické internalizace a samozřejmě řízeného uvolňování léčiv z vezikul (Franco *et al.*, 2021; Saad & Hasan, 2022).

Podobně jako v případě magnetických nanočástic i fotosensitizerů lze enkapsulovat v lumenu liposomu nebo inkorporovat do lipidové dvojvrstvy, případně navázat k povrchu jakožto konjugáty či ligandy. Jejich chemická struktura vychází z porfinu, případně dalších tetrapyrrolů (viz Obr. X). Vzhledem k potenciálním cytotoxickým účinkům je vhodné fotosensitizerů interkalovat pokud možno co nejhlouběji do lipidové dvojvrstvy, kde mohou déle indukovat stres v membráně. Druhou možností je zmíněná enkapsulace, kdy však je nutné určit vhodný molární poměr ke zbytku komponent liposomů. Při molárních procentuálních koncentracích >15 % dochází k destabilizaci vezikuly a agregaci enkapsulovaného fotosensitizeru (Ghosh *et al.*, 2019). Inkorporace cholesterolu a PEG se projevuje stabilizačními účinky zlepšujícími farmakokinetickou povahu *in vivo*. Současně platí, že saturované fosfolipidy poskytují rigidnější a odolnější membrány vůči oxidačnímu poškození (Saad & Hasan, 2022).

Vyjma indukce oxidativního stresu nicméně existují i další, byť méně rozšířené strategie eluce látek z liposomů. Při procesu fotoizomerizace dochází k destruktivní změně konformace lipidů uvnitř membrány vedoucí k její ruptuře. Liu a kolektiv vytvořili vezikulární formulaci na bázi vaječného PC s přidavkem Chol a azobenzenů o různé polaritě. Ozářením UV světlem při vlnové délce 360 nm došlo ke změně konformace z *cis* na *trans* (Liu *et al.*, 2005).

Další metoda spočívá v indukovaném štěpení labilních vazeb molekul inkorporovaných v lipidové membráně, tedy např. 2-nitrobenzylu (Franco *et al.*, 2021). Yavlovich a kolektiv poukázali na možnost využití fotosenzitivních polymerů, jejichž zesíťování způsobuje dezintegraci membrán, v nichž jsou tyto látky navázány. 1,2-bis (10,12-trikosadinoyl) sn-glycero-3-fosfatidylcholin (DC 8.9 PC) se ukázal jako vhodnější formulace ve srovnání s ThermoDox[®] obsahujícím enkapsulovaný fotosenzitizer (Yavlovich *et al.*, 2011).

Ozáření fotosenzitizeru je nicméně do jisté míry doprovázeno sekundárním uvolněním energie v podobě tepla (existuje ovšem i dedikovaná fototermální terapie). Při takzvaném fototermálním efektu dochází ke konverzi světelné energie na tepelnou (respektive je tak vyvolána intermolekulární oscilace), přičemž obdobně jako u některých výše uvedených metod vzniká lokální hypertermie navyšující permeabilitu membrán. Lze jej navodit s pomocí uhlíkových nanočástic, především grafénu, a také zlatých NP představující vynikající tepelné vodiče. Účinek je omezen pouze v místě lokalizace nanočástic, neboť dochází k rychlé disipaci tepla (Franco *et al.*, 2021; Veeren *et al.*, 2022).

2.3.1.4 Elektroporace lipidových vezikul

Působením vnějšího elektrického pole na lipidové membrány dochází ke zvýšení jejich permeability skrze formaci hydrofilních mikropórů, jimiž může z vezikuly enkapsulovaná látka proniknout ven. Pokud vystavení elektrickému poli trvá pouze krátce, mikropóry se opět spontánně zacelí. Reverzibilní elektroporace, taktéž známá jako elektropermeabilizace, se zcela běžně používá jako jedna z metod genového inženýrství při přenosu genetického materiálu (např. plasmidové DNA). Zásadní výhodou této metody je vysoká modularita parametrů (délka působení, intenzita elektrického pole, napětí, atd.) a nízké technologické nároky. Při vysokých hodnotách el. napětí a delších periodách působení elektrického pole se již elektroporace stává nevratnou, přičemž integrita lipidové membrány je tak permanentně narušena. Permeabilitu vezikul lze

samozejmě opět modulovat aplikaci patřičné lipidové formulace. Aditiva jako např. cholesterol a biotinylované lipidy zlepšují tuto vlastnost (Silbaugh *et al.*, 2023).

2.3.1.5 Chemicky indukovaná eluce z vezikul

Jedná se o relativně široké spektrum protokolů vedoucích k rozvolnění lipidové dvojvrstvy na základě externě katalyzované chemické reakce. Jako chemické spouštěče se zpravidla používají relativně netoxické látky, které dokáží proniknout do libovolné lokace v organismu. Komplikaci však představuje nalezení kompatibilní lipidové formulace s danými činidly. Exogenní reaktant by měl specificky interagovat pouze s liposomem, neboť projevy afinity k jiným strukturám jsou nežádoucí. Jako příklad lze uvést uvolňování z liposomů s pomocí dipikolylaminu zinečnatého (ZnDPA), jenž interaguje se záporně nabitými membránami (Plaunt *et al.*, 2012).

V nedávné studii byly využity liposomy responzivní vůči palladiu, respektive PdCl₂, jenž aktivuje membrány destabilizující lipid DOPE, tedy dioleoylfosfoethanolamin (Chasteen *et al.*, 2023).

2.3.2 Endogenní mechanismy uvolnění

V této kategorii jsou zdaleka nejvýznamnější pH senzitivní liposomy, které slouží jednak jako cílené nosiče, které zároveň plní funkci elučního mechanismu. Extracelulární pH maligních nádorů se vyznačuje nižším pH (6,8), než je fyziologická norma. To umožňuje pasivní akumulaci liposomů dle zesíleného efektu EPR. Následně dochází k jejich internalizaci a fúzi s endosomálními membránami za současného uvolnění obsahu do cytoplasmy. Liposomální formulace tedy musejí být navrženy tak, aby zprostředkovaly endoplasmatickou internalizaci a zároveň na základě změny pH rozvolnily svou strukturu (Franco *et al.*, 2021; Swain *et al.*, 2023).

Zpravidla se rozdělují do čtyř kategorií. První z nich zahrnuje směs polymorfních lipidů (např. nenasycené PE) a mírně acidických amfifilních stabilizátorů. Druhá se zakládá na lipidických derivátech s vyšší permeabilitou, třetí spoléhá na destabilizační efekt fúzních proteinů či pH senzitivních lipidů. Poslední a prozatím nejmodernější kategorie se vyznačuje využitím titrovatelných polymerů sloužících jako destabilizační element v membráně, jakmile nastane změna pH (Wagner & Vorauer-Uhl, 2011).

Základní princip tedy spočívá v původně stabilní povaze vezikul při fyziologickém pH, která se však mění, jakmile se liposom ocitne v acidických podmínkách. Při neutrálním pH membrány těchto útvarů nejsou schopny formovat

lamelární dvojvrstvy. Namísto toho se vyskytují v takzvané invertované hexagonální fázi H₂. Vložení amfifilní kyseliny (např. CHEMS=hemisukcinát) dojde ke vzájemnému elektrostatickému odpuzení fosfátových a karboxylových skupin za tvorby lamelárních struktur, kterou rozruší fázová změna v kyselém prostředí vlivem protonace CHEMS. Ostatní endogenní metody zahrnují např. glutathionový spouštěč (GSH), enzymaticky indukované uvolnění (proteázy, fosfolipázy), a hypoxicky vyvolanou eluci enkapsulované látky (Franco *et al.*, 2021).

2.4 Ultrazvuk

Vznik mechanického vlnění je podmíněn existencí vazebných sil mezi částicemi, jejichž oscilací kolem svých rovnovážných poloh probíhá přenos energie prostředím z jednoho bodu do druhého. Propagace této energie je zprostředkována vzájemnými kolizemi přilehlých částic, čímž vzniká periodická akustická tlaková vlna způsobující kompresi média, kterým se šíří. V závislosti na směru oscilace lze tyto harmonické vlny rozdělit na longitudinální (kompresní) a transverzální (střížné). V materiálech o pevném skupenství (např. kostech) se vlnění může šířit oběma způsoby, v ostatních je propagace možná pouze longitudinálně, tedy například v měkkých tkáních a tělesných tekutinách.

Základní vlastnosti mechanických vln, tedy vlnová délka, frekvence a perioda jsou analogické k ostatním typům vlnění a formují kritéria, na jejichž základě lze akustické vlny kategorizovat. V rozsahu lidského sluchu, tedy frekvencích od 16 po 20 000 Hz se jedná o klasické zvukové vlny. Kmitání přesahující toto frekvenční rozpětí se označuje jako ultrazvuk (Powles *et al.*, 2018; Kossoff, 2000; Leighton, 2007).

2.4.1 Obecné vlastnosti ultrazvuku

2.4.1.1 Rychlost šíření

Míra rychlosti propagace ultrasonických vln je značně specifická pro konkrétní prostředí, přičemž nezávisí na frekvenci. Lze ji charakterizovat jako funkci modulu pružnosti K (nikoliv však poddajnosti) a hustoty prostředí ρ , nebo také jako součin frekvence f a vlnové délky λ (viz vzorce níže) v souvislosti s obecnými parametry vlnění:

$$c = \sqrt{\frac{K}{\rho}} \quad c = \lambda \times f \quad [m/s]$$

Obecně platí, že v pevných materiálech se ultrazvuk (US) šíří oproti ostatním skupenstvím zdaleka nejrychleji, neboť částice se zde vyskytují v těsné blízkosti vlivem

uspořádání v krystalické mřížce. Například rychlost šíření longitudinálních vln v kostech dosahuje hodnot mezi 2770-5000 m/s v závislosti na kompozici konkrétní kosti (pro lebeční kosti kolem 4000 m/s). Vlny transverzální ve srovnání s podélnými putují až o 30 % pomaleji. Díky nižší hustotě se v kapalném prostředí bude mechanické vlnění pohybovat ještě pomaleji. Například ve vodě při teplotě 25 °C platí, že $c = 1497$ m/s. V měkkých tkáních pak přibližně 1460-1580 m/s. Obdobný princip se uplatňuje i v plynech, kde se vlnění pohybuje ve srovnání s ostatními skupenstvími nejpomaleji. Kupříkladu propagace vzduchem dosahuje pouhých 340 m/s. Na základě tohoto modelu lze částečně popsat i interakci vln s liposomy, kde se US rychleji šíří ve fázi L_β oproti L_α (Kossoff, 2000; Schroeder *et al.*, 2009).

2.4.1.2 Vlnová délka a amplituda

Vzdálenost, jež vlna urazila v rámci jednoho cyklu, nazýváme vlnovou délkou λ . Lze ji také definovat jako vzdálenost mezi dvěma body periodického vlnění. Kratší vlnové délky poskytují vyšší rozlišení v oblasti zobrazovacích metod, avšak utrpí tím penetrace do měkkých tkání. Výpočet vychází z výše uvedené rovnice pro fázovou rychlost, tedy:

$$\lambda = \frac{c}{f}$$

Amplituda vlny označuje v kontextu US maximální lokální tlak či největší intermolekulární vzdálenost (Kossoff, 2000; Schroeder *et al.*, 2009; Powles *et al.*, 2018).

2.4.1.3 Frekvence

Jedná se o míru oscilace v podobě poměru fázové rychlosti a vlnové délky, tedy $f = \frac{c}{\lambda}$. Zároveň představuje základní parametr popisující US vlny (Timko *et al.*, 2010), jenž umožňuje jejich rozdělení do kategorií dle výše kmitočtu. Ultrazvuková frekvence tak předurčuje specifickou aplikaci US v praxi. Nízkofrekvenční ultrazvuk (LFUS) pohybující se mezi 20-200 kHz nalézá uplatnění v rámci oboru fyzioterapie, chirurgie (ultrasonické zákroky, konkrétně litotrypse při vysokém akustickém tlaku, liposukce, tkáňová ablace), dále pak při čištění povrchů, sterilizaci a sonochemii. Při nižších frekvencích často nastává jev tzv. kavitace (viz dále), jenž je relevantní při rozrušení biologických membrán. Někdy se rozlišuje i kategorie středních frekvencí do 1 MHz, avšak běžně se lze setkat pouze s klasickým rozdělením na LFUS a vysokofrekvenční ultrazvuk, tedy HFUS. Jeho frekvence dosahují hodnot >1 MHz. Využití spočívá taktéž ve fyzioterapii, drobných kosmetických zákrocích a zobrazovacích metodách či

diagnostice. Pro zobrazení v dopplerovském režimu se uplatňují frekvence 3-30 MHz, pro klasický B-mode je rozpětí také poměrně široké (Leighton, 2007; Ahmadi *et al.*, 2020; Entzian & Aigner, 2021).

Vyšší frekvence se vyznačují citelně kvalitnějším rozlišením (axiální rozlišení instrumentace se v závislosti na jeho kvalitě pohybuje při frekvenci 5 MHz mezi 0,6-1,2 mm; laterální rozlišení pak mezi 0,9-3 mm), nicméně jak již bylo zmíněno, penetrace tkání se tím snižuje. Z tohoto důvodu je frekvence vysoce variabilní parametr závislý na konkrétním uplatnění. Pro vyšetření hluboko uložených struktur (např. abdominální orgány) se používají US sondy o frekvenci 2-5 MHz, kdežto pro superficiální útvary se frekvence pohybují v rozsahu 5-10 MHz (Powles *et al.*, 2018; Kossoff, 2000).

2.4.1.4 Intenzita

Množství přenesené energie na určitou plochu je definováno veličinou intenzity ultrazvukového vlnění I . Jedná se o podíl energie E , jež prochází za jednotku času t jednotkovou plochou S , která je kolmá vůči směru šíření vln:

$$I = \frac{dE}{dS} \times \frac{1}{t} \left[\frac{E}{m^2} \right]$$

Tato veličina přímo koreluje s akustickým tlakem p , hustotou daného prostředí ρ a s ním související rychlostí šíření c :

$$I = \frac{p^2}{2\rho c} \left[\frac{E}{m^2} \right]$$

Na základě hodnot I lze US rozdělit do dvou skupin, první z nichž je ultrazvuk o nízké intenzitě (0,125-3 W/cm²) a dále pak ultrazvuk o vysoké intenzitě (>3 W/cm²), jenž se vyznačuje intenzivnějšími účinky působení na biologický materiál (Entzian & Aigner, 2021) a využívá se tedy například při litotrypsi či ozařování nádorů, kde působí na tkáň působí termickým efektem (více popsáno níže). Ultrazvuk o nízkých intenzitách je vhodnější pro uplatnění v rámci zobrazovacích metod, např. sonografii srdce, břišních orgánů nebo i analýzy průtoku krve v cévách prostřednictvím Dopplerova efektu (Schroeder *et al.*, 2009).

I lze modulovat fokusací s pomocí převodníků či upravených ultrazvukových hlavic. Energie vlnění je tak soustředěna na menší plochu, čímž dochází ke zvýšení intenzity v definovaném prostoru a hloubce. To umožňuje cílené, neinvazivní ozvučení specifické oblasti bez působení na okolní tkáň, což naskýtá potenciální alternativu k chirurgickým výkonům v rámci léčby onkologických onemocnění. Fokusace se

zpravidla uplatňuje pouze pro HFUS. Disponuje nicméně chabou penetrací tkáně a disipuje relativně blízko povrchu. Oproti tomu LFUS proniká hlouběji a nelze jej typicky dostatečně dobře fokusovat (Entzian & Aigner, 2021).

2.4.1.5 Akustická impedance

Výše uvedené parametry jsou všeobecně charakteristické pro mechanické vlny a závisí na konkrétním typu prostředí, přičemž ultrazvuk samozřejmě není výjimkou. Impedance Z tvoří součin prostředí ρ , případně modulu pružnosti K a rychlosti propagace vlnění c :

$$Z = \rho \times c \quad Z = \sqrt{K \times \rho} \quad \left[\frac{kg}{m^2 \times s} \right]$$

2.4.1.6 Odraz, refrakce a disperze

Z obou vzorců tedy vyplývá, že Z popisuje interakci akustického vlnění s médiem, jímž prochází. Současně tak lze objasnit i chování vln při přechodu z jednoho prostředí do druhého. Například vzduch má nižší denzitu než voda a kostní tkáň. Pokud ultrasonické vlnění prochází dvěma kapalinami, rozdíl impedancí obou prostředí není signifikantní a prakticky nedochází k žádnému odrazu energie. Avšak při přechodu například z měkkých tkání do pevného prostředí, zpravidla kosti, jsou již hodnoty impedancí na rozhraní obou prostředí natolik rozdílné, že se větší část energie odráží nazpět.

Platí tedy, že s rostoucím rozdílem mezi Z narůstá podíl odraženého vlnění, a naopak klesá podíl vln procházejících prostředím dále. Při přechodu z měkké tkáně do kosti se přenáší pouze 30 % energie vlnění, kdežto uvnitř kostí se zpět odráží pouze 10 % energie. Tento jev vysvětluje vznik ech, a současně také odůvodňuje nutnost použití ultrazvukového gelu při vyšetření (Powles *et al.*, 2018). Kvůli nízké denzitě vzduchu toto médium disponuje velmi nízkou impedancí, a tudíž se při následném přechodu do kůže drtivá většina energie odráží zpět (Kossoff, 2000). Podíl neboli frakci odraženého vlnění lze vypočítat následovně:

$$R = \left[\frac{Z_1 - Z_2}{Z_1 + Z_2} \right]^2$$

Z_1 a Z_2 zde značí jednotlivé impedance prostředí. Kromě odrazu vln také probíhá jejich refrakce a rozptyl. V prvním případě se jedná o lom vlnění na rozhraní dvou prostředí. K rozptylu dochází v momentě, kdy vlnění naráží na částice o mnohem menších rozměrech, než je λ ultrazvuku. Typickým příkladem je interakce s erytrocyty.

2.4.1.7 Absorbce a atenuace

Při průniku elastického vlnění skrze médium dochází k postupné ztrátě energie v rámci jevu zvaném atenuace, jenž je způsobem celou řadou dílčích příčin. Jmenovitě se podílí již zmíněný odraz, refrakce, a disperze vlnění. Zdaleka největší podíl však představuje absorbce, neboli konverze energie mechanických vln na tření mezi oscilujícími částicemi a následná přeměna na ztrátové teplo. Z tohoto důvodu je nutné signál zpětně odražených vln amplifikovat (Powles *et al.*, 2018).

2.4.2 Metody generování ultrazvuku

V současnosti existuje několik způsobů produkce ultrazvukových vln. Například v raných 90. letech Davies a kolektiv experimentovali s použitím near-IR (blízko infračervenému spektru) CO₂ laseru v pevných látkách (Davies *et al.*, 1993). Tento koncept se dále s postupem času rozvíjel (např. pro zobrazování intravaskulárních prostor dle Zhao *et al.*, 2018), přičemž dnes primárně slouží k měření tloušťky materiálů či detekce defektů (Selim *et al.*, 2020). Dále taktéž stojí za zmínku například optoakustické (Li *et al.*, 2022) nebo elektromagnetické generátory (Buchelnikov & Vasilev, 1992; Rueter & Morgenstern, 2014).

Zdaleka nejrozšířenějším typem je však takzvaný piezoelektrický generátor/převodník, jenž konvertuje elektrickou energii na oscilační pohyb krystalu v ultrazvukové sondě. Struktura a specifické technologie se značně liší [např. typ piezoelektrika (PZT-5H, LiNbO₃, ZnO, PLLA a další), uspořádání převodníku (imerzní, kontaktní, úhlový, atd.)], nicméně obecný princip zůstává neměnný. Piezoelektrické materiály projevují rezpozivitu k externí stimulaci v rámci přímého a reverzního piezoelektrického efektu. V prvním případě na kompozit působí mechanická energie přeměňující se na elektrickou. V případě druhém je situace opačná, tedy krystal se mechanicky deformuje pod vlivem elektrické stimulace (Yang *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2022). Jedná se tudíž o systém schopný signál vytvářet a současně zpětně detekovat.

Dipóly nacházející se v krystalickém materiálu jsou nahodile orientovány, přičemž jejich vystavením elektrickému poli dojde k uspořádání částic a indukci elektrického náboje. Deformací krystalu dojde k uvolnění mechanické, tedy akustické vlny se střídavými oblastmi komprese (Patey & Corcoran, 2020). Tato vlna se posléze šíří médiiem, ve kterém dochází k odrazu části energie nazpět do měniče, jenž ji vyhodnocuje jako elektrický signál. Vlastnosti vyzářeného vlnění určuje konkrétní typ piezoelektrika,

ale také stavba ultrazvukové sondy. Aby mohl zářič zároveň plnit funkci detektoru odražených vln, musí mezi vysláním a přijetím signálu uběhnout určitá lhůta, než dojde k vyslání dalšího pulzu. Piezoelektrické krystaly typicky v daném časovém období emitují signál pouze z 0,1 %, a z 99,9 % signál přijímají. Délku pulzů lze samozřejmě modulovat dle možností přístroje (Powles *et al.*, 2018; Kossoff, 2000).

2.4.3 Biologické účinky

Ultrazvuk se vyznačuje především svou neinvazivní povahou, relativně nízkými náklady a specifickými účinky na biologický materiál, které z něj činí velmi užitečný nástroj v mnohých oblastech nejen klinické praxe (v rámci zobrazovacích metod, rutinních diagnostických vyšetření, ale i drobných výkonů), ale taktéž vědeckého výzkumu, a to především při léčbě onkologických onemocnění a uvolnění léčiv z rozličných systémů. Mechanismy působení US lze rozdělit do dvou hlavních skupin, tedy tepelných a mechanických účinků uvedených v následujících dvou podkapitolách.

2.4.3.1 Termický efekt

Vlivem absorpce akustické energie dochází k jejím ztrátám na základě přeměny v teplo, které je předáno okolnímu prostředí mechanismem vaskulární perfuze. Nárůst teploty nastává typicky při ozvučení tkáně pomocí HIFU s delšími střídami signálu, tedy tzv. „duty cycle“, a dlouhou celkovou dobou ozvučení. Tento jev může vzejít i jako sekundární důsledek kavitace (viz dále), a to buď v kontinuální podobě kvůli nepřetržité stabilní oscilaci kavitačních bublin, ale lze jej vyvolat také pouze jednorázově vlivem náhlého kolapsu bublin, jenž vyvolá lokální nárůst teploty až o 5000 K. Přesněji řečeno, dostatečně velká tlaková amplituda vyvolá kavitační efekt v určitém objemu, v němž se akustické vlnění rozptyluje, což vede k navýšení teploty (ter Haar & Coussios, 2009; Timko *et al.*, 2009). Kvantitativně jej popisuje tepelný index TI, jehož výpočet se zakládá na poměru tkáněmi tlumeného akustického výkonu W_p a výkonu nutného ke zvýšení teploty o jednotku W_{deg} (tedy o 1 °C).

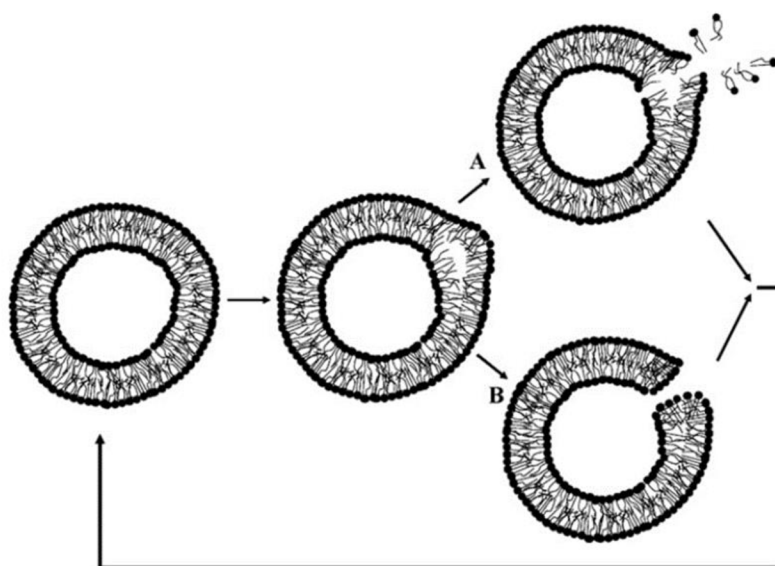
Při teplotě 43 °C nastává stav ultrazvukem indukované hypertermie, kdy v tkáni dochází k lýze buněk, nekróze a denaturaci proteinů. Při extrémní hypertermii nad 55 °C je koagulační nekróza a buněčná smrt prakticky okamžitá. Mírná hypertermie zvyšuje permeabilitu buněčných membrán, čehož lze využít při dávkování cytostatik a léčiv obecně, respektive jejich řízenému uvolnění z termosenzitivních systémů (Tu *et al.*, 2021; Entzian & Aigner, 2021).

2.4.3.2 Mechanický efekt

Akustické elastické vlnění přímo interaguje s hmotou prostřednictvím tlakových sil, které se projevují ve formě torzního momentu, okamžitého akustického tlaku, střížných sil, ale především akustické kavitace, jež je ze zmíněných účinků nejvýznamnější a nejstudovanější (Izadifar *et al.*, 2017).

Jedná se o poměrně nepředvídatelný jev, jenž vzniká díky působení oscilačního tlaku na kapalné či plynné médium obsahující duté prostory. Formují se bubliny, které společně s průchodem ultrasonických vln započnou kmitavý pohyb (Schroeder *et al.*, 2009). Tyto bubliny mohou být exogenního či endogenního původu. V případě endogenních bublin hovoříme o plynných kapsách uvnitř tkáně, kdežto exogenní bubliny dle názvu vznikají vně tkáně (Izadifar *et al.*, 2017; Entzian & Aigner, 2021).

V závislosti na charakteru oscilací lze kavitaci rozdělit do dvou kategorií. Neinerciální kavitace, taktéž nazývaná jako stabilní, je výsledkem kontinuální oscilace bublin, jejichž rozměry zachovávají stav ekvilibria (respektive jejich velikost fluktuuje v určitém rozsahu; zpravidla mezi 1-8 μm), a tedy nedochází k jejich kolapsu. Vzniká působením US s nízkou intenzitou. Stabilní kavitace může vyvolat střížný stres v okolních strukturách skrze difuzní pohyb mikrobublin a jejich vzájemné spojování do bublin větších rozměrů, což dává vznik lokálním prouděním, tzv. „microstreaming“, která zapříčiňují deformaci buněčných membrán a navýšení jejich permeability. Tento fakt naznačuje možné praktické využití kavitace při řízeném uvolňování látek z nosičů (Schroeder *et al.*, 2009; Timko *et al.*, 2009; Ahmadi *et al.*, 2020; Entzian & Aigner, 2021). Jak již bylo řečeno, kavitaci zpravidla doprovází i lokální nárůst teploty vlivem rozptylu vlnění uvnitř bubliny. Současně při teplotách blízcích se bodu varu ke kavitaci nedochází pouze mechanicky, nýbrž i vlivem vzniku odpařujících se velkých bublin (ter Haar & Coussios, 2010). Účinky kavitace jsou znázorněny na Obr. 9.



Obrázek 9: Schématická reprezentace formace tranzientních pórů v membráně v důsledku působení US; Ke vzniku pórů může dojít díky vzniku plyných kavitačních jader; Póry mohou nabýt hydrofobní (A) či hydrofilní podoby (B); **Přejato od:** Schroeder et al., 2009

Druhý typ kavitace se označuje jako nestabilní, transientní či inerciální, a lze jej popsat jako oscilaci při neustále rostoucích amplitudách do chvíle, kdy expanze bubliny dosáhne kritického poloměru (tzv. rezonanční rádius R_r), načež se rapidně zhroutí. Tento kolaps následně vyvolává intenzivní, krátký nárůst lokální teploty a tlaku. Celý proces se děje v řádu mikrosekund, tudíž se dá z termodynamického hlediska považovat za adiabatický. Zpravidla bývá vyvolán s pomocí HIFU, či obecně US o vysoké intenzitě. Společně s kolapsem bubliny vzniká tlaková vlna o rychlosti až 1000 m/s, jež působí destruktivně na buněčné membrány. Dochází k fragmentaci až buněčné lýze za současného uvolnění kyslíkových radikálů (Schroeder *et al.*, 2009; Ahmadi *et al.*, 2020).

2.5 Řízené uvolňování látek z liposomů pomocí ultrazvuku

Jak již bylo výše zmíněno, neinvazivní povaha především u diagnostických ultrazvukových systémů, možnost spaciotemporální modulace a fyzikální vlastnosti ultrazvukových vln umožnily jejich proliferaci do mnohých odvětví medicíny, průmyslu, ale také biotechnologického a nanomateriálového výzkumu. Jedno z těchto uplatnění spočívá v efektivním uvolnění látek z různých nanočásticových nosičů, jako například micel, mikrobublin, polymerových skeletů, a v neposlední řadě také liposomů. Fyzikální principy vedoucí k eluci enkapsulované látky byly podrobně objasněny v kapitole „Ultrazvuk“, avšak v kontextu tématu lipidových vezikul budou taktéž patřičně připomenuty.

2.5.1 Fyzikální princip a metodika provedení

Propagace mechanických vln médiiem v závislosti na jejich parametrech (frekvence, akustický tlak, intenzita, doba trvání a tzv. duty cycle) zpravidla zapříčiňuje dva odlišné jevy vedoucí k rozrušení struktury lipidové membrány v rámci tzv. sonoporace. Termický efekt je typicky asociován s aplikací HIFU či HFUS vůči teplotně senzitivním formulacím liposomů (viz výše). Absorbci ultrazvuku v médiu a samotnými vezikulami dochází ke konverzi mechanické energie na teplo. Výsledkem postupného nárůstu teploty až na hodnoty kolem či nad T_t je konformační změna struktury lipidové dvojvrstvy do permeabilní kapalné fáze (respektive kapalné neuspořádané), kdy se z liposomu spontánně uvolňuje enkapsulovaný náklad. T_t je závislá na molekulární struktuře lipidů obsažených v membráně (Huang, 2008; Schroeder *et al.*, 2009).

Druhý typ účinku závisí na mechanickém působení ultrazvuku, typicky LFUS. Kavitace označuje proces nukleace, růstu a oscilace plyných dutinek či mikrobublin. Stabilní neboli neinerciální kavitace vede ke kontinuální rovnovážné oscilaci bublin v určitém velikostním rozsahu při působení nižších intenzit ultrazvuku. Změny v poloměru bubliny indukují lokální proudění média při jevu zvaném microstreaming. Malé konvekce a vířivé pohyby na lipidovou membránu působí střižným stresem, jenž narušuje strukturní integritu vezikuly díky vzniku defektů. V momentě, kdy dojde k reverzibilnímu navýšení permeability, se uvolňují enkapsulované látky.

Naproti tomu inerciální kavitace, která se též nazývá transientní, vede k ireverzibilní destrukci dvojvrstvy. Ultrazvuk o vysoké intenzitě způsobuje nelineární odezvu mikrobublin, v důsledku čehož jejich objem rapidně narůstá až po dosažení kritického resonantního poloměru, načež během kompresní fáze v rámci velmi krátkých akustických cyklů dochází k jejich kolapsu. Tento jev generuje extrémní akustický tlak a nárůst teplot. Výsledná tlaková vlna prolifereje rychlostí zvuku, čímž v médiu vznikají vysokorychlostní trysková proudění. Intenzita mechanického poškození ušetřeného vůči lipidovým membránám vede k jejich fragmentaci a dezintegraci (Ahmadi *et al.*, 2020; Franco *et al.*, 2021)

Dodatečně je však potřeba zmínit ještě třetí účinek mechanického vlnění, jenž nezávisí na nárůstu teploty ani kavitaci. Efekt sonoforézy spočívá v přímé interakci ultrazvuku s lipidovou dvojvrstvou. Fluktuační mezi pozitivními/kompresními a negativními/relaxačními tlakovými hodnotami vede k dočasnému narušení membrány a vzniku mezer mezi jednotlivými vrstvami dvojité lamely (Entzian & Aigner, 2021).

2.5.2 Liposomální systémy senzitivní k ultrazvuku

Vzhledem k relativně rekalitrantnímu charakteru většiny měkkých tkání s ohledem ke kavitaci je často k její indukci nutno použít vysokointenzivní ultrazvuk, jenž ale s sebou nese riziko nežádoucího mechanického poškození (obecně se z tohoto důvodu většinou neaplikují intenzity přesahující hodnoty terapeutického ultrazvuku, tedy nad 10 W/cm^2). Obdobná situace nastává i v případě liposomů, které zpravidla neobsahují žádná kavitační jádra, tedy dutiny či plynné bubliny. Je tedy vhodné navrhnout strategii, jež by navýšila akustickou rezpozivitu lipidových vezikul i bez použití drastických ultrazvukových parametrů.

Citlivost vůči mechanickému vlnění určuje celá řada vlastností daného nosiče. Jako zcela zásadní lze označit vazebnou sílu, která je primární příčinou případných strukturních defektů (tedy deformace vazeb a jejich oslabení). Vliv má také molekulová hmotnost, její distribuce a stupeň polymerizace, případně rozvětvení. S narůstající hmotností se lineárně navyšuje citlivost vůči US. Důležitý je taktéž tvar nosiče a heterogenita jeho povrchu (Tu *et al.*, 2021).

Lee a kolektiv provedli *in silico* analýzu vztahu mezi lipidovou konformací, zakřivením membrány a celkového tvaru na echogenitu. Na základě této studie bylo zjištěno, že vzájemné interakce lipidů s cholesterolem vedou k redukci laterální mobility lipidů v membráně, což by znamenalo, že cholesterol působí jako stabilizační strukturní element. Avšak současně dochází k zakřivení membrán. Tyto efekty tudíž působí proti sobě navzájem. Ve stejné studii bylo také objasněno, jakým způsobem lysolipidy interagují s membránou. Na strukturu dvojvrstvy jednoznačně působí stabilizujícím efektem, neboť zmenšují její zakřivení (Lee *et al.*, 2022). Iregularity (nepravidelnost povrchu) například umožňují lepší adhezi a kontakt s endoteliálními buňkami (Entzian & Aigner, 2021).

Bylo zjištěno, že k absorpci ultrazvukových vln dochází především při přechodu z pevné uspořádané fáze do kapalné neuspořádané, což je samozřejmě jev specifický pro T_f (Schroeder *et al.*, 2009). Již poněkud starší studie naznačují, že LFUS je v tomto ohledu účinnější ve srovnání s HFUS, byť ultrazvukově indukovaná kavitace závisí i na intenzitě. Oerlemans a kolektiv zkoumali mechanismus uvolnění fluoresceinu z liposomů, jenž není závislý na termickém, ani kavitačním efektu ultrazvuku. Bylo zjištěno, že při použití HIFU, jež nevyústilo v překročení T_f za současného vyloučení kavitačního efektu, i přesto došlo k uvolnění enkapsulovaného nákladu. Jako možné opodstatnění byl uveden

mechanismus kolizi liposomů se stěnou vzorkové komůrky, tedy střížné síly (Oerlemans *et al.*, 2013). Susceptibilitu lipidových membrán ovlivňují také konstituenty. Jedná se tedy o validní strategii modulace tohoto parametru (Schroeder *et al.*, 2007).

Typickým představitelem povrchové funkcionalizace membrán je z tohoto hlediska PEGylace. Inkorporace tohoto alkoholu do lipidové dvojvrstvy při její hydrataci způsobí prostorovou extenzi vazebných skupin a tvorbu korony o tloušťce 4-10 nm, jež v závislosti na koncentraci může celou vezikulu obepnout a zformovat tak protektivní stérickou bariéru (účinky již byly vysvětleny výše). Druhá PEGylační metoda již nevede k inkorporaci do membrány, nýbrž vyvolává narušení osmotického ekvilibria v médiu, kde se nelipidický PEG nachází. Účinek PEGylace je zřejmý především při nízkých koncentracích, kdy navyšuje sonickou senzitivitu vezikuly. Vyšší koncentrace tento účinek naopak inhibují, respektive spíše zesilují termický efekt na úkor mechanického (Schroeder *et al.*, 2009).

Další účinnou modifikaci představují příměsi surfaktantů (např. Triton a Tween). Samy o sobě destabilizují strukturu lipidových membrán, nicméně jejich inkorporace navyšuje akustickou susceptibilitu liposomů. Další metodou vedoucí ke zlepšení echogenních vlastností je enkapsulace takzvaných akusticky kontrastních látek formujících kavitační jádra. Jejich působení aktivně snižuje intenzitu ultrazvuku potřebnou k indukci jevu mechanické kavitace. Tato činidla se uvnitř vezikuly vyskytují ve formě plynných kompartmentů stabilizovaných surfaktanty (Huang, 2008). Jedná se například o sérový albumin, polymery či enkapsulované fosfolipidy. Relativně nedávno bylo experimentálně ověřeno využití echogenních eLiposomů obsahujících enkapsulované perfluorokarbony (PFC). Principiálně při iradiaci ultrazvukem dochází k poklesu tlaku až pod bod varu emulze PFC. Za takových podmínek tedy dojde k narušení membrány (Lattin *et al.*, 2012).

Nalezení ideální akusticky senzitivní lipidové formulace je i v současné době stále ožehavým tématem výzkumu v této oblasti. De Matos a kolektiv experimentovali s uvolněním enkapsulovaného lektinu ML1 z liposomů složených z DPPC: Chol: DSPE-PEG-2000 v poměru 60: 20: 20 s obsahem enkapsulované PFC směsi (DPPC a perfluoropentan). Působením HIFU došlo k uvolnění 80 % enkapsulovaného ML1 (de Matos *et al.*, 2019). Další studie se zabývala formulací sonosenzitivních liposomů s pomocí DSPC, DOPE, DSPE-PEG2000, cholesterolu, sfingomyelinu a S-lysoPC (1-stearoyl-2-lyso-sn-glycero-3fosfatidylcholin). Formulace byla označena pod názvem IMP301-DC a působením nízkofrekvenčního HIFU došlo k účinnému uvolnění DOX

(Moon *et al.*, 2022). Al Sawaftah a kolektiv se ve dvou *in vitro* studiích pokoušeli uvolnit enkapsulovaný kalcein k léčbě kolorektálního karcinomu (buněčná linie HCT116), a karcinomu děložního čípku (linie HeLa). V první studii bylo prokázáno, že liposomální formulace obsahující cRGD zlepšuje echogenní vlastnosti lipidových vezikul. Ve studii druhé byla jako modifikace zvolena konjugace transferrinu s PEGylovanými liposomy. I zde byl zjištěn signifikantní účinek (Al Sawaftah *et al.*, 2021; Al Sawaftah *et al.*, 2022). Na závěr lze ještě zmínit i nedávnou práci, jež se zabývala použitím formulace IMP301 (tedy DSPC, DSPE-PEG2000, DOPE, MSPC (resp. S-lysoPC), která se taktéž prokázala jako efektivní (Kim *et al.*, 2022).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 MATERIÁLY

3.1.1 Chemické látky:

- Destilovaná voda
- Diethylether (Sigma Aldrich, Spojené státy)
- Chloroform (Sigma Aldrich, Spojené státy)
- ATP (Adenosintrifosfát; Sigma Aldrich, Spojené státy)
- D-Luciferin (Pierce D-Luciferin, Monosodium salt; ThermoFisher Scientific, Spojené státy)
- Luciferáza (Firefly luciferase, Sigma Aldrich, Spojené státy)
- MgCl₂ (chlorid hořečnatý; Sigma Aldrich, Spojené státy)
- Pufř HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl] ethan-1-sulfonová kyselina; Sigma Aldrich, Spojené státy)
- Pufř PBS 10x koncentrovaný (Phosphate Buffered Saline; pH 7,4; Složení: 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na₂HPO₄·12H₂O; 2,6 g KH₂PO₄)
- Sephadex G-25 (Sigma Aldrich, Spojené státy)
- Triton X-100 (2-[4-(2,4,4-trimethylpentan-2-yl)fenoxy]ethanol; ThermoFisher Scientific, Spojené státy)
- PEG-8000 (Sigma Aldrich, Spojené státy)
- Plynný dusík
- Kalcein (Fluorexon; Carl Roth, Německo)
- Chlorid kobaltnatý (CoCl₂; Sigma Aldrich, Spojené státy)

3.1.1.1 Lipidy:

- DPPC (16:0 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfatidylcholin; Avanti Polar Lipids Inc.)
- EggPC (L- α -fosfatidylcholin; Avanti Polar Lipids Inc.)
- Hydro Soy PC (hydrogenovaný L- α -fosfatidylcholin/HSPC; Avanti Polar Lipids Inc.)
- Cholesterol (Avanti Polar Lipids Inc.)

3.1.2 Instrumentace:

- Nahřívací blok (MR-Hei Connect Hotplate; Heidolph, Německo)
- Sonikátor (Elmasonic P30H; Elma, Švýcarsko)
- Extruzní set (Avanti Mini Extruder; Avanti Polar Lipids Inc., Spojené království)
- Experimentální aparatura pro vysušení zkumavek (vyrobena na 3D tiskárně)
- Modulární spektrofluorimetr (FLS 980; Edinburgh Instruments, Spojené království)
- Centrifuga (NF 048; Nüve, Turecko)
- Centrifuga (Rotina 420R; Hettich, Německo)
- Experimentální modul spektrometru pro měření vzorků (vyrobena na 3D tiskárně)
- Zdroj elektrického napětí (HY 3003 DC Power Supply; Mastech, Spojené státy)
- Nízkofrekvenční ultrazvukový generátor (PH100H; Hielscher, Německo)
- Vysokofrekvenční ultrazvukový generátor/1kanálový ultrazvuk (BTL-4000 SMART; BTL, Česká republika)
- Experimentální ultrazvukový generátor (zkonstruován doc. PhDr. Ing. Jaroslavem Průchou, Ph.D. et Ph.D; ČVUT)
- Analytické váhy

3.1.3 Ostatní laboratorní vybavení:

- Pinzety, sephadexové kolonky, skleněné zkumavky, mikrozukavky (Eppendorf), plastové zkumavky (Sartorius), ultracentrifugační mikrozukavky (Vivaspin 500; Vivaspin), 1000 μ l injekční stříkačky (Avanti Polar Lipids Inc.), odměrné nálevky, laboratorní baňky, lžice, skelná vata, fixy, papírové ubrousky, automatické pipety a příslušné násady/špičky, flow box, ultrazvukový gel (Aquasonic Clean; Parker), ultrazvukové násady (1 a 5 cm²; BTL), filtrační membrány (1 μ m, 200 nm a 100 nm; Nucleopore Trace-Etch Membrane; Whatman), filtrační disky (10 mm PE Drain Disc; Cytiva), teploměr, kovový odrážec, spektrofotometrické kyvety

3.1.4 Software:

- Origin Pro (OriginLab Corporation, Spojené státy)
- MS Excel a Word (Microsoft, Spojené státy)
- F980 (Edinburgh Instruments, Spojené království)

3.2 METODY

3.2.1 Příprava multilamelárních vezikul

Nejprve je nutné si poměrně přesně připravit navážku příslušných pufrů (vhodné jsou zejména zwitteriontové pufrы s pH na úrovni fyziologických hodnot, tedy např. HEPES či PBS), značky určené k enkapsulaci (ATP/Kalcein) a samotných lipidů. Konkrétně tedy:

- 500 ml, 10mM interního pufru
- Roztok 60mM ATP; 200 μ M kalceinu
- Lipidy o finální koncentraci 10 mg/ml

Po navázení potřebných látek byly lipidy rozpuštěny v organickém rozpouštědle (2 ml diethyletheru, případně chloroformu) při celkové koncentraci lipidů 10 mg/ml. Následuje odstranění organického rozpouštědla proudem dusíku po dobu 1 hodiny. Záměrem je získat vysušený film na dně a na stěnách zkumavky. Vysušené lipidy jsou posléze minimálně 30 minut hydratovány ve 2 ml interního pufru (10 Mm HEPES či PBS) s požadovanou látkou určenou k enkapsulaci a sonikovány v ultrazvukové lázni pro homogenizaci směsi po dobu 15 minut při frekvenci 37 kHz. Výsledkem je vznik heterogenní populace multilamelárních vezikul s variabilními rozměry, což představuje důvod proto další patřičné zpracování, viz dále.

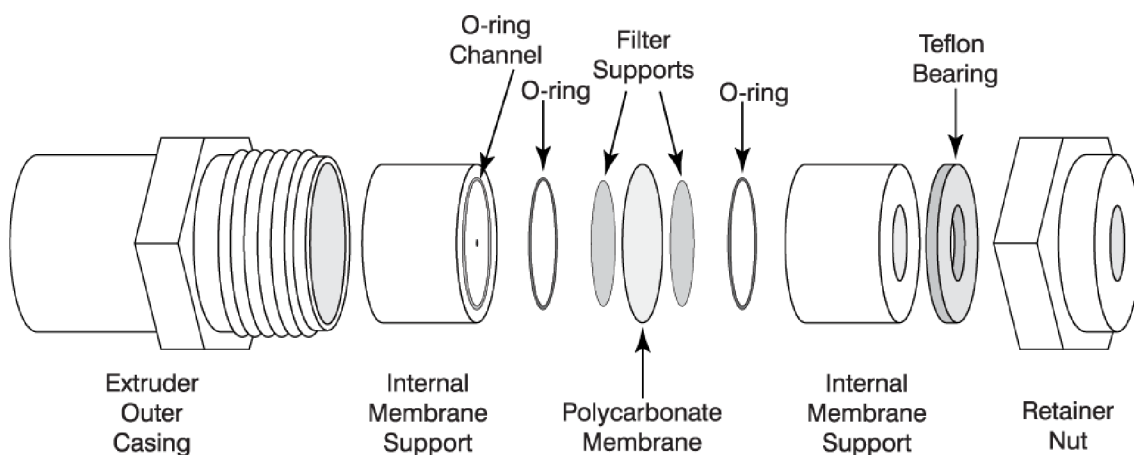
Tabulka 1: Výběr lipidů pro tvorbu liposomů; Oranžovou barvou jsou zvýrazněny lipidy použité v této práci z důvodu vhodné transienční teploty a nulového náboje; **Přejato z:** Avanti Polar Lipids Inc.

Název	Mastná kyselina	Tranzienční teplota (°C)	Náboj při pH 7.4	Kód produktu
DLPC	12:0	-1	0	850335
DMPC	14:0	23	0	850345
DPPC	16:0	41	0	850355
DSPC	18:0	55	0	850365
Hydro Soy PC	16:0-18:0	52	0	
DOPC	18:1	-20	0	850375
DMPE	14:0	50	0	850745
DHPC	7:0			850306
DAP	14:0			890840
EPC	18:1			890704
EPC	16:0-18:1	49		890705
DPPE	16:0	63	0	850705
DOPE	18:1	-16	0	850725
DMPA•Na	14:0	50	-1.3	830845
DPPA•Na	16:0	67	-1.3	830855
DOPA•Na	18:1	-8	-1.3	840875
DMPG•Na	14:0	23	-1	840445
DPPG•Na	16:0	41	-1	840455
DOPG•Na	18:1	-18	-1	840475
DMPS•Na	14:0	35	-1	840033
DPPS•Na	16:0	54	-1	840037
DOPS•Na	18:1	-11	-1	840035
DOPE-Glutaryl•(Na) ₂	18:1	~-10	-2	870242
Tetramyristoyl Cardiolipin•(Na) ₂	14:0	59	-2	710332
DSPE-mPEG-2000•Na	18:0	N/A	-1	880120
DSPE-mPEG-5000•Na	18:0	N/A	-1	880220
DSPE-Maleimide PEG- 2000•Na	18:0	N/A	-1	880126
DOTAP•Cl	18:1	~-0	+1	890890

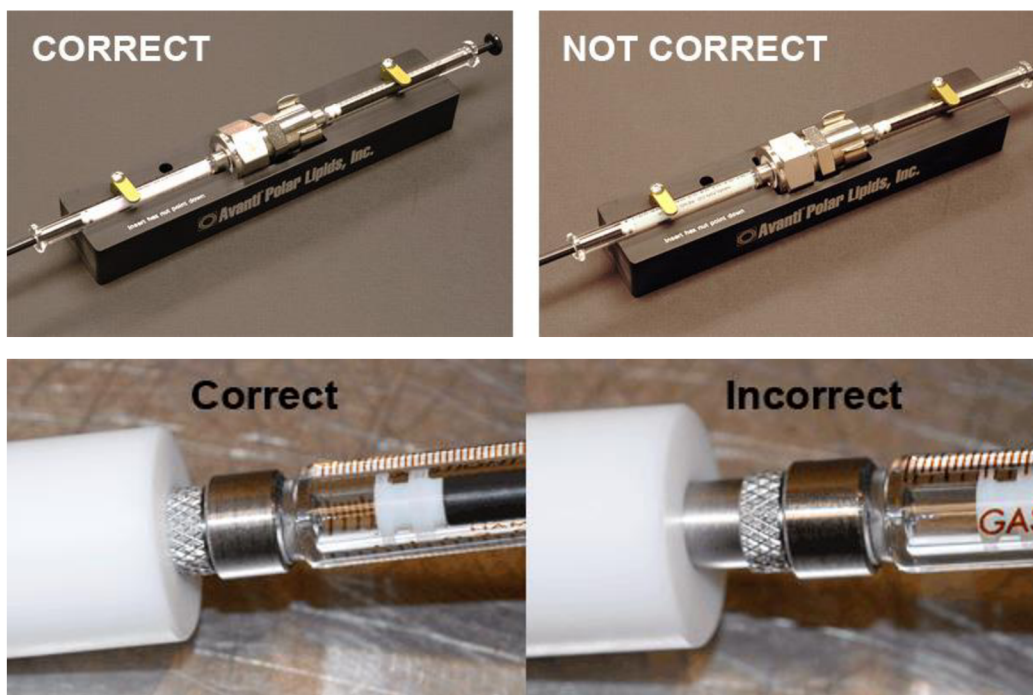
3.2.2 Příprava unilamelárních vezikul

Pouhou hydratací lipidové směsi bez využití extrudéru lze docílit syntézy polydisperzní suspenze multilamelárních vezikul (viz výše), jež jsou pro účely experimentů oproti unilamelární kompozici méně vhodné. Z tohoto důvodu se provádí několikanásobná extruze s pomocí miniextrudéru společnosti Avanti Polar Lipids. Tento proces zajišťuje získání unifikované směsi lipidových vezikul identických vlastností a rozměrů v závislosti na použitých filtrech v extrudéru, jenž lze sestavit dle níže uvedeného schématu (Obr. 10). Na tomto obrázku si lze povšimnout dvou přídatných filtrů (Drain discs) a polykarbonátové membrány s danými rozměry pórů. K dosažení zcela homogenní směsi unilamelárních liposomů je potřeba použít nejprve 1 μ m membránu, poté 0,2 μ m pro získání 200nm vezikul (více popsáno níže).

Za zcela ideálních podmínek by hydratace i extruze měly probíhat nad transienční teplotou (T_t) použitého lipidu (viz Tabulka 1). Před provedením samotné extruze je také nutno nejprve celou konstrukci (především píst uvnitř injekčních stříkaček) navlhčit destilovanou vodou prostřednictvím jejího protlačení přes membránu a nazpět, čímž dojde k redukci nevyužitého objemu při extruzi.



Obrázek 10: Grafické schéma jednotlivých součástí extrudéru; Zleva doprava: Vnější tělo extrudéru, vnitřní opora membrán, prstencový kanálek, těsnící prstenec, přídatné filtry, polykarbonátový filtr, těsnící prstenec, vnitřní opora membrán, teflonové ložisko, těsnící matice; **Zdroj:** avantilipids.com



Obrázek 11: Srovnání správného a nesprávného sestavení extrudéru (nahore); Správné a nesprávné vložení injekční stříkačky do extrudéru (dole); **Zdroj:** avantilipids.com

Jakmile je extrudér zkonstruován, vložíme jej správným směrem (vrcholy těsnící matice dolů) do topného bloku s teploměrem (Obr. 11), jenž bude vyhříván zahřívací deskou na požadovanou teplotu (doporučuje se přibližně 10 °C nad transientní teplotou zvoleného lipidu, typicky 55-60 °C po dobu 15 minut, avšak teplota nesmí přesáhnout 80 °C). Poté s pomocí 1000 μ l utěsněné injekční stříkačky nasajeme hydratovanou lipidovou suspenzi a vložíme ji do extrudéru ze strany těsnící matice, přičemž z protilehlé strany vložíme druhou, prázdnou stříkačku (správné usazení na Obr. 11).

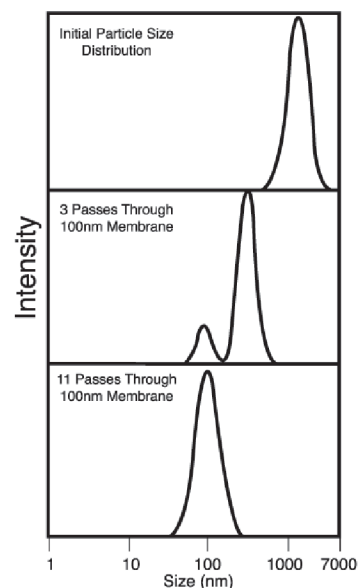
Zařízení posléze zajistíme otáčivými příklopkami a necháme přibližně 10 minut ekvilibrovat teploty lipidové směsi a extrudéru. V tuto chvíli lze provést extruzi, a to následujícím způsobem:

- Stlačením pístu stříkačky protlačíme její obsah srze systém membrán až do druhé stříkačky, jež se sama napustí. Poté stejný postup několikrát opakujeme dle vložené membrány v extrudéru tak, aby byl vzorek ve finální fázi extruze protlačen do výchozí stříkačky.
- Pro 1 μ m filtr postačuje 7x průtah, pro 0,2 μ m membrány 10x (zpravidla nejprve probíhá extruze skrze 1 μ m membránu a posléze 0,2 μ m; vliv počtu extruzních cyklů je zobrazen na Obr. 12); Při výměně filtrů či vzorku je nutno aparaturu před dalším použitím vyčistit destilovanou vodou.

Po dokončení extruze se přistupuje buď k očištění vzorků od extravezikulární značky, nebo případně uchování pro pozdější využití (v chladničce, nanejvýše 3-4 dny, jelikož dochází k rychlé degradaci integrity vezikul).

3.2.3 Modifikace liposomů

Aplikací různých látek lze ovlivnit povahu lipidových vezikul. Jedná se o pouhou úpravu stávajícího protokolu v podobě přidání modifikující látky v příslušné koncentraci k lipidové směsi v organickém rozpouštědle před jejím odpařením plynným dusíkem v digestoři. V této práci byl použit cholesterol v molárním poměru 30 % a 40 %, dále pak PEG-8000 v poměru 5 % a 15 %.



Obrázek 12: Vliv počtu extruzních cyklů na velikostní distribuci částic. **Zdroj:** avantilipids.com

3.2.4 Odstranění extravezikulární značky:

Suspenze liposomů je nanášena na 5ml sephadexové (G-25) kolonky připravené aplikací Sephadexu a interního pufru v poměru 1:5 do nabobtnání, a následně centrifugována k zadržení neenkapsulované próby (ATP/kalcein). Centrifugace je provedena několikrát z důvodu kvalitního promytí kolon a odstranění extravezikulární značky, případně též nenavázaného PEG či cholesterolu. První cyklus se provádí pouze s prázdnými kolonkami bez nanášeného vzorku k odstranění přebytečného pufru, a to po dobu 1 minuty při 500 ot/min.

Dále se s pomocí automatické pipety nanášejí vzorky po 1 ml na jednotlivé kolonky a dvakrát stáčí při 1400 ot/min po dobu 2 minut. Přechištěné vzorky jsou nyní připraveny k měření či uskladnění v chladničce (téměř všechny vzorky byly proměřeny až následující den).

3.2.5 Měření uvolňování ATP z liposomů pomocí ultrazvuku:

Práce probíhá na fluorescenčním spektrometru/spektrofluorimetru FLS980 (na Obr. 13) s excitační xenonovou lampou s výběrem vlnových délek pro excitaci (zde 490 nm) s příslušnou emisí (525 nm). K zařízení FLS980 je připojena experimentální měřicí komůrka vybavená teploměrem a míchadlem (Obr. 14) pro uložení vzorku a aplikaci reagensů. Pracoviště musí být v průběhu měření zásadně zatemněno.

Vzorky, jež v daný moment nebyly podrobeny experimentu, byly po celou dobu uchovány na ledě z důvodu potenciální degradace. V měřicí komůrce se uprostřed zařízení nachází umístění pro kyvety, které se naplňují v plném objemu z důvodu velké akustické impedance vzduchu, která by při nekompletním naplnění nastala.

Konkrétní složení obsahu zkumavek je značně specifické pro konkrétní typ detekčního systému či značky, jejíž prostřednictvím dochází k tvorbě měřitelného signálu (zde luminiscenčního) ke kvantifikaci uvolňování intravezikulární látky. Při použití systému luciferinu, luciferázy, kofaktoru $MgCl_2$ a intravezikulární ATP vzniká luminiscenční signál, přičemž se do kyvety pipetuje 300 μ l liposomů, 2250 μ l média (tedy 10mM pufru), 25 μ l 5mM $MgCl_2$, stejný objem D-luciferinu a 10 μ l luciferázy (40 μ g/ml), která se přidává při zahájení měření intenzity luminiscence.



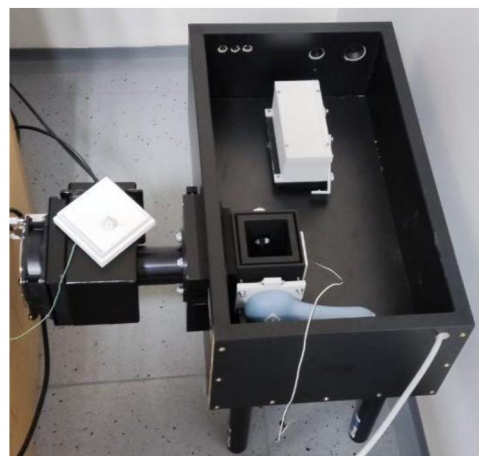
Obrázek 13: Spektrofluorimetr FLS980; **Zdroj:** edinst.com

Kinetické měření jediného vzorku trvá až 1200 s za neustálého monitoringu teploty a promíchávání média v kyvetě, čímž se předchází sedimentaci liposomů ke dnu. Zpravidla však měření trvá pouze 500 s a celý proces se dělí se na několik důležitých segmentů. Prvních 200 s dochází k ustálení signálu pozadí na stabilní úroveň, posléze je vzorek ozvučen buď LFUS či HFUS, a po uběhnutí 400 s od počátku měření přichází na řadu aplikace pozitivní kontroly v podobě 50 μ l 1% surfaktantu Triton X-100, jehož působením dochází ke snížení povrchového napětí

a následnému narušení struktury lipidových membrán. Eluce ATP v tomto bodě je maximální. Výsledkem měření je tedy kinetická křivka, na jejímž základě lze usuzovat účinnost jednotlivých liposomálních složení a dalších parametrů.

Modularita experimentu spočívá v nastavitelných parametrech ultrazvuku či různých úpravách v měřicí komůrce. Aplikace LFUS proběhly při frekvenci 30 kHz a intenzitě 130 W/cm², u HFUS lze nastavit frekvenci na režim 1 až 3 MHz a intenzitu až 3 W/cm². Dále lze střídat velikost ultrazvukové hlavice (1 a 5 cm²), případně vlnění fokusovat či zpětně odrážet s cílem zvýšení intenzity. Nastavitelná je taktéž frekvence pulzů (150 Hz) a střída (1:16 nebo 1:2, případně kontinuální režim). V případě potřeby lze též kyvetu umístit do chladicího média (viz diskuse). Přesto však mezi kyvetou a ultrazvukovou hlavici vždy dochází ke vzájemnému kontaktu skrze vodu nebo nanesený ultrazvukový gel. Konkrétní parametry pro tuto práci jsou následující:

- LFUS: $f=30$ kHz, $I=130$ W/cm²; kontinuální režim
- HFUS: $f=1$ MHz, $I=3$ W/cm²; pulzní režim (150 Hz)
- Hlavice o ploše 1 cm²
- Po počátečních měřeních nasazeno vodní chlazení



Obrázek 14: Experimentální komůrka pro umístění kyvet se vzorky s upevněnou ultrazvukovou hlavici

3.2.6 Měření uvolňování kalceinu z liposomů pomocí ultrazvuku

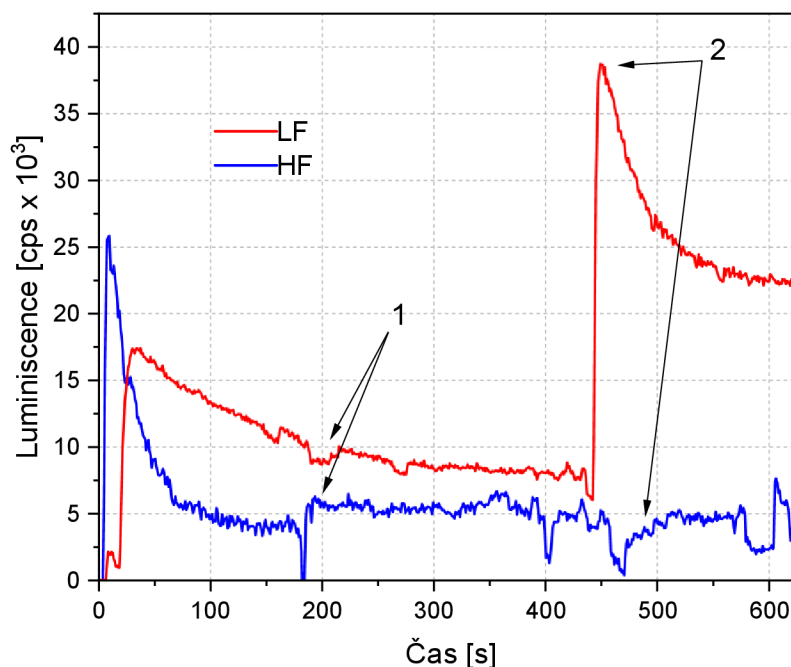
Fluorescenční signál byl vyhodnocen na základě eluce kalceinu z lipidových vezikul. Do kyvety bylo pipetováno 2400 μl 10mM pufru HEPES a 200 μl liposomů. Stejně jako v případě luminiscenčního měření byly vzorky v komůrce chlazeny vodou. Po uplynutí 100 s od počátku kinetického měření byl dodatečně do kyvety pipetován též 25 mM CoCl_2 v objemu 10 μl sloužící jako zhášec pozadí, tedy extravezikulární značky). Po 200 s byl vzorek ozvučen s pomocí HFUS v kontinuálním režimu ($f=1$ MHz; $I=10$ W/cm²). Jako pozitivní kontrola opět posloužilo 50 μl 1% detergentu Triton X-100, čímž došlo k uvolnění dosud enkapsulovaného kalceinu z liposomů.

Výpočet procentuálního uvolnění kalceinu byl proveden dle vzorce od Huang & MacDonald (2004):

$$\% \text{ uvolnění} = \left[\frac{F_{in} - F_{ultrasound}}{F_{in} - F_{totq}} \right] \times 100$$

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Komparace účinků LFUS a HFUS



Obrázek 15: Kinetické měření luminiscenčního signálu při uvolňování ATP z liposomů (DPPC) po dobu 650 s; **Červeně:** křivka aplikace LFUS ($f = 30$ kHz, $I = 130$ W/cm²); **Modře:** křivka aplikace HFUS ($f = 1$ MHz, $I = 3$ W/cm²); **1)** ozvučení ultrazvukem, **2)** kontrola s pomocí detergentu Triton X-100

V rámci této práce nejprve proběhlo základní srovnání působení HFUS a LFUS vůči několika typům lipidů. Výše uvedený graf (Obr. 15) znázorňuje oddělené kinetické křivky z měření luminiscenčního signálu prostřednictvím ATP uvolněného z vezikul. Na samém počátku lze vždy pozorovat náhlý a rapidní nárůst signálu vlivem přidavku enzymu luciferázy, jež katalyzuje reakci mezi extravezikulární ATP a luciferinem. V důsledku této reakce dochází k oxidaci luciferinu za vzniku luminiscenčního signálu. Jako optimální doba k ustanovení základní signální hladiny (tedy pozadí) bylo určeno 200 s po přidání reagentů do kyvety.

V tomto bodě byl vzorek ozvučen příslušným typem US. Nejprve tedy s pomocí kontinuálního LFUS a až v následujícím měření s HFUS. Účinky LFUS vůči nemodifikovaným 200nm liposomům složeným z DPPC lze charakterizovat jako nevalné, neboť bezprostředně po ozvučení došlo k navýšení signálu o 15,1 % s okamžitou tendencí opět klesat na původní hladinu. Regresní analýza poukázala na silnou korelaci mezi oběma jevy ($R=0,78$), avšak s relativně nízkým koeficientem determinace $R^2=0,62$.

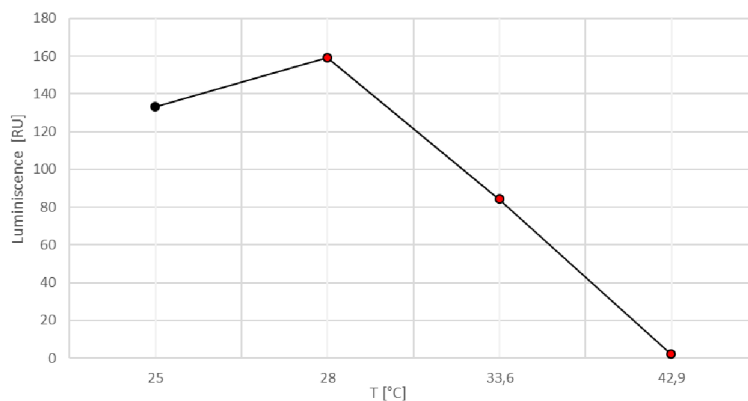
Jako kontrola byl po přibližně 450 s (hodnota byla určena na 400 s, ale pravděpodobně došlo k opožděnému přidání kontroly do kyvety) použit detergent Triton X-100, jenž snižuje povrchové napětí na membránách, což vyústí v dezintegraci vezikuly. Opět lze pozorovat značný nárůst signálu díky eluci ATP z dosud neporušených liposomů, přičemž LFUS zjevně nevedl k signifikantnímu uvolnění enkapsulované látky.

V případě HFUS došlo k nárůstu signálu o 17,5 %, přičemž $R=0,71$ a $R^2=0,5$. Trend sklonu regresní křivky je však pozitivní, a to až do doby aplikace kontroly. Zde si můžeme povšimnout, že signál nijak signifikantně nevzrostl, což může být zapříčiněno termickými účinky US. Původní signál pozadí je vysoký a odezva kontroly slabá, což může být také zapříčiněno propustností liposomů již od počátku. Na Obr. 16 lze vidět, že při vyšších teplotách klesá aktivita luciferázy, jejíž teplotní optimum se pohybuje kolem 25 °C a při 45 °C dochází k její kompletní inhibici (Noori *et al.*, 2014). Tento fakt všeobecně představuje značnou komplikaci při praktickém použití luciferázy jako detekčního systému eluce, neboť nemalé množství lipidů disponuje $T_t > 40$ °C (viz katalog Avanti Polar Lipids Inc.).

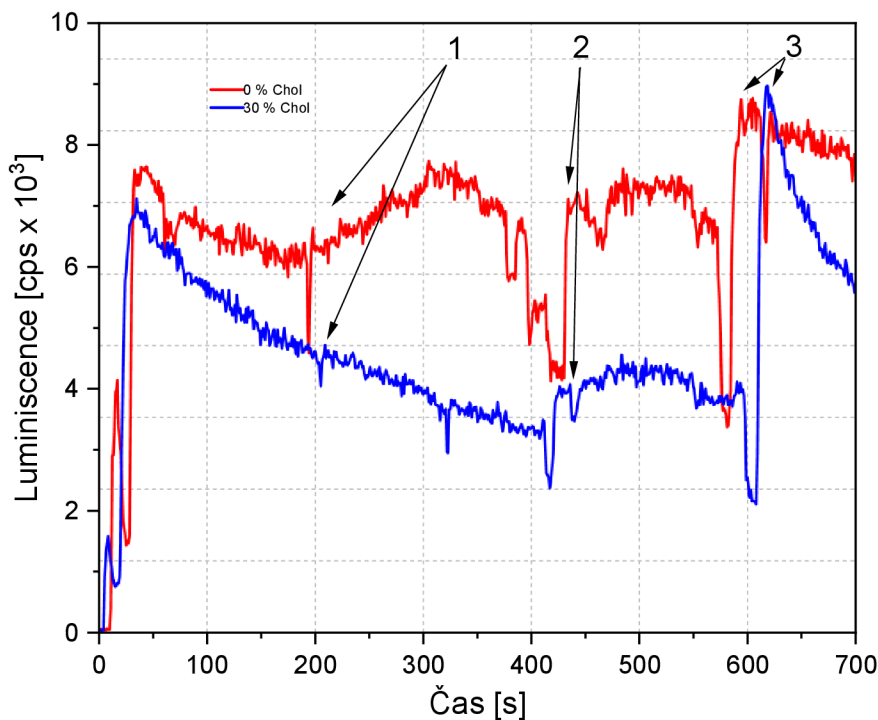
Pokud by ovšem byla zvýšena sonosenzitivita liposomů, bylo by možné měření provádět i při pokojové teplotě (kolem maxima aktivity luciferázy), kdy se jedná o velice senzitivní metodu. Ve srovnání s fluorescencí si lze všimnout násobně většího nárůstu signálu. Problematiku teplot by také bylo možné zcela obejít použitím chemiluminiscenční látky, která není termosenzitivní.

Hodnota T_t pro nemodifikovaný DPPC nicméně dosahuje 41 °C, což je stále pod inhibiční teplotou. Jak je však možné z výše zmíněného grafu odečíst, US teploty vzorku v nijak teplotě neregulované kyvetě navyšuje i na 42 °C i více. Bylo již také řečeno, že permeabilita liposomů je nejvyšší právě při T_t , a to i ve srovnání s teplotami vyššími (Schoeder *et al.*, 2009).

Na základě Obr. X lze usoudit, že vzhledem k míře signálu při aplikaci kontroly v případě křivky pro LFUS liposomální formulace obsahující čistý DPPC není příliš echogenní. V případě HFUS došlo k signifikantnějšímu uvolnění, které ale bylo spíše zapříčiněno termickým efektem, nikoliv vlivem kavitace.



Obrázek 16: Závislost luminiscence na teplotě, červené body značí ozvučení US; Vzorek obsahuje směs 10mM pufru (PBS) s liposomy, 50 mM luciferinu, 40 $\mu\text{g/ml}$ luciferázy a 5mM hořčíku; HFUS: $I = 1 \text{ W/cm}^2$, $f = 1 \text{ MHz}$



Obrázek 17: Kinetické měření luminiscenčního signálu při uvolňování ATP z liposomů (HSPC) po dobu 700 s; **Červeně:** křivka lipidu bez přidavku cholesterolu; **Modře:** křivka lipidu s přidavkem 30 % cholesterolu; **1)** ozvučení s pomocí HFUS ($f = 1 \text{ MHz}$, $I = 3 \text{ W/cm}^2$), **2)** ozvučení s pomocí LFUS ($f = 30 \text{ kHz}$, $I = 130 \text{ W/cm}^2$), **3)** kontrola s pomocí detergentu Triton X-100

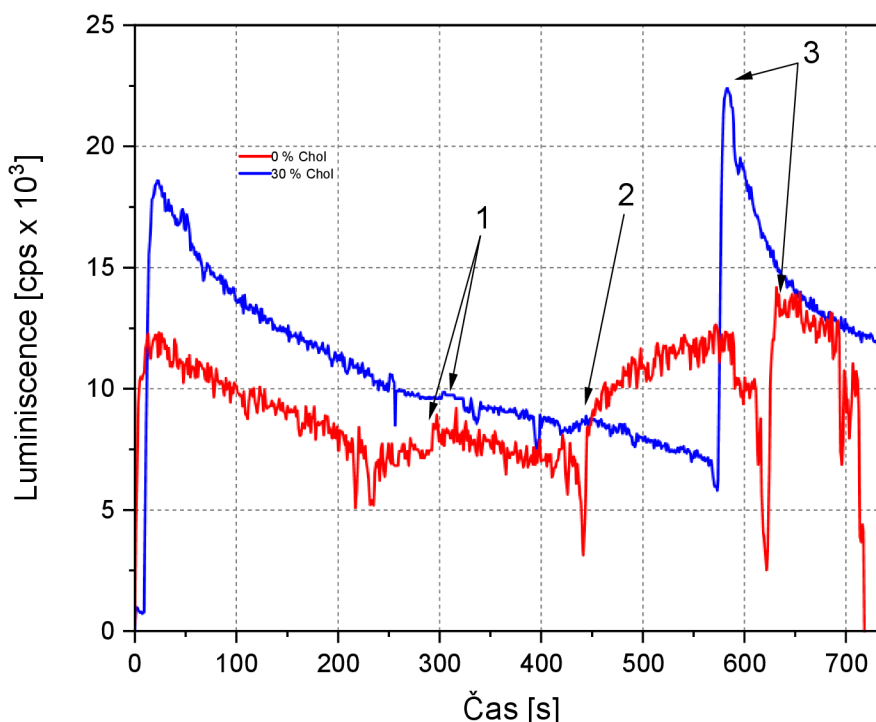
Oproti přechozímu grafu se na Obr. 17 vyskytuje několik změn. Kinetické křivky byly zhotoveny pro lipid HSPC jednak bez přidavku cholesterolu, ale také v 30% molární koncentraci. Současně k ozvučení oběma typy ultrazvuku došlo v rámci jediného měření kvůli časové optimalizaci. Signál je také zřetelně slabší, než tomu bylo u minulého grafu. Odůvodněním může být fakt, že purifikační metoda, s níž byl vzorek částečně očištěn od extravezikulární ATP, je značně hrubá. Je tudíž pravděpodobné, že koncentrace jednotlivých reagensů nejsou ve vzorcích zcela identické. Taktéž lze tímto vysvětlit přítomnost pozadí. Preciznější metodou by nepochybně byla např. dialýza, nicméně jednalo by se o zdlouhavý proces. Další variantu představuje ultracentrifugace (viz kapitola „Modulace intenzity US s pomocí odražeče v měřící komůrce“), která však podobně jako dialýza trvá při zpracování liposomů neúměrně dlouho.

Při ozvučení vzorků HFUS po uplynutí 200 s od počátku měření lze pozorovat zcela odlišnou odezvu liposomů obohacených o cholesterol proti vezikulám bez modifikace složení. Fluidita membrány byla přidavkem cholesterolu zjevně snížena vlivem stabilizace membrán, což odpovídá zjištěním ze starších studií, kde právě 30% molární koncentrace způsobuje konformační změnu ke stabilní fázi, kdy dochází ke

zmenšení objemu dvojvrstev. To konsektivně vede ke snížení permeability a teplotní senzitivity (Barenholz & Cevc, 1999; Mouritsen, 2005). V případě křivky pro 0% obsah cholesterolu došlo bezprostředně po ozvučení k nárůstu signálu o 21,2 % ($R=0,85$; $R^2=0,73$), zatímco u modifikovaných liposomů byl zaznamenán pouze malý peak představující pozitivní změnu detekované luminiscence o 6,2 % ($R=0,5$; $R^2=0,13$), jenž ihned poté následuje pravidelný pokles křivky. Byť v případě zmíněného peaku se může jednat také o pouhý artefakt.

Následné ozvučení prostřednictvím LFUS (400 s) se projevilo u obou vzorků v podobě nárůstu signálu. V případě nemodifikovaných liposomů došlo ke skokovému navýšení o 37 % ($R=0,75$; $R^2=0,56$), kdežto přídavek cholesterolu tento přírůstek omezil na 30 % ($R=0,76$; $R^2=0,57$). Kontrola v obou případech prokázala přítomnost dosud neuvolněného ATP i po dvojitým ozvučení. Zdá se, že HSPC představují perspektivnější volbu lipidu oproti DPPC, a to i navzdory vyšší T_t (52 °C). Můžeme tedy hovořit o působení kavitačního efektu.

Volba cholesterolu jako mebránového konstituentu spočívá v nutnosti stabilizace liposomů při uskladnění. I při pokojové teplotě dochází k jejich postupné degradaci a je proto nutné je uchovávat v chladničce nebo na ledě. Vzhledem k tomu, že prakticky všechny vzorky v této práci byly měřeny teprve až den po jejich přípravě, je vhodné je stabilizovat. K tomuto účelu slouží rozličné polymery (chitosan, pektin, alginát a další) a například také cholesterol (Pasarín et al., 2023). Jelikož liposomy bez cholesterolu tuto stabilizaci postrádají, lze poněkud nižší signál kontroly vysvětlit i tak, že vezikuly byly do jisté míry rozrušeny už před samotným měřením, což by však doprovázely vysoké hodnoty pozadí (z tohoto důvodu byly také vzorky před měřením ještě jednou očištěny od extravezikulární značky).

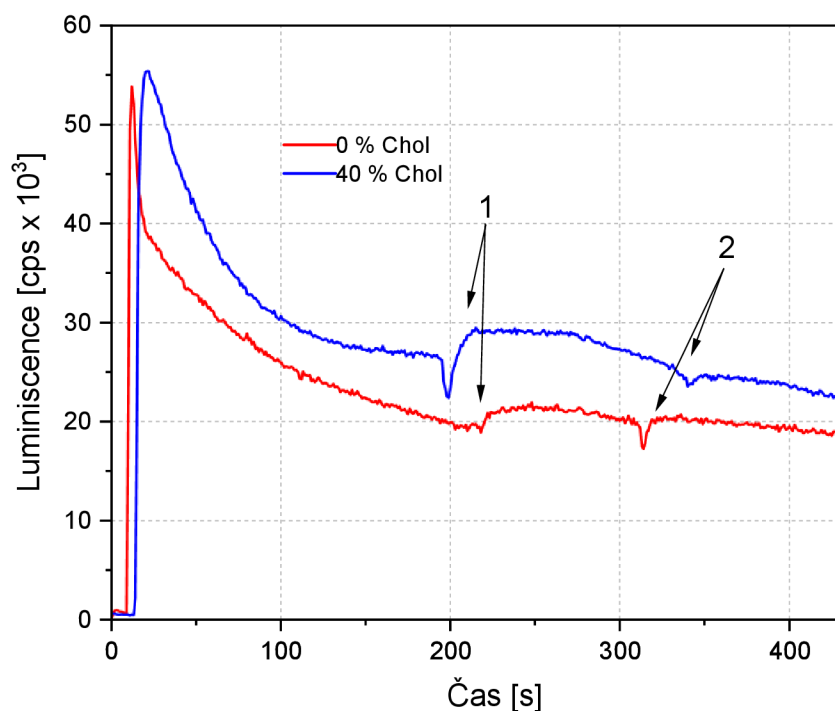


Obrázek 18: Kinetické měření luminiscenčního signálu při uvolňování ATP z liposomů (PC) po dobu 700 s; **Červeně:** křivka lipidu bez přídavku cholesterolu; **Modře:** křivka lipidu s přídavkem 30 % cholesterolu; **1)** ozvučení s pomocí HFUS ($f = 1$ MHz, $I = 3$ W/cm²), **2)** ozvučení s pomocí LFUS ($f = 30$ kHz, $I = 130$ W/cm²), **3)** kontrola s pomocí detergentu Triton X-100

Při ozvučení EggPC (PC) bylo dosaženo podobných výsledků (na Obr. 18) jako u HSPC. Inkorporovaný cholesterol jednak stabilizoval liposomy, čímž byla snížena membránová fluidita, ale také luminiscenční signál kontroly dosahuje vysokých hodnot. Opačná situace nastala u nestabilizovaných vzorků. Zde aplikací HFUS došlo k navýšení signálu o 15,7 % ($R=74$; $R^2=0,54$) s následným trendem poklesu. Posléze ozvučení LFUS vedlo k růstu signálu o 40 % ($R=0,79$; $R^2=0,63$). Kavitační efekt HFUS tedy nedosáhl úrovně LFUS, což je konzistentní jev, neboť ke kavitaci dochází spíše při nižších frekvencích. Ke stejnému zjištění přišel i Al Sawaftah s kolegy, kdy HFUS o $f=3$ MHz a $I=158$ W/cm² (*in vitro* zcela nerealistická/nepoužitelná úroveň vedoucí k mechanickému poškození tkání) vedl k uvolnění pouze 2,87 % enkapsulovaného kalceinu během celkových 200 min sonikačního ošetření. Nižší frekvence (1 MHz) a zároveň i intenzita (22,59 W/cm²) ukázaly až trojnásobný účinek, tedy eluce 6,39 % kalceinu (Al Sawaftah et al., 2022).

Přídavek 30 % cholesterolu opět snížil, nárůst signálu, ba dokonce prakticky eliminoval odezvu vezikul vůči HFUS, neboť signál pouze v jediném peaku vzrostl o 2,7 % ($R=0,52$; $R^2=0,23$) s následným sestupným průběhem křivky. Ozvučení LFUS způsobilo nárůst o 9,5 % ($R=0,81$; $R^2=0,67$).

4.2 Vliv koncentrace cholesterolu na sonosenzitivitu liposomů

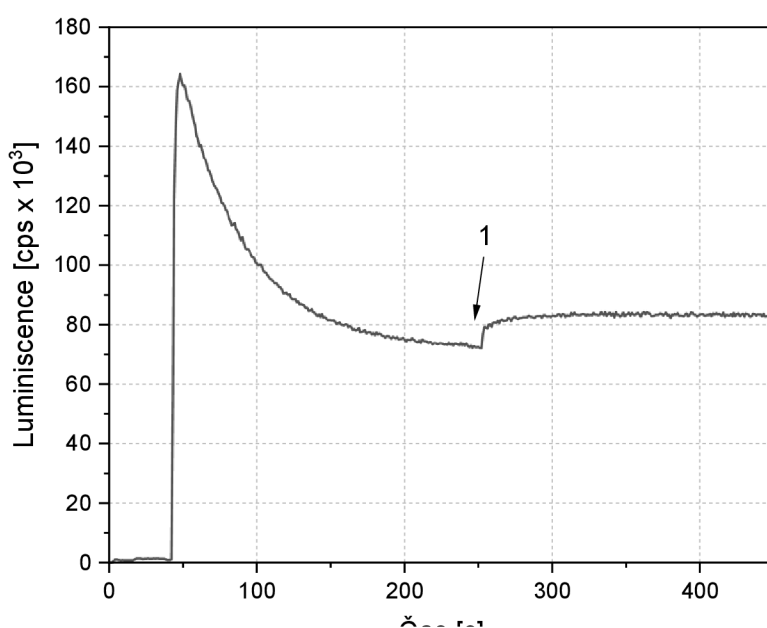


Obrázek 19: Kinetické měření luminiscenčního signálu při uvolňování ATP z liposomů (HSPC) po dobu 450 s; **Červeně:** křivka lipidu bez přídavku cholesterolu; **Modře:** křivka lipidu s přídavkem 40 % cholesterolu; **1)** ozvučení s pomocí HFUS ($f = 1 \text{ MHz}$, $I = 3 \text{ W/cm}^2$), **2)** kontrola s pomocí detergentu Triton X-100

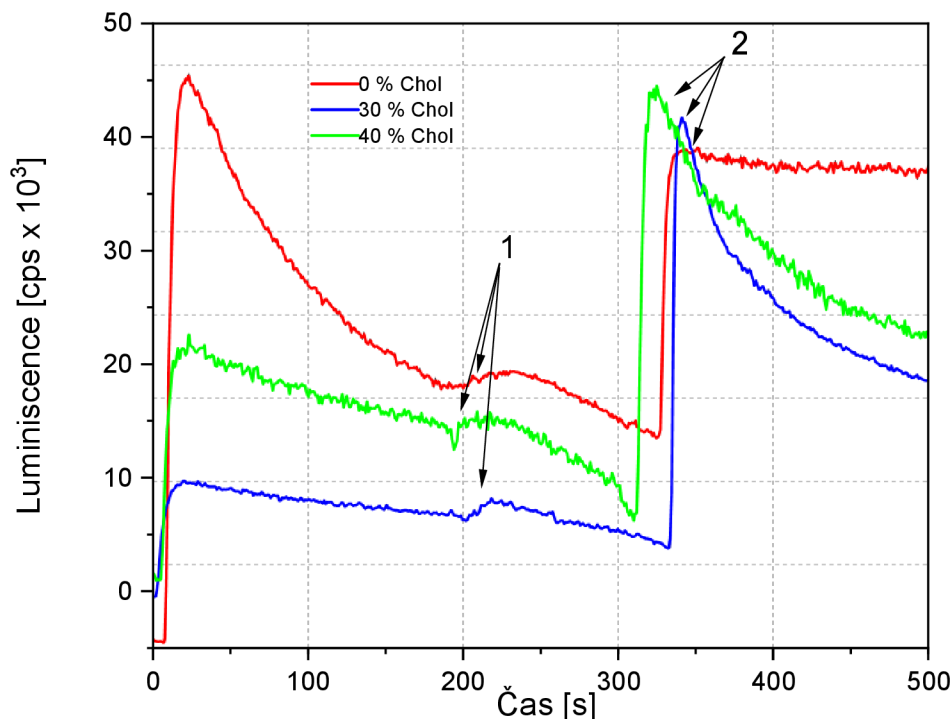
V další části práce je předmětem zájmu specificky vliv koncentrace cholesterolu inkorporovaného v lipidové membráně (Obr. 19), ačkoliv se tato tematika objevila již v minulé podkapitole. Lipid DPPC se ukázal jako nejméně senzitivní k ultrazvuku, a proto zde není uveden. Současně u HSPC chybí jedna křivka, a to z důvodu ztráty vzorku při sonikaci ve zkumavce (již nevyšel čas na opakování). Co se tedy tohoto lipidu týče, lze si povšimnout zajímavého jevu, a sice že při 40% molárním podílu cholesterolu došlo ke zvýšení fluidity membrán oproti ostatním vzorkům s nižším obsahem této látky, a to navzdory jeho stabilizační funkci. Schroeder a kolektiv uvádějí, že i obsah cholesterolu do 50 % stabilizuje membránu (Schroeder *et al.*, 2009), avšak výsledky uvedené na Obr. X naopak ukazují, že již 40 % vede k destabilizaci.

Následná kontrola (Obr. 20) se neprojevila nárůstem signálu (po provedení experimentu bylo také zvlášť provedeno měření alikvotu, kde se signál projevil jen mírným nárůstem). Je tedy možné, že enkapsulovaný ATP byl částečně z vezikul uvolněn před samotným měřením právě z důvodu nestabilního charakteru takto upravených liposomů. Za přítomnosti cholesterolu tedy došlo k nárůstu signálu o 10,6 % ($R=0,96$; $R^2=0,93$), zatímco v případě liposomů bez této úpravy se jednalo o 16 % ($R=0,81$; $R^2=0,65$). Efekt vysokých teplot lze vyloučit, neboť vzorky byly nově externě chlazeny vodou přímo ve vzorkové komůrce. Nebylo tak na druhou stranu dosaženo T_t , čímž utrpěla sonosenzitivita liposomů.

Opět se zde objevuje problém spočívající v konfliktu teplotního optima luciferázy a transientních teplot lipidů, což lze řešit buď navýšením intenzity US k dosažení kavitačního efektu, anebo navržením jiného detekčního mechanismu (viz kapitola „Měření fluorescenčního signálu při uvolnění kalceinu z liposomů“). Nejjednodušší postup by samozřejmě zahrnoval použití LFUS, neboť sonosenzitivita liposomů nejlépe odpovídá frekvencím s korespondující vlnovou délkou pohybující se řádově v oblasti rozměrů vezikul. Jestliže je liposom vystaven účinkům vlnění s větší λ než jsou rozměry vezikul, akustický tlak lze považovat za prakticky uniformní, což v důsledku znamená, že tlakový gradient je zanedbatelný (Pong et al., 2006).



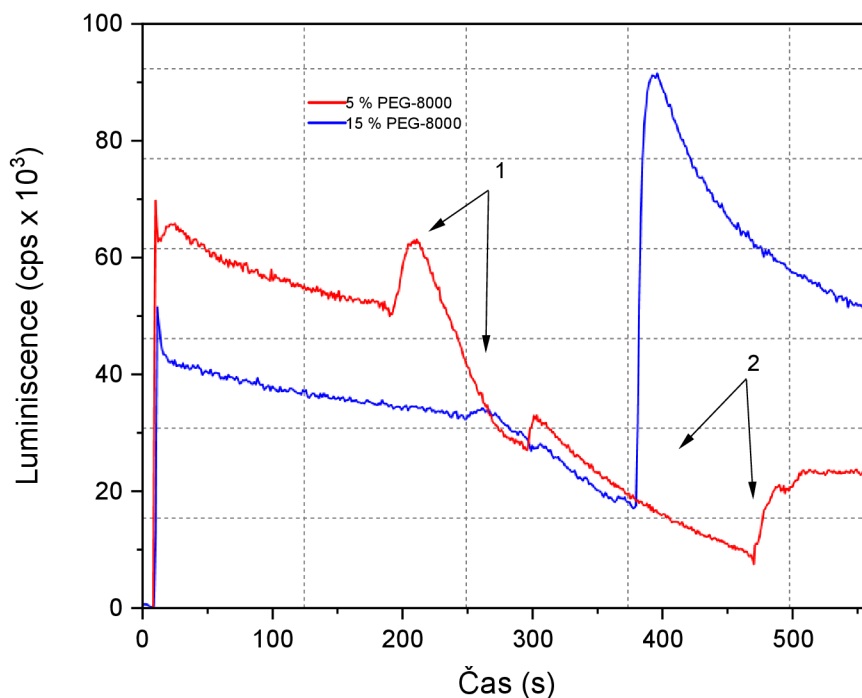
Obrázek 20: Kontrola s pomocí detergentu Triton X-100 (1)



Obrázek 21: Kinetické měření luminiscenčního signálu při uvolňování ATP z liposomů (PC) po dobu 500 s; **Červeně:** křivka lipidu bez přídavku cholesterolu; **Modře:** křivka lipidu s přídavkem 30 % cholesterolu; **Zeleně:** křivka lipidu s přídavkem 40 % cholesterolu; 1) ozvučení s pomocí HFUS ($f = 1$ MHz, $I=3$ W/cm²), 2) kontrola s pomocí detergentu Triton X-100

Na snímku výše (Obr. 21) je uvedena výsledná kinetická křivka pro EggPC bez obsahu cholesterolu, a následně také se 30% a 40% přídavkem. Dle očekávání byly nejvyšší hodnoty signálu naměřeny v rámci kinetické křivky nemodifikovaného lipidu, a to především v oblasti iniciálního pozadí (prvotní peak). Následuje křivka náležící PC modifikaci 40 % cholesterolu a na závěr 30 %. Nárůst signálu po ozvučení s pomocí HFUS dosáhl 6,8 % pro první zmíněnou křivku ($R=0,86$; $R^2=0,73$), pro 40 % cholesterolu pak 18,7 % ($R=0,71$; $R^2=0,46$) a pro 30 % cholesterolu dokonce relativní nárůst o 26 % ($R=0,95$; $R^2=0,92$). Poslední křivka nicméně vykazuje všeobecně nejnižší hodnoty signálu. Současně lze vyloučit teplotní inhibici, neboť při kontrole, respektive solubilizaci liposomů detergentem, signál skokově vzrostl u všech vzorků.

4.3 Vliv koncentrace PEG-8000 na sonosenzitivitu liposomů



Obrázek 22: Kinetické měření luminiscenčního signálu při uvolňování ATP z liposomů (PC) po dobu 550 s; **Červeně:** křivka lipidu s přidavkem 5 % PEG-8000 a 30 % cholesterolu; **Modře:** křivka lipidu s přidavkem 15 % PEG a 30 % cholesterolu; **1)** ozvučení s pomocí HFUS ($f = 1 \text{ MHz}$, $I = 3 \text{ W/cm}^2$), **2)** kontrola s pomocí detergentu Triton X-100

Další modifikací lipidových membrán, jejíž vliv na sonosenzitivitu byl patřičně prověřen, je takzvaná PEGylace. Na Obr. 22 lze pozorovat dvě křivky, z nichž jedna náleží EggPC modifikovanému s pomocí inkorporace PEG-8000 při procentuální molární koncentraci 5 %. Běžně se v praxi používá především PEG-2000 spolu s DSPE, jež jsou součástí formulace zvané ThermoDox[®] (Lyon et al., 2018). V teoretické rovině by PEG s větší molekulovou hmotností mohl při inkorporaci do membrány a následné hydrataci utvářet objemnější korunu kolem liposomů, což by mohlo zlepšit jejich interakci s US. Na druhou stranu se při extruzi ukázalo, že vzorky je velice obtížné protlačit přes polykarbonátové membrány. Naskytá se tak otázka, jaké množství použitého PEG-8000 bylo inkorporováno do lipidových membrán, pokud vůbec.

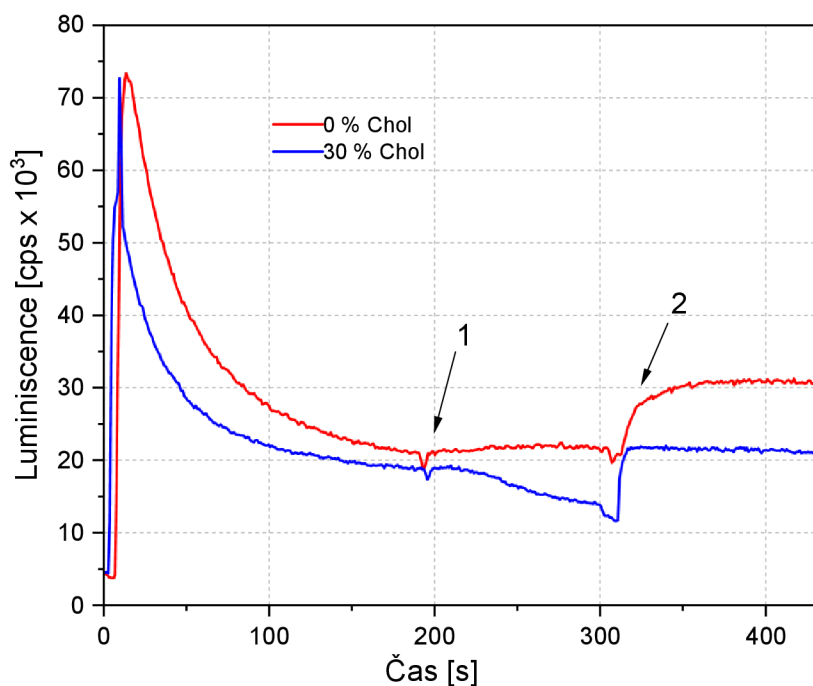
Tuto myšlenku podporuje i relativně nedávná komparativní studie PEGylovaných liposomů, kde byla stanovena molární procentuální koncentrace o hodnotě 2 % jako maximum, které lze extruzí připravit. Při větších koncentracích jsou vzorky již příliš viskózní a jejich průchod filtračními póry se stává obtížným. (Nakamura et al., 2012).

Tento problém lze nicméně obejít přidáním PEG až ke zformovaným vezikulám. Při nižších koncentracích dochází k osmotickému narušení stability membrány, což zlepšuje echogenní vlastnosti. Jsou-li však koncentrace až příliš vysoké, dochází k absorpci US hydratovanými molekulami PEG, což podstatně omezuje množství akustické energie působící na lamelární dvojvrstvu. Účinek US v tomto případě spoléhá spíše na vysoké teploty (Schroeder et al., 2009).

Výše zmíněné informace tak do značné míry vysvětlují naměřené výsledky na Obr. X. Kinetická křivka vzorku s obsahem 15 % PEG-8000 se vyznačuje dvěma malými peaky po ozvučení HFUS. Větší peak představuje relativní nárůst signálu o 6 % ($R=0,95$; $R^2=0,89$), menší peak pak 3,2 %. 15% koncentrace PEG již pravděpodobně negativně ovlivňuje interakci US s vezikulami.

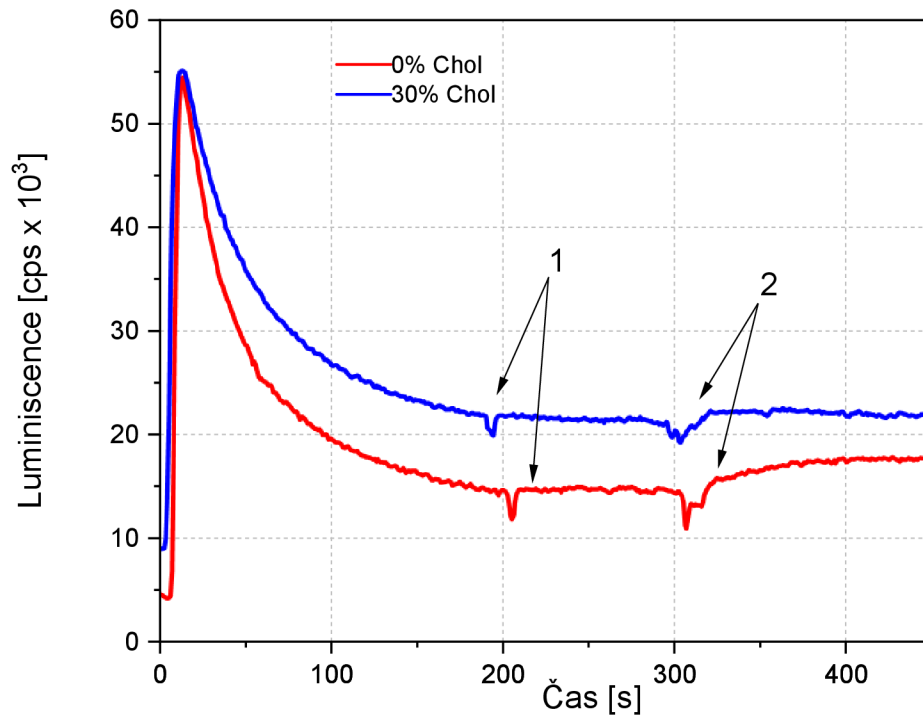
V případě menší příměsi PEG, tedy 5 %, nejprve došlo k relativnímu navýšení signálu v rámci velmi výrazného peaku o 26,4 % ($R=0,95$; $R^2=0,91$), a poté v peaku menším o 21,3 % ($R=0,94$; $R^2=0,87$). Existenci dvou odlišných peaků může objasnit agregace modifikovaných vezikul, k jejichž oddělení došlo teprve po sonikaci. Jelikož kontrola s pomocí detergentu nevedla k výraznému navýšení signálu, lze tvrdit, že došlo k nezanedbatelnému uvolnění enkapsulovaného ATP.

4.4 Modulace intenzity US s pomocí fokusace nástavce



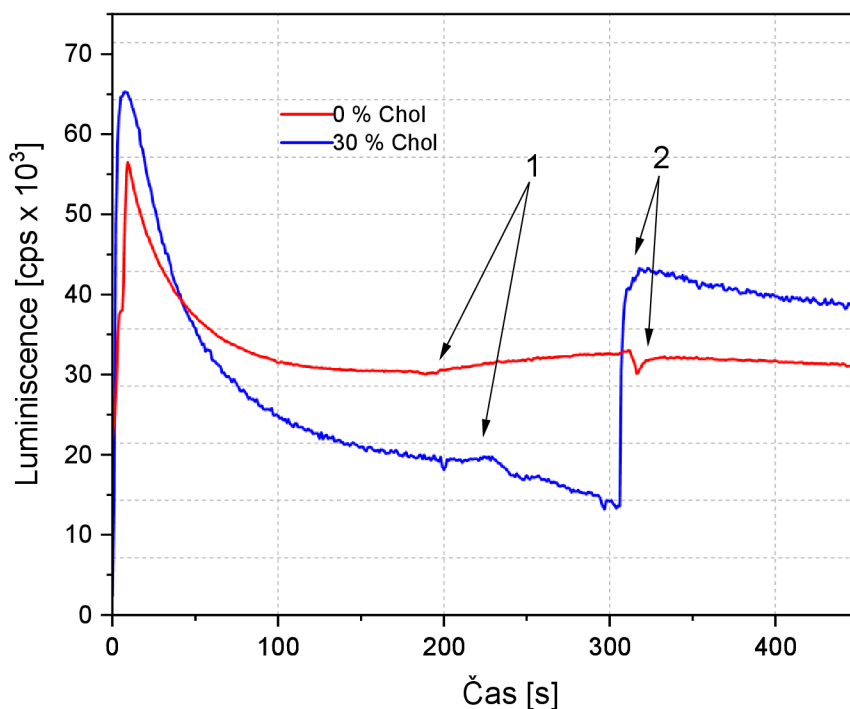
Obrázek 23: Kinetické měření luminiscenčního signálu při uvolňování ATP z liposomů (DPPC) po dobu 450 s; **Červeně:** křivka lipidu bez přidavku cholesterolu; **Modře:** křivka lipidu s přidavkem 30 % cholesterolu; **1)** ozvučení s pomocí HFUS ($f = 1$ MHz, $I = 30$ W/cm²-teoretická hodnota!), **2)** kontrola s pomocí detergentu Triton X-100

Následující tři grafy znázorňují měření luminiscence při fokusaci US s pomocí experimentálního nástavce připojeného k hlavici o ploše 1 cm². Obr. 23 znázorňuje kinetické křivky pro lipid DPPC bez cholesterolu a s 30% příměsí. Nástavec by teoreticky měl až desetkrát znásobit intenzitu US a vyvolat tak větší nárůst signálu prostřednictvím indukovaného kavitačního efektu. Jak lze ale vidět, ke kýženému efektu zjevně nedošlo. Možné vysvětlení spočívá pravděpodobně v konstrukci nástavce, jenž namísto fokusace spíše akustické vlny disipuje, neboť bylo dosaženo výsledků horších ve srovnání s měřeními bez nástavce. Křivka liposomů bez cholesterolu projevuje mírný nárůst signálu o 6,8 % ($R=0,88$; $R^2=0,78$). Nejedná se však o signifikantní údaj vzhledem k pozadí a následné kontrole. Křivka s přidavkem 30 % cholesterolu po ozvučení na chvíli vzrostla o pouhých 5 % ($R=0,71$; $R^2=0,46$) s následným prudkým poklesem. Výsledky jsou tedy obecně v souladu s očekávanými, co se srovnání stabilizovaných liposomů s nemodifikovanými týče.



Obrázek 24: Kinetické měření luminiscenčního signálu při uvolňování ATP z liposomů (HSPC) po dobu 450 s; **Červeně:** křivka lipidu bez přídavku cholesterolu; **Modře:** křivka lipidu s přídavkem 30 % cholesterolu; **1)** ozvučení s pomocí HFUS ($f = 1 \text{ MHz}$, $I = 20 \text{ W/cm}^2$ -teoretická hodnota!), **2)** kontrola s pomocí detergentu Triton X-100

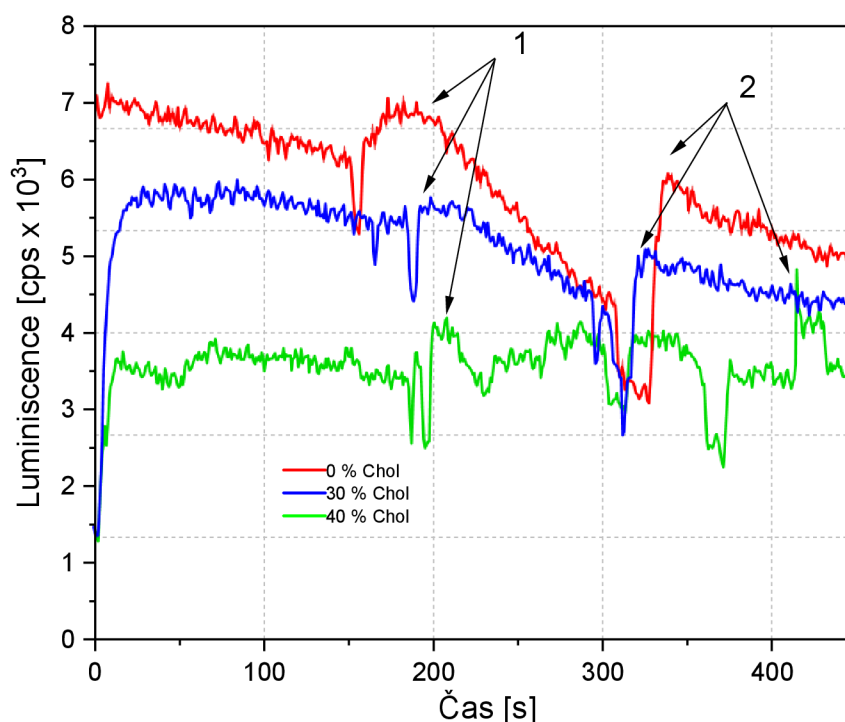
Na Obr. 24 jsou opět viditelné dvě křivky kinetického měření s nebo bez cholesterolu, přičemž v případě HSPC pravděpodobně došlo k uvolnění většiny ATP ještě před měřením. Na základě tohoto i předchozích měření s tímto lipidem si lze všimnout, že se oproti ostatním vzorkům vyznačuje zvýšenou nestabilitou (viditelné primárně u kontroly). U obou měření došlo k naprosto zanedbatelné změně signálu, jež nevypovídá o účinku US.



Obrázek 25: Kinetické měření luminiscenčního signálu při uvolňování ATP z liposomů (PC) po dobu 450 s; **Červeně:** křivka lipidu bez přídavku cholesterolu; **Modře:** křivka lipidu s přídavkem 30 % cholesterolu; **1)** ozvučení s pomocí HFUS ($f = 1$ MHz, $I = 30$ W/cm²-teoretická hodnota!), **2)** kontrola s pomocí detergentu Triton X-100

Fokusace US nevedla k výrazné eluci ani při ozvučení vzorků PC. (Obr 25). Neupravené liposomy se opět vyznačují svou nestabilitou, což lze názorně vidět díky vysokému pozadí, nízkému efektu US a také prakticky nulové odezvě při aplikaci kontroly. Bezprostředně po ozvučení došlo k téměř dokonale lineárnímu ($R=0,98$; $R^2=0,96$) relativnímu nárůstu signálu o 12 %. Druhá křivka poukazuje na již známý stabilizační efekt cholesterolu při 30% koncentraci. Signál byl působením US zvýšen pouze přechodně, tedy pokud vůbec (nárůst 1,5 % nelze považovat za průkazný), přičemž posléze opět lineárně klesl. Efekt stabilizace dokazuje především signál kontroly a nízká eluce. Vysoké pozadí pravděpodobně zapříčiňuje nedokonalé předchozí pročištění vzorku na kolonce. Současně nebylo dosaženo T_t , tudíž je omezena permeabilita vezikulární membrány.

4.5 Modulace intenzity US s pomocí odrážače v měřící komůrce



Obrázek 26: Kinetické měření luminiscenčního signálu při uvolňování ATP z liposomů (PC) po dobu 450 s; **Červeně:** křivka lipidu bez přídavku cholesterolu; **Modře:** křivka lipidu s přídavkem 30 % cholesterolu; **Zeleně:** křivka lipidu s přídavkem 40 % cholesterolu; **1)** ozvučení s pomocí HFUS ($f = 1$ MHz, $I = 6$ W/cm²-teoretická hodnota!), **2)** kontrola s pomocí detergentu Triton X-100

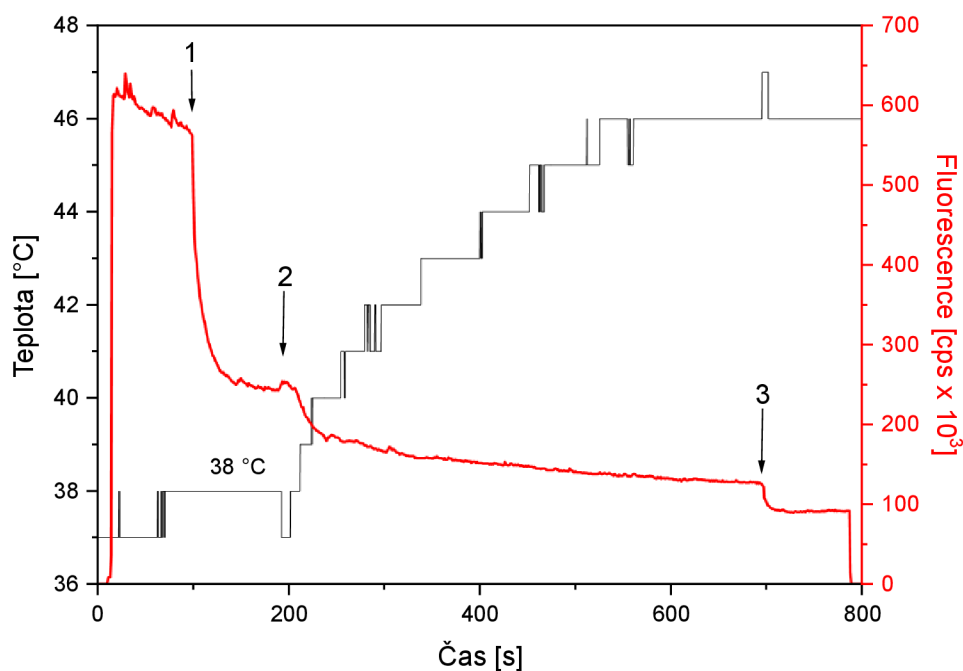
Jedním z dalších způsobů, jak lze modulovat intenzitu US působícího na vzorky v kyvetě umístěné v měřící komůrce, může teoreticky být reflexe akustického vlnění nazpět ke zdroji ozvučení, tedy US sondě s hlavicí. Podobného principu je hojně využíváno v oblasti sonografie. Odrazem vln, respektive jejich neabsorbovaného či nerozptýleného podílu, dojde k další interakci se vzorkem, čímž teoreticky dochází ke zdvojnásobení intenzity.

Co se týče výsledků znázorněných na Obr. 26, je nejprve nutné zmínit nezvykle nízké hodnoty luminiscenčního signálu a nevýraznost kontrolních peaků (tedy při aplikaci detergentu). Pro tuto sadu vzorků byla vyzkoušena odlišná purifikační metoda, konkrétně se jednalo o ultracentrifugaci s pomocí speciálních filtrů. Podařilo se tak do značné míry eliminovat signál pozadí, avšak jedná se o metodu poměrně časově náročnou.

Můžeme pozorovat mírné zvýšení luminiscenčního signálu díky zvýšení intenzity US, přičemž opět pozorujeme trend nižší eluce ze stabilizovaných liposomů obohacených 30% cholesterolem. Ozvučením tohoto vzorku s pomocí HFUS došlo k naprosto minimálnímu navýšení signálu o pouhých 2,7 %.

Naproti tomu ozvučením vzorku nestabilizovaných vezikul pomocí US došlo k relativnímu nárůstu signálu o 15,6 % ($R=0,86$; $R^2=0,72$) následovaném strmým poklesem. Na závěr opět platí, že přídavek 40% již vede k destabilizaci membrán a náhlému růstu luminiscence, v tomto případě o 13,5 % ($R=0,77$; $R^2=0,56$) v rámci prvního peaku, po němž následuje několik menších. Vzhledem k nízkému signálu kontroly lze usoudit, že značné množství enkapsulovaného ATP bylo eluováno z vezikul před provedením měření vlivem nestability. Je také poměrně pravděpodobné, že vlivem rapidního nárůstu teploty v kyvetě navzdory chlazení došlo k teplotní inhibici luciferázy.

4.6 Měření fluorescenčního signálu při uvolnění kalceinu z liposomů



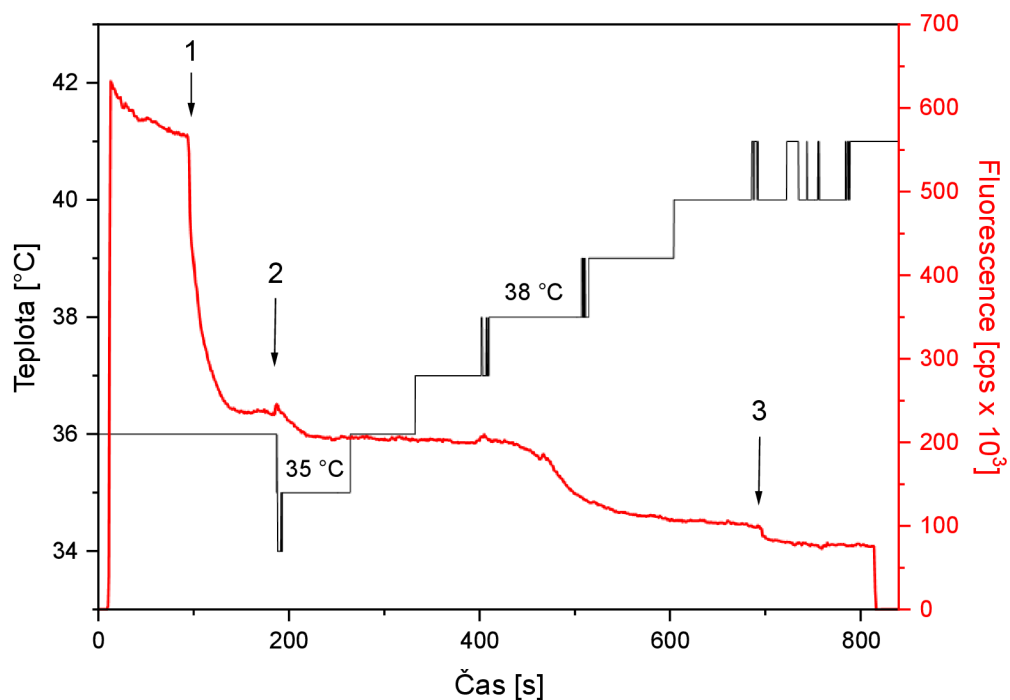
Obrázek 27: Červeně: Kinetická křivka fluorescenčního signálu při eluci kalceinu z liposomů (DPPC, 800 s); Černě: měření teploty; 1) aplikace zhasiče fluorescence (CoCl_2), 2) ozvučení s pomocí HFUS ($f = 1 \text{ MHz}$, $I = 10 \text{ W/cm}^2$), 3) kontrola prostřednictvím detergentu Triton X-100

Na základě předchozích provedených měření bylo zjištěno, že detekční systém na bázi luminiscenčního signálu produkovaného reakcí ATP a luciferinu je značně citlivý vůči teplotám. Sonosenzitivita liposomů dosahuje maxima při T_i , v důsledku čehož je ale nemožné přesně kvantifikovat uvolnění enkapsulované látky z důvodu inhibice enzymu. Dalším faktorem, jenž komplikuje přesné stanovení, je také povaha přípravných metod. Purifikace na sephadexových kolonách poskytuje vzorky s variabilními finálními koncentracemi liposomů, což také znemožňuje přesný výpočet množství enkapsulované látky. Dle specifikací uvedených v práci Huang & MacDonald (2004) byl tedy navržen experiment s využitím fluorescenčního značení, konkrétně kalceinu, jenž ve srovnání s luciferázou tolik nezávisí na teplotě.

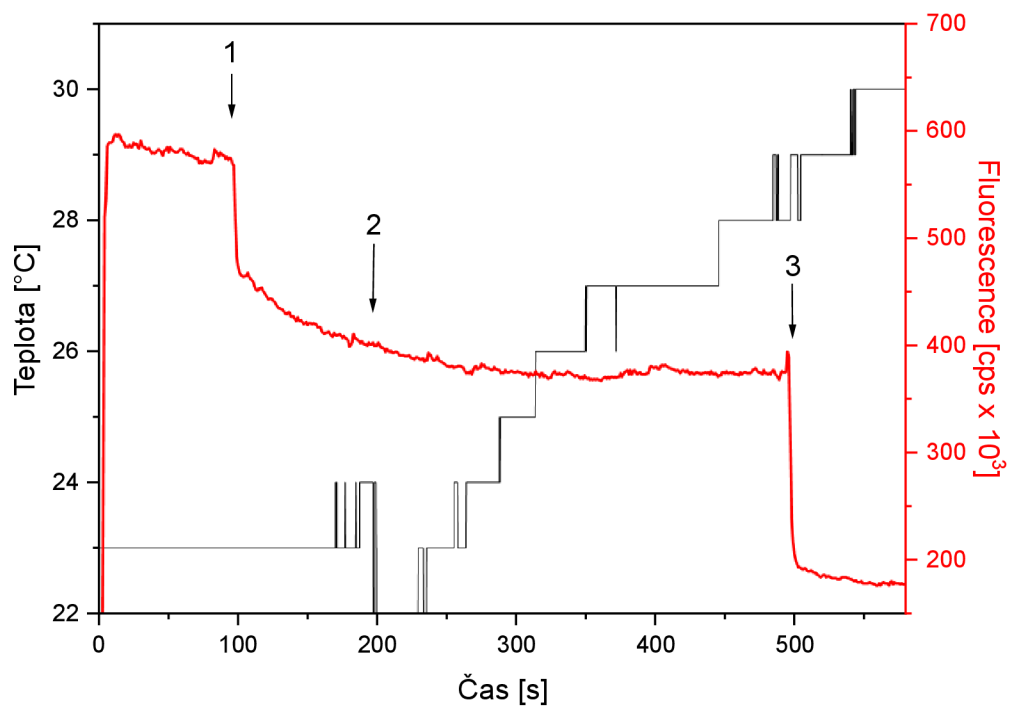
Na obrázcích 27-29 jsou vyobrazeny kinetické křivky fluorescenčního signálu při měření trvajícím 800 s. Signál pozadí se podařilo eliminovat přidávkem CoCl_2 jakožto zhasiče extravezikulární značky. Posléze byl aplikován HFUS o intenzitě 10 W/cm^2 (krátce zapůjčené zařízení), čímž došlo k eluci kalceinu enkapsulovaného v liposomech složených z DPPC.

Ve všech třech případech došlo k relativně zanedbatelné odezvě vůči působení US ve vztahu ke kontrole (navýšení signálu o 5 %), přičemž procentuální uvolnění kalceinu pro Obr. 27 činí 7,2 %, pro Obr. 28 pak 7,5 % a pro Obr. 29 na závěr pouze 4 %. Při teplotě 35 °C lze vidět, že liposomy byly částečně permeabilní, neboť se tato teplotě již postupně přibližuje hodnotě T_t . Při teplotě 38 °C, tedy blízko T_t je propustnost lépe pozorovatelná.

Na závěr byla provedena kontrola s pomocí detergentu Triton X-100. Tři grafy, na nichž jsou tyto výsledky vyznačeny, slouží jako ilustrační příklad důležitosti T_t vzhledem k permeabilitě vezikul, neboť ani s výkonnějším zdrojem US se nepodařilo navodit výrazný kavitační efekt, pokud liposomy nejsou vůči akustickým vlnám senzitivní. Pokud by v tomto experimentu byl použit např. PEGylovaný EggPC, pravděpodobně bychom dosáhli podstatně lepších výsledků (již bohužel na zbylé lipidy nevyšel čas). Další možnost představují také echogenní liposomy obsahující PFC (Lattin et al., 2012), které se ovšem vyznačují svou toxicitou. Ke zvýšení sonosenzitivity by mohly též přispět navázané biodegradabilní polymery, nicméně jejich inkorporace do membrán je komplikovaná.



Obrázek 28: Červeně: Kinetická křivka fluorescenčního signálu při eluci kalceinu z liposomů (DPPC, 800 s); Černě: měření teploty; 1) aplikace zhasěče fluorescence (CoCl₂), 2) ozvučení s pomocí HFUS ($f = 1$ MHz, $I = 10$ W/cm²), 3) kontrola prostřednictvím detergentu Triton X-100



Obrázek 29: Červeně: Kinetická křivka fluorescenčního signálu při eluci kalceinu z liposomů (DPPC, 800 s); Příklad 130 mM NaCl; Černě: měření teploty; 1) aplikace zhasěče fluorescence (CoCl₂), 2) ozvučení s pomocí HFUS ($f = 1$ MHz, $I = 10$ W/cm²), 3) kontrola prostřednictvím detergentu Triton X-100

5 ZÁVĚR

V rámci této práce byly ověřeny rozličné parametry ovlivňující působení vysokofrekvenčního a nízkofrekvenčního ultrazvuku na lipidové vezikuly o různém složení. Mimo jiné taktéž experimentálně proběhlo srovnání chemiluminiscenčního a fluorescenčního systému detekce signálu vzniklého uvolněním látek se zaměřením na účinky vysokofrekvenčního ultrazvukového vlnění. Liposomy, tedy nosiče enkapsulovaných látek, byly připraveny s pomocí tenkovrstevné hydratační metody a následně prostřednictvím extruze skrze sérii polykarbonátových membrán upraveny do konečné podoby, tedy unilamelárních vezikul o průměru 200 nm. Při volbě lipidů byly brány v potaz především hodnoty tranzitních teplot, aby nedosahovaly příliš nízkých ani vysokých hodnot.

Základní lipidové formulace, tedy čisté DPPC, EggPC a HSPC ve výsledné koncentraci 10 mg/ml, byly eventuálně v průběhu výrobního procesu modifikovány s cílem modulace sonosenzitivity. Prvotní úpravu představuje inkorporace cholesterolu v molárním poměru 30 a 40 %. Dle literatury by zmíněné koncentrace měly vyústit ve stabilizaci liposomů za současného poklesu jejich akustické senzitivity (Schroeder et al., 2009). Dále byly liposomy povrchově upraveny takzvanou PEGylací, jež vede k navýšení sonosenzitivity a termosenzitivity. Běžně se používají varianty s menší molekulární hmotností (např. PEG-2000). Jelikož jsou účinky PEG-2000 poměrně dobře popsány, namísto něj byl pro potřeby této práce zvolen PEG-8000, jehož inkorporace do lipidové dvojvrstvy se ukázala jako problematická z důvodu fyzicky obtížné extruze.

Neupravené i modifikované lipidy byly následně purifikovány s pomocí sephadexových kolonek jejich nanesením a centrifugací, čímž byla odstraněna extravezikulární značka. Posléze proběhlo kinetické měření uvolňování enkapsulovaných látek na spektrometru FLS980 s experimentálním přídavným modulem pro umístění kyvet se vzorky a ultrazvukové hlavice. Metodika detekce spočívá ve dvou odlišných principech. Zprvu byl k enkapsulaci zvolen ATP, jehož elucí dojde k reakci s luciferinem při katalýze zprostředkované enzymem luciferázou. Ta vyvolá oxidaci luciferinu za tvorby luminiscenčního signálu. Jako kontrola byl zvolen detergent Triton X-100.

Na základě provedených experimentů bylo zjištěno, že působením ultrazvuku dochází v nechlazených kyvetách ke značnému nárůstu teploty vedoucímu k termické inhibici luciferázy, což samozřejmě znemožňuje detekci signálu. Vzniká tedy jisté dilema, kdy při teplotách nižších lipidy nedosahují své tranzitní teploty vyznačující se právě

nejvyšší sonosenzitivitou. Na druhou stranu, jak již bylo řečeno, vysoké teploty vedou k inhibici enzymu. Při srovnání efektu nízkofrekvenčního a vysokofrekvenčního ultrazvuku lze vyvodit závěr, že nižší frekvence zpravidla vedly k lepšímu účinku na liposomy, neboť došlo k indukci kavitace. Toto tvrzení se shoduje s literaturou (Al Sawafrah et al., 2022). Vzhledem k nižší intenzitě potřebné k eluci ATP byl pozorován i vyšší signál., a to především u EggPC a HSPC. DPPC se prokázal jako nejméně sonosenzitivní lipid. Je však potřeba říci, že akustická intenzita 130 W/cm^2 je již poměrně extrémní a v klinické praxi nepoužitelná, neboť při aplikaci by US s těmito parametry způsobil poškození tkání.

Jako další poznatek lze uvést faktor molárního podílu cholesterolu a jeho vliv na echogenitu vezikul. V rozporu s literaturou (Schroeder et al., 2009) bylo zjištěno, že při 40% podílu cholesterolu v lipidové membráně dochází k její destabilizaci, zatímco 30% podíl již v souladu s uvedenou studií naopak vezikuly stabilizuje a snižuje jejich echogenitu, což je jev konzistentní v průběhu celé této práce. Prověřen byl také efekt PEGylace u EggPC (na základě naměřených výsledků nejperspektivnější lipid, byť spolu s HSPC bez přídavku cholesterolu poněkud nestabilní při skladování). Zde byly potvrzena zjištění z již publikované literatury (Schroeder et al., 2009; Nakamura et al., 2012). Nízký molární podíl PEG způsobil výrazné zvýšení sonosenzitivity. Naopak podíl vyšší echogenitu snížil.

Postupně došlo k optimalizaci experimentu s pomocí vodního chlazení květ se vzorky, což omezilo termický efekt ultrazvuku a zároveň i inhibici luciferázy. Zde se však opět vyskytly komplikace v podobě jednak nedostatečně vysokých teplot k permeabilizaci membrán, respektive teploty tranzitní, a také nedostatečné intenzity vysokofrekvenčního ultrazvuku k dostačující indukci mechanické kavitace liposomů.

Vysokofrekvenční ultrazvukový generátor použitý v rámci této práce je komerčně dostupný, terapeutický model, jenž neumožňuje nastavení vysokých intenzit (maximum 2 W/cm^2), které by dokázaly vyvinout patřičný akustický tlak k rozrušení i slabě echogenních lipidových vezikul.

Další strategie postupu by tedy měly zahrnovat jednak zvýšení akustické senzitivity liposomů, ale také optimálně použití výkonnějšího zařízení, případně modulovat mechanické vlnění generované zařízením stávajícím. Pokusy o fokusaci s pomocí nástavce skončily neúspěšně, proto byl do měřicí komůrky umístěn kovový odrazec, jenž by teoreticky měl navýšit celkovou intenzitu vlnění. Zde skutečně došlo k navýšení

luminiscenčního signálu, avšak spolu s teplotami, které opět mohly způsobit inhibici luciferázy.

Z tohoto důvodu v samém závěru práce proběhly experimenty inspirované již poněkud starší studií (Huang & MacDonald, 2004), kde jako detekční značka slouží kalcein produkující fluorescenční signál nezávislý na teplotě. S pomocí zhasěče CoCl_2 bylo taktéž eliminováno pozadí vzniklé nedokonalou purifikací vzorků na kolonách. Ačkoliv v tomto případě došlo ke spolehlivé detekci signálu, s jehož pomocí bylo možné kvantifikovat i podíl eluce enkapsulovaného kalceinu, stále přetrvává potíž se sonosenzitivitou liposomů, které nerozrušil ani výkonnější, tentokrát průmyslový zdroj ultrazvuku (10 W/cm^2), jenž je však v ČR poněkud složité získat (alespoň tedy za rozumnou cenu).

Do budoucna by tedy bylo vhodné buď aplikovat současné poznatky z této oblasti, tedy eLiposomy s obsahem perfluorokarbonů (Lattin et al., 2012), lysolipidů (Moon et al., 2022), anebo spoléhat na směsi lipidů s konjugovaným PEG (Lyon et al., 2018; Kim et al., 2022). Co se detekce uvolňování látek týče, luminiscenční postup sice poskytuje zpravidla silnější signál, nicméně je nutné jej uplatnit při nižších teplotách v oblasti optima aktivity specifického enzymu ($25 \text{ }^\circ\text{C}$), což neodpovídá fyziologickým podmínkám a současně je tak nutné znovu odkázat na aspekt sonosenzitivity liposomů pod hodnotou tranzitní teploty.

6 REFERENCE

6.1 Literatura

- Abbasi, H., Kouchak, M., Mirveis, Z., Hajipour, F., Khodarahmi, M., Rahbar, N., & Handali, S. (2023). What We Need to Know about Liposomes as Drug Nanocarriers: An Updated Review. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 13(1), 7–23. <https://doi.org/10.34172/apb.2023.009>.
- Adepu, S., & Ramakrishna, S. (2021). Controlled drug delivery systems: Current status and future directions. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules26195905>.
- Ahmadi, A., Hosseini-Nami, S., Abed, Z., Beik, J., Aranda-Lara, L., Samadian, H., Morales-Avila, E., Jaymand, M., & Shakeri-Zadeh, A. (2020). Recent advances in ultrasound-triggered drug delivery through lipid-based nanomaterials. *Drug Discovery Today*, 25(12), 2182–2200. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2020.09.026>.
- Alavi, M., Karimi, N., & Safaei, M. (2017). Advanced Pharmaceutical Bulletin Application of Various Types of Liposomes in Drug Delivery Systems. *Adv Pharm Bull*, 7(1), 3–9. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.002>.
- Allen, T. M., Hansen, C. B., & Lopes De Menezes, D. E. (1995). Pharmacokinetics of long-circulating liposomes. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 16).
- Allen, T. M., Hansen, C., & Rutledge, J. (1989). Liposomes with prolonged circulation times: factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 981(1), 27–35. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(89\)90078-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(89)90078-3).
- Allen, T. M., Newman, M. S., Woodle, M. C., Mayhew, E., & Uster, P. S. (1995). Pharmacokinetics and anti-tumor activity of vincristine encapsulated in sterically stabilized liposomes. *International journal of cancer*, 62(2), 199–204. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910620215>.
- AlSawaftah, N. M., Awad, N. S., Paul, V., Kawak, P. S., Al-Sayah, M. H., & Hussein, G. A. (2021). Transferrin-modified liposomes triggered with ultrasound to treat HeLa cells. *Scientific reports*, 11(1), 11589. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90349-6>.
- AlSawaftah, N. M., Paul, V., Awad, N. S., & Hussein, G. A. (2022). Effect of High-Frequency Ultrasound on Targeted Liposomes. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 18(7), 1793–1804. <https://doi.org/10.1166/jbn.2022.3396>.
- AlSawaftah, N. M., Paul, V., Kosaji, D., Khabbaz, L., Awad, N. S., & Hussein, G. A. (2022). Ultrasound-sensitive cRGD-modified liposomes as a novel drug delivery system. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 50(1), 111–120. <https://doi.org/10.1080/21691401.2022.2074439>.
- Amstad, E., Kohlbrecher, J., Müller, E., Schweizer, T., Textor, M., & Reimhult, E. (2011). Triggered release from liposomes through magnetic actuation of iron oxide nanoparticle containing membranes. *Nano Letters*, 11(4), 1664–1670. <https://doi.org/10.1021/nl2001499>.
- Arias-Alpizar, G., Kong, L., Vlieg, R. C., Rabe, A., Papadopoulou, P., Meijer, M. S., Bonnet, S., Vogel, S., van Noort, J., Kros, A., & Campbell, F. (2020). Light-triggered switching of liposome surface charge directs delivery of membrane impermeable payloads in vivo. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17360-9>.
- Bai, L., Deng, S., Reboulet, R., Mathew, R., Teyton, L., Savage, P. B., & Bendelac, A. (2013). Natural killer T (NKT)-B-cell interactions promote prolonged antibody responses and long-term memory to pneumococcal capsular polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(40), 16097–16102. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303218110>.

- Bandak, S., Goren, D., Horowitz, A., Tzemach, D., & Gabizon, A. (1999). Pharmacological studies of cisplatin encapsulated in long-circulating liposomes in mouse tumor models. *Anti-cancer drugs*, 10(10), 911–920. <https://doi.org/10.1097/00001813-199911000-00007>.
- Bangham, A. D., & Home, R. W. (1964). Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology*, 8(5), 660-1N10. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(64\)80115-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(64)80115-7)
- Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of molecular biology*, 13(1), 238–252. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(65)80093-6).
- Bangham, A. D., Standish, M. M., Watkins, J. C., & Weissmann, G. (1967). The diffusion of ions from a phospholipid model membrane system. *Protoplasma*, 63(1), 183–187.
- Barenholz, Y. (2012). Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 160, Issue 2, pp. 117–134). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>.
- Barenholz, Y., & Cevc, G. (1999). Structure and properties of membranes. In *Physical chemistry of biological interfaces* (pp. 183-254). CRC Press.
- Benalcazar, W. A. (2012). *Phase transitions in lipid bilayers*.
- Bi, H., Xue, J., Jiang, H., Gao, S., Yang, D., Fang, Y., & Shi, K. (2019). Current developments in drug delivery with thermosensitive liposomes. In *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 14, Issue 4, pp. 365–379). Shenyang Pharmaceutical University. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2018.07.006>.
- Blasiak, B., van Veggel, F. C. J. M., & Tomanek, B. (2013). Applications of nanoparticles for MRI cancer diagnosis and therapy. In *Journal of Nanomaterials* (Vol. 2013). <https://doi.org/10.1155/2013/148578>.
- Bozzuto, G., & Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. In *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 10, pp. 975–999). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>.
- Buchelnikov, V. D., & Vasilev, A. N. (1992). *Electromagnetic generation of ultrasound in ferromagnets*.
- Cao, Y., Dong, X., & Chen, X. (2022). Polymer-Modified Liposomes for Drug Delivery: From Fundamentals to Applications. In *Pharmaceutics* (Vol. 14, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040778>.
- Craig, D. Q. M., Taylor, K. M. G., & Barker, S. A. (1990). Calorimetric Investigations of Liposome Formation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 42(Supplement_1), 29P-29P. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1990.tb14402.x>
- Davies, S. J., Edward, C., Taylor, G. S., & Palmers, S. B. (1993). Laser-generated ultrasound: its properties, mechanisms and multifarious applications. In *J. Phys. D Appl. Phys* (Vol. 26).
- de Matos, M. B. C., Deckers, R., van Elburg, B., Lajoinie, G., de Miranda, B. S., Versluis, M., Schiffelers, R., & Kok, R. J. (2019). Ultrasound-Sensitive Liposomes for Triggered Macromolecular Drug Delivery: Formulation and *In Vitro* Characterization. *Frontiers in pharmacology*, 10, 1463. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01463>.
- Dou, Y., Hynynen, K., & Allen, C. (2017). To heat or not to heat: Challenges with clinical translation of thermosensitive liposomes. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 249, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.01.025>.
- Dymek, M., & Sikora, E. (2022). Liposomes as biocompatible and smart delivery systems – the current state. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 309). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102757>.
- Edwards, K. A., & Baeumner, A. J. (2006). Analysis of liposomes. In *Talanta* (Vol. 68, Issue 5, pp. 1432–1441). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.08.031>.
- Elsayed, M. M., Abdallah, O. Y., Naggar, V. F., & Khalafallah, N. M. (2007). Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. *International journal of pharmaceutics*, 332(1-2), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.12.005>.

- Entzian, K., & Aigner, A. (2021). Drug delivery by ultrasound-responsive nanocarriers for cancer treatment. In *Pharmaceutics* (Vol. 13, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081135>
- Ezike, T. C., Okpala, U. S., Onoja, U. L., Nwike, C. P., Ezeako, E. C., Okpara, O. J., Okoroafor, C. C., Eze, S. C., Kalu, O. L., Odoh, E. C., Nwadike, U. G., Ogbodo, J. O., Umeh, B. U., Ossai, E. C., & Nwanguma, B. C. (2023). Advances in drug delivery systems, challenges and future directions. *Heliyon*, 9(6), e17488. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2023.E17488>.
- Faller, R. (2024). *UCD BIOPHYSICS 241: MEMBRANE BIOLOGY*. <https://LibreTexts.org>.
- Fellnerová, I. (2022). *Imunologie pro biology (První vydání)*. Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN: 978-80-244-3775-0.
- Filipczak, N., Pan, J., Yalamarty, S. S. K., & Torchilin, V. P. (2020). Recent advancements in liposome technology. *Advanced drug delivery reviews*, 156, 4–22. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.022>.
- Franco, M. S., Gomes, E. R., Roque, M. C., & Oliveira, M. C. (2021). Triggered Drug Release From Liposomes: Exploiting the Outer and Inner Tumor Environment. *Frontiers in Oncology*, 11, 470. <https://doi.org/10.3389/FONC.2021.623760/BIBTEX>.
- Franková, J., Modrianský, M., & Vrba, J. (2014). *Základy lékařské chemie pro studenty všeobecného lékařství (První vydání)*. Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN: 978-80-244-4085-9.
- Gaber, M. H., Wu, N. Z., Hong, K., Huang, S. K., Dewhirst, M. W., & Papahadjopoulos, D. (1996). Thermosensitive liposomes: extravasation and release of contents in tumor microvascular networks. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 36(5), 1177–1187. [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(96\)00389-6](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(96)00389-6).
- Ghosh, S., Carter, K. A., & Lovell, J. F. (2019). Liposomal formulations of photosensitizers. *Biomaterials*, 218, 119341. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119341>.
- Gregoriadis G. (1976). The carrier potential of liposomes in biology and medicine (first of two parts). *The New England journal of medicine*, 295(13), 704–710. <https://doi.org/10.1056/NEJM197609232951305>.
- Gregoriadis G. (1976). The carrier potential of liposomes in biology and medicine (second of two parts). *The New England journal of medicine*, 295(14), 765–770. <https://doi.org/10.1056/NEJM197609302951406>
- Gregoriadis, G., Leathwood, P. D., & Ryman, B. E. (1971). Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Letters*, 14(2), 95–99. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(71\)80109-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(71)80109-6).
- Guimarães, D., Cavaco-Paulo, A., & Nogueira, E. (2021). Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 601, 120571. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2021.120571>.
- Gunaseelan, S., Gunaseelan, K., Deshmukh, M., Zhang, X., & Sinko, P. J. (2010). Surface modifications of nanocarriers for effective intracellular delivery of anti-HIV drugs. *Advanced drug delivery reviews*, 62(4-5), 518–531. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.021>.
- Guo, H., Chen, W., Sun, X., Liu, Y. N., Li, J., & Wang, J. (2015). Theranostic magnetoliposomes coated by carboxymethyl dextran with controlled release by low-frequency alternating magnetic field. *Carbohydrate polymers*, 118, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.076>.
- Gutman M. (1984). The pH jump: probing of macromolecules and solutions by a laser-induced, ultrashort proton pulse--theory and applications in biochemistry. *Methods of biochemical analysis*, 30, 1–103. <https://doi.org/10.1002/9780470110515.ch1>.
- Hope, M. J., Bally, M. B., Webb, G., & Cullis, P. R. (1985). Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 812(1), 55–65.
- Huang, S. L. (2008). Liposomes in ultrasonic drug and gene delivery. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 60, Issue 10, pp. 1167–1176). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.003>.

- Huang, S. L., & MacDonald, R. C. (2004). Acoustically active liposomes for drug encapsulation and ultrasound-triggered release. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1665(1–2), 134–141. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2004.07.003>.
- Chasteen, J. L., Padilla-Coley, S., Li, D. H., & Smith, B. D. (2023). Palladium responsive liposomes for triggered release of aqueous contents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 84, 129215. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2023.129215>.
- Chen, P. C., Mwakwari, S. C., & Oyelere, A. K. (2008). Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing. *Nanotechnology, science and applications*, 1, 45–65. <https://doi.org/10.2147/nsa.s3707>.
- Chen, W., Yan, W., & Huang, L. (2008). A simple but effective cancer vaccine consisting of an antigen and a cationic lipid. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 57(4), 517–530. <https://doi.org/10.1007/s00262-007-0390-4>.
- Izadifar, Z., Babyn, P., & Chapman, D. (2017). Mechanical and Biological Effects of Ultrasound: A Review of Present Knowledge. In *Ultrasound in Medicine and Biology* (Vol. 43, Issue 6, pp. 1085–1104). Elsevier USA. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2017.01.023>.
- Jahn, A., Vreeland, W. N., Gaitan, M., & Locascio, L. E. (2004). Controlled Vesicle Self-Assembly in Microfluidic Channels with Hydrodynamic Focusing. *Journal of the American Chemical Society*, 126(9), 2674–2675. <https://doi.org/10.1021/ja0318030>.
- Jiang, Q., Yue, D., Nie, Y., Xu, X., He, Y., Zhang, S., Wagner, E., & Gu, Z. (2016). Specially-Made Lipid-Based Assemblies for Improving Transmembrane Gene Delivery: Comparison of Basic Amino Acid Residue Rich Periphery. *Molecular pharmaceutics*, 13(6), 1809–1821. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00967>.
- Kamboj, S., Saini, V., Magon, N., Bala, S., & Jhawat, V. (2013). Vesicular drug delivery systems: A novel approach for drug targeting. In *International Journal of Drug Delivery* (Vol. 5). <http://www.arjournals.org/index.php/ijdd/index>.
- Khan, Masood & Aljarbou, Ahmed & Aldebasi, Yousef. (2014). Activation of natural killer T cells by liposomal glycosphingolipids increases the efficacy of liposomal doxorubicin against DMBA-induced tumors in mice (VAC10P. 968).
- Kim, J. S. (2016). Liposomal drug delivery system. In *Journal of Pharmaceutical Investigation* (Vol. 46, Issue 4, pp. 387–392). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s40005-016-0260-1>.
- Kim, Y. S., Ko, M. J., Moon, H., Sim, W., Cho, A. S., Gil, G., & Kim, H. R. (2022). Ultrasound-Responsive Liposomes for Targeted Drug Delivery Combined with Focused Ultrasound. *Pharmaceutics*, 14(7), 1314. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071314>.
- Kimelberg, H. K., Tracy Jr, T. F., Biddlecome, S. M., & Bourke, R. S. (1976). The effect of entrapment in liposomes on the in vivo distribution of [3H] methotrexate in a primate. *Cancer research*, 36(8), 2949-2957.
- Klibanov, A. L., Maruyama, K., Torchilin, V. P., & Huang, L. (1990). Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS letters*, 268(1), 235–237. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81016-h](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81016-h).
- Kossoff, G. (2000). Basic physics and imaging characteristics of ultrasound. In *World Journal of Surgery* (Vol. 24, Issue 2, pp. 134–142). <https://doi.org/10.1007/s002689910026>.
- Kotouček, J., Hubatka, F., Mašek, J., Kulich, P., Velínská, K., Bezděková, J., Fojtíková, M., Bartheldyová, E., Tomečková, A., Stráská, J., Hřebík, D., Macaulay, S., Kratochvílová, I., Raška, M., & Turánek, J. (2020). Preparation of nanoliposomes by microfluidic mixing in herring-bone channel and the role of membrane fluidity in liposomes formation. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62500-2>.
- Kume, Y., Maeda, F., Harashima, H., & Kiwada, H. (1991). Saturable, non-Michaelis-Menten uptake of liposomes by the reticuloendothelial system. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 43(3), 162–166. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1991.tb06658.x>.
- L. Tu, Z. Liao, Z. Luo, Y.-L. Wu, A. Herrmann, S. Huo, *Exploration* 2021, 1, 20210023. <https://doi.org/10.1002/EXP.20210023>.

- Laffleur, F., & Keckeis, V. (2020). Advances in drug delivery systems: Work in progress still needed?. *International journal of pharmaceutics*, 590, 119912. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119912>.
- Lamparelli, E. P., Ciardulli, M. C., Scala, P., Scognamiglio, M., Charlier, B., di Pietro, P., Izzo, V., Vecchione, C., Maffulli, N., & della Porta, G. (2022). Lipid nano-vesicles for thyroid hormone encapsulation: A comparison between different fabrication technologies, drug loading, and an in vitro delivery to human tendon stem/progenitor cells in 2D and 3D culture. *International Journal of Pharmaceutics*, 624. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2022.122007>.
- Large, D. E., Abdelmessih, R. G., Fink, E. A., & Auguste, D. T. (2021). Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. *Advanced drug delivery reviews*, 176, 113851. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113851>.
- Lasic, D. D., & Barenholz, Y. (1996). *Handbook of Nonmedical Applications of Liposomes From Gene Delivery and Diagnostics to Ecology*.
- Lattin, J. R., Belnap, D. M., & Pitt, W. G. (2012). Formation of eLiposomes as a drug delivery vehicle. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 89(1), 93–100. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2011.08.030>.
- Lázaro-Ibáñez, E., Al-Jamal, K. T., Dekker, N., Faruqu, F. N., Saleh, A. F., Silva, A. M., Wang, J. T. W., & Rak, J. (2021). Selection of fluorescent, bioluminescent, and radioactive tracers to accurately reflect extracellular vesicle biodistribution in vivo. *ACS Nano*, 15(2), 3212–3227. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c09873>.
- Lee, H., Moon, H., & Kim, H. R. (2022). Effects of Lipid Shape and Interactions on the Conformation, Dynamics, and Curvature of Ultrasound-Responsive Liposomes. *Pharmaceutics*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071512>.
- Leighton, T. G. (2007). What is ultrasound? In *Progress in Biophysics and Molecular Biology* (Vol. 93, Issues 1–3, pp. 3–83). <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.026>.
- Lem, O., Gangurde, P., Keskinen, A., Efimov, A., & Durandin, N. (2023). Far-red light-triggered cargo release from liposomes bound to a photosensitizer-cellulose nanofiber hydrogel. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2023-8vnmw>.
- Li, J., Ma, Y., Zhang, T., Shung, K. K., & Zhu, B. (2022). Recent Advancements in Ultrasound Transducer: From Material Strategies to Biomedical Applications. In *BME Frontiers* (Vol. 2022). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.34133/2022/9764501>.
- Li, M., Du, C., Guo, N., Teng, Y., Meng, X., Sun, H., Li, S., Yu, P., & Galons, H. (2019). Composition design and medical application of liposomes. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 164, pp. 640–653). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.007>.
- Lima, P. H. C. de, Butera, A. P., Cabeça, L. F., & Ribeiro-Viana, R. M. (2021). Liposome surface modification by phospholipid chemical reactions. *Chemistry and Physics of Lipids*, 237, 105084. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMPHYSLIP.2021.105084>.
- Liu, J., Li, X., Liu, L., Bai, Q., Sui, N., & Zhu, Z. (2021). Self-assembled ultrasmall silver nanoclusters on liposome for topical antimicrobial delivery. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 200, 111618. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111618>.
- Liu, X. M., Yang, B., Wang, Y. L., & Wang, J. Y. (2005). Photoisomerisable cholesterol derivatives as photo-trigger of liposomes: Effect of lipid polarity, temperature, incorporation ratio, and cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1720(1–2), 28–34. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2005.10.016>.
- Luiz, H., Oliveira Pinho, J., & Gaspar, M. M. (2023). Advancing Medicine with Lipid-Based Nanosystems—The Successful Case of Liposomes. In *Biomedicines* (Vol. 11, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020435>

- Lyon, P. C., Gray, M. D., Mannaris, C., Folkes, L. K., Stratford, M., Campo, L., Chung, D. Y. F., Scott, S., Anderson, M., Goldin, R., Carlisle, R., Wu, F., Middleton, M. R., Gleeson, F. v., & Coussios, C. C. (2018). Safety and feasibility of ultrasound-triggered targeted drug delivery of doxorubicin from thermosensitive liposomes in liver tumours (TARDOX): a single-centre, open-label, phase 1 trial. *The Lancet Oncology*, *19*(8), 1027–1039. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30332-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30332-2).
- Martinho, N., Damg , C., & Reis, C. P. (2011). Recent Advances in Drug Delivery Systems. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, *02*(05), 510–526. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2011.225062>
- Matsumoto, A., Takahashi, Y., Nishikawa, M., Sano, K., Morishita, M., Charoenviriyakul, C., Saji, H., & Takakura, Y. (2017). Role of Phosphatidylserine-Derived Negative Surface Charges in the Recognition and Uptake of Intravenously Injected B16BL6-Derived Exosomes by Macrophages. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *106*(1), 168–175. <https://doi.org/10.1016/J.XPHS.2016.07.022>.
- Matsumura, Y., & Maeda, H. (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer research*, *46*(12 Pt 1), 6387–6392.
- Maurer, N., Wong, K. F., Stark, H., Louie, L., McIntosh, D., Wong, T., Scherrer, P., Semple, S. C., & Cullis, P. R. (2001). Spontaneous entrapment of polynucleotides upon electrostatic interaction with ethanol-destabilized cationic liposomes. *Biophysical journal*, *80*(5), 2310–2326. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76202-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76202-9).
- Mehta, P. P., Ghoshal, D., Pawar, A. P., Kadam, S. S., & Dhapte-Pawar, V. S. (2020). Recent advances in inhalable liposomes for treatment of pulmonary diseases: Concept to clinical stance. In *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (Vol. 56). Editions de Sante. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101509>
- Moghimi, S. M., & Hamad, I. (2008). Liposome-Mediated Triggering of Complement Cascade. *Journal of Liposome Research*, *18*(3), 195–209. <https://doi.org/10.1080/08982100802309552>.
- Monteiro, N., Martins, A., Reis, R. L., & Neves, N. M. (2014). Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of the Royal Society, Interface*, *11*(101), 20140459. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0459>.
- Moon, H., Hwang, K., Nam, K. M., Kim, Y. S., Ko, M. J., Kim, H. R., Lee, H. J., Kim, M. J., Kim, T. H., Kang, K. S., Kim, N. G., Choi, S. W., & Kim, C. Y. (2022). Enhanced delivery to brain using sonosensitive liposome and microbubble with focused ultrasound. *Biomaterials advances*, *141*, 213102. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213102>.
- Mouritsen, O. G. (2005). *Life-as a matter of fat* (Vol. 537). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Nakamura, K., Yamashita, K., Itoh, Y., Yoshino, K., Nozawa, S., & Kasukawa, H. (2012). Comparative studies of polyethylene glycol-modified liposomes prepared using different PEG-modification methods. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1818*(11), 2801–2807. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.06.019>.
- Needham, D., Anyarambhatla, G., Kong, G., & Dewhirst, M. W. (2000). A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: characterization and testing in a human tumor xenograft model. *Cancer research*, *60*(5), 1197–1201.
- Noori, A., Ghiasi, P., Akbari, J., & Heydari, A. (2014). Magnetic Nanoparticles Supported Ionic Liquids Improve Firefly Luciferase Properties. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *172*. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0730-8>.
- Nsairat, H., Khater, D., Sayed, U., Odeh, F., al Bawab, A., & Alshaer, W. (2022). Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. In *Heliyon* (Vol. 8, Issue 5). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394>.
- Oerlemans, C., Deckers, R., Storm, G., Hennink, W. E., & Nijssen, J. F. W. (2013). Evidence for a new mechanism behind HIFU-triggered release from liposomes. *Journal of Controlled Release*, *168*(3), 327–333. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.03.019>

- Oku, N., Kendall, D. A., & Macdonald, R. C. (1982). A SIMPLE PROCEDURE FOR THE DETERMINATION OF THE TRAPPED VOLUME OF LIPOSOMES. In *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 691).
- Olson, F., Hunt, C. A., Szoka, F. C., Vail, W. J., & Papahadjopoulos, D. (1979). Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 557(1), 9-23.
- Ota, S., Yoshizawa, S., & Takeuchi, S. (2009). Microfluidic formation of monodisperse, cell-sized, and unilamellar vesicles. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 48(35), 6533-6537. <https://doi.org/10.1002/anie.200902182>.
- Paolino, D., Sinha, P., Fresta, M., & Ferrari, M. (2006). Drug delivery systems. *Encyclopedia of medical devices and instrumentation*.
- Park, H., Otte, A., & Park, K. (2022). Evolution of drug delivery systems: From 1950 to 2020 and beyond. *Journal of Controlled Release*, 342, 53-65. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.12.030>.
- Pasarin, D., Ghizdareanu, A. I., Enascuta, C. E., Matei, C. B., Bilbie, C., Paraschiv-Palada, L., & Veres, P. A. (2023). Coating Materials to Increase the Stability of Liposomes. In *Polymers* (Vol. 15, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/polym15030782>.
- Patey, S. J., & Corcoran, J. P. (2021). Physics of ultrasound. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 22(1), 58-63. <https://doi.org/10.1016/J.MPAIC.2020.11.012>.
- Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R., & Langer, R. (2020). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nano-enabled medical applications*, 61-91.
- Pentak, D. (2014). Alternative methods of determining phase transition temperatures of phospholipids that constitute liposomes on the example of DPPC and DMPC. *Thermochimica Acta*, 584, 36-44. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2014.03.020>.
- Pešťálová, A., Molatová K. & Gajdziok J. Příprava a hodnocení sprejově sušených inhalovatelných mikročástic ze směsí nosičů. Online. Česká a slovenská farmacie. 2023, roč. 72, č. 1, s. 214-222. ISSN 1210-7816.
- Plaunt, A. J., Courbanou, M. B., Cuisson, K. D., Harmatys, K. M., & Smith, B. D. (2012). Selective non-covalent triggered release from liposomes. *Chemical Communications*, 48(65), 8123-8125. <https://doi.org/10.1039/C2CC32962J>.
- Pong, M., Umchid, S., Guarino, A. J., Lewin, P. A., Litniewski, J., Nowicki, A., & Wrenn, S. P. (2006). In vitro ultrasound-mediated leakage from phospholipid vesicles. *Ultrasonics*, 45(1-4), 133-145. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2006.07.021>.
- Powles, A. E., Martin, D. J., Wells, I. T., & Goodwin, C. R. (2018). Physics of ultrasound. In *Anaesthesia and Intensive Care Medicine* (Vol. 19, Issue 4, pp. 202-205). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2018.01.005>.
- Regenold, M., Kaneko, K., Wang, X., Peng, H. B., Evans, J. C., Bannigan, P., & Allen, C. (2023). Triggered release from thermosensitive liposomes improves tumor targeting of vinorelbine. *Journal of Controlled Release*, 354, 19-33. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.12.010>.
- Riaz, M. K., Riaz, M. A., Zhang, X., Lin, C., Wong, K. H., Chen, X., Zhang, G., Lu, A., & Yang, Z. (2018). Surface functionalization and targeting strategies of liposomes in solid tumor therapy: A review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19010195>.
- Robertson J. D. (1960). The molecular structure and contact relationships of cell membranes. *Progress in biophysics and molecular biology*, 10, 343-418.
- Rueter, D., & Morgenstern, T. (2014). Ultrasound generation with high power and coil only EMAT concepts. *Ultrasonics*, 54(8), 2141-2150. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2014.06.012>.
- Saad, M. A., & Hasan, T. (2022). Spotlight on Photoactivatable Liposomes beyond Drug Delivery: An Enabler of Multitargeting of Molecular Pathways. In *Bioconjugate Chemistry* (Vol. 33, Issue 11, pp. 2041-2064). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.2c00376>.

- Selim, H., Delgado-Prieto, M., Trull, J., Picó, R., Romeral, L., & Cojocar, C. (2020). Defect reconstruction by non-destructive testing with laser induced ultrasonic detection. *Ultrasonics*, 101. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2019.106000>.
- Sessa, G., & Weissmann, G. (1968). Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *Journal of lipid research*, 9(3), 310–318.
- Sharma, D., Ali, A. A. E., & Trivedi, L. R. (2018). An Updated Review On: Liposomes as Drug Delivery System. *Pharmatutor*, 6(2), 50. <https://doi.org/10.29161/pt.v6.i2.2018.50>
- Schroeder, A., Avnir, Y., Weisman, S., Najajreh, Y., Gabizon, A., Talmon, Y., Kost, J., & Barenholz, Y. (2007). Controlling liposomal drug release with low frequency ultrasound: Mechanism and feasibility. *Langmuir*, 23(7), 4019–4025. <https://doi.org/10.1021/la0631668>.
- Schroeder, A., Kost, J., & Barenholz, Y. (2009). Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 162(1–2), 1–16. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMPHYSLIP.2009.08.003>.
- Silbaugh, A., Vallin, J., Pelaez, F., Kim, M., Shao, Q., Lee, H. S., Bischof, J. C., & Azarin, S. M. (2023). Enhancing electroporation-induced liposomal drug release in suspension and solid phases. *International journal of pharmaceutics*, 635, 122744. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122744>.
- Slütter, B., Bal, S. M., Ding, Z., Jiskoot, W., & Bouwstra, J. A. (2011). Adjuvant effect of cationic liposomes and CpG depends on administration route. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 154(2), 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.02.007>.
- Smyth, T., Kullberg, M., Malik, N., Smith-Jones, P., Graner, M. W., & Anchordoquy, T. J. (2015). Biodistribution and delivery efficiency of unmodified tumor-derived exosomes. *Journal of Controlled Release*, 199, 145–155. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2014.12.013>.
- Stetefeld, J., McKenna, S.A. & Patel, T.R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev* 8, 409–427 (2016). <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>.
- Sung, Y. K., & Kim, S. W. (2020). Recent advances in polymeric drug delivery systems. In *Biomaterials Research* (Vol. 24, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40824-020-00190-7>.
- Swain, B., Koilpillai, J., & Narayanasamy, D. (2023). A Systematic Review on Recent Advancements and Liposomal Technologies to Develop Stable Liposome. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 17(1), 735–748. <https://doi.org/10.5530/ctbp.2023.1.13>.
- Ta, T., & Porter, T. M. (2013). Thermosensitive liposomes for localized delivery and triggered release of chemotherapy. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 169, Issues 1–2, pp. 112–125). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.03.036>.
- ter Haar, G., & Coussios, C. (2007). High intensity focused ultrasound: Physical principles and devices. *International Journal of Hyperthermia*, 23(2), 89–104. <https://doi.org/10.1080/02656730601186138>.
- Tewabe, A., Abate, A., Tamrie, M., Seyfu, A., & Abdela Siraj, E. (2021). Targeted Drug Delivery - From Magic Bullet to Nanomedicine: Principles, Challenges, and Future Perspectives. *Journal of multidisciplinary healthcare*, 14, 1711–1724. <https://doi.org/10.2147/JMDH.S313968>.
- Timko, B. P., Dvir, T., & Kohane, D. S. (2010). Remotely triggerable drug delivery systems. In *Advanced Materials* (Vol. 22, Issue 44, pp. 4925–4943). <https://doi.org/10.1002/adma.201002072>.
- Vakhshiteh, F., Khabazian, E., Atyabi, F., Ostad, S. N., Madjd, Z., & Dinarvand, R. (2020). Peptide-conjugated liposomes for targeted miR-34a delivery to suppress breast cancer and cancer stem-like population. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 57, 101687. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2020.101687>.

- van der Koog, L., Gandek, T. B., & Nagelkerke, A. (2022). Liposomes and Extracellular Vesicles as Drug Delivery Systems: A Comparison of Composition, Pharmacokinetics, and Functionalization. In *Advanced Healthcare Materials* (Vol. 11, Issue 5). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/adhm.202100639>.
- Vargason, A. M., Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2021). The evolution of commercial drug delivery technologies. In *Nature Biomedical Engineering* (Vol. 5, Issue 9, pp. 951–967). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00698-w>.
- Veeran, A., Ogunyankin, M. O., Shin, J. E., & Zasadzinski, J. A. (2022). Liposome-Tethered Gold Nanoparticles Triggered by Pulsed NIR Light for Rapid Liposome Contents Release and Endosome Escape. In *Pharmaceutics* (Vol. 14, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040701>
- W. Lin, X. Xie, Y. Yang, X. Fu, H. Liu, Y. Yang, J. Deng, *Drug Delivery* 2016, 23, 3436.
- Wagner A, Vorauer-Uhl K. Liposome Technology for Industrial Purposes. *J Drug Deliv* [Internet]. 2011 Dec 5;2011:1–9. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jdd/2011/591325>.
- Wassef, N. M., Matyas, G. R., & Alving, C. R. (1991). Complement-dependent phagocytosis of liposomes by macrophages: Suppressive effects of “stealth” lipids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 176(2), 866–874. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(05\)80266-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(05)80266-9).
- William, B., Noémie, P., Brigitte, E., & Géraldine, P. (2020). Supercritical fluid methods: An alternative to conventional methods to prepare liposomes. In *Chemical Engineering Journal* (Vol. 383). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123106>.
- Wu, A. M., & Senter, P. D. (2005). Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nature biotechnology*, 23(9), 1137–1146. <https://doi.org/10.1038/nbt1141>.
- X. Zheng, J. Lu, L. Deng, Y. Xiong, J. Chen, *Int. J. Pharm.* 2009, 366, 211.
- Yadav, Kumar, S., Mishra, M., Garima, V., Nayak, K., Shukla, A., Shukla, A., & Kumar, Y. (2016). NIOSOMES: AN APPROACH TOWARDS TARGETED DRUG DELIVERY SYSTEM. *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences*, 6, 39–52.
- Yan, Y., Zhu, X., Yu, Y., Li, C., Zhang, Z., & Wang, F. (2022). Nanotechnology Strategies for Plant Genetic Engineering. In *Advanced Materials* (Vol. 34, Issue 7). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/adma.202106945>.
- Yang, S., Wang, Y., & Liang, X. (2023). Piezoelectric Nanomaterials Activated by Ultrasound in Disease Treatment. In *Pharmaceutics* (Vol. 15, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051338>.
- Yavlovich, A., Singh, A., Blumenthal, R., & Puri, A. (2011). A novel class of photo-triggerable liposomes containing DPPC:DC(8,9)PC as vehicles for delivery of doxorubicin to cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1808(1), 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.07.030>.
- Yoon, H. Y., Chang, I. H., Goo, Y. T., Kim, C. H., Kang, T. H., Kim, S. Y., Lee, S. J., Song, S. H., Whang, Y. M., & Choi, Y. W. (2019). Intravesical delivery of rapamycin via folate-modified liposomes dispersed in thermo-reversible hydrogel. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 6249–6268. <https://doi.org/10.2147/IJN.S216432>.
- Zahednezhad, F., Saadat, M., Valizadeh, H., Zakeri-Milani, P., & Baradaran, B. (2019). Liposome and immune system interplay: Challenges and potentials. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 305, 194–209. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.05.030>.
- Zhao, T., Su, L., & Xia, W. (2018). Optical ultrasound generation and detection for intravascular imaging: A review. In *Journal of Healthcare Engineering* (Vol. 2018). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2018/3182483>.

6.2 Hypertextové odkazy

- Ref.1: <https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/phase-transition-temps> (navštíveno 5.5. 2024)
- Ref. 2: <https://avantilipids.com/tech-support/faqs/transition-temperature> (navštíveno 22. 4. 2024)
- Ref. 3: <https://avantilipids.com/divisions/equipment-products> (navštíveno 15.3. 2024)
- Ref 4.: <https://www.edinst.com/products/fls-980-fluorescence-spectrometer/> (navštíveno 15.3. 2024)

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

- ACMF → alternating current magnetic field
- AFM → mikroskopie atomárních sil
- APC → antigen prezentující buňky
- BSA → bovinní sérový albumin
- c → rychlost propagace
- CARPA → c-activation related pseudo-allergy
- CLR → c-type lectin receptor
- CMD → karboxymethyl dextran
- cRGD → cyklický arginyl-glycyl-aspartát
- CRP → c-reactive protein
- CTAB → cetyltrimethylamoniumbromid
- DAMPs → damage-associated molecular patterns
- DC → dendritické buňky
- DC 8.9 PC → 1,2-bis (10,12-trikosadinoyl) sn-glycero-3-fosfatidylcholin
- DLS → dynamic light scattering/dynamický rozptyl světla
- DMPC → dimyristoylfosfatidylcholin
- DOPA → dihydroxyfenylalanin
- DOPC → dioleoylfosfatidylcholin
- DOPE → dioleoylfosfoethanolamin
- DOTAP → (2,3-dioleoyl-propyl)-trimethylamin
- DOTMA → (2,3-dioleoyl-propyl)trimethylaminbromid
- DOX → doxorubicin
- DPPC → dipalmitoylfosfatidylcholin
- DSPC → distearoylfosfatidylcholin
- DSPE → 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
- E → energie
- EGF → epidermální růstový faktor
- EggPC → vaječný fosfatidylcholin
- EPR → elektronová paramagnetická rezonance
- EPR → enhanced permeability effect/zlepšený efekt permeability
- f → frekvence
- FGF → fibroblastový růstový faktor

F_{in} → fluorescence po přidání zhášeče
FTIR → infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
 F_{tot} → celková fluorescence liposomové suspenze
 F_{totq} → fluorescence při rovnovážné koncentraci uvolněného detekčního činidla
GSH → glutathion
HDL → high density lipoproteins/ vysokodenzitní lipoproteiny
HEPES → 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HER2 → lidský epidermální faktor
HFUS → vysokofrekvenční ultrazvuk
HIFU → vysokofrekvenční fokusovaný ultrazvuk
HLA → human leukocyte antigen
HSPC → hydro-soy phosphatidylcholine (hydrogenovaný sójový fosfatidylcholin)
Hz → Hertz
CHEMS → hemisukcinát
Chol → cholesterol
I → intenzita
IPA → izopropylalkohol
 L_0 → kapalná uspořádaná fáze
 L_c → pseudokrystalická fáze
LDL → low density lipoproteins/nízkodenzitní lipoproteiny
LFUS → nízkofrekvenční ultrazvuk
LUV → large unilamellar vesicles/velké unilamelární vezikuly
 L_α → kapalná neuspořádaná fáze
 L_β → gelová uspořádaná fáze
mAb → monoklonální protilátka
MHC → major histocompatibility complex/hlavní histokompatibilní komplex
MK → mastná kyselina
MLV → multilamellar vesicles/ multilamelární vezikuly
MPPC → 1-myristoyl-2-palmitoyl-sn-glycero-3-fosfatidylcholin
MPS → mononukleární fagocytární systém
MSPC → 1-myristoyl-2-stearoyl-sn-glycero-3-fosfatidylcholin
MVV → multivesicular vesicles/ multivezikulární vezikuly
NK → natural killer cells

NMR → nukleární magnetická rezonance
NP → nanoparticles/nanočástice
p → akustický tlak
PA → kyselina fosfatidová
PACA → polyalkylcyanoakrylát
PAMPs → pathogen-associated molecular patterns
PBS → Phosphate Buffer Saline (fosfátový pufr)
PC → fosfatidylcholin
PCS → fotonová korelační spektroskopie
PE → fosfatidylethanolamin
PEG → polyethylenglykol
PFC → perfluorokarbon
PG → fosfatidylglycerol
PI → fosfatidylinositol
PLA → polylaktát
POE → polyoxyethylenové alkylové estery
PP → packing parametr
PRR → pattern-recognition receptor
PS → fosfatidylserin
PVA → polyvinyl alkohol
 $P\beta$ → zvlněná fáze
QD → quantum dots/kvantové tečky
r → faktor ředění fluorescenčního činidla po přidání detergentu
RES → retikuloendoteliální systém
RGD → arginyl-glycyl-aspartát
ROS → reaktivní formy kyslíku
SCF → supercritical fluid/superkritická fluidní metoda
SEM → skenovací/rastrovací elektronová mikroskopie
SUV → small unilamellar vesicles/malé unilamelární vezikuly
TEM → transmisní elektronová mikroskopie
TLL → toll-like receptor
TSL → termosenzitivní liposomy
 T_t → transientní teplota
US → ultrazvuk

V → volt

W → watt

Z → akustická impedance

ZnDPA → dipikolyamin zinečnatý

ζ → zeta potenciál

λ → vlnová délka