



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE NANOLIPOSOMÁLNÍCH
NOSIČŮ HYDROFOBNÍCH CYTOSTATIK S VYUŽITÍM
NANOFLUIDNÍHO SMĚŠOVÁNÍ**

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF NANOLIPOSOMAL CARRIERS OF HYDROPHOBIC
CYTOSTATICS USING NANOFLUIDIC MIXING

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Jaroslava Zelníčková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Jaroslav Turánek, CSc.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1115/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Jaroslava Zelníčková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **RNDr. Jaroslav Turánek, CSc.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Příprava a charakterizace nanoliposomálních nosičů hydrofobních cytostatik s využitím nanofluidního směšování

Zadání diplomové práce:

1. Příprava liposomů technikou nanofluidního směšování
2. Charakterizace liposomálních nosičů pomocí moderních fyzikálně-chemických metod
3. Inkorporace modelových látek (hydrofobní cytostatika na bázi vitamínu E) do liposomálních nosičů
4. In vitro testování protinádorové účinnosti na nádorových liniích

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Jaroslava Zelníčková
student(ka)

RNDr. Jaroslav Turánek, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práce je zaměřená na přípravu liposomů pomocí relativně nové metody nanofluidizace. Tato metoda umožňuje kontrolovanou přípravu malých unilamelárních liposomů v jednom kroku. Ve své práci jsem se zaměřila na optimalizaci přípravy liposomů nesoucích hydrofobní cytostatikum pomocí této metody. Dále jsem se zabývala stanovováním cytotoxického účinku liposomů nesoucích hydrofobní cytostatikum *in vitro* na buněčných liniích A549 a MCF-7. V testech cytotoxicity jsem srovnávala účinek hydrofobních cytostatik (paclitaxel, deriváty vitamínu E, konkrétně α -TOS a α -TEA) inkorporovaných do liposomů připravených metodou nanofluidizace a liposomů připravených metodou hydratace lipidového filmu. Pro liposomy připravené metodou nanofluidního směšování byla vypracována technologie lyofilizace v prostředí sacharidových kryoprotektiv.

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on preparation of liposome by relatively new method called nanofluidisation. This method allows the controlled preparation of small unilamellar liposomes in one step. In my thesis I was dealing with optimization of liposomes preparation which carry hydrophobic cytostatics using this method. Cytotoxic effect of liposomes carrying hydrophobic cytostatics *in vitro* on cell lines A549 and MCF-7 was determined. In cytotoxicity test I compared the effect of hydrophobic cytostatics (paclitaxel and derivatives of vitamin E specifically α -Tos, α -TEA) that were incorporated into liposomes prepared via nanofluidisation method and lipid film hydration method. Moreover, a technology of lyophilisation in the presence of cryoprotectants for preparation of liposomes using the method of nanofluidisation was developed.

KLÍČOVÁ SLOVA

Liposomy, nanofluidizace, Nanoassemblr™, deriváty vitamínu E, α -tokoferyl sukcinát, paclitaxel, hydrofobní cytostatika, nádorová linie A549, nádorová linie MCF-7, apoptóza

KEY WORDS

Liposomes, nanofluidic, Nanoassemblr™, vitamin E derivatives, α -tokopheryl succinate, paclitaxel, hydrophobic cytostatics, cancer cell line A549, cancer cell line MCF-7, apoptosis

ZELNÍČKOVÁ, J. *Příprava a charakterizace nanoliposomálních nosičů hydrofobních cytostatik s využitím nanofluidního směšování*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 73 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Jaroslav Turánek, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

..... podpis studenta

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce panu RNDr. Jaroslavu Turánkovi, CSc. za to, že mi umožnil vypracovat tuto diplomovou práci pod jeho vedením a za čas, který mi věnoval. Dále bych chtěla poděkovat MVDr. Pavlíně Turánek Knötigové, Ph.D. za pomoc při práci s buněčnými liniemi a za cenné rady, Mgr. Františku Hubatkovi a Ing. Janu Kotoučkovi za jejich ochotu kdykoliv pomoci a poradit. Také děkuji MVDr. Pavlu Kulichovi za pomoc při pořizování fotografií liposomů na elektronovém mikroskopu. Děkuji i celému kolektivu oddělení Farmakologie a imunoterapie VÚVeL za příjemnou přátelskou atmosféru, která na pracovišti panovala. Také děkuji svým nejbližším a především svému příteli za podporu při vypracovávání této práce.

OBSAH

1	Cíl práce	7
2	Úvod	8
3	Teoretická část	9
3.1	Liposomy	9
3.1.1	Rozdělení liposomů	9
3.1.2	Enkapsulace léčiv do liposomu	11
3.1.3	Interakce liposomu s buňkou	11
3.1.4	Komponenty liposomů	12
3.2	Metody přípravy liposomů	14
3.2.1	Hydratace lipidového filmu	15
3.2.2	Sonikace	16
3.2.3	Extruze	16
3.2.4	Opakované zmrazování a rozmrazování	17
3.2.5	Vysokotlaká homogenizace	17
3.2.6	Detergentová metoda	17
3.2.7	Etanolová nebo éterová injekce	18
3.2.8	Nanofluidizace	18
3.3	Charakterizace liposomů	20
3.3.1	Zetasizer Nano ZSP	20
3.3.2	NanoSight NS500	23
3.3.3	Elektronová mikroskopie	24
3.4	Aplikace liposomů v léčbě nádorových onemocnění	26
3.5	Hydrofobní cytostatika	29
3.5.1	Vitamín E	29
3.5.2	Deriváty vitamínu E	30
3.5.3	Paclitaxel (Taxol)	32
4	Experimentální část	34
4.1	Chemikálie	34
4.2	Přístrojové vybavení	34
4.3	Buněčné linie	34

4.4	Metody.....	35
4.4.1	Příprava liposomů metodou nanofluidizace	35
4.4.2	Příprava liposomů metodou hydratace lipidového filmu	35
4.4.3	Příprava volného cytostatika.....	35
4.4.4	Charakterizace částic.....	35
4.4.5	Kvantifikace lipidů.....	36
4.4.6	Lyofilizace	36
4.4.7	Studium stability	37
4.4.8	Stanovení zbytkové vody.....	37
4.4.9	Rozmrazování buněčných linií	38
4.4.10	Pasážování buněčných linií.....	38
4.4.11	Počítání buněk.....	38
4.4.12	MTT test	39
5	Výsledková část.....	40
5.1	Optimalizace rychlosti průtoku (TFR) a poměru vodné a organické fáze (FRR).....	40
5.2	Optimalizace vodné fáze.....	41
5.3	Optimalizace obsahu cholesterolu v liposomech	43
5.4	Optimalizace obsahu α -TOS	45
5.5	Porovnání metod nanofluidizace a hydratace lipidového filmu.....	46
5.6	Lyofilizace liposomů	53
5.7	Stanovení obsahu vody	54
5.8	Stanovení obsahu fosfolipidů.....	54
5.9	Testy cytotoxicity	55
6	Diskuse	60
7	Závěr	64
8	Seznam symbolů a zkratk	65
9	Seznam použité literatury	67
10	Přílohy	73

1 CÍL PRÁCE

1. Příprava liposomů technikou nanofluidního směšování
2. Charakterizace liposomálních nosičů pomocí moderních fyzikálně-chemických metod
3. Inkorporace modelových látek (hydrofobní cytostatika na bázi vitamínu E, paclitaxel) do liposomálních nosičů
4. *In vitro* otestování protinádorové účinnosti na nádorových liniích

2 ÚVOD

V současné době jsou liposomy velmi intenzivně zkoumány, jelikož se jeví jako ideální nosiče léčiv. Liposomy jsou vezikuly, které jsou tvořené lipidovou dvojvrstvou a vnitřním vodným objemem. Jako nosiče mohou poskytnout léčivu metabolickou ochranu, prodloužit dobu jejich cirkulace, snížit toxicitu, cílit léčivo do místa žádaného účinku a kontrolovat uvolňování transportovaného léku. Liposomy představují netoxické biokompatibilní nanočástice schválené FDA a EMA pro použití v humánní medicíně. Jejich výhodou je i to, že mohou transportovat jak hydrofilní léčiva, tak hydrofobní léčiva.

Avšak navzdory značnému výzkumu těchto nanočástic v posledních 50 letech nepostupuje klinický pokrok tak rychle, jak naznačovalo množství pozitivních výsledků. Omezení v oblasti farmaceutického vývoje je způsobeno problémy se zajištěním kvality a náklady na vývoj komerčního preparátu. Zabezpečení kvality zahrnuje otázky týkající se výrobního procesu a stability liposomů. Proto je tedy snaha vyvíjet nové postupy jejich přípravy.

Existují dva základní způsoby přípravy liposomů. Prvním je metoda, při které dochází ke vzniku velkých vezikul, jejichž velikost je následně redukována použitím dalších procesů jako je například extruze, sonikace atd. Druhou možností je přímá tvorba malých unilamelárních liposomů např. metodou etanolového vstříkávání. Relativně novou oblastí syntézy liposomů je nanofluidizace. Tato metoda nám umožňuje kontrolovatelný proces výroby malých unilamelárních vezikul a snižuje čas přípravy liposomů. Ve své práci se budu zabývat možností využití metody nanofluidizace pro přípravu liposomů nesoucí hydrofobní cytostatika. Následně budu tuto metodu porovnávat s metodou hydratace lipidového filmu, která je běžně využívána pro laboratorní přípravu liposomů.

Mezi studovaná hydrofobní cytostatika patří deriváty vitamínu E, konkrétně α -TOS a α -TEA. Bylo zjištěno, že tyto látky indukují buněčnou apoptózu selektivně vůči nádorovým buňkám. Dále u nich byla prokázána jejich antiproliferační aktivita *in vitro*. Studie také potvrzují, že tyto látky vykazují cytotoxické účinky proti širokému spektru nádorů zejména rakoviny prsu, plic, prostaty a tlustého střeva. Na základě těchto výsledků se deriváty vitamínu E jeví jako látky vhodné pro využití při léčbě karcinomů.

Dalším studovaným hydrofobním cytostatikem je paclitaxel. Tato látka se dlouhodobě využívá v klinické praxi k léčbě rakoviny prsu a vaječníků. Pro aplikaci se používá směs paclitaxelu rozpuštěného ve směsi Cremophoru a bezvodého etanolu. Cremophor je však spojován s řadou vedlejších účinků zahrnující přecitlivělost, nefrotoxicitu a neurotoxicitu. Možnost snížení toxicity nabízí inkorporace paclitaxelu do membrán liposomů, které by ho mohli dopravit na místo účinku a zároveň zamezit nežádoucím vedlejšími účinkům.

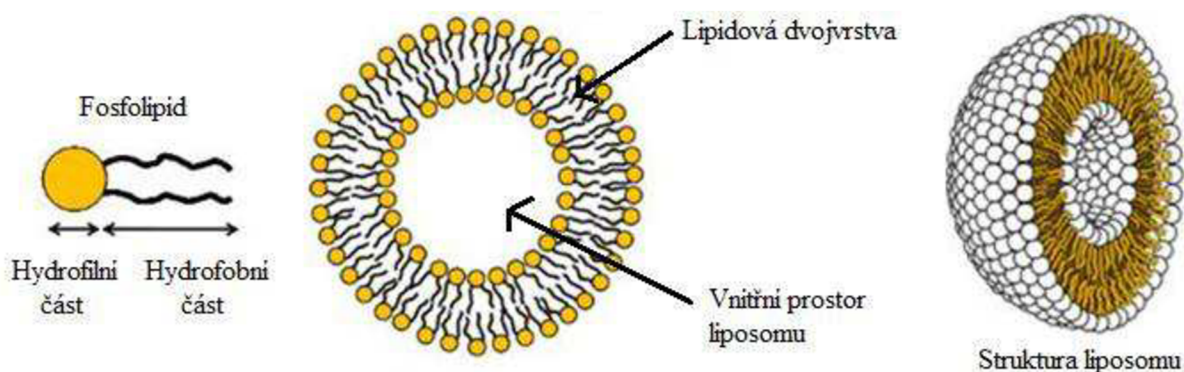
3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Liposomy

Poprvé byly liposomy popsány v roce 1961 britským hematologem Dr. Alecem Banghamem, kterému se povedlo je objevit, při testování nových elektronových mikroskopů [1].

Liposomy jsou lipidové částice, které se svojí strukturou podobají membránám. Jelikož jsou lipidy amfifilní molekuly složené z hydrofilní a hydrofobní části, dochází při jejich kontaktu s vodou k odpuzování mezi hydrofobními částmi lipidů a molekulami rozpouštědla, což způsobí samouspořádání do formy liposomů. Liposomy jsou tedy složeny z vodného objemu obaleného lipidovou dvojvrstvou, jak je patrné z obrázku 1.

Liposomy jsou biokompatibilní a biodegradovatelné, díky čemuž jsou vhodné pro biomedicínský výzkum. Jejich nespornou výhodou také je, že mohou transportovat jak hydrofilní, tak hydrofobní léčiva. Hydrofobní léčiva se zabudují do jejich membrány, zatímco hydrofilní léčiva jsou uzavřena v jejich vodném vnitřním objemu. V současné době jsou liposomy využívány a nadále studovány jako vhodní kandidáti pro transport léčiv. Jako již bylo zmíněno v úvodu, liposomy jako nosiče přináší řadu výhod, mezi které patří metabolická ochrana léčiva, prodloužení doby jeho cirkulace, snížení toxicity, cílení do místa žádaného účinku a kontrolované uvolňování transportovaného léčiva [1],[2].

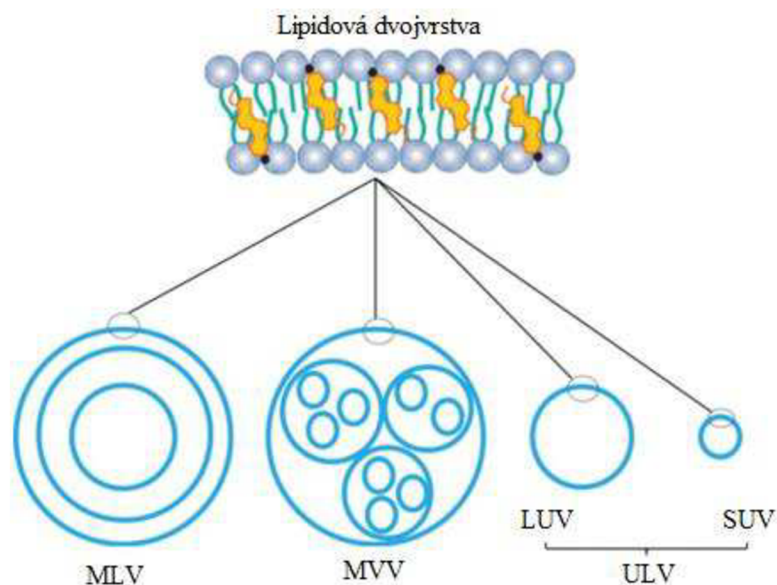


Obrázek 1: Schematické zobrazení struktury fosfolipidu a liposomu [3]

3.1.1 Rozdělení liposomů

Liposomy rozdělujeme podle velikosti a lamelarity nebo podle způsobu jejich přípravy. Nicméně klasifikace podle velikosti a lamelarity je nejčastější.

Podle lamelarity se liposomy dělí na unilamelární (ULV) a velké multilamelární (MLV), popřípadě velké multivezikulární (MVV). Unilamelární liposomy se dále dělí dle velikosti na malé (SUV) a velké (LUV). Jednotlivé typy liposomů jsou zobrazeny na obrázku 2.



Obrázek 2: Rozdělení liposomů podle velikosti a morfologie [5]

Malé unilamelární vezikuly (small unilamellar vesicles, SUV)

SUV jsou vezikuly tvořené jednou lipidovou dvojvrstvou o průměru přibližně 50 nm. Od jiných liposomů se odlišují vysokým povrchovým napětím způsobeným značným zakřivením membrány. Díky své velikosti jsou schopny unikat z cévního řečiště extravaskulárně přes endotel kapilár do okolních tkání a mohou tak být výhodné jako cílené nosiče léčiv. Na druhé straně jsou tyto malé vezikuly po fyzikálně-chemické stránce relativně nestabilní. Další nevýhodou je, že inkorporace hydrofilních molekul léčiva je omezena malým vnitřním objemem.

Velké unilamelární vezikuly (large unilamellar vesicles, LUV)

Tento typ unilamelárních vezikul má průměr větší než 50 nm. LUV vykazují nízké membránové napětí a větší stabilitu než SUV. Dále mají poměrně vysoký podíl obsahu vody, a jsou tedy vhodné jako nosiče hydrofilních léčiv.

Velké multilamelární vezikuly (multilamellar large vesicles, MLV)

Mnohvrstevné vezikuly mají velikost v rozmezí 100–1000 nm. Obsahují velký počet lipidových dvojvrstev, které zapříčiňují zpomalené uvolňování enkapsulovaného hydrofilního léčiva. Tyto vezikuly také vykazují vyšší enkapsulační kapacitu pro hydrofobní látky.

Multivezikulární vezikuly (multivesicular vesicles, MVV)

V tomto typu liposomů je v jedné větší vezikule enkapsulováno více menších vezikul. Tento typ liposomů vzniká také jako vedlejší produkt při výrobě jiných typů, zejména MLV [4].

3.1.2 Enkapsulace léčiv do liposomu

Metody zapouzdření léčiva v liposomech můžeme rozdělit do dvou podskupin. Pasivní zachycení, ve kterém k zapouzdření léčiva dochází v průběhu procesu formování vezikulu a aktivní zachycení, ve kterém je léčivo zachyceno až po vytvoření vezikulu.

Pasivní zachycení

K zapouzdření *hydrofilních léčiv* dochází v průběhu hydratace lipidů v přítomnosti hydrofilního léčiva. Část léčiva je totiž zachycena uvnitř liposomu a uzavřena v jeho vodném vnitřním objemu. Léčivo, které zůstalo v rozpouštědle, je odstraněno gelovou filtrací, ionexovou chromatografií nebo dialýzou.

Při přípravě liposomů nesoucích *hydrofobní látky* se postupuje následujícím způsobem. Hydrofobní léčivo se rozpustí v organickém rozpouštědle spolu s fosfolipidy. Rozpouštědlo je odstraněno vakuovou evaporací za vzniku fosfolipidového filmu. Během následné hydratace fosfolipidového filmu zůstávají hydrofobní látky zachycené ve fosfolipidové dvojvrstvě [1],[6].

Aktivní zachycení

Léčiva amfifilní povahy mohou být inkorporována do liposomu až po vytvoření lipidové membrány. Tato léčiva jsou velmi těžko zadržována uvnitř liposomu, protože jsou schopna difundovat přes lipidovou membránu.

Při aktivní zachycení se upraví podmínky uvnitř liposomu tak, aby se při nich léčiva nacházela v ionizovaném stavu. Léčivo rozpuštěné v roztoku tedy vstupuje do liposomu difúzí skrz membránu v neionizovaném stavu. Uvnitř liposomu je převedeno na ionizovanou formu, která již není schopná difundovat ven. Léčivo se tak hromadí uvnitř liposomu. Tento princip je využíván pro inkorporaci protinádorového léčiva doxorubicinu [6],[7].

3.1.3 Interakce liposomu s buňkou

Rozlišujeme tři mechanismy, kterými může liposom transportovat svůj obsah do buňky, a to endocytózu, adsorpci a fúzi. Schéma těchto mechanismů je znázorněné na obrázku 3.

Endocytóza

Při endocytóze dochází k vazbě liposomů na receptory buněk a k vytvoření endocytického váčku, který je následně odškracen za vzniku časného endosomu. Ve fázi časného endosomu dochází k rozpojení komplexu liposom-receptor vlivem kyselého pH uvnitř systému a k transportu receptoru transportním váčkem zpět na buněčnou membránu. Následně se časné endosomy mění na pozdní endosomy.

Pozdní endosom má kyselejší pH než časný a vyskytují se v něm některé hydrolytické enzymy dopravené z Golgiho aparátu, které zahajují rozklad endosomového obsahu. Liposomální fosfolipidy jsou hydrolyzovány na mastné kyseliny a mohou být zabudovány do fosfolipidů buněčných membrán. Pozdní endosom poté splývá s lysosomem.

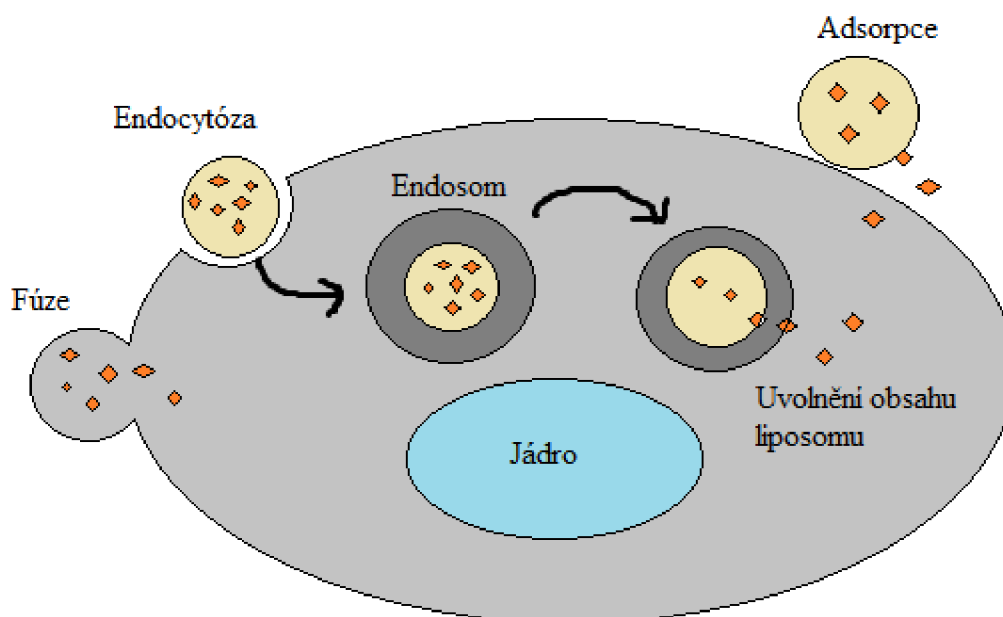
Lysosom je buněčná organela, která má pH 4,5 a obsahuje velké množství hydrolytických enzymů. Obsah liposomů je tedy uvolněn do lysozomu a odtud je odstraňován exocytózou nebo proniká difuzí do cytoplazmy.

Adsorpce na povrch buňky

Adsorpce liposomu na buněčnou membránu je nejčastější formou interakce. Liposom může zůstat adsorbovaný na buňce po delší dobu nebo může dojít k extensivní výměně lipidů mezi liposomem a buněčnou membránou.

Fúze

Fúze liposomu s buněčnou membránou zahrnuje úplné splynutí liposomální a buněčné membrány, čímž se uvolní liposomální obsah do cytoplazmy buňky. Fúze liposomů s buňkami probíhá poměrně zřídka, jelikož tento proces vyžaduje specifické fúzní proteiny nebo peptidy. Tento proces můžeme podpořit přidávkem fúzogenických lipidů do liposomové membrány [8].



Obrázek 3: Interakce buňky s liposomem [9]

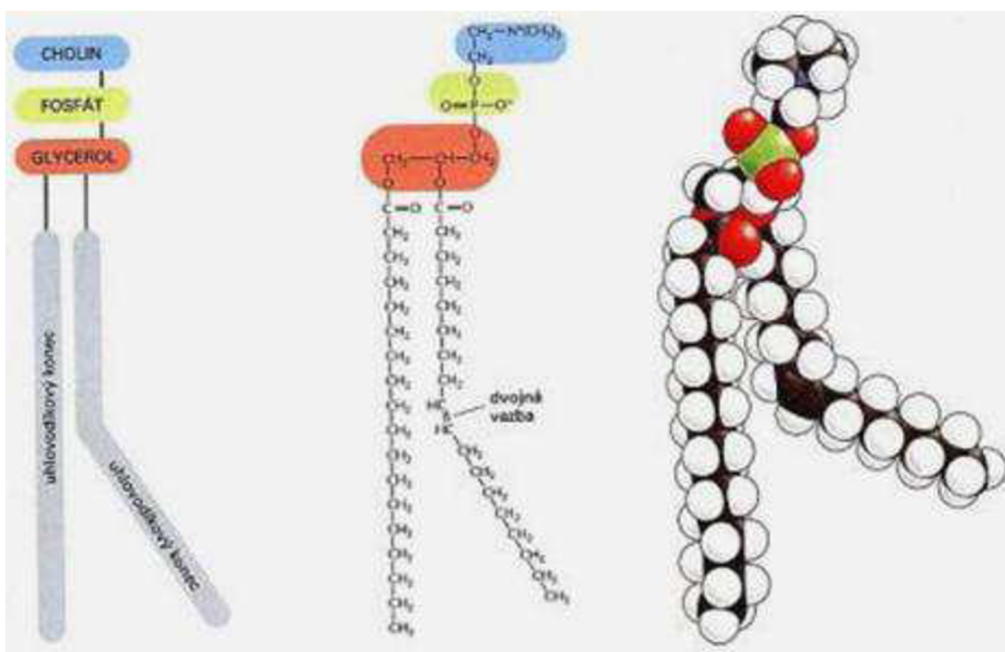
3.1.4 Komponenty liposomů

Podstatnou část liposomů tvoří fosfatidylcholin nebo směsi obsahující různé druhy fosfatidylcholinu, které se liší délkou řetězců mastných kyselin a jejich stupněm nasycení. Dále mohou liposomy obsahovat i jiné fosfolipidy, jako je např. fosfatidylglycerol, fosfatidyletanolamin a sfingomyelin. Do liposomů bývá často zabudován i cholesterol, jehož přidávkem dochází ke snížení fluidity a tím i permeability liposomálních membrán [4].

Fosfolipidy

Nejběžnější fosfolipidy používané pro přípravu liposomů jsou fosfatidylcholiny (struktura fosfatidylcholinu je znázorněna na obrázku 4), které můžeme rozdělit na přírodní, získávané z vajec (EPC) či sóji (SoyPC), nebo syntetické (PC). Přírodní fosfatidylcholiny jako je EPC a SoyPC obsahují množství polynenasycených mastných kyselin, což je činí méně stabilní vůči oxidaci než v případě nasycených syntetických fosfolipidů.

Fosfolipidy se skládají z hydrofilní fosfátové části a hydrofobní části složené z uhlovodíkových řetězců. Uhlovodíkové řetězce tvoří vnitřní část liposomu a fosfátová část tvoří vnější část dvojvrstvy. Hydrofilní část může být modifikována navázáním dalších látek, např. polyethylenglykolu (PEG), který se používá k prodloužení cirkulace liposomů v krvi.



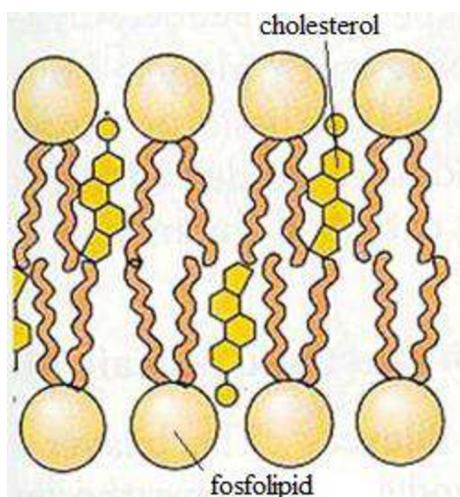
Obrázek 4: Schematické znázornění struktury fosfolipidu fosfatidylcholinu [10]

Důležitým kritériem pro výběr vhodných fosfolipidů je teplota fázového přechodu (T_c), která je definována jako teplota, při které je struktura fosfolipidové dvojvrstvy převedena z uspořádané gelové fáze do neuspořádané kapalně fáze. T_c závisí na délce uhlovodíkového řetězce, stupni nasycení, náboji a druhu polární skupiny. Použitím fosfolipidů s vyššími teplotami fázového přechodu získáme dvojvrstvy, které jsou stabilnější, čímž se snižuje možnost předčasného propuštění enkapsulované složky z liposomu. Na druhé straně v případě, že teplota fázového přechodu vybraných fosfolipidů je příliš vysoká, může docházet k denaturaci zapouzdřených léčiv při přípravě liposomů, která musí probíhat nad hodnotou T_c . Proto musíme dbát na to, aby vybrané fosfolipidy měly teplotu fázového přechodu takovou, která brání předčasnému úniku enkapsulovaných složek, ale umožňuje práci při teplotách, které nezpůsobují denaturaci enkapsulované složky [6].

Cholesterol

Fosfolipidová dvojvrstva si zachovává organizovanou strukturu, ale její jednotlivé složky v ní vykonávají několik různých způsobů pohybu. Mezi pohyby, které jsou vykonávány fosfolipidy v dvojvrstvě, patří rotace molekul, laterální pohyb („plutí“ v membráně) a flip-flop pohyb (překlápění molekul z jedné vrstvy fosfolipidů do druhé).

Cholesterol je složka, která se přidává do liposomů za účelem stabilizace fosfolipidové dvojvrstvy. Přítomnost cholesterolu ve fosfolipidové dvojvrstvě snižuje překlápění molekul lipidů způsobem flip-flop a snižuje jejich laterální pohyb v membráně. Přidaný cholesterol obecně stabilizuje fosfolipidovou dvojvrstvu. Obsah cholesterolu v liposomech bývá v rozmezí mezi 30–45 mol% v závislosti na požadované elasticitě a fluiditě dvojvrstvy. Cholesterol je v liposomu umístěn ve vnitřní části fosfolipidové dvojvrstvy a slouží k zaplnění mezer vytvořených z důvodu nedokonalého sbalení fosfolipidových molekul [6]. Cholesterol je v membráně orientován tak, aby jeho hydrofilní hydroxylová skupina směřovala k vodnému prostředí (viz. obrázek 5).



Obrázek 5: Uspořádání fosfolipidové dvojvrstvy s inkorovoaným cholesterolem [6]

3.2 Metody přípravy liposomů

V současné době existuje poměrně široká škála metod sloužících k přípravě liposomů. Typ zvolené metody významně ovlivňuje druh, velikost a homogenitu vznikajících liposomů a také jejich enkapsulační účinnost pro danou látku.

Vlastnosti, jako je jednotná velikost částic a dobrá koloidní stabilita jsou nezbytné pro liposomy, které mají být vyvinuty jako *in vivo* nosiče léčiv. Velikost liposomů má rozhodující vliv na kapacitu, obsah účinné látky, biodistribuci, rychlost clearance apod. Z tohoto důvodu je nezbytné, aby byl způsob přípravy liposomů reprodukovatelný. Jedním z hlavních parametrů hodnocení liposomálních preparátů jako nosičů léčiv je kontrola distribuce jejich velikosti a ζ -potenciál.

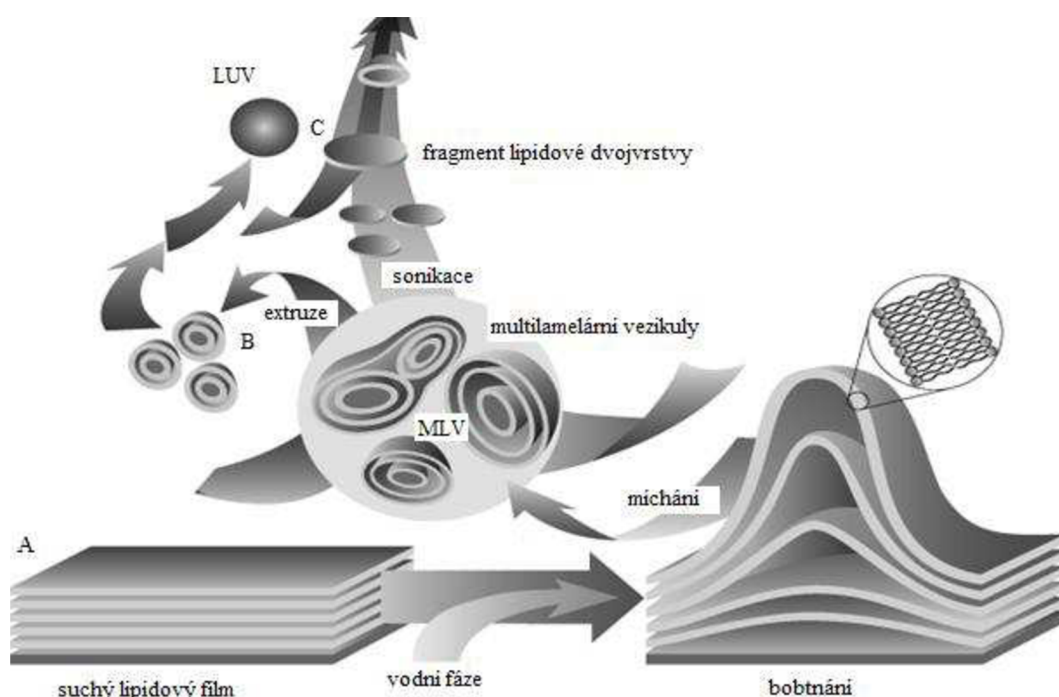
V této kapitole jsem popsala několik základních metod, které se nejčastěji používají pro přípravu liposomů [11].

3.2.1 Hydratace lipidového filmu

Tato metoda je založena na tvorbě liposomů hydratací tenkého lipidového filmu. Lipidový film je tvořen z více lipidových dvojvrstev naskládaných na sebe. Tyto vrstvy začnou důsledkem hydratace bobtnat a v průběhu míchání se zformují do MLV.

Prvním krokem při přípravě liposomů touto metodou je rozpuštění lipidů v organickém rozpouštědle, tak aby vznikla homogenní směs. Jako organické rozpouštědlo se nejčastěji volí chloroform nebo směs chloroformu a metanolu. Po důkladném rozpuštění a promísení lipidů v organickém rozpouštědle se rozpouštědlo odpaří na rotační odparce, čímž získáme tenký lipidový film. Hydratace suchého lipidového filmu se provádí prostým přidáním vodného média do baňky a promícháváním. Teplota hydratačního média by měla být nad T_c lipidů. Jako vhodné hydratační médium se používá destilovaná voda, tlumivé roztoky, fyziologický roztok nebo neelektrolyty, jako jsou např. roztoky sacharidů.

Produktem hydratace jsou MLV, jejichž velikost a morfologie může být upravena různými sekundárními procesy, např. sonikací, extruzí nebo vysokotlakou homogenizací, mikrofluidní homogenizací nebo mražením a rozmrazováním [11]. Teoretické modely přípravy liposomů vychází z hydratace fosfolipidové dvojvrstvy a následné vesikulace nebo jsou liposomy formovány z fragmentů lipidové dvojvrstvy. Procesy formování liposomů jsou znázorněny na obrázku 6.



Obrázek 6: Teoretický model mechanismů vzniku liposomů [11]. Na obrázku 6 je zobrazen jednotný koncept vzniku lipidových membrán a jejich fragmentů. Základní procesy vedoucí ke vzniku liposomů jsou: A) Hydratace suchého lipidového filmu vodnou fází, kdy dochází k bobtnání a v průběhu míchání ke zformování MLV; B) Transformace MLV na LUV mechanicko-fyzikálními procesy (např. extruze, vysokotlaká homogenizace); C) Tvorba fragmentů lipidní membrány (např. deskovité směsné micely) a jejich vesikulace (např. metoda odstranění detergentu, metoda proliposom-liposom). Vytvořené fragmenty lipidové dvojvrstvy jsou nestabilní a následně spontánně vesikulují za tvorby SUV a LUV.

3.2.2 Sonikace

Při sonikaci dochází k rozrušení MLV použitím zvukové energie za vzniku SUV s průměrem v rozmezí asi 15–50 nm. Pro přípravu liposomů lze využít dvou technik a to sonikační sondy nebo sonikační vodní lázně.

Při sonikaci pomocí sondy, je špička sonikátoru ponořena přímo do liposomové disperze. Tato technika je vhodná pro menší objemy vzorků. Její nevýhodou je, že v průběhu sonikace dochází k uvolňování energie a tím k přehřívání vzorku a případné oxidaci nenasycených lipidů. Nádoba se vzorkem tedy musí být umístěna v ledové lázni. Další nevýhodou je, že se ze sondy mohou uvolňovat titanové částice, které kontaminují vzorek.

Z těchto důvodů je používanější technikou sonikace ve vodní lázni, která se provádí umístěním zkumavky obsahující suspenzi ve vodní lázni po dobu 5–10 minut. Střední velikost a distribuce liposomů je ovlivněna složením a koncentrací liposomů, objemem vzorku, teplotou, dobou působení ultrazvuku a nastavením výkonu sonikátoru. Vzhledem k tomu je téměř nemožné reprodukovat podmínky při použití ultrazvuku. Rovněž vzhledem k vysokému stupni zakřivení SUV membrán, jsou tyto částice nestabilní a mohou spontánně tvořit větší vezikuly [12].

3.2.3 Extruze

Extruze je jednoduchá metoda sloužící k získání liposomů o určité velikosti. K extruzi se využívá extrudér s polykarbonátovými membránovými filtry. MLV liposomy jsou opakovaně protlačovány polykarbonátovými filtry s definovanou velikostí pórů za vzniku částic, které mají průměr o podobné velikosti, jako je velikost pórů použitého filtru. Tato metoda je jednoduchým a rychlým způsobem získání homogenního vzorku [13].

Pro extruzi může být použit ruční extrudér (viz. obrázek 7), který je vhodný pro menší množství vzorku nebo vysokotlaký extrudér (viz. obrázek 8) pomocí kterého lze extrudovat větší objemy.



Obrázek 7: Ruční extrudér LiposoFast (Avestin, Kanada) (laboratoř NanoPharm, VÚVeL Brno)



Obrázek 8: LIPEX 10 (Avestin, Kanada) (laboratoř NanoPharm, VÚVeL Brno)

3.2.4 Opakované zmrazování a rozmrazování

Tato technika spočívá v opakovaném rychlém zmrazení liposomů v kapalném dusíku nebo směsi suchého ledu s acetonem, a v následném rozmrazení nad teplotu fázového přechodu. K morfologickým změnám liposomů dochází důsledkem dehydratace polárních skupin fosfolipidů a vytvořením trhlin ve fosfolipidové dvojvrstvě působením ledových krystalků, které vznikají během zmrazení. Tímto způsobem lze připravit MLV nebo LUV s vysokým podílem vodné fáze ve vezikulech [14].

3.2.5 Vysokotlaká homogenizace

Vysokotlaká homogenizace je jednoduchá a rychlá metoda přípravy unilamelárních a oligolamelárních liposomů o průměru asi 30–80 nm v závislosti na použitém tlaku.

Při použití této techniky je vodná suspenze liposomů umístěna v komoře cely při laboratorní teplotě a je rychle protlačována při vysokém tlaku přes malý otvor. V jediném kroku se tak transformuje více než 70 % z extrudovaných liposomů na homogenní populaci. Liposomy připravené touto metodou jsou stabilní a tedy vhodné jako nosiče léčiv [15],[16].

3.2.6 Detergentová metoda

Tato metoda je založená na principu solubilizace lipidového filmu pomocí detergentu ve vodné fázi za vzniku směsných micel. Postupným a kontrolovaným odstraňováním detergentu z roztoku směsných micel dochází k jejich přeměně na diskovité micely. Splýváním a vezikulací diskovitých micel vznikají liposomy.

Detergent je možné odstranit ředěním, dialýzou, gelovou filtrací nebo adsorpcí. Liposomy připravené touto technikou jsou unilamelární a jejich velikost závisí na experimentálních

podmínkách jako je např. koncentrace fosfolipidů, počáteční poměr fosfolipidů a detergentu nebo rychlosti odstraňování detergentu.

K tvorbě liposomů touto technikou lze využít prakticky všechny lipidy. Z detergentů je nejpoužívanější sodná sůl kyseliny žlučové, alkyl(thio)glykosidy a alkyloxypolyethyleny. Výhodou této metody je vytvoření reprodukovatelných liposomů homogenní velikosti. Hlavní nevýhodou jsou stopy detergentu v liposomech [17],[19].

3.2.7 Etanolová nebo éterová injekce

Princip metody spočívá ve vstříknutí lipidů rozpuštěných v organické fázi (etanol nebo éter) do přebytku vodného média. Velkou výhodou je, že dochází ke vzniku SUV v jednom kroku, bez použití dalších metod jako je extruze nebo sonikace. Etanolová injekce má ale také řadu nevýhod, mezi něž patří to, že vzniklá populace liposomů je heterogenní (30–110 nm). Liposomy jsou velmi zředěné a je obtížné odstranit všechny etanol, protože tvoří azeotropickou směs s vodou.

Éterová injekční metoda se liší od etanolové tím, že éter je nemísitelný s vodnou fází. Vodná fáze je zahřívána nad bod varu éteru, čímž dochází k odstranění rozpouštědla z lipidové fáze. Výhodou éterového způsobu vstříkávání ve srovnání s metodou vstříkávání etanolu je tedy odstranění rozpouštědla z produktu [17],[18].

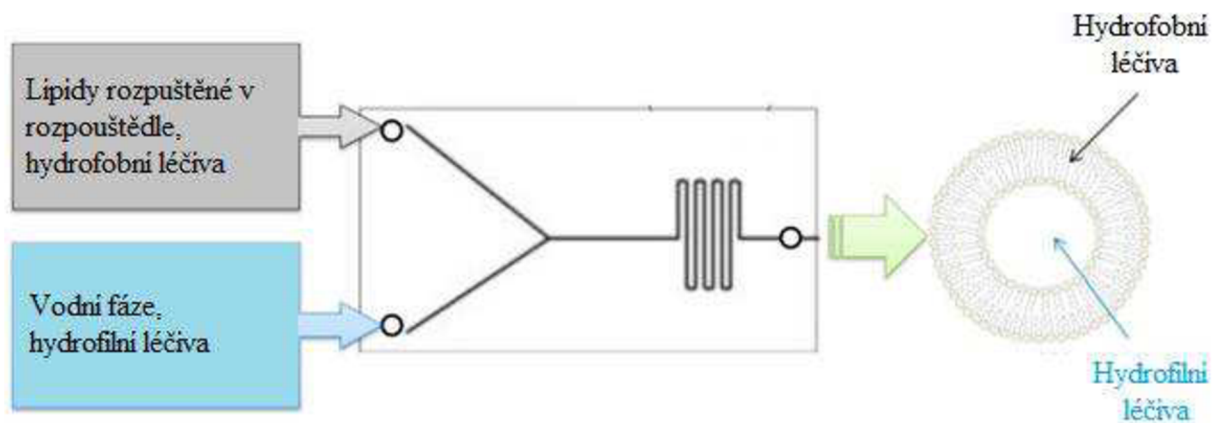
3.2.8 Nanofluidizace

Nanofluidizace je relativně nová oblast syntézy liposomů, která se uskutečňuje na směšovací kazetě opatřené mikrokanálkem. V principu je metoda podobná etanolové injekci, avšak mísení je provedeno nanofluidizací. Výhodou nanofluidních systémů je, že mají nízkou energetickou spotřebu a nízké výrobní náklady.

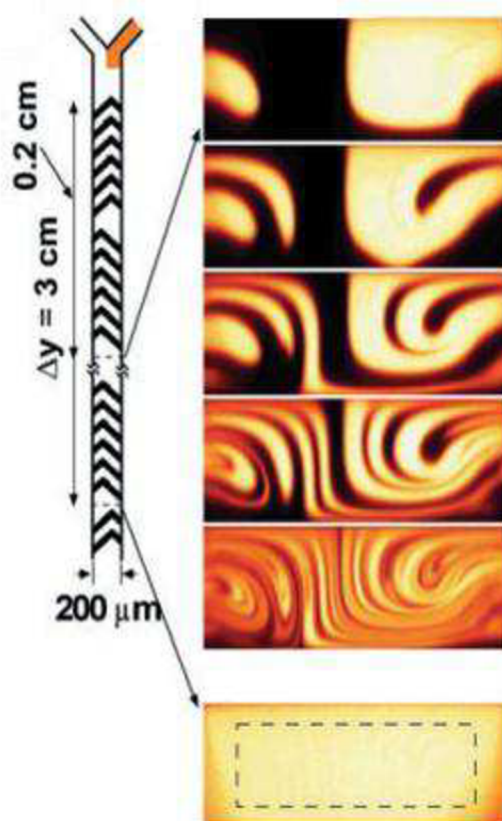
Při použití nanofluidního mísení je zapotřebí mikromixerů, nejčastěji mikromixerů na principu „*the staggered herringbone micromixer*“ (SHM). SHM je opatřen speciálně umístěnými šikmými drážkami na stranách kanálku. Šikmé drážky slouží k přepravě kapaliny od vrcholu struktury drážky ke spodnímu okraji mikrokanálku, čímž je zabezpečeno dostatečné promíchávání [20],[21]. Princip promíchávání a struktura kanálků je znázorněna na obrázku 10.

Principu SHM je využito i v přístroji Nanoassemblr™ (viz. obrázek 11), který umožňuje rychlou výrobu reprodukovatelných a homogenních nanočástic. Reakce probíhá ve směšovací kazetě se dvěma vstupními otvory, která je znázorněna na obrázku 9. Jedním otvorem vstupuje do kazety lipid rozpuštěný v organickém rozpouštědle, druhým vodný roztok. Smísení obou kapalin se uskutečňuje v mikrokanálcích opatřených drážkami, podporujícími mísení tekutin [22]. V důsledku míchání rozpouštědla a vodného média se zvyšuje polarita prostředí, což způsobuje to, že se postupně snižuje rozpustnost lipidů a dochází k jejich samouspořádání do rovinných lipidových dvojvrstev. S rostoucí velikostí těchto rovinných dvojvrstev, roste velikost povrchu hydrofobních řetězců, které se snaží minimalizovat kontakt s vodným prostředím. Dochází tedy k postupnému ohýbání dvojvrstev a jejich následné vezikulaci za tvorby liposomů [23].

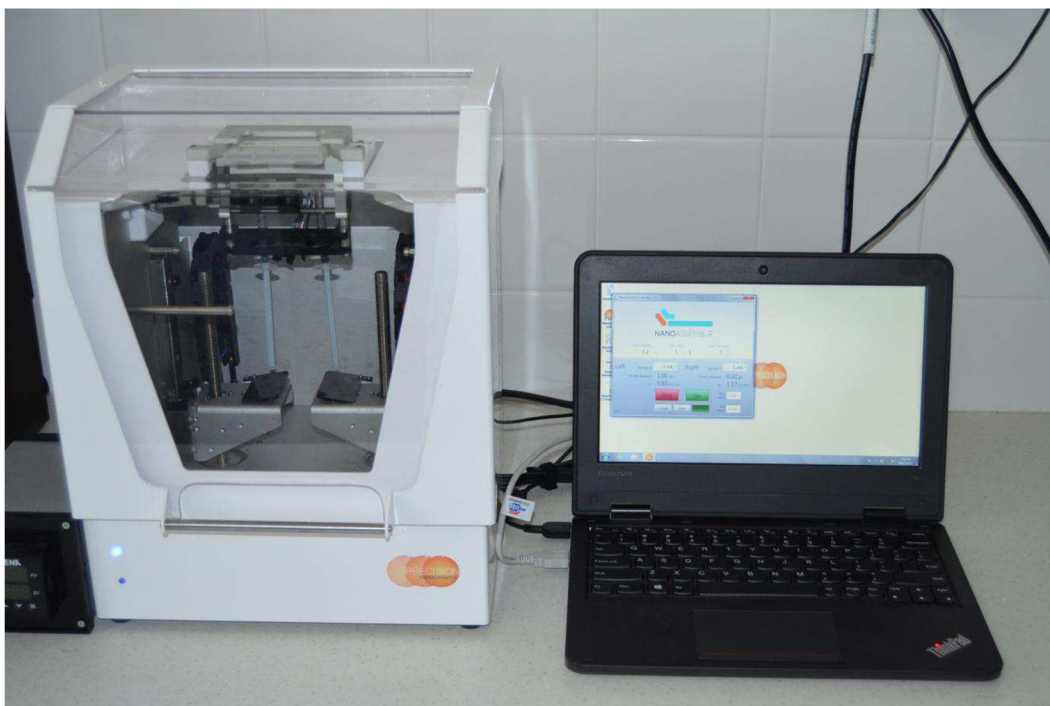
Aplikace nanofluidiky pro syntézu liposomů v zařízeních na bázi lab-on-a-chip dramaticky snižuje čas na přípravu vzorků a může být navíc plně softwarově řízena. Velikost liposomů je možno regulovat pomocí nastavení rychlosti průtoku a poměru organické a vodné složky [22]. Mezi kritické faktory při přípravě liposomů za použití nanofluidizace patří výběr vhodného rozpouštědla, koncentrace lipidů, iontová síla, pH a typ vodné fáze [24].



Obrázek 9: Princip přípravy liposomů na přístroji NanoAssemblr™ [25]



Obrázek 10: Schematické znázornění SHM a znázornění principu promíchávání směsi kapalin [26]



Obrázek 11: Nanoassemblr™ Banchtop (Precision Nanosystems, Kanada) (laboratoř NanoPharm, VÚVeL Brno)

3.3 Charakterizace liposomů

Jelikož jsou liposomy poměrně rozmanité, je pro jejich studium důležité blíže je charakterizovat a získat tak o nich základní informace. Liposomy lze charakterizovat nepřímou, například můžeme pomocí přístroje NanoSight NS500 nebo Zetasizer Nano ZSP změřit jejich velikost a ζ -potenciál. Přímé stanovení liposomů můžeme provést díky elektronové mikroskopii, která nám umožňuje určit například lamelaritu liposomů.

3.3.1 Zetasizer Nano ZSP

Zetasizer Nano ZSP (viz. obrázek 12) je zařízení určené k měření velikosti částic, jejich molekulové hmotnosti a ζ -potenciálu. Ke stanovení velikosti částic využívá dynamického rozptylu světla (DLS). DLS je neinvazivní metoda vhodná pro přesné stanovení velikosti částic v suspenzích.

Základem této techniky je měření fluktuace intenzity rozptýleného světla z laserového zdroje okolo její průměrné hodnoty. Tyto fluktuace jsou způsobeny interferenčním zeslabováním a zesilováním světla rozptýleného na částicích disperzní fáze, které podléhají Brownovu pohybu (Brownův pohyb je blíže popisován v kapitole 3.3.2). Čím rychlejší je pohyb částic, tím rychleji se intenzita rozptýleného světla mění. Rychlost změn fluktuace je tedy přímo závislá na pohybu molekuly. Velikost částic lze vypočítat pomocí difúzního koeficientu D prostřednictvím Stokesovy-Einsteinovy rovnice (rovnice č. 1).

$$D_H = \frac{k_B \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D}, \quad (1)$$

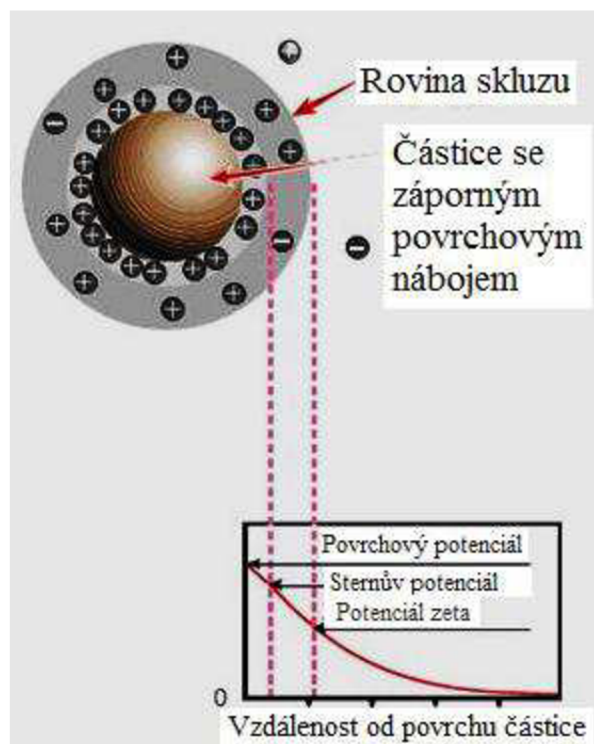
kde D_H je hydrodynamický průměr částice, D je difúzní koeficient, k_B je Boltzmannova konstanta, T je absolutní teplota a η je viskozita disperzního prostředí.

Získaný průměr částic je hydrodynamický průměr, což je průměr kulové částice, která by měla stejný difúzní koeficient jako částice měřená v systému. Výhodami této metody je její rychlost, jednoduchost měření, malá spotřeba vzorku a schopnost analýzy částic s rozměry od 0,6 nm do několika μm [27]. Horní limit velikosti částic pro měření pomocí DLS je dán sedimentací částic v roztoku.



Obrázek 12: Zetasizer Nano ZSP (Malvern, UK) (laboratoř NanoPharm, VÚVeL Brno)

Pomocí přístroje Zetasizer Nano ZSP lze také měřit ζ -potenciál neboli elektrokinetický potenciál. Princip spočívá v tom, že pokud vložíme nabitou částici do kapalného prostředí, dojde ke kompenzaci jejího náboje ionty rozpouštědla. Ionty, které jsou souhlasně nabitě, jsou od povrchu částice odpuzovány a naopak. Na povrchu částice tak dochází ke vzniku elektrické dvojvrstvy. Elektrická dvojvrstva je popsána několika modely, přičemž nejvíce používaný je Sternův model, jehož schéma je znázorněné na obrázku 13. Podle Sternova modelu můžeme elektrickou dvojvrstvu rozdělit na Sternovu vrstvu, která je tvořena protionty adsorbovanými na povrchu částice a difúzní vrstvu tvořenou protionty vázanými elektrostatickými silami, které neutralizují zbytek náboje částice. Při vložení napětí se částice začnou pohybovat k opačně nabitě elektrodě, přičemž dojde k rozdělení elektrické dvojvrstvy. Sternova vrstva a část difúzní vrstvy se bude pohybovat společně s částicí. Zbytek difúzní vrstvy se pohybuje s kapalinou. ζ -potenciál je tedy potenciál pohybového rozhraní mezi přiléhající vrstvou protiiontů a kapalinou [28].



Obrázek 13: Sternův model elektrické dvojvrstvy [28]

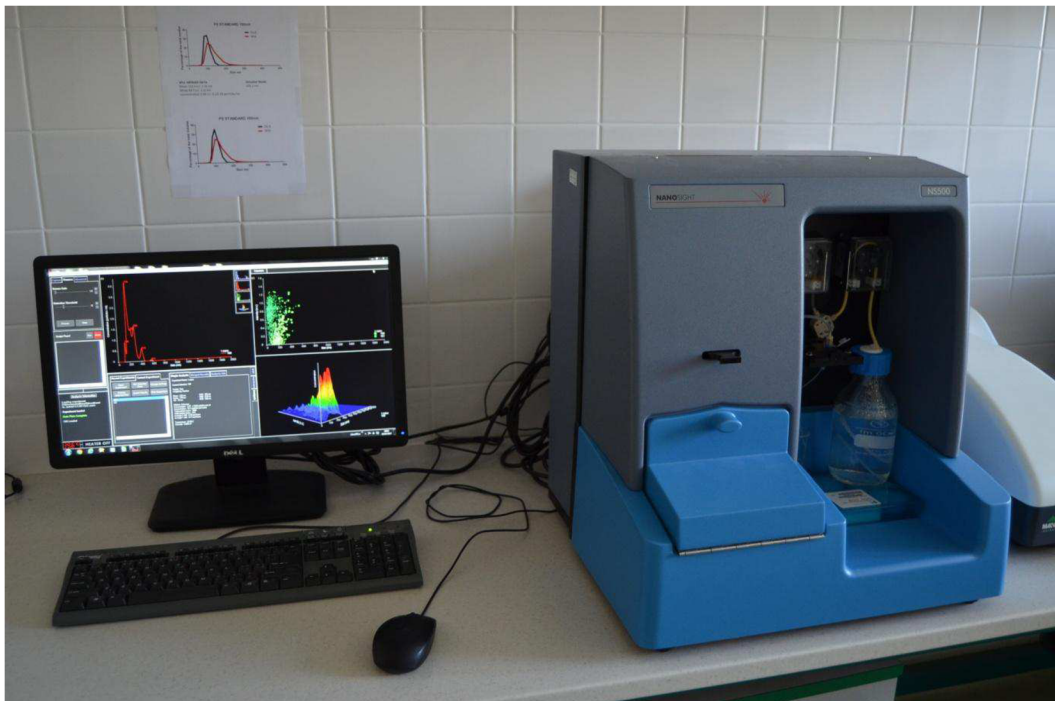
Metoda elektroforetického rozptylu světla měří rychlost pohybu částice v kapalině po vložení elektrického pole. Známe-li rychlost částice a velikost vloženého elektrického pole, můžeme při znalosti viskozity a dielektrické konstanty rozpouštědla vypočítat ζ -potenciál, který je významným faktorem určujícím stabilitu disperzního systému.

Stabilitu disperzního systému můžeme popsat pomocí Děrjaginovy, Landauemovy, Verweymovy a Overbeekemovy teorie (DLVO teorie). Podle této teorie je celková energie systému dána součtem přitažlivých a odpuzivých sil. Důsledkem Brownova pohybu se budou částice mezi sebou nepřetržitě srážet a následkem toho se mohou působením Van der Waalsových přitažlivých sil shlukovat. To může vést k tvorbě částic o větší velikosti, které jsou náchylné k sedimentaci. Proti shlukování částic působí odpuzivá síla, způsobená elektrostatickou repulzí. Tato síla zabrání, aby se k sobě dvě částice navzájem přiblížily a držely pohromadě. Jestliže odpuzivá síla převyší přitažlivou sílu, měl by být výsledný systém stabilní. Velikost této potenciálové bariéry může být vyjádřena velikostí ζ -potenciálu.

Nabývá-li hodnota ζ -potenciálu u všech částic v suspenzi vysokého kladného nebo záporného čísla, pak se budou tyto částice navzájem odpuzovat a nebudou mít žádnou tendenci se shlukovat. Mají-li částice nízké hodnoty ζ -potenciálu, pak odpuzování nebude dostatečné k tomu, aby zabránilo shlukování částic. Obecná dělicí hranice mezi stabilní a nestabilní suspenzí je ± 30 mV. Částice, které mají ζ -potenciál vně těchto mezí, nemají tendenci k agregaci a systém vykazuje stabilitu [29],[30].

3.3.2 NanoSight NS500

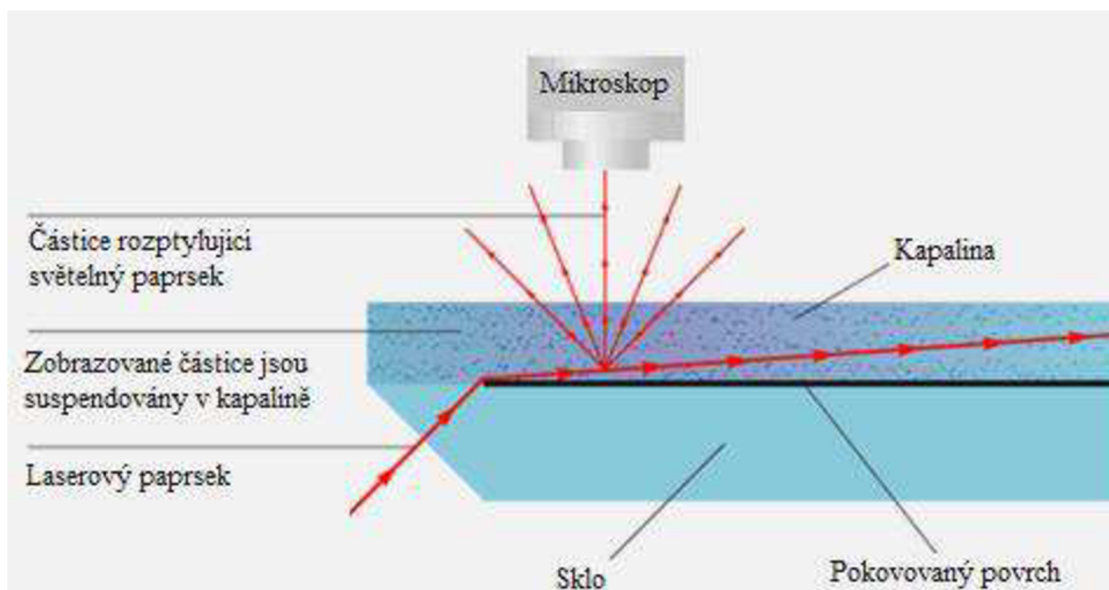
Přístroj NanoSight NS500 (viz. obrázek 14) využívá k analýze kombinaci rozptylu světla a Brownova pohybu. Tato metoda je v literatuře uváděna jako „*Nanoparticle Tracking Analysis*“ (NTA).



Obrázek 14: Přístroj NanoSight NS500 (Malvern, UK) (laboratoř NanoPharm, VÚVeL Brno)

Brownův pohyb je projevem tepelného pohybu částic. Vložíme-li částici o velikosti v řádech nanometrů až mikrometrů do kapalného nebo plynného prostředí, bude tato částice vykonávat nepravidelný pohyb. Tento pohyb je způsoben neustálými nárazy molekul prostředí do částice. V jednom okamžiku převáží nárazy z jedné strany částice a dochází k jejímu posunu určitým směrem. V další chvíli převáží nárazy z jiné strany a částice se posouvá jiným směrem [31].

Analyzované částice musí být rozpuštěny v rozpouštědle. Bez ohledu na to, jaké si zvolíme rozpouštědlo, musíme znát jeho viskozitu při teplotě měření. Jakmile se roztok obsahující částice nasaje do kanálku v měrné cele, aktivuje se laser. Částice v suspenzi, které vstupují do dráhy paprsku, rozptylují světlo. Ke zviditelnění částic nám slouží mikroskop umístěný nad kanálkem vybavený citlivou kamerou [32]. Princip této metody je také znázorněn na obrázku 15. Důležité je, že nevidíme samotné částice, ale body rozptylující světlo. Kamera následně zachycuje pohyb a trajektorii souboru částic pohybujících se v důsledku Brownova pohybu. Brownův pohyb každé částice je sledován na videu v reálném čase. Jakmile software NTA zanalyzuje daný vzorek, vypočítá střední kvadratický posun a z něj difúzní koeficient. Hydrodynamický poloměr částice lze poté vypočítat za použití Stokes-Einsteinovy rovnice (rovnice č. 1) [33].



Obrázek 15: Princip metody NTA [32]

3.3.3 Elektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie je metoda, která má velmi široké spektrum využití v materiálových i biomedicínských vědách. Struktury vybraného objektu jsou studovány ve vakuu za pomoci elektronového svazku vznikajícího emisí elektronů z katody, urychleného k anodě. Aby bylo dosaženo požadovaného zvětšení, je svazek elektronů fokusován elektrickým, magnetickým nebo elektromagnetickým polem. Svazek vytváří obraz interakcemi se sledovaným preparátem [34]. Elektronovou mikroskopii můžeme rozdělit podle fyzikální tvorby obrazu na dva základní druhy: transmisní a skenovací elektronovou mikroskopii. Porovnání principů obou typů EM je znázorněno na obrázku 16.

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

V transmisní elektronové mikroskopii pronikají elektrony preparátem. Interakcemi s preparátem jsou elektrony odchylovány od původního směru, kterým se pohyboval hlavní svazek. Tyto odchylené elektrony jsou pomocí clony ze svazku vyloučeny. Obraz je tvořen dopadem převážně neodchýlených elektronů na zobrazovací systém, kterým může být stínítko z luminiscenčního materiálu [34].

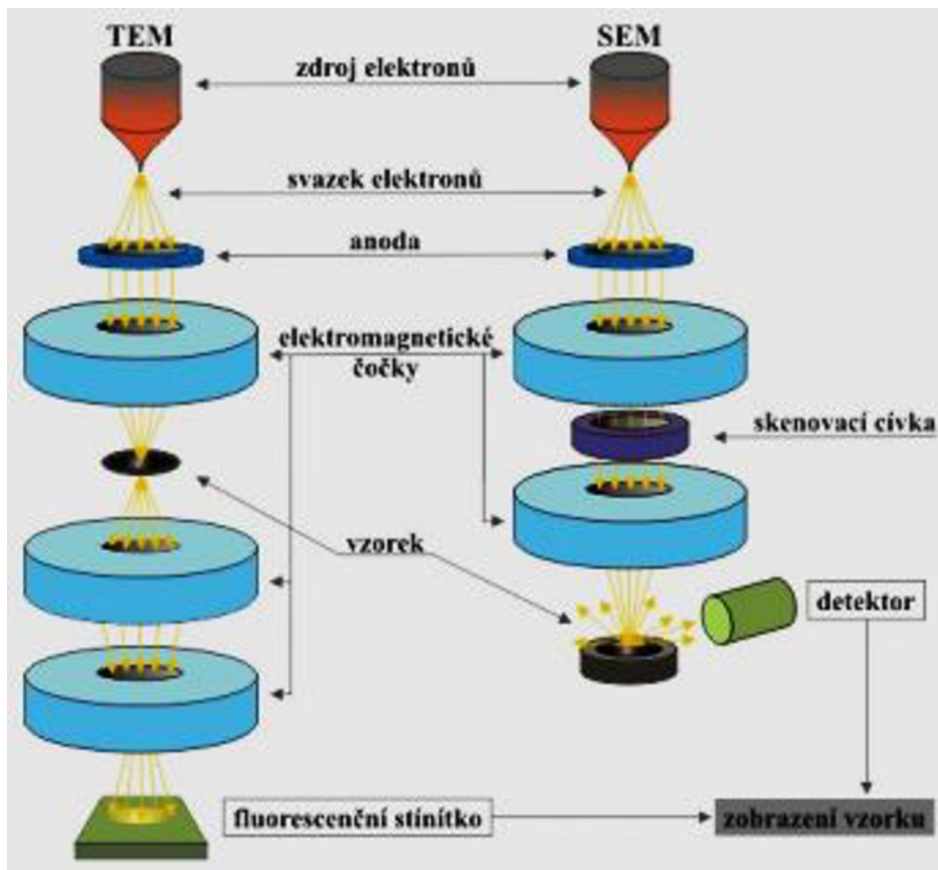
TEM se využívá v řadě vědních oborů, přičemž každé odvětví výzkumu používá pro přípravu vzorků specifické metody. Podmínkou je, že vzorky pro TEM musí být dostatečně malé (o průměru cca 3 μm) a dostatečně tenké ($\leq 0,5 \mu\text{m}$), aby nimi mohli procházet elektrony. K manipulaci se vzorkem se používají podložní síťky, které jsou vyráběny elektrogalvanickým leptáním z různých materiálů např. nikl, zlato, měď. Nejčastěji používanými síťkami ve výzkumu nanomateriálů jsou síťky měděné, potažené uhlíkovou vrstvou, která zabraňuje propadnutí vzorku skrz otvory v síťce [35].

K vizualizaci liposomů pomocí TEM se využívá metody negativního barvení, při které se pro zlepšení kontrastu liposomů se používá 2% roztok molybdenanu amonného.

Skenovací elektronový mikroskop

Skenovací elektronový mikroskop (SEM), který je často také označován jako rastrovací elektronový mikroskop (REM), je zařízení, jehož pomocí můžeme sledovat povrch zkoumaných objektů při velkém zvětšení.

Jak název napovídá, paprsek elektronů v preparátové komoře mikroskopu skenuje malou plošku na povrchu vzorku. Při interakci primárních elektronů uvolňovaných z elektronové trysky s hmotou dochází k vyražení sekundárních elektronů z atomů preparátu. Tyto sekundární elektrony se od primárních liší svojí energií, která je poměrně nízká. Vyražené elektrony jsou pomocí vhodného potenciálu přitahovány na detektory, které vytváří signál upravený pro zpracování v zobrazovacím systému. Zobrazovací systém je tvořený obrazovkou, na které se vytváří obraz vzniklý rastrováním elektronového paprsku po snímané ploše. Jsou-li detekovány emitované sekundární elektrony s velmi nízkou energií, dostane se jich k detektoru z vyvýšených oblastí na vzorku více než z prohlubní. Ve výsledném obrazu povrchu vzorku, tedy vyvýšené oblasti, budou světlé, zatímco prohlubně tmavé [36].



Obrázek 16: Porovnání principu mikroskopie [37]

3.4 Aplikace liposomů v léčbě nádorových onemocnění

Liposomy představují netoxické biokompatibilní nanočástice schválené FDA a EMA pro použití v humánní medicíně. Jako nosiče mohou liposomy ochránit léčivo před metabolickou degradací, prodloužit dobu jeho cirkulace, cílit léčivo k nádoru a kontrolovat jeho uvolnění v nádorové tkáni. Tyto faktory vedou ke snížení vedlejších toxických účinků cytostatik. Cílem enkapsulace cytostatik do liposomů je tedy zvýšení terapeutického indexu léčiv. Terapeutický index je poměr dávky léčiva, která vyvolá terapeutický účinek k dávce léčiva, která již navozuje toxické účinky. Pokud je terapeutický index nízký vyžaduje užití takovýchto látek monitoring, aby bylo dosaženo terapeutické dávky a současně i ochrany před toxickými účinky [38]. Hodnotu terapeutického indexu, lze vypočítat pomocí rovnice č. 2.

$$\text{Terapeutický index} = \frac{\text{TD}_{50}}{\text{ED}_{50}}, \quad (2)$$

TD_{50} je střední toxická dávka, což je dávka, při které se projeví toxicita u 50 % zkoumaných jedinců; ED_{50} je střední efektivní dávka, což je dávka, při které se projeví sledovaný efekt u 50 % zkoumaných jedinců [39].

Vznik nádorového onemocnění je složitý a vícestupňový proces, během něhož se normální buňka mění akumulací řady klíčových genetických a epigenetických mutací na nádorovou buňku. Rakovinné buňky se od normálních zdravých buněk odlišují v řadě vlastností [40]. Zde bych chtěla uvést osm hlavních charakteristických znaků, které nádorové buňky vykazují.

1. Nezávislost na růstových faktorech

Pro přechod normálních buněk z klidového stavu do aktivního proliferačního stavu je nezbytná přítomnost mitogenních růstových signálů. Nádorové buňky jsou schopny stimulovat signální dráhy, které jsou v normálních buňkách aktivní pouze v přítomnosti růstových faktorů [40].

2. Odolnost vůči antiproliferačním signálům

V normální tkáni navozují antiproliferační signály klidový stav buňky a udržují tak homeostázu. Tyto signály jsou způsobované inhibitory růstu, které se vážou na transmembránové receptory a blokuje proliferaci dvěma různými mechanismy:

- a. Buňky jsou převedeny z aktivního proliferačního stavu do klidové fáze G_0 ovlivněním aktivity proteinu pRb.
- b. Buňky mohou být indukovány k tomu, aby se trvale vzdaly proliferačního potenciálu tím, že vstoupí do postmitotického stavu [41].

3. Vzporování buněčné smrti tzv. apoptóze

U mnohobuněčného organismu jsou buňky vysoce organizovaným společenstvím. Počet buněk je přísně regulován řízením rychlosti buněčného dělení a řízením rychlosti buněčné smrti. Pokud již buňky nejsou potřebné, je aktivována apoptóza neboli programovaná smrt. Existují dvě hlavní apoptické dráhy:

Receptorová apoptóza je aktivována signálem z vnějšího prostředí buňky. Dochází k navázání signálu na tzv. receptory smrti. Následně dochází k trimerizaci receptoru a vytvoření komplexu zvaného DISK společně s FADD proteinem a prokaspázou-8. V DISK dochází k aktivaci kaspáz, čímž je propojena receptorová signální dráha s mitochondriální signální dráhou apoptózy indukovanou vnitřními signály v buňce jako je například poškození DNA nebo nedostatek růstových faktorů.

Mitochondriální apoptóza funguje jako buněčný senzor defektů replikace, zejména mutací DNA. Mitochondrie jsou orgány, které jsou nezbytné pro život buňky, jelikož se v nich uskutečňuje buněčné dýchání. Na druhou stranu jsou tyto orgány také schopny aktivovat buněčnou smrt. V mitochondriích je obsaženo velké množství kyslíkových radikálů a proapoptických molekul, které jsou za normálních okolností v mitochondriích uzavřeny. Mitochondriální apoptóza je spuštěna disrupcí vnější mitochondriální membrány a následným vyplavením volných radikálů a proapoptických molekul do cytosolu. Proapoptické molekuly aktivují kaspázy, které způsobují řízenou degradaci buněčných komponent. Dochází ke štěpení aktinu a jiných základních buněčných struktur, ke kondenzaci chromatinu a přeměně buněk na proapoptická tělíčka, která vykazují zvýšenou expresi fosfatidylserinu na vnější straně buněčné membrány. Fosfatidylserin je posléze rozpoznán makrofágy a dochází k fagocytóze buňky.

Mezi regulátory mitochondriální apoptózy patří proteiny rodiny BCL-2, které se dělí na proapoptické a antiapoptické. Mezi proapoptické patří proteiny BAK a BAX, které mají schopnost vytvářet póry ve vnější mitochondriální membráně, čímž dochází k úniku volných kyslíkových radikálů, cytochromu c a dalších proapoptických proteinů do cytosolu, a tím ke spuštění apoptózy. Antiapoptické proteiny blokují proapoptické proteiny BAK a BAX tím, že se na ně navážou. V mitochondriální apoptóze hraje důležitou roli také tumor supresorový protein p53, který může vyvolat apoptózu zvýšením exprese proapoptických BAX v odezvě na snímání poškození DNA. Právě mutace proteinu p53 bývá příčinou zástavy apoptózy u více než 50 % nádorových onemocnění [42].

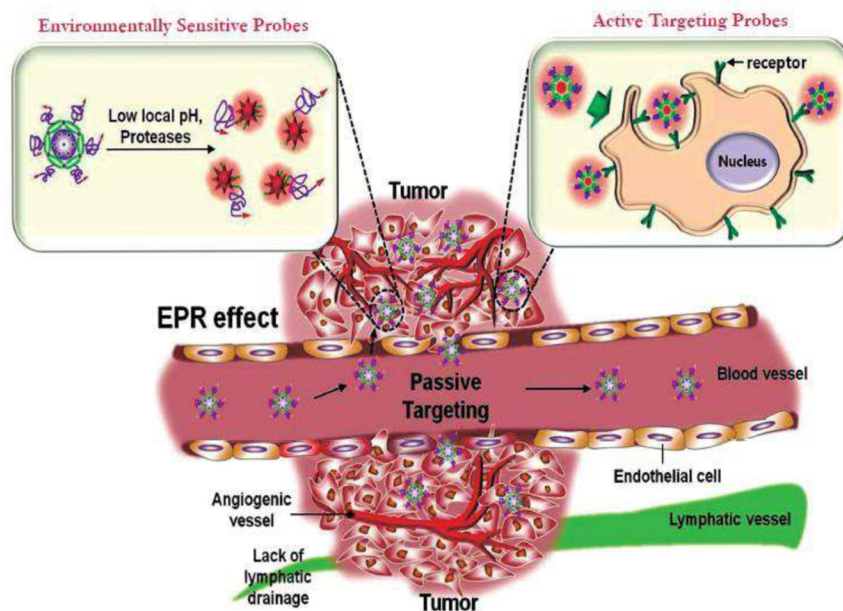
4. Vzдорování buněčné smrti

Je známo, že buňky mají omezený replikační potenciál tzv. Hayflickův limit. Jakmile buněčné populace dosáhnou určitého počtu dělení, přestanou růst. Tento děj je nazván stárnutí neboli senescence. Občas se však vyskytne varianta buňky, která získala schopnost se množit bez omezení. Důvodem nesmrtnosti těchto buněk je obnova telomer. V průběhu každého buněčného cyklu dochází ke ztrátě sekvencí telomerické DNA z konců každého chromozómu, což má za následek ztrátu jejich schopnost chránit konce chromozomální DNA. U nechráněné chromozomální DNA, dochází k end-to-end chromozomální fúzi, což vede ke smrti buňky. U zhoubných buněk dochází k expresi enzymu, který přidává hexanucleotidy na konce telomerické DNA, čímž dochází k zachování telomer [43].

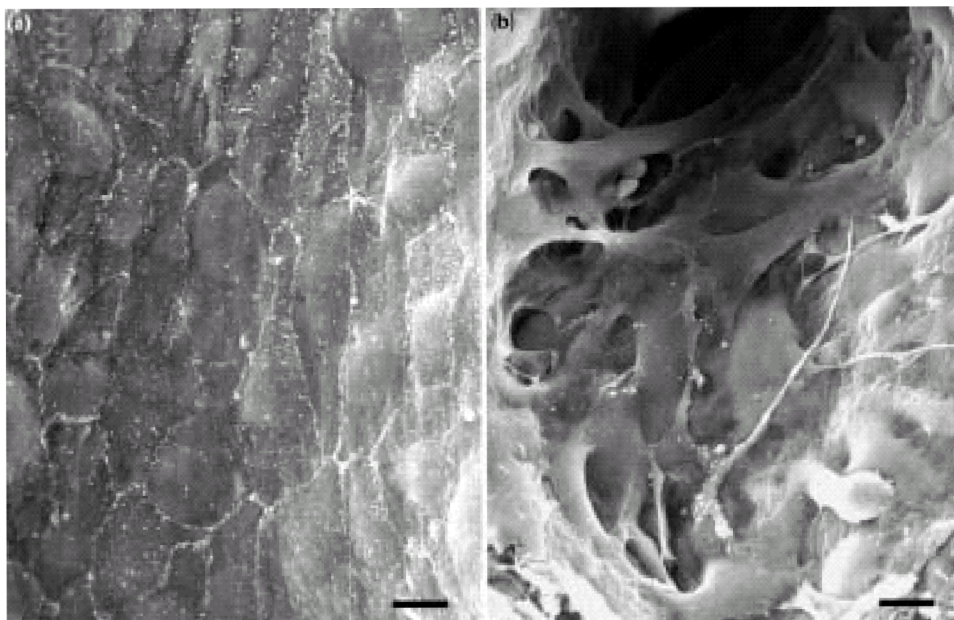
5. Indukce angiogeneze

Vzniklý nádor neustále roste a stává se tak čím dál více náročnější na spotřebu kyslíku a živin. Aby si nádorové buňky zabezpečily dostatek živin a kyslíku, začnou produkovat angiogenní hormony, které stimulují okolní tkáň k růstu cév. Dochází tedy k tvorbě kapilár

v tumoru a tím k dostatečnému přísunu živin. Tento děj se nazývá angiogeneze. Nově vytvořené cévy se však vyznačují defektem epitelových buněk, což způsobuje zvýšenou propustnost těchto cév pro molekuly o velikosti 150–200 nm (např. liposomy), které mají poté tendenci se hromadit v nádorové tkáni. Tento jev se nazývá efekt zvýšené propustnosti a zadržování (EPR efekt) a je znázorněn na obrázku 17 a 18 [43].



Obrázek 17: Na obrázku je vidět mechanismus EPR efektu. Je zde patrný průchod malých částic skrze defekty v epitelu kapilár nádorových buněk [44].



Obrázek 18: Snímek z EM znázorňuje plně funkční endoteliální výstelky cév (A) a fenestrace v endoteliální výstelce cévní kapiláry v nádoru (B) [45]

6. Změny energetického metabolismu

Nekontrolovatelná proliferace maligních buněk je charakteristická také úpravou energetického metabolismu. U normálních buněk dochází k aerobnímu odbourávání glukózy. Pro maligní buňky je charakteristické zpracovávat glukózu anaerobně. Tento jev byl pojmenován Warburgův efekt. Důvodem pro anaerobní metabolismus nádorových buněk je využívání meziproductů glykolýzy pro syntézu nukleových kyselin a aminokyselin, což umožňuje biosyntézu makromolekul a organel nutných pro tvorbu nových buněk [41].

7. Invazivnost, schopnost tvorby metastáz

K tvorbě metastáz dochází, když se z primární nádorové masy uvolňují buňky, které se šíří prostřednictvím krevního a lymfatického systému do celého těla. V různých částech těla mohou poté tvořit sekundární nádory tzv. metastázy. Schopnost invaze a tvorby metastáz umožňuje rakovinným buňkám, aby kolonizovaly další tkáně v těle, kde alespoň zpočátku, mají dostatek živin a prostoru pro růst [43].

8. Vyhýbání se imunitě

Nádorové buňky jsou pouze pod omezeným dohledem imunity. Imunitnímu systému se mohou vyhnout několika způsoby:

- a. Mohou změnit svoje povrchové struktury tak, že je imunitní buňky nejsou schopny rozeznat.
- b. Některé nádory produkují faktory inaktivující T-lymfocyty nebo jiné blokující faktory.
- c. Faktory produkované některými nádory přímo inhibují funkce nebo životnost dendritických buněk [45].

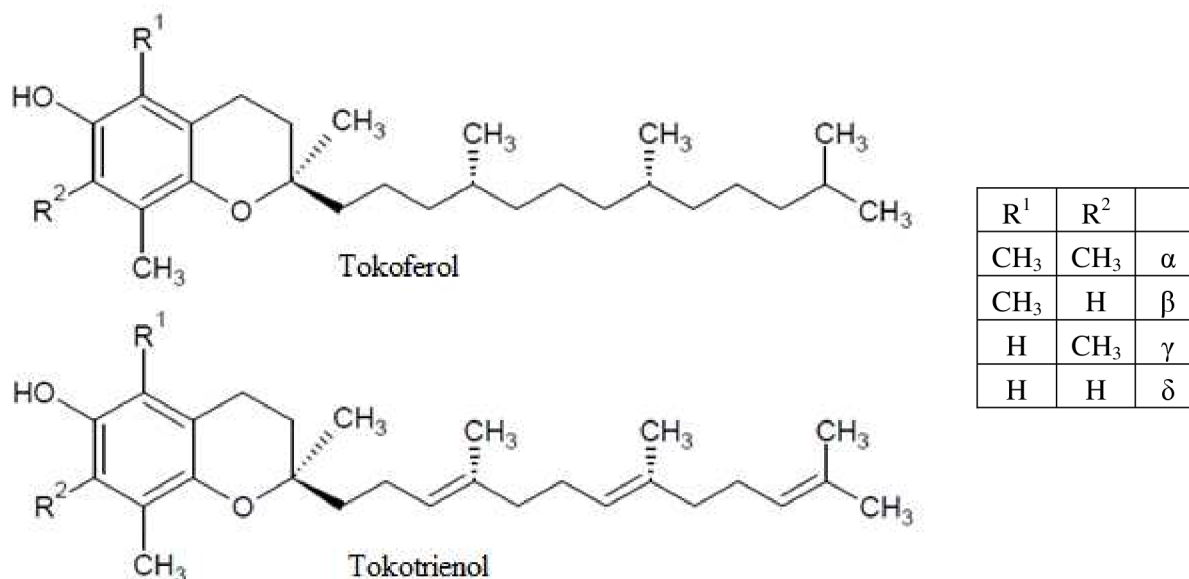
3.5 Hydrofobní cytostatika

Jako cytostatika se označují látky, které jsou používány k léčbě nádorových onemocnění. Jejich cílem je zastavení růstu nádorových buněk. Nevýhodou řady cytostatik je, že jejich působení není selektivní a postihuje i zdravé buňky, což vede k řadě nežádoucích vedlejších účinků. Dalším problémem je, že různé typy karcinomů mají odlišnou citlivost vůči jednotlivým cytostatikům. Proto je neustálá snaha, objevovat cytostatika nová, která budou účinnější a selektivnější, což je předpoklad k potlačení vedlejších účinků. V současné době je viděn velký potenciál v derivátech vitamínu E (VE) [38].

3.5.1 Vitamín E

Vitamín E je souhrnný název pro tokoferoly, které mají nasycený postranní řetězec a tokotrienoly, které mají nenasycený postranní řetězec. Existují čtyři tokoferolové a čtyři tokotrienolové izomery, které se liší polohou a počtem metylových skupin. Všechny jsou však tvořené chromanolovým kruhem a hydrofobním fytylovým vedlejším řetězcem, který způsobuje nerozpustnost těchto látek ve vodě a naopak jejich dobrou rozpustnost v tucích. Na chromanovém kruhu je připojena jedna hydroxylová skupina, která je dárce vodíkových atomů a umožňuje tak antioxidační účinek; a metylové skupiny, jejichž různý

počet určuje konkrétní tokoferol/tokotrienol. Chemické vzorce tokoferolů a tokotrienolů jsou znázorněny na obrázku 19.



Obrázek 19: Deriváty vitamínu E [47]

Vitamín E se řadí do skupiny vitamínů rozpustných v tucích, snadno tedy proniká do buněčných membrán a stává se jejich součástí. Jeho přítomnost v membránách umožňuje vychytávání volných kyslíkových radikálů a ochranu polyenových mastných kyselin obsažených ve fosfolipidech tvořících membrány. Oxidace polyenových mastných kyselin by mohla způsobit nevratné narušení či ztrátu funkce membrány, což by vedlo k poškození buňky. Další funkcí tokoferolu je podobně jako u cholesterolu zvýšení stability membrány [47].

3.5.2 Deriváty vitamínu E

Nedávné studie prokázaly, že některé deriváty vitamínu E indukují apoptózu, inhibují angiogenezi a vykazují antiproliferační aktivitu *in vitro*. Proto jsou deriváty VE v současné době velmi atraktivním tématem a je prováděna řada výzkumů, které se zaměřují na pochopení mechanismu protinádorového účinku těchto látek. V této kapitole se pokusím shrnout dosavadní poznatky o těchto látkách [38].

Inhibice angiogeneze

Bylo zjištěno, že deriváty vitamínu E inhibují angiogenezi. Inhibice angiogeneze souvisí se schopností derivátů VE ovlivnit přenos elektronů v dýchacím řetězci maligních buněk, tím že vytěšňují ubiquinon uvnitř mitochondriálního komplexu II. Absence elektronového akceptoru má za následek reakci elektronů dýchacího řetězce s molekulárním kyslíkem za vzniku peroxidů (ROS). Vysoká hladina ROS indukují apoptózu a inhibuje proces angiogeneze [49].

Inhibice proliferace

Deriváty VE zabraňují proliferaci nádorových buněk inhibicí cyklinu A vazbou na transkripční faktor E2F. Cyklin A se účastní S fáze buněčného cyklu a regulace vstupu do mitózy. Exprese cyklinu A je spuštěna mitogenními signály přes fosforylaci Rb proteinu a transkripčního faktoru E2F. Blokací transkripčního faktoru E2F, tedy dochází k inhibici cyklinu A, a tím k inhibici buněčného cyklu [50].

Selektivní účinek

Bylo prokázáno, že deriváty vitamínu E vyvíjejí selektivní toxicitu vůči nádorovým buňkám a pouze nízkou toxicitu vůči buňkám nenádorovým. Důvody selektivity derivátů VE nejsou zatím známy, ale předpokládá se, že souvisí s rychlou proliferací a se zrychlením buněčného cyklu nádorových buněk [50].

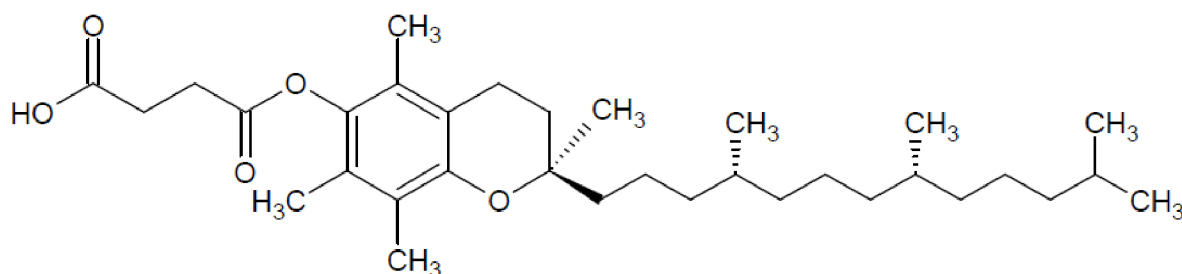
Indukce apoptózy

Přítomnost derivátů VE, vyvolává spuštění proapoptotických signálů vedoucích k destabilizaci mitochondrií, jejichž dysfunkce vede k programované buněčné smrti.

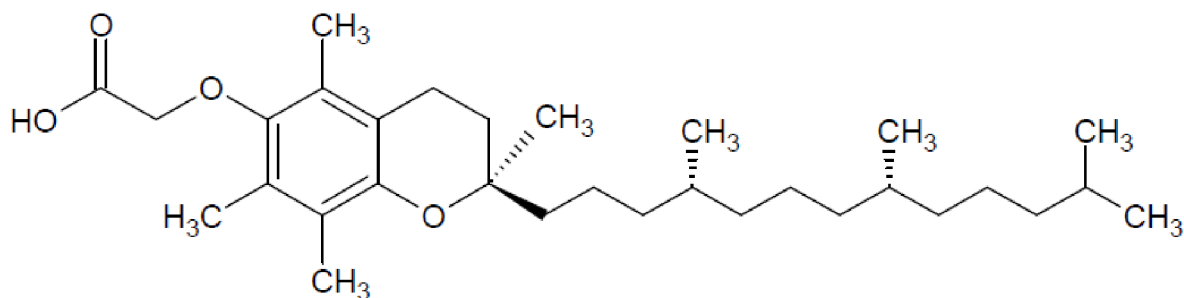
Mezi regulátory mitochondriální apoptózy patří proteiny rodiny BCL-2. Pro normální funkci BCL-2 je nezbytná fosforylace serinového zbytku na pozici 70. Jedná se o dynamický proces, v němž účinkují dva antagonistické enzymy: proteinová kináza C (PKC) a proteinová fosfatáza 2A (PP2A). Aktivace mitochondriální PP2A, která zapříčiňuje defosforylaci BCL-2 je jednou z možných cest vedoucích ke smrti buňky apoptózou. Předpokládá se, že chromanolový kruh derivátů VE ovlivňuje PP2A/PKC aktivitu, a tím indukuje mitochondriální apoptózu [51].

Další možností je, že deriváty VE způsobují apoptózu nádorových buněk tím, že prodlouží aktivitu kinázy JNK, která hraje roli při translokaci BAK do mitochondrií, což má za následek zvýšenou mitochondriální propustnost membrány související s uvolněním volných kyslíkových radikálů a proapoptických molekul do cytosolu buňky a iniciací mitochondriální apoptózy [52].

Mezi deriváty vitamínu E, kterými se budu ve svojí práci zabývat, patří α -TOS a α -TEA, jejich chemické vzorce jsou znázorněné na obrázku 20 a 21.



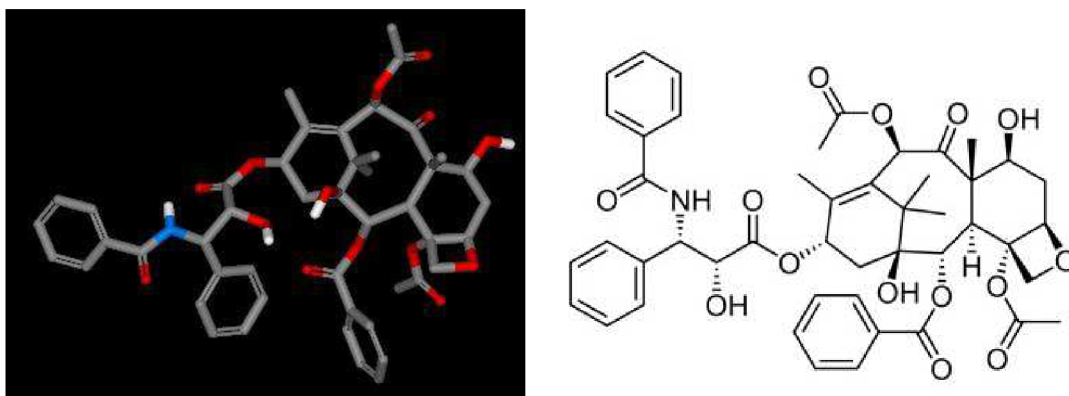
Obrázek 20: Strukturální vzorek α -TOS



Obrázek 21: Strukturní vzorek α -TEA

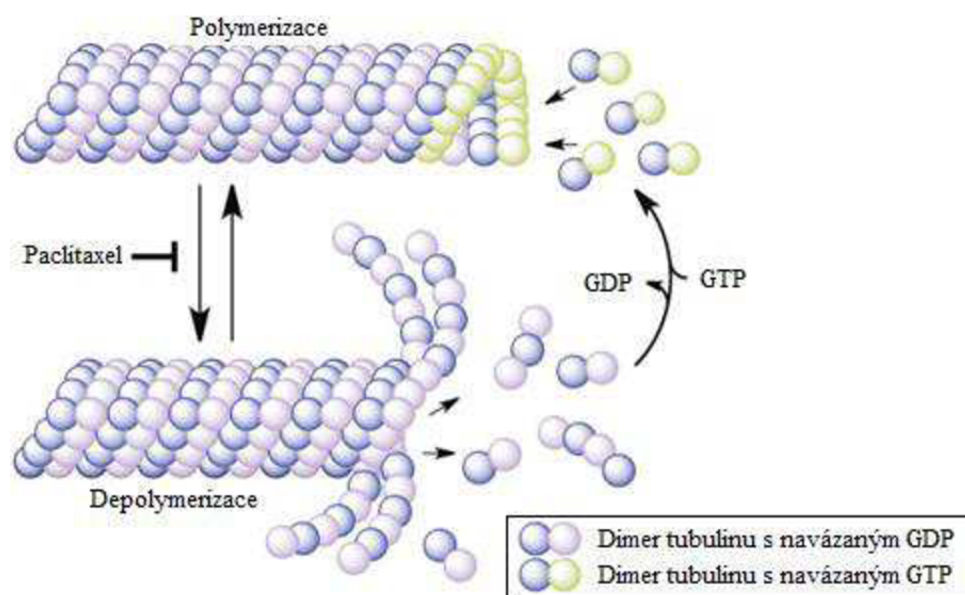
3.5.3 Paclitaxel (Taxol)

Struktura chemického vzorce paclitaxelu (5 β ,20-epoxy-1,2 α ,4,7 β ,10 β ,13 α -hexahydroxytax-11-en-9-one 4,10-diacetate 2-benzoate 13-ester with (2R,3S)-N-benzoyl-3-phenylisoserine) je znázorněn na obrázku 22 [53].



Obrázek 22: Chemický vzorec Paclitaxelu [53]

Paclitaxel je diterpenoid získávaný z jehličí a kůry tichomořského tisů (*taxus brevifoliae*), který se řadí mezi taxany, což jsou látky se schopností inhibice depolymerace mikrotubulů. Mikrotubuly jsou vlákna cytoskeletu, která slouží k transportu různých struktur a látek uvnitř buňky. Zastávají také klíčovou úlohu při správné migraci chromozomů při mitóze. Mikrotubuly jsou tvořené polymerací podjednotek α a β tubulinu. Poškození tvorby a funkce mikrotubulů je v případě taxanů tedy způsobeno inhibicí jejich depolymerace, což urychluje jejich tvorbu a stabilizuje již vytvořené mikrotubuly. Dochází tak k zástavě buněčného cyklu v G₂/M kontrolním bodu, zároveň dochází ke spuštění apoptózy [42]. Princip cytotoxických vlastností paclitaxelu je znázorněn na obrázku 23.



Obrázek 23: Polymerace a depolymerace mikrotubulů [48]

Paclitaxel je hydrofobní molekula, která je komerčně používána pod názvem Taxol, což je paclitaxel rozpuštěný ve směsi Cremophoru EL (polyetoxylovaný ricinový olej) a bezvodého etanolu v poměru 1:1. Tento lék je schválen pro léčbu rakoviny prsu a vaječníků. Cremophor je však spojován s řadou vedlejších účinků zahrnující přecitlivělost, nefrotoxicitu a neurotoxicitu. Ačkoli premedikace kortikoidy a antihistaminiky snižuje výskyt závažných hypersenzitivních reakcí, dosud bylo zjištěno, že mírnější reakce se vyskytují u 5–30 % léčených pacientů. Kromě toho Cremophor EL může způsobit vyluhování di-(2-ethylhexyl)ftalátu (DEHP) z nádob vyrobených z měkčeného polyvinylchloridu (PVC). DEHP je potenciální hepatotoxin, karcinogen, teratogen a mutagen. Proto musí příprava, uchování a podávání přípravku probíhat v zařízeních neobsahujících PVC [54].

Jelikož je paclitaxel hydrofobní látka, začleňuje se do liposomální dvojvrstvy liposomů. Pro přípravu liposomů, které budou transportovat paclitaxel je vhodnější využít nenasyčených lipidů, protože objemná hydrofobní a asymetrická molekula PTX může způsobovat deformaci liposomů složených z lipidů nasycených. Tyto lipidy se brání tím, že paclitaxel z liposomu vytlačují a dochází ke vzniku jehlicových krystalů paclitaxelu, což je nežádoucím jevem pro farmakologické aplikace. U liposomů tvořených z nenasyčených lipidů naopak paclitaxel svojí přítomností stabilizuje lipidovou dvojvrstvu [53].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie

1) *Lipidy:*

EPC: čistota ≥ 99 %, Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)

SoyPC: čistota ≥ 95 %, Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)

DSPC: čistota > 99 %, Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)

MOPC: čistota > 99 %, Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)

SOPC: čistota > 99 %, Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)

POPG: čistota > 99 %, Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)

Cholesterol: čistota ≥ 99 %, Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

2) *Hydrofobní cytostatika:*

α -Tos: čistota ≥ 95 %, Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

α -TEA: čistota ≥ 95 %

PTX: čistota 97 %, HPLC, Hauser Chemical Research Inc. (Boulder, CO-USA)

3) *Pufry:*

PBS (16 g NaCl; 0,4 g KH_2PO_4 ; 0,4 g KCl; 0,4 g $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)

Tris: čistota min. 99,9 %, SERVA (Heidelberg, Německo)

4) *Další chemikálie:*

EtOH (abs.): (Penta, ČR)

Chloroform: (Penta, ČR)

Sacharosa: (Penta, ČR)

4) *Růstové médium:*

GE Healthcare life sciences, HyClone™ DMEM/ High glucose (US)

4.2 Přístrojové vybavení

Nanoassemblr™ Benchtop: Precision Nanosystems, Kanada

Zetasizer Nano ZSP: Malvern, UK

NanoSight NS500: Malvern, UK

Rotační vakuová odparka – Heidolph, Německo

Lipex 10 (Avestin, Kanada)

Ruční extrudér LiposoFast (Avestin, Kanada)

Elektronový mikroskop: Philips 208S Morgagny, Holandsko

Světelný mikroskop: Nikon Eclipse T 200, Japonsko

Lyofilizátor: Lyovac GT 2 (Finn-AQUA, Finsko)

UV-VIS spektrofotometr (Cary 50 Probe, USA)

4.3 Buněčné linie

A549 (lidská plicní nádorová linie) (ATCC)

MCF-7 (lidská nádorová linie prsu) (ATCC)

4.4 Metody

4.4.1 Příprava liposomů metodou nanofluidizace

Pro přípravu liposomů byl použit Nanoassembler™ Benchtop. Lipidy v odpovídajícím poměru a hydrofobní cytostatikum jsem rozpustila v absolutním etanolu. Jako vodnou fázi jsem použila fosfátový pufr PBS pH 7 nebo Tris 5 mM pH 7. Poměr mezi vodnou a organickou fází (FRR) jsem měnila od 5:1 do 1:1 a celkový průtok (TFR) od 4 do 11 ml·min⁻¹. Liposomy jsem připravovala nad teplotou fázového přechodu použitých lipidů.

4.4.2 Příprava liposomů metodou hydratace lipidového filmu

Směs lipidů v odpovídajícím poměru jsem rozpustila společně s hydrofobním cytostatikem v chloroformu. Posléze jsem směs převedena do baňky s kulatým dnem a rozpouštědlo odpařila za použití vakuové odparky nad teplotou fázového přechodu lipidů při tlaku 50 mBar. Vzniklý lipidový film jsem hydratovala fosfátovým pufrem nebo Tris (5 mM, pH 7). Vzniklé liposomy jsem extrudovala nad teplotou fázového přechodu lipidů, přes polykarbonátové filtry o velikosti pórů 400 nm, 200 nm a 100 nm.

4.4.3 Příprava volného cytostatika

Navázila jsem vhodné množství cytostatika, v závislosti na požadované výsledné koncentraci v růstovém médiu, ve kterém byly kultivovány nádorové buněčné linie. Navážku jsem rozpustila v 100 µl absolutního etanolu a doplnila na požadovanou koncentraci médiem. Směs jsem dala na 15 minut sonikovat. Konkrétní hodnoty pro daná cytostatika jsou v kapitole výsledky (viz. kapitola 5.9.).

4.4.4 Charakterizace částic

Velikost částic, polydisperzitu a ζ-potenciál liposomů jsem stanovovala metodou DLS a mikroeletroforézou za použití přístroje Zetasizer Nano ZS. Měření se uskutečňovalo ve fosfátovém pufru PBS a 5 mM Tris pH 7 při teplotě 25 °C. Velikost liposomů jsem také pozorovala na přístroji NanoSight NS500. Pro měření jsem musela připravené liposomy zředit 10 000x.

K vizualizaci liposomů jsem využila transmisní elektronové mikroskopie. Vzorek liposomů jsem připravila za využití metody negativního barvení. Liposomy jsem nanasla na karbonovou mřížku potaženou vrstvičkou mědi. Následně jsem přidala 2% roztok molybdenanu amonného. Morfologii a velikost připravených liposomů jsem pozorovala na Philips-Morgagni elektronovém mikroskopu.

4.4.5 Kvantifikace lipidů

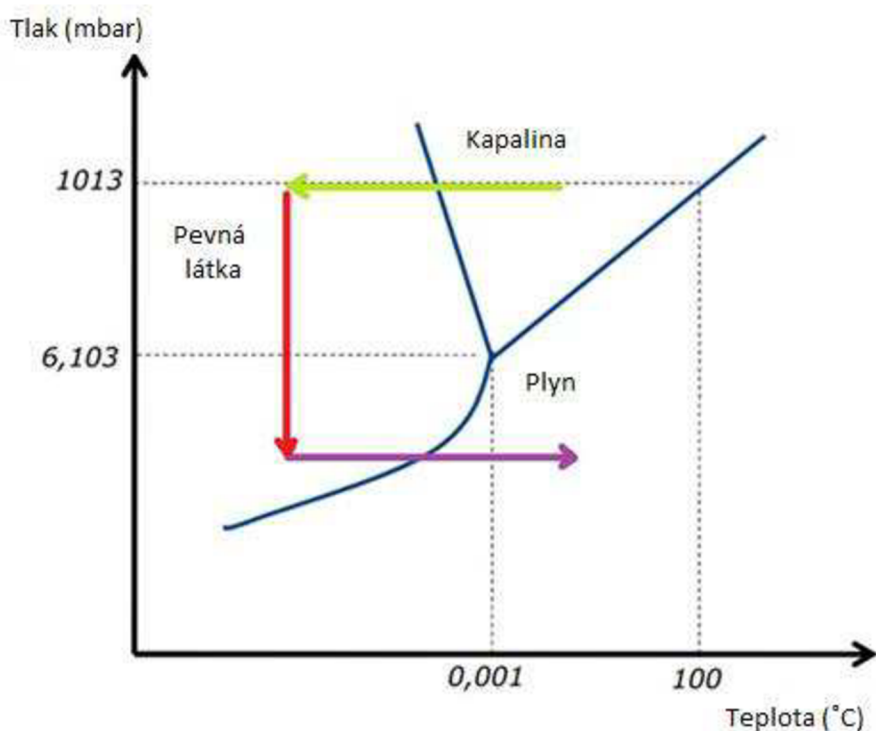
Obsah fosfolipidů v připravených liposomech jsem kvantifikovala pomocí Stewartova testu. Stewartův test je založen na schopnosti fosfolipidů vytvářet komplex s ferothiokyanátem draselným, který přechází do organické fáze.

Postup: Jako reakční činidlo jsem použila 0,1 M roztok thiokyanatoželezitanu draselného. Roztok jsem připravila rozpuštěním $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ a KSCN ve vodě v molárním poměru 1:2,5. Dále jsem si připravila kalibrační křivku z EPC rozpuštěného v chloroformu (0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 a 0,05 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Ke každé koncentraci jsem přidala 1 ml reakčního činidla. Směs jsem 15 s vortexovala a poté jsem ji nechala 5 min odstředit v centrifuze při 1000 ot./min. Pro další postup jsem odebrala spodní chloroformovou fázi. Organickou fázi jsem změřila na UV-VIS. Proměřila jsem celé spektrum v rozsahu od 300 do 600 nm. Poté jsem odečetla absorbance pro maximum při vlnové délce 472 nm.

Vzorek liposomů o koncentraci 0,1 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ jsem připravila metodou nanofluidizace (FRR 5:1, TFR 7 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$) v 5 mM Tris, pH 7. Složení liposomů bylo 60 mol% EPC, 30 mol% cholesterolu a 10 mol% α -Tos. Liposomy jsem poté smísila s chloroformem tak, aby obsah EPC v liposomech byl v rámci kalibrační křivky. Přidala jsem 1 ml reagentu a směs jsem 15 s vortexovala a poté jsem ji nechala 5 min odstředit v centrifuze při 1000 ot./min. Pro další postup jsem odebrala spodní chloroformovou fázi. Organickou fázi jsem změřila na UV-VIS. Ze závislosti absorbance na koncentraci jsem sestrojila kalibrační křivku, kterou jsem proložila lineární regresí, ze které jsem vypočetla koncentrace vzorku. Kalibrační křivka je průměrem dvou hodnot absorbance. Stejně tak vzorek je průměrem dvou hodnot [56].

4.4.6 Lyofilizace

Lyofilizace je metoda odstranění vody ze vzorku sublimací. Tato metoda zajišťuje stabilitu vzorků při dlouhodobém skladování. Proces lyofilizace má tři kroky: Zamrazení, čímž je materiál převeden do pevného skupenství. Poté je vzorek umístěn do lyofilizátoru, kde je vakuum, čímž se dostaneme pod hodnotu trojného bodu. V posledním kroku nazývaném sušení je dodána taková energie, aby došlo k sublimaci vody obsažené ve vzorku. Schéma celého procesu je přehledně znázorněné na obrázku 24 [57].



Obrázek 24: Fázový diagram pro proces lyofilizace [57]

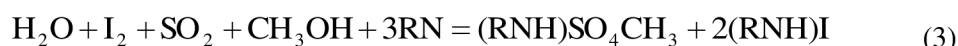
Postup: Liposomy připravené nanofluidizací jsem smísila s odpovídajícím množstvím sacharózy, které působí jako kryoprotektant (zabraňuje agregaci a fúzi připravených liposomů). Molární poměr liposomů a sacharózy byl 1:5, 1:7 a 1:9. Jeden vzorek jsem připravila bez obsahu sacharózy. Směs kryoprotektantu a vzorku jsem sterilizovala filtrací přes filtr o velikosti pórů 0,22 μm . Připravený roztok jsem rozpipetovala do 2 vialek (jednu pro stanovení stability a jednu pro stanovení obsahu zbytkové vody Karl-Fischerovou titrací), do každé po 1 ml vzorku. Vialky jsem zvažila před a po naplnění vzorkem a jejich váhu jsem zaznamenala. Poté jsem vialky zamrazila na teplotu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posléze jsem vzorky lyofilizovala za použití Lyovac GT2. Lyofilizace probíhala 24 hodin při tlaku 8 Pa. Lyofilizované vzorky jsem uschovala do chladničky při teplotě $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro budoucí studování stability [55].

4.4.7 Studium stability

Získaný lyofilizát sloužící pro stanovení stability jsem hydratovala 1 ml 5 mM Tris, pH 7 a jeho velikost a ζ -potenciál jsem proměřila na Zetasizeru Nano ZSP.

4.4.8 Stanovení zbytkové vody

Zbytkovou vodu obsaženou v lyofilizovaném vzorku jsem stanovila Karl-Fischerovou titrací za použití volumetrického TitroLine KF titrátoru (Metler, Toledo). Tato metoda je založena na principu jodometrického stanovení vody v roztoku metanolu, imidazolu, jódu a oxidu siřičitého podle rovnice č. 3 [58]



Postup: Z rozdílu hmotností prázdné vialky a vialky s lyofilizátem jsem si vypočetla množství lyofilizátu a přidala k němu známé množství reakční směsi prostřednictvím stříkačky přes septum. Po rozpuštění lyofilizátu jsem odebrala známé množství rozpuštěného vzorku a převedla jej do Karl-Fisherovy titrační nádoby. Zaznamenala jsem si obsah vody ve vzorku.

4.4.9 Rozmrazování buněčných linií

Buňky jsem rychle rozmrazila ve vodní lázni při 37 °C a převedla do PBS. Poté jsem pufr odstředila a slila. Vzniklá paletka je převedla do kultivační nádoby o objemu 25 ml naplněnou 15 ml média. Buňky jsem dále nechala kultivovat v termostatu při teplotě 37 °C, 5 % CO₂ a 95 % vzdušné vlhkosti.

4.4.10 Pasážování buněčných linií

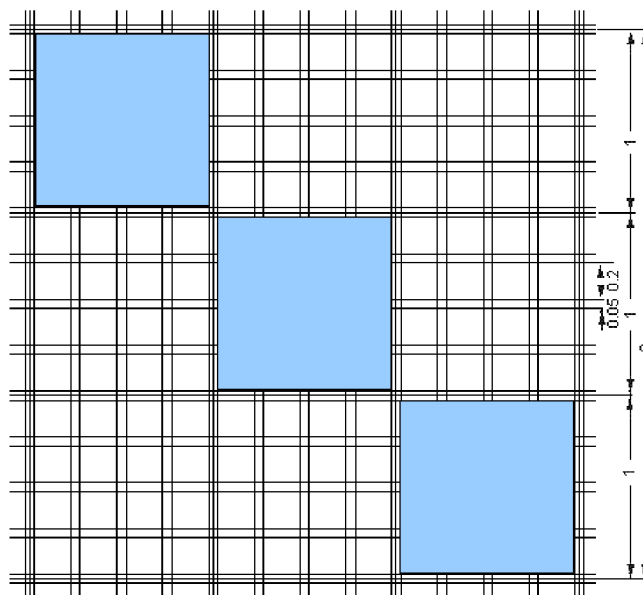
Z kultivační nádoby jsem slila médium a nádobu 3krát promyla 8 ml PBS. Následně jsem do nádoby přidala 1 ml trypsinu, který způsobí rozvolnění buněk ode dna kultivační nádoby. Po zhruba 5 minutách působení jsem přidala 15 ml PBS. Jednu třetinu buněk jsem dala odstředit do centrifugy. Vzniklou paletku jsem převedena do kultivační nádoby s 15 ml média a nechala kultivovat v termostatu při teplotě 37 °C, 5 % CO₂ a 95 % vzdušné vlhkosti.

4.4.11 Počítání buněk

Koncentraci buněk jsem stanovila za pomoci Bürkerovy komůrky, což je speciální podložní sklíčko s počítací ploškou, ve které je mikromřížka o přesně definovaných rozměrech [59]. Na obrázku 25 jsou modře vyznačená okénka, ve kterých jsem buňky spočítala a jejich počet jsem zprůměrovala. Poté jsem pomocí rovnice č. 4 vypočetla jejich koncentraci.

$$\text{koncentrace částic} = \frac{2 \cdot n}{100} \cdot 10^6 \text{ částic} \cdot \text{ml}^{-1}, \quad (4)$$

kde n je průměrný počet částic ve čtverci



Obrázek 25: Bürkerova komůrka schéma [59]

Postup: Slila jsem médium, buňky jsem 3krát propláchla 8 ml PBS, přidala jsem 1 ml trypsinu a počkala, až se buňky uvolní ode dna. Poté jsem přidala 15 ml média a buňky přenesla do centrifugací baňky. Do kultivační nádoby jsem přidala také 15 ml média a nádobu uschovala do inkubátoru. Na destičce jsem smísila 10 μl trypanové modře a 10 μl roztoku buněk. Směs jsem nanasla na Bürkerovu komůrku. Buňky jsem spočítala za pomoci mikroskopu a vypočetla jejich koncentraci.

4.4.12 MTT test

Za pomoci MTT testu lze zjistit viabilitu buněk. Princip spočívá v tom, že živé buňky jsou schopny přeměnit žlutou tetrazoniovou sůl MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromid) dehydrogenázami dýchacího řetězce ve fialový nerozpustný formazan, který má absorpční maximum blízko 570 nm. Před měřením absorbance je nutné formazan rozpustit detergentem, nejčastěji SDS [59].

Postup: Po obvodu destičky na MTT test jsem napipetovala 100 μl PBS. Do vnitřních jamek jsem napipetovala 100 μl buněk v médiu. Koncentrace buněk v jamce byla $1,15 \cdot 10^6$ buněk $\cdot \text{ml}^{-1}$. Buňky jsem nechala po nějakou dobu usadit na dno. Poté jsem si připravila koncentrační řady zkoumaného cytostatika (volného, liposomálního připraveného metodou hydratace lipidového filmu a liposomálního připraveného metodou nanofluidizace) dvojkovým ředěním od 320 μm do 1,25 μm . Následně jsem přidala 20 μl zkoumaného hydrofobního cytostatika k buňkám, vždy v triplicátech do jednotlivých sloupců sestupně podle koncentrace. Poslední sloupec sloužil jako kontrola (nebylo k němu přidáváno cytostatikum). Po 48 hodinách jsem do jamek přidala 20 μl 0,5% MTT v PBS a po 3 hodinách 100 μl 10% SDS. Další den jsem změřila absorbanci na spektrofotometru pro 540 nm. Z naměřených hodnot jsem poté v programu Prizma sestrojila graf.

5 VÝSLEDKOVÁ ČÁST

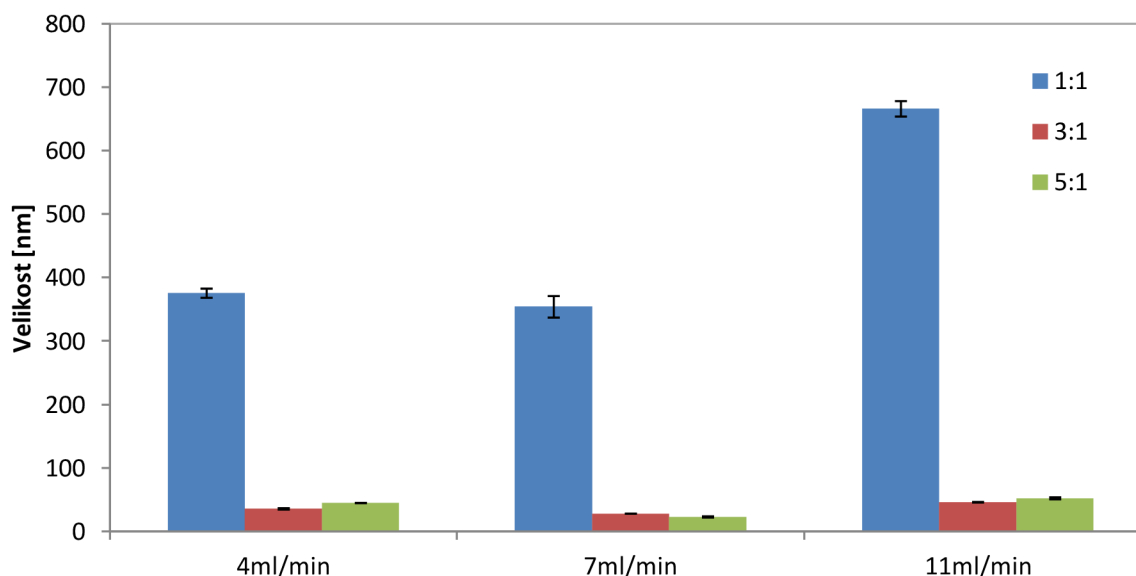
5.1 Optimalizace rychlosti průtoku (TFR) a poměru vodné a organické fáze (FRR)

Tabulka 1 a obrázek 26 udávají experimentální výsledky z charakterizace liposomů co do velikosti a polydispersity. Z těchto údajů lze vyčíst, že největší liposomy s největší polydispersitou vznikaly při FRR 1:1. Při FRR 3:1 a 5:1 již není tak výrazná změna velikosti, ale FRR 5:1 vykazuje nižší polydispersitu. Jako optimální FRR jsem tedy zvolila poměr 5:1. Nejmenší liposomy vznikaly při TFR 7 ml·min⁻¹. Tyto liposomy také vykazovaly menší polydispersitu než liposomy připravené při jiných průtokových rychlostech mísení. Proto jsem jako optimální TFR zvolila hodnotu 7 ml·min⁻¹.

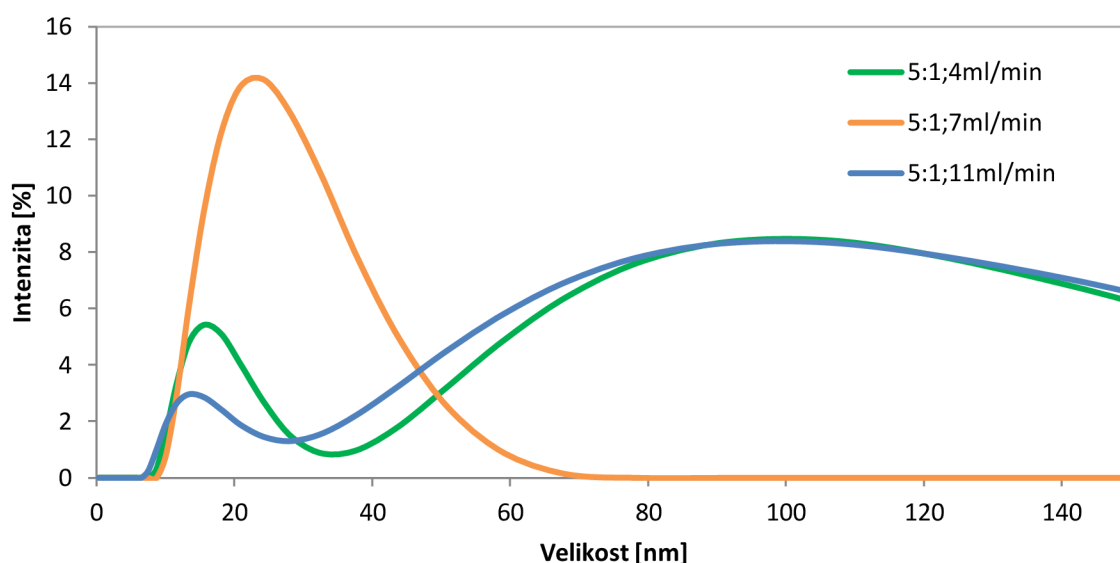
Tabulka 1: Charakterizace liposomů připravených při různých FRR a TFR

TFR [ml·min ⁻¹]	FRR					
	1:1		3:1		5:1	
	Z-Ave [nm]	PdI	Z-Ave [nm]	PdI	Z-Ave [nm]	PdI
4	375,40 ± 7,24	0,37 ± 0,02	35,50 ± 0,96	0,59 ± 0,02	44,68 ± 0,92	0,52 ± 0,01
7	353,90 ± 16,95	0,52 ± 0,07	27,89 ± 0,06	0,39 ± 0,01	22,74 ± 0,25	0,17 ± 0,01
11	666,00 ± 12,12	0,53 ± 0,03	45,96 ± 0,38	0,54 ± 0,01	52,12 ± 1,61	0,50 ± 0,02

Koncentrace připravených liposomů byla 1 mg·ml⁻¹. Liposomy byly měřeny v 5 mM Tris pH 7, při teplotě 25 °C.



Obrázek 26: Porovnání velikosti liposomů připravovaných při různém FRR a TFR



Obrázek 27: Polydisperzita liposomů v závislosti na TFR.

Obrázek 27 potvrzuje, že nejvhodnějším parametrem je TFR $7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. U ostatních TFR vznikala druhá populace liposomů, což zvyšovalo výslednou polydisperzitu.

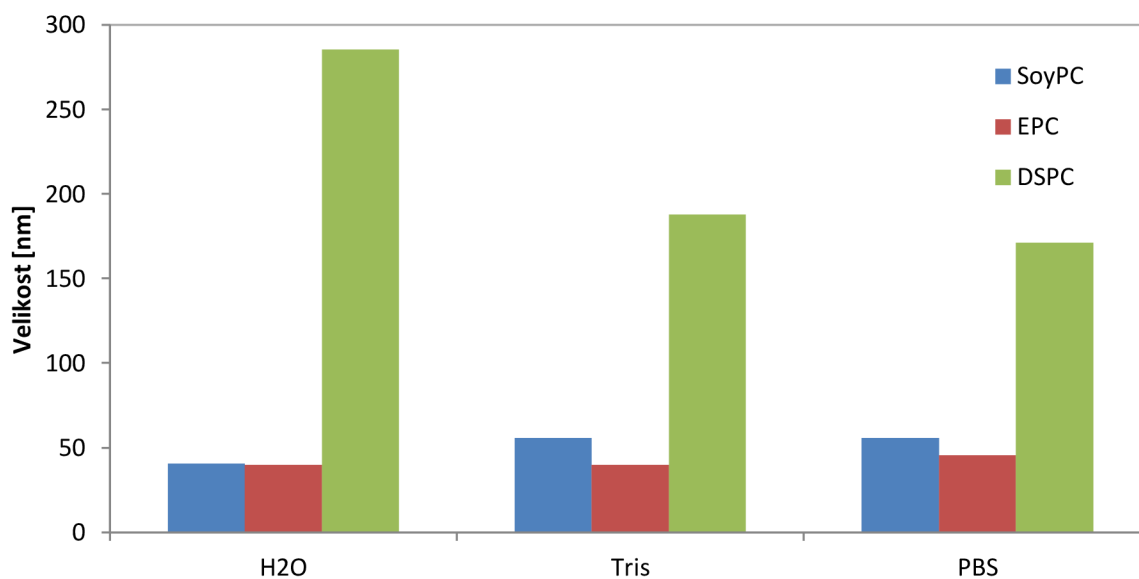
5.2 Optimalizace vodné fáze

Pro stanovení optimalizace složení vodné fáze jsem použila kompozice 30 mol% cholesterolu a 60 mol% fosfolipidu. Cholesterol jsem k liposomům přidávala, protože liposomy složené ze samotného DSPC vykazovaly příliš vysokou polydisperzitu. Z tabulky 2 a obrázku 28 lze vyčíst, že největší liposomy vznikaly z lipidu DSPC, nejmenší potom z EPC. Z následujících dat je také patrné, že vodná fáze má vliv na velikost výsledných vezikul. Nejvhodnějším vodným médiem pro SoyPC se ukázala voda (Mili Q destilovaná, deionizovaná), pro EPC a DSPC Tris 5 mM, pH 7. Na základě naměřených dat jsem zhodnotila, že nejvhodnější bude použít pro přípravu liposomů lipidní kompozici na bázi EPC v 5 mM Tris, pH 7.

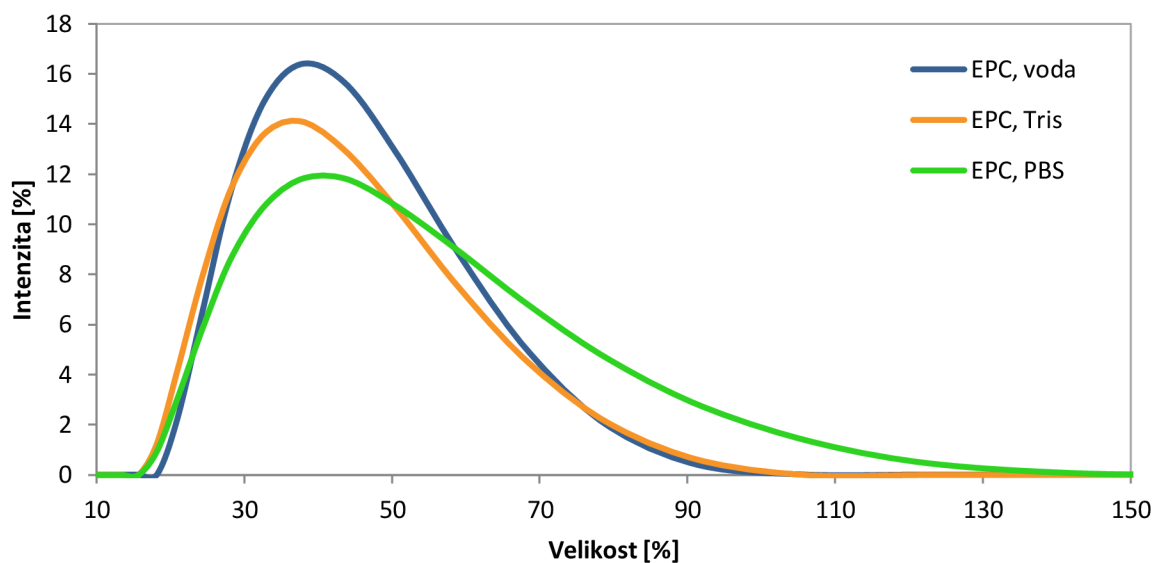
Tabulka 2: Charakterizace liposomů připravovaných v různých vodních fázích

Vodná fáze	SoyPC		EPC		DSPC	
	Z-Ave	PdI	Z-Ave	PdI	Z-Ave	PdI
H ₂ O	40,79 ± 0,11	0,10 ± 0,01	39,95 ± 0,43	0,24 ± 0,01	285,40 ± 9,92	0,70 ± 0,06
Tris	55,66 ± 0,72	0,35 ± 0,01	39,83 ± 0,29	0,20 ± 0,01	187,63 ± 1,59	0,24 ± 0,02
PBS	55,65 ± 0,06	0,25 ± 0,01	45,62 ± 0,37	0,26 ± 0,01	171,03 ± 0,8	0,24 ± 0,01

Koncentrace připravených liposomů byla $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Liposomy byly měřeny při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$.



Obrázek 28: Porovnání velikostí liposomů připravovaných v různé vodní fázi



Obrázek 29: Vliv vodné fáze na velikost liposomů složených z EPC.

Z obrázku 29 lze vidět, že rozdíly velikosti liposomů složených z EPC v různých vodních fázích nejsou příliš výrazné, ale nejmenší polydisperzity vykazují liposomy připravované v 5 mM Tris, pH 7.

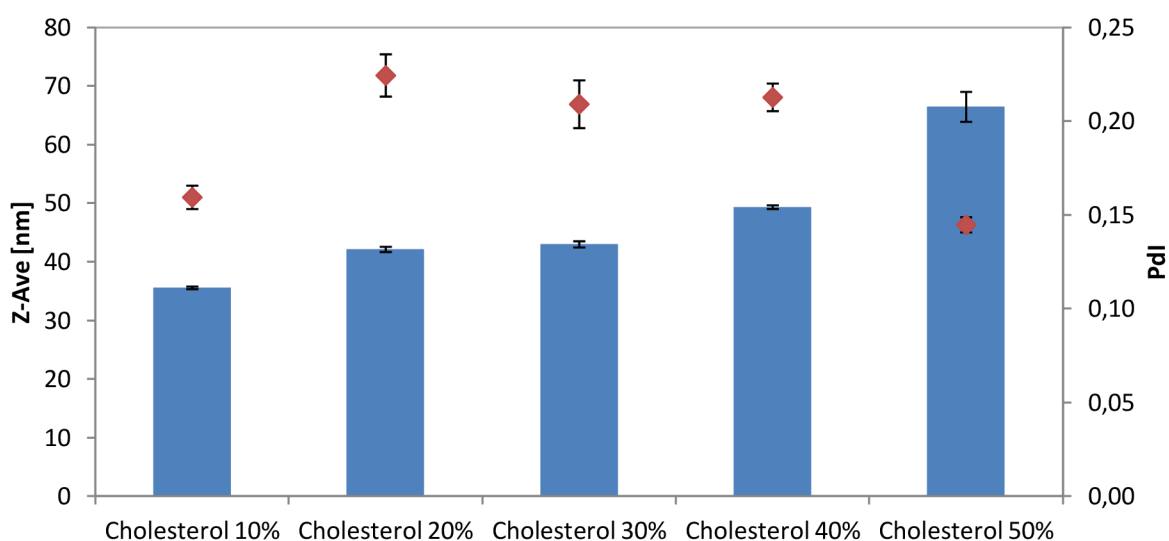
5.3 Optimalizace obsahu cholesterolu v liposomech

Z naměřených dat, které jsou zaznamenány v tabulce 3 a na obrázku 30 je patrné, že s rostoucím obsahem cholesterolu se velikost liposomů zvyšovala. Jako nevhodnější obsah cholesterolu jsem zvolila 30 mol%, protože předchozí studie prokázaly, že vysoký obsah cholesterolu v liposomech inhibuje inkorporaci hydrofobního léčiva do lipidové membrány [24]. ζ -potenciály připravených liposomů se pohybovaly kolem nuly, jelikož v nich nebyla obsažena žádná složka, která by nesla náboj, neboť všechny lipidní komponenty jsou elektroneutrální.

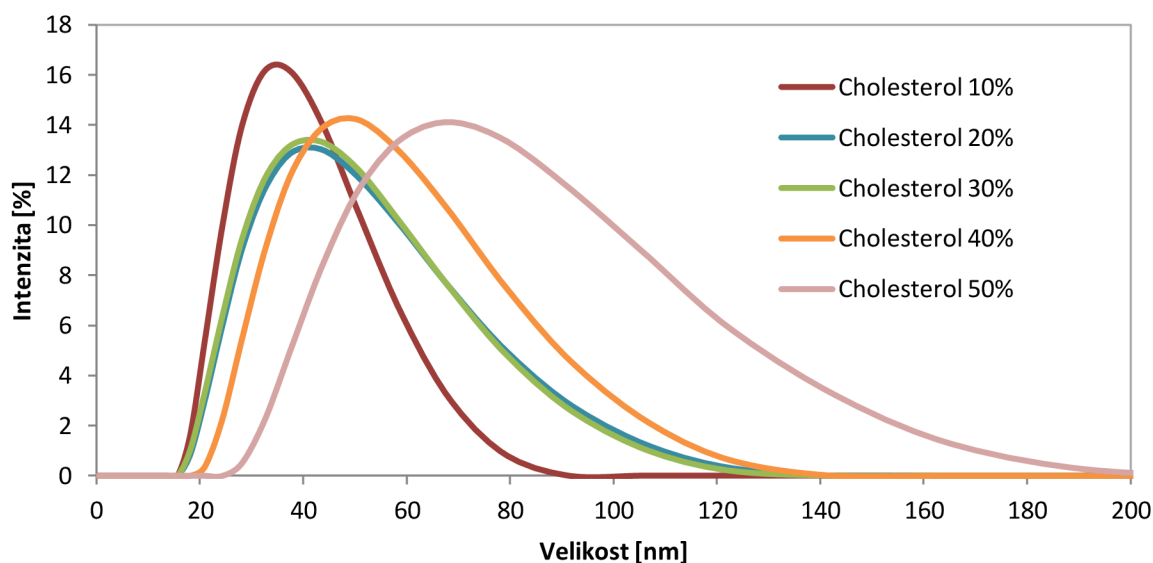
Tabulka 3: Charakterizace vlivu cholesterolu na velikost liposomů a ζ -potenciál

Obsah cholesterolu [mol%]	Z-Ave [nm]	PdI	ζ -potenciál [mV]
10	35,55 ± 0,22	0,16 ± 0,01	-0,49 ± 0,51
20	42,11 ± 0,44	0,22 ± 0,01	-0,20 ± 0,32
30	42,97 ± 0,53	0,21 ± 0,01	-0,43 ± 0,24
40	49,32 ± 0,31	0,21 ± 0,01	-0,82 ± 0,65
50	66,43 ± 2,55	0,14 ± 0,01	-1,06 ± 0,29

Koncentrace připravených liposomů byla $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Liposomy byly měřeny v 5 mM Tris, pH 7, při teplotě 25 °C.

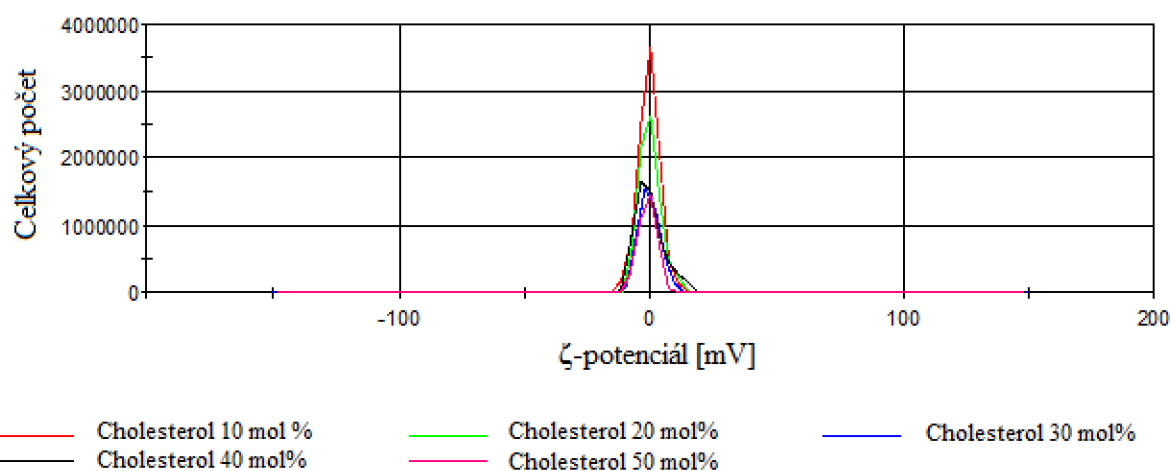


Obrázek 30: Porovnání velikosti a polydisperzity liposomů s různým obsahem cholesterolu



Obrázek 31: Vliv přídavku cholesterolu na velikost a polydisperzitu liposomů.

Z obrázku 31 je patrné, že rostoucí obsah cholesterolu zvyšuje velikost liposomů, což může být způsobeno tím, že přídavek cholesterolu zvyšuje tuhost membrány. Proto se s rostoucím obsahem cholesterolu zvyšuje i velikost liposomů složených z nenasycených lipidů (EPC).



Obrázek 32: Vliv obsahu cholesterolu na ζ-potenciál liposomů.

Z obrázku 32 je patrné, že obsah cholesterolu nijak neovlivňuje výsledný ζ-potenciál připravovaných liposomů, jelikož nenesou žádnou nabitou skupinu.

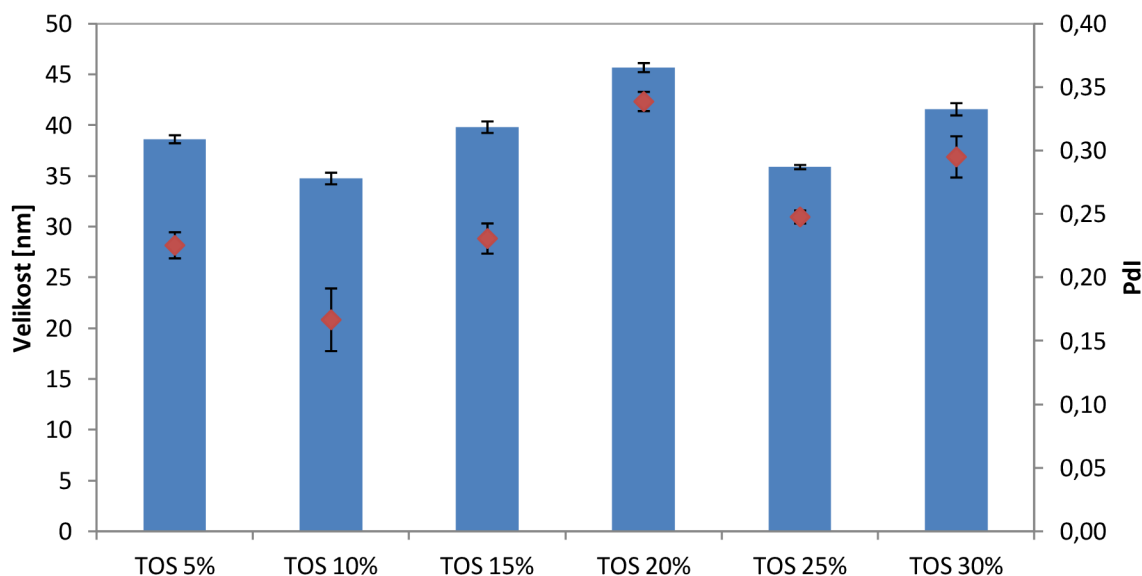
5.4 Optimalizace obsahu α -TOS

Z tabulky 4 a obrázku 33 je patrné, že se velikost liposomů s rostoucím obsahem α -TOS nijak výrazně neměnila. Polydisperzita byla nejnižší u 10 mol% α -TOS, proto jsem toto množství zvolila za optimální pro přípravu liposomálního preparátu na testování protinádorového účinku na nádorových liniích. Nad 20 mol% α -TOS již byla narušena stabilita liposomů a vznikaly pravděpodobně i neliposomální struktury [38]. Negativní hodnota ζ -potenciálu se s rostoucím obsahem α -TOS zvyšovala, jelikož α -TOS vnášel do liposomu záporný náboj.

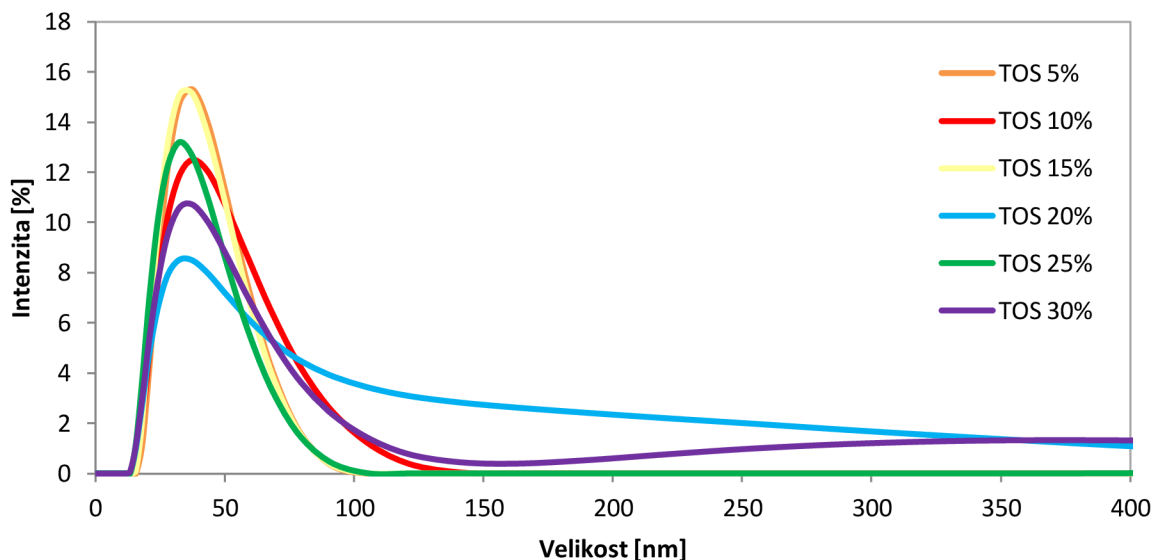
Tabulka 4: Charakterizace vlivu α -TOS na výslednou velikost a ζ -potenciál liposomů

Obsah α -TOS [mol%]	Z-Ave [nm]	PdI	ζ -potenciál [mV]
5	38,61 \pm 0,39	0,23 \pm 0,01	-4,96 \pm 1,05
10	34,74 \pm 0,57	0,17 \pm 0,02	-18,70 \pm 0,90
15	39,80 \pm 0,57	0,23 \pm 0,01	-18,97 \pm 1,33
20	45,67 \pm 0,45	0,34 \pm 0,01	-25,97 \pm 0,54
25	35,87 \pm 0,21	0,25 \pm 0,01	-27,20 \pm 1,16
30	41,57 \pm 0,60	0,30 \pm 0,02	-32,43 \pm 0,95

Koncentrace připravených liposomů byla 1 mg·ml⁻¹. Liposomy byly měřeny v 5 mM Tris o pH 7, při teplotě 25 °C. Složení liposomů bylo 30 mol% cholesterolu, 65–40 mol% EPC a 5–10 mol% α -TOS.



Obrázek 33: Porovnání velikosti a polydisperzity liposomů s různým obsahem α -TOS



Obrázek 34: Porovnání velikosti liposomů při různém obsahu α -TOS.

Z obrázku 34 lze vidět, že u liposomů s obsahem α -TOS ≥ 20 mol% dochází ke zvýšení polydisperzity.

5.5 Porovnání metod nanofluidizace a hydratace lipidového filmu

Liposomy s optimalizovanou kompozicí lipidů jsem připravila pomocí dvou různých metod. První metodou byla hydratace lipidového filmu. Liposomy byly složené z 30 mol% cholesterolu, 10 mol% α -TOS a 60 mol% EPC. Vodná fáze byla: 5 mM Tris, pH 7. Liposomy jsem extrudovala přes 200 nm a 100 nm polykarbonátový filtr za použití ručního extrudéru. Koncentrace liposomů byla $6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Druhou metodou přípravy byla nanofluidizace. Tyto liposomy jsem také připravila v 5 mM Tris, pH 7 o stejném složení jako při hydrataci lipidového filmu, TFR $7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a FRR 5:1. Velikost a ζ -potenciál jsem poté proměřila pomocí přístroje Zetasizer Nano ZSP, dále jsem velikost proměřila na přístroji NanoSight NS500 a pořídila jsem snímky liposomů pomocí TEM metodou negativního barvení.

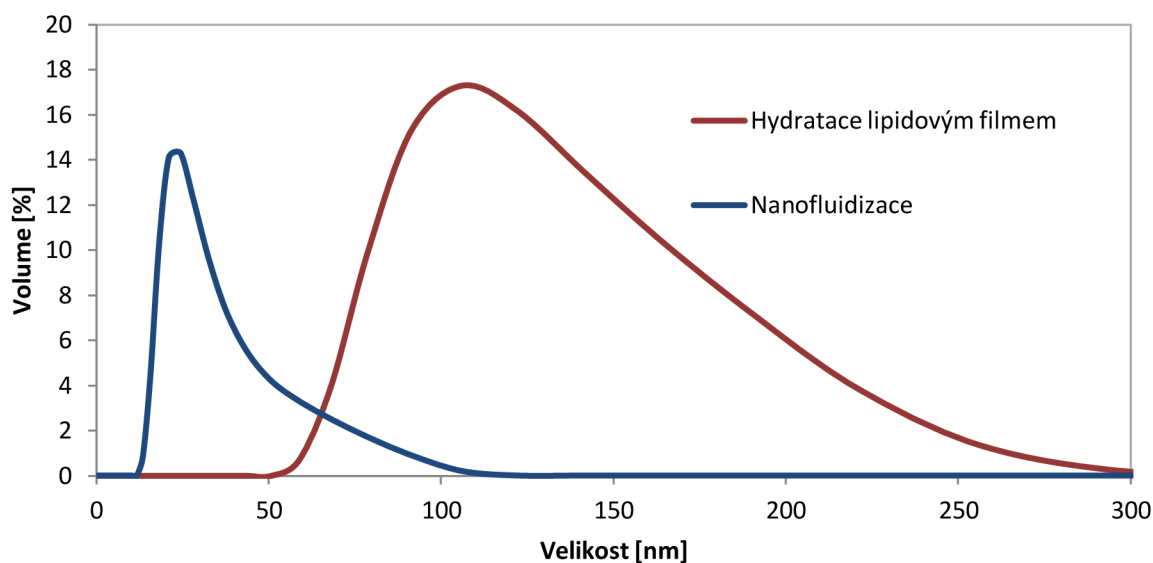
Zetasizer Nano ZSP

Liposomy jsem proměřila na Zetasizeru při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Velikost a ζ -potenciál připravených liposomů je zaznamenán v tabulce 5.

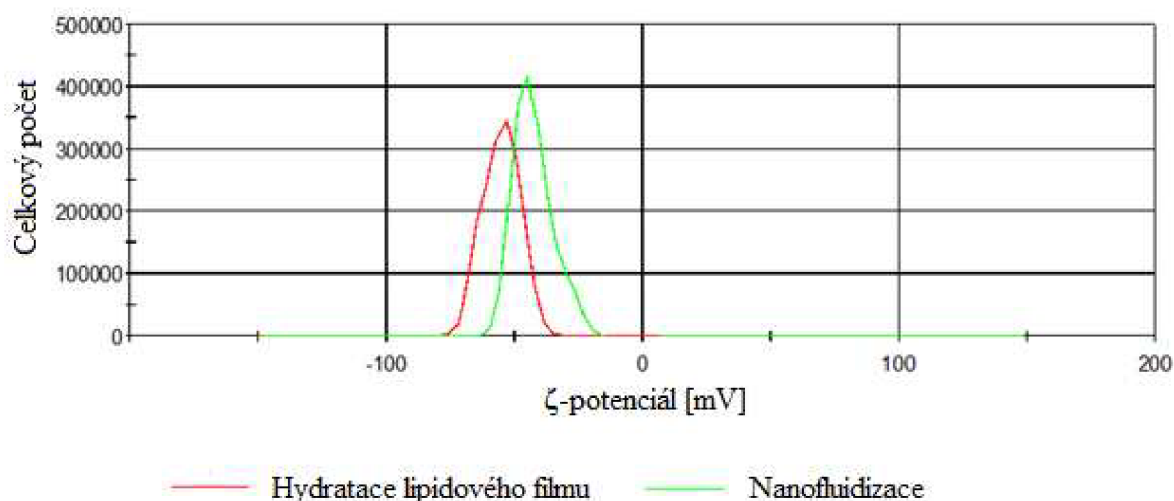
Tabulka 5: Velikost a ζ -potenciál liposomů připravených pomocí dvou různých metod

Metoda	Z-Ave [nm]	PdI	ζ -potenciál [mV]
Hydratace lip. filmu	$129,13 \pm 0,26$	$0,075 \pm 0,13$	$-50,1 \pm 1,31$
Nanofluidizace	$50,09 \pm 0,45$	$0,306 \pm 0,15$	$-47,7 \pm 0,29$

Koncentrace připravených liposomů byla $6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Liposomy byly měřeny v 5 mM Tris o pH 7, při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Složení liposomů bylo 30 mol% cholesterolu, 60 mol% EPC a 10 mol% α -TOS.



Obrázek 35: Porovnání velikosti liposomů připravovaných pomocí dvou různých metod

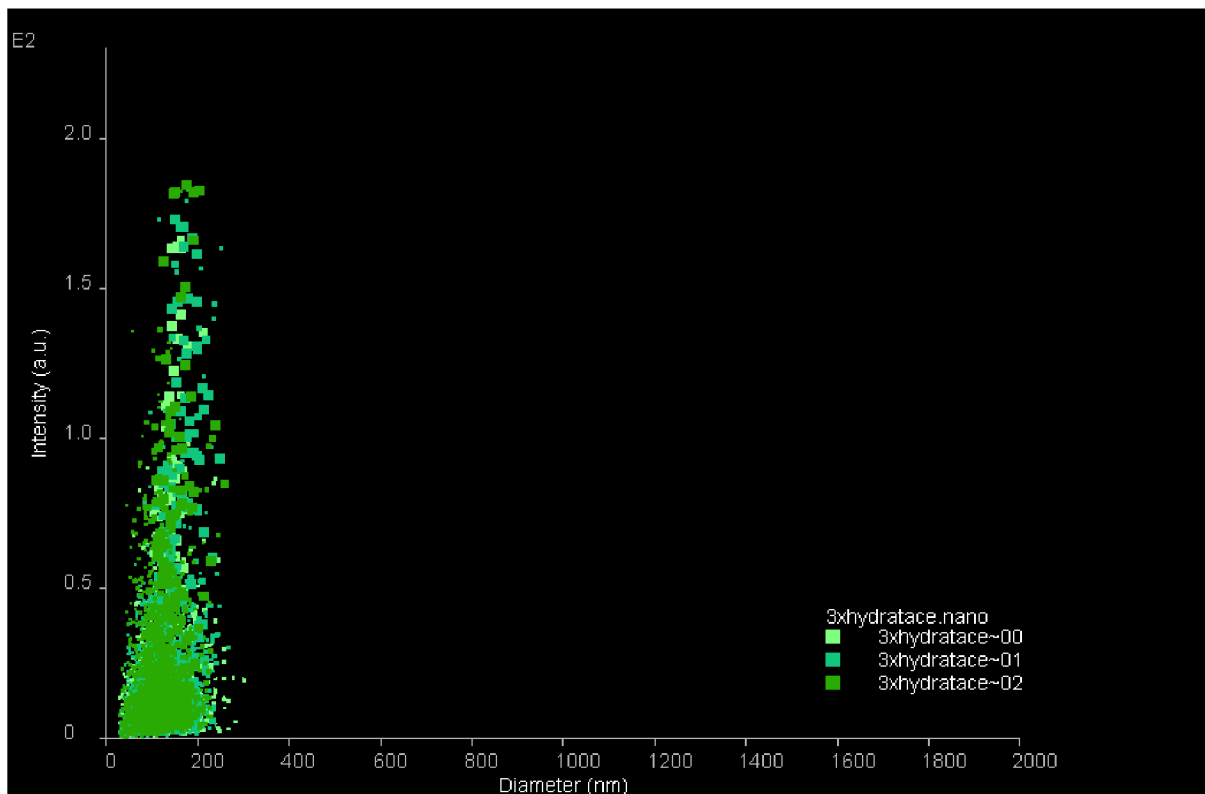


Obrázek 36: ζ-potenciál liposomů připravovaných dvěma různými metodami.

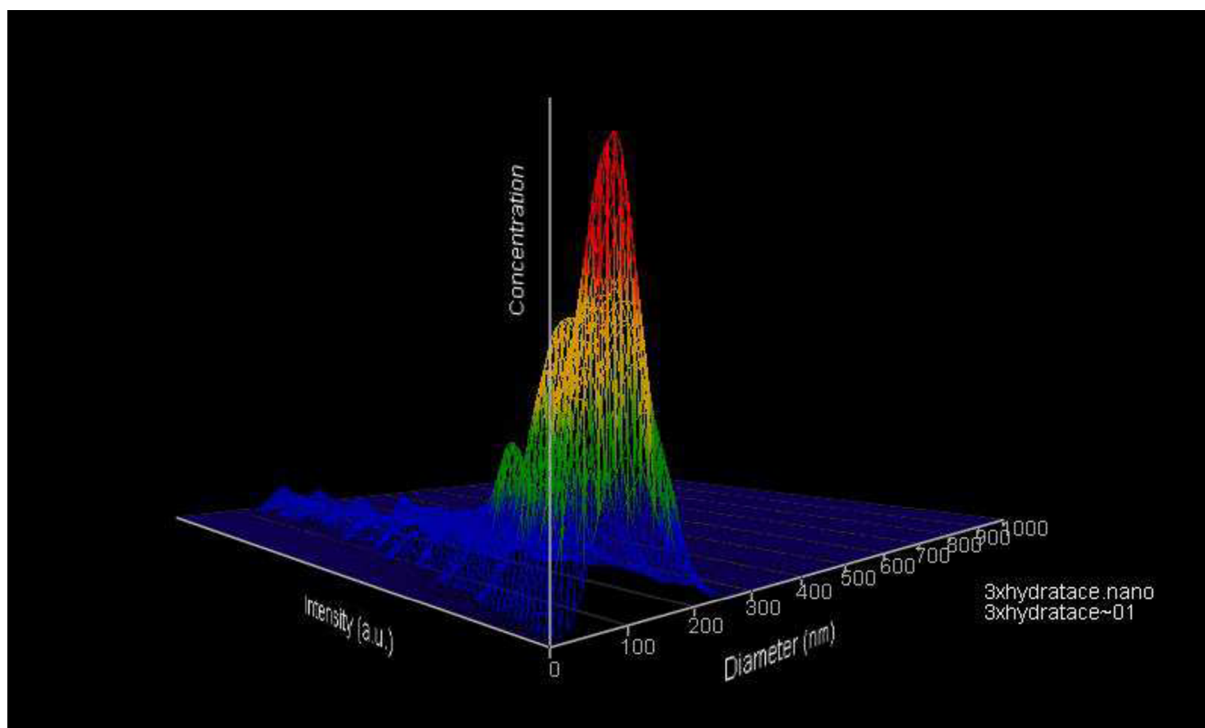
Z obrázku 36 lze vyčíst, že ζ-potenciál liposomů připravených metodou hydratace lipidového filmu je o trochu vyšší než u liposomů připravených metodou nanofluidizace.

Nanosight NS500

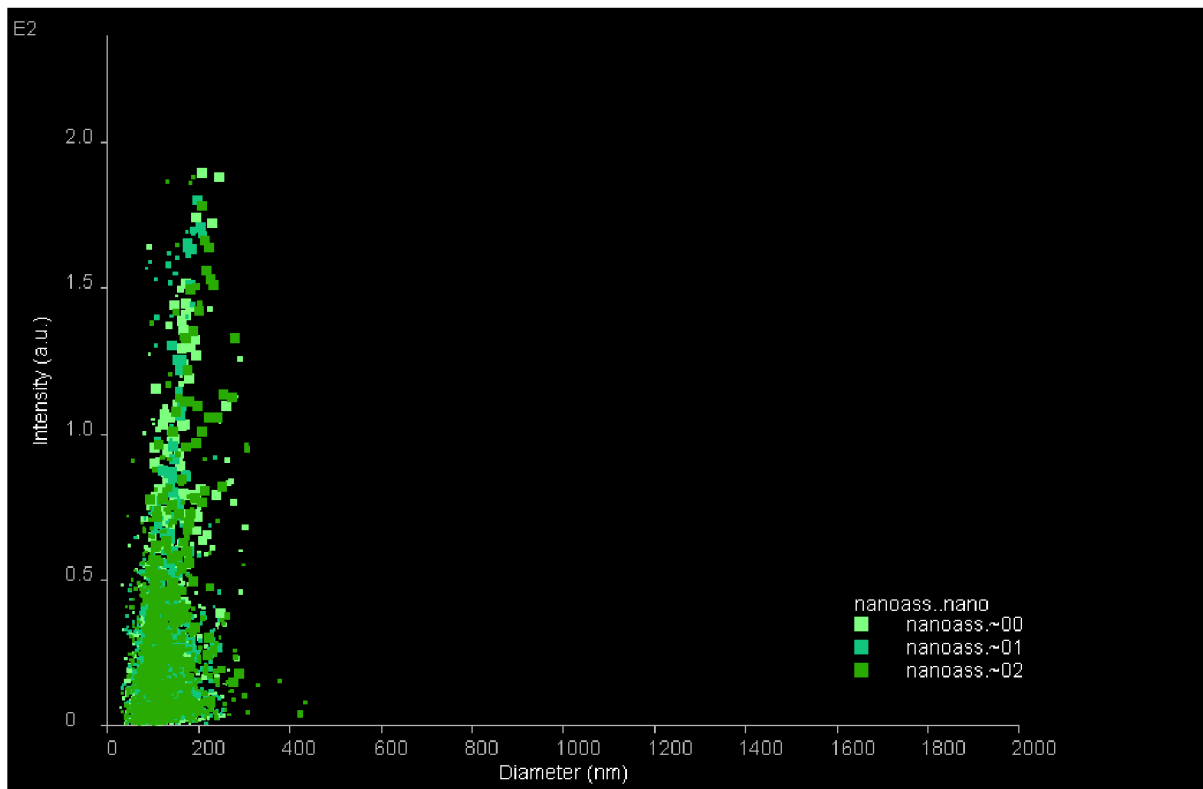
Připravené liposomy jsem zředila 10 000x a proměřila jsem jejich velikost na přístroji NanoSight NS500. Velikost a distribuce lipomů připravených metodou hydratace lipidového filmu je zaznamenána na obrázku 37 a 38. U liposomů připravených metodou nanofluidizace je velikost a distribuce zaznamenána na obrázku 39 a 40.



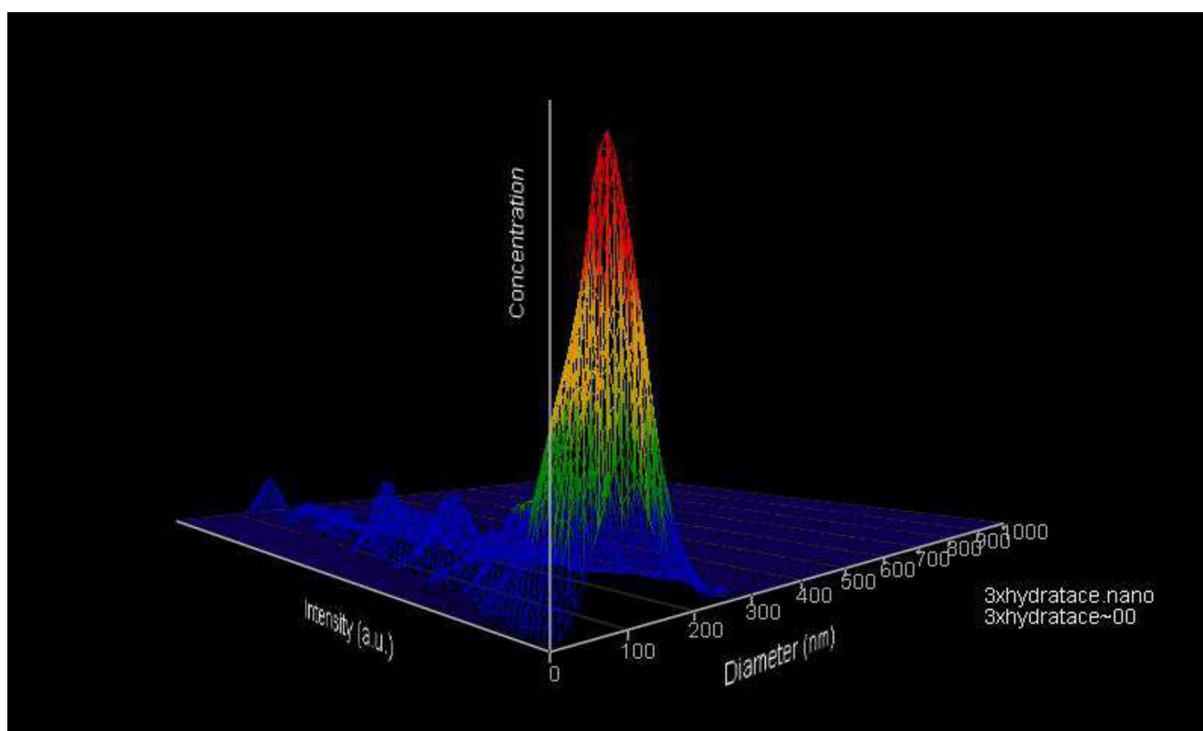
Obrázek 37: Distribuce velikosti liposomů připravených metodou hydratace lipidového filmu.
 Dot plot z triplikátu preparátu liposomů připravených hydratací lipidního filmu.



Obrázek 38: Velikost liposomů připravovaných metodou hydratace lipidového filmu proměřená metodou NTA



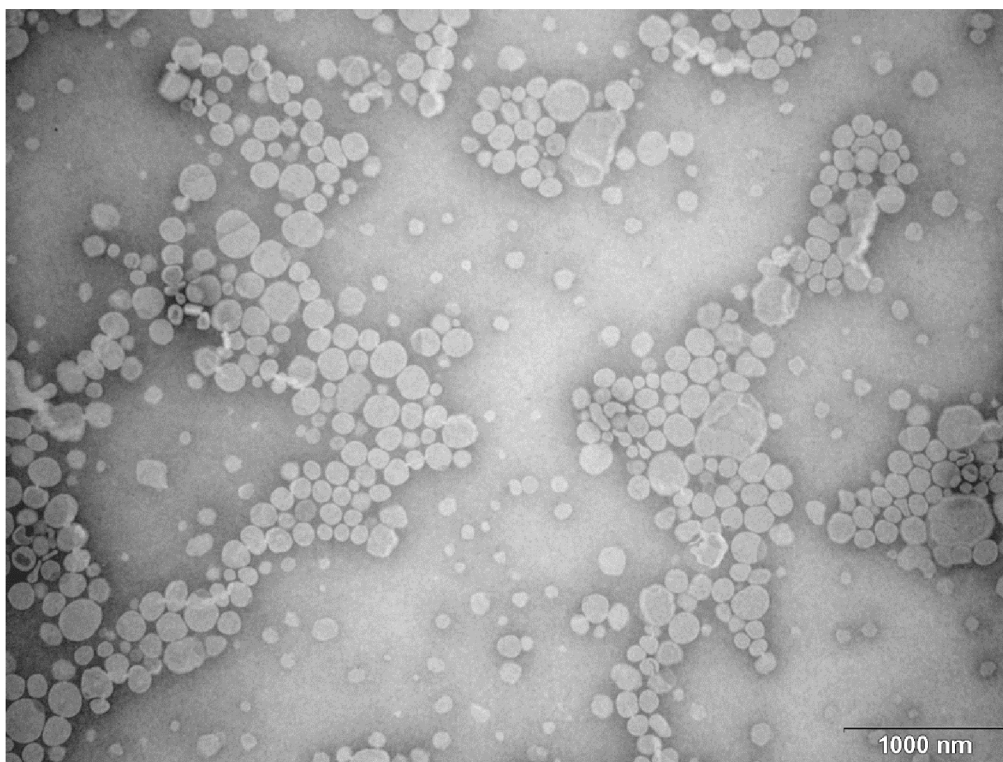
Obrázek 39: Distribuce liposomů připravených metodou nanofluidizace. Dot plot z triplikátu měření liposomů připravených nanofluidizací.



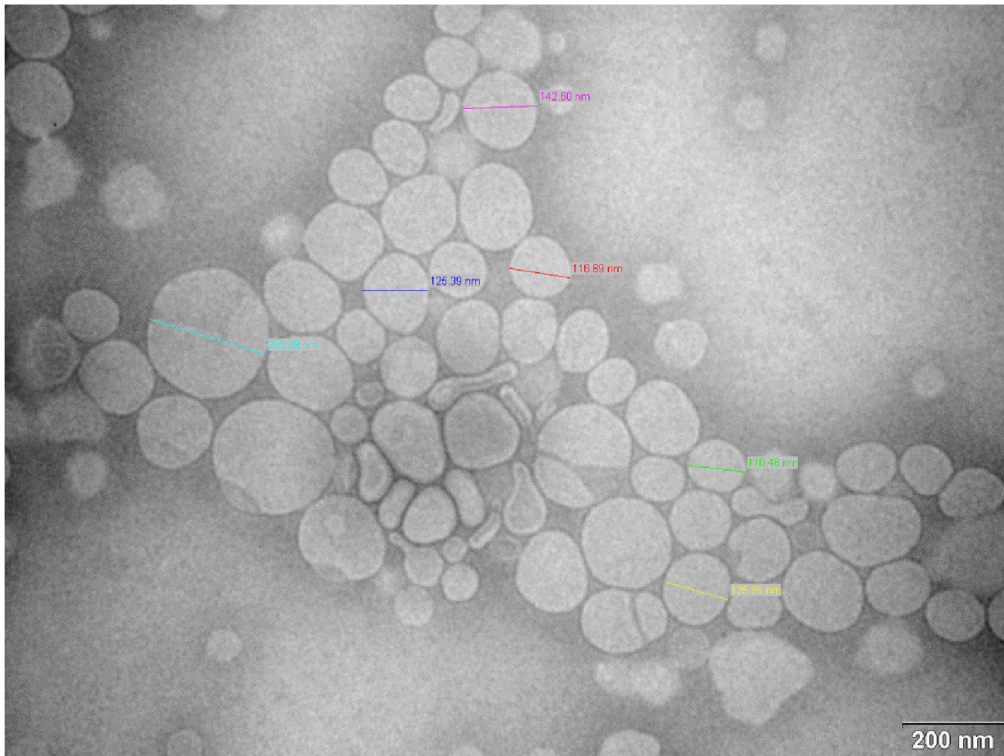
Obrázek 40: Velikost liposomů připravených nanofluidizace proměřená metodou NTA

Elektronová mikroskopie

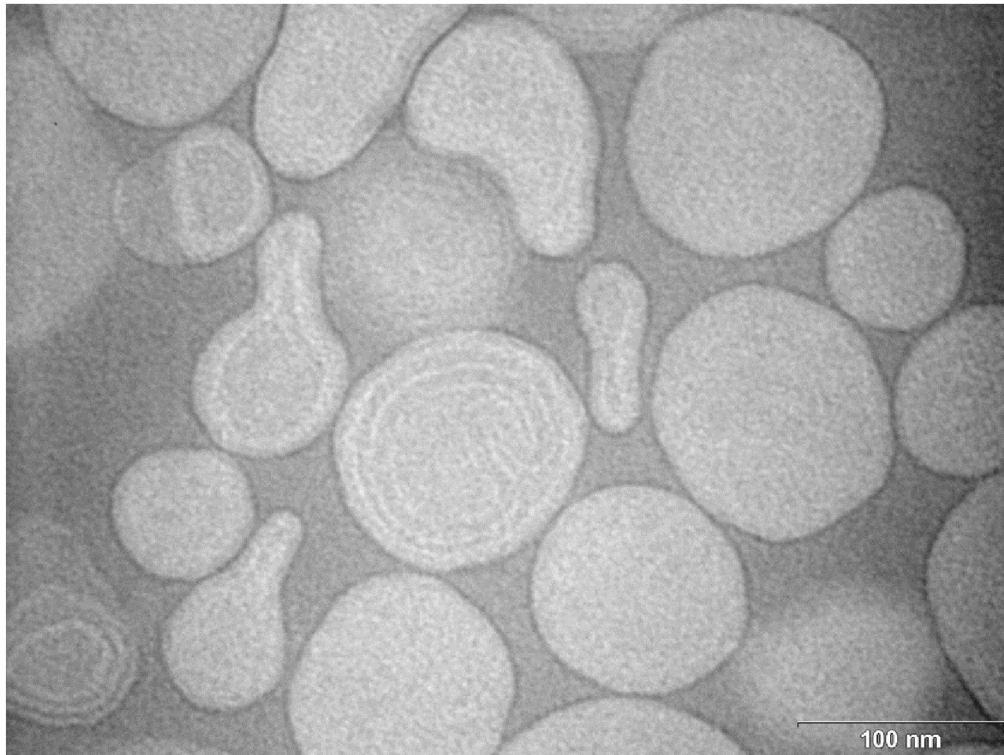
Následující snímky byly pořízeny z transmisního elektronového mikroskopu Philips 208S Morgagni metodou negativního barvení. Jako první byly pozorovány liposomy připravené metodou hydratace lipidového filmu. Ze snímků je patrné, že touto metodou byly připraveny multilamelární liposomy. Jako druhé byly pozorovány liposomy připravené metodou nanofluidizace. Tyto liposomy, jak je vidět z následujících snímků, jsou unilamelární. Pomocí mikroskopu byla také proměřena velikost liposomů. Liposomy připravené metodou hydratace lipidového filmu měli průměrnou velikost okolo 170 nm, liposomy připravené metodou nanofluidizace měli průměrnou velikost okolo 70 nm. Větší velikost oproti měření metodou DLS je způsobena deformací liposomů ve vakuu mikroskopu, kdy je kulovitý tvar liposomů zploštěn na kruh. Pro přepočet těchto velikostí (hodnota označuje průměr disku po kolapsu liposomů ve vakuu) na hydrodynamický průměr je nutno vydělit stanovené hodnoty koeficientem $\sqrt{2}$.



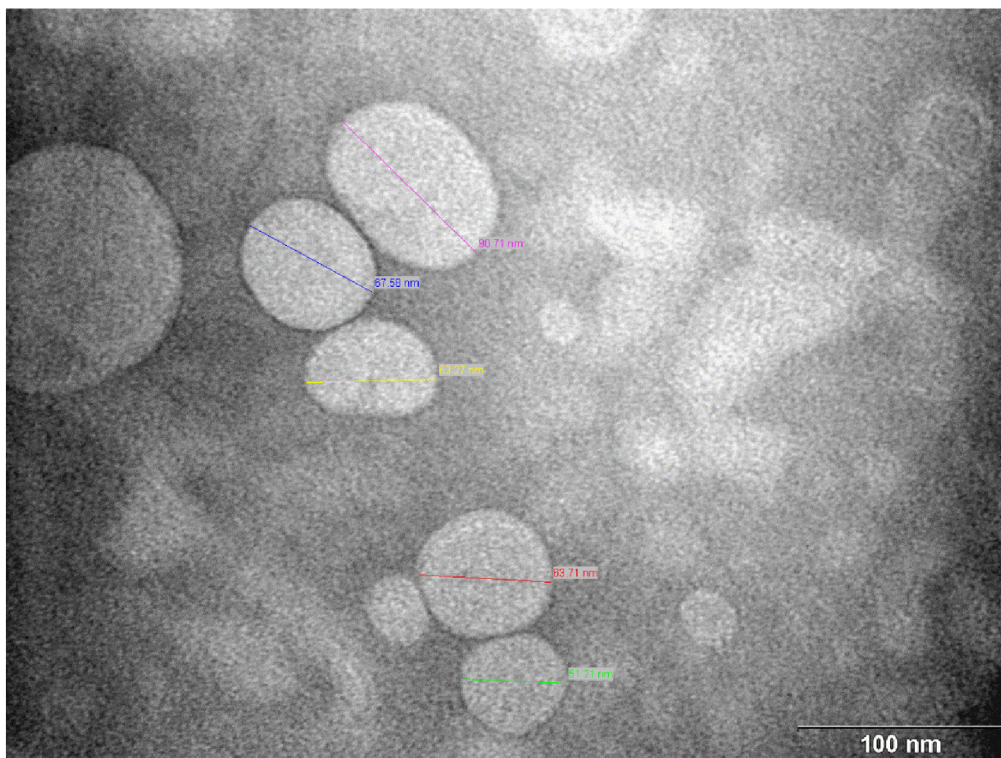
Obrázek 41: Snímek z elektronového mikroskopu zachycující liposomy připravené hydratací lipidového filmu a extrudované přes 100 nm polykarbonátový filtr.



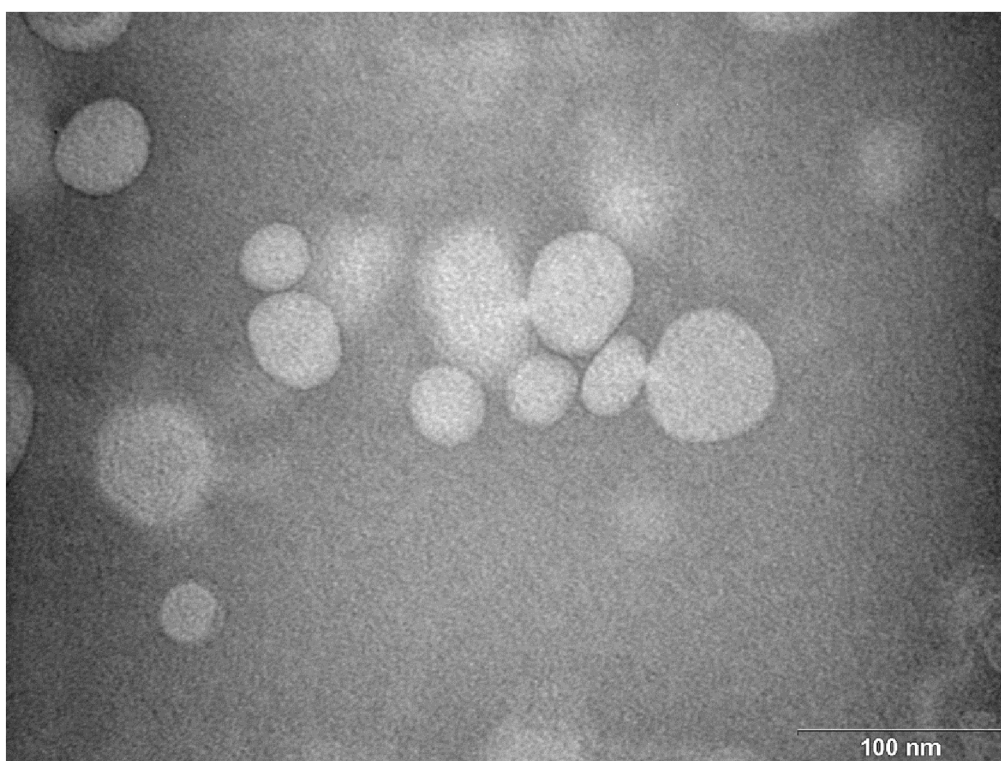
Obrázek 42: Snímek z elektronového mikroskopu zachycující liposomy připravené hydratací lipidového filmu. Na tomto snímku byla také proměřena velikost některých lipomů.



Obrázek 43: Snímek z elektronového mikroskopu zachycující liposomy připravené hydratací lipidového filmu. Na tomto snímku je patrné, že liposomy připravované touto metodou jsou multilamelární.



Obrázek 44: Snímek z elektronového mikroskopu zachycující liposomy připravované metodou nanofluidizace. Na snímku byla také proměřena velikosti liposomů.



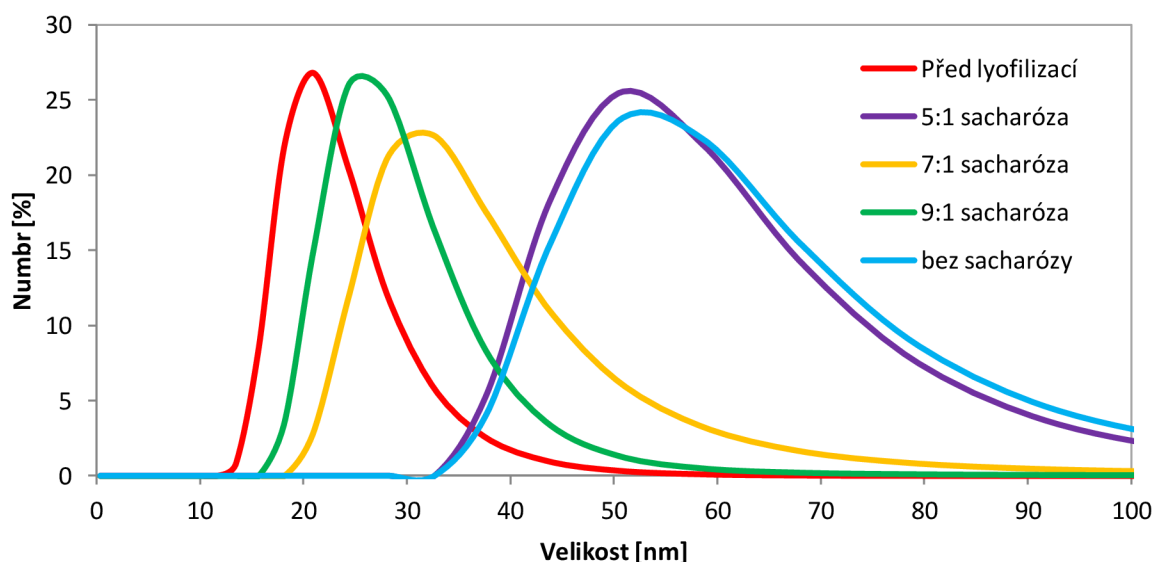
Obrázek 45: Snímek z elektronového mikroskopu zachycující liposomy připravované metodou nanofluidizace. Z obrázku je patrné, že liposomy připravované touto metodou jsou unilamelární.

5.6 Lyofilizace liposomů

K liposomům připraveným metodou nanofluidizace, složeným z 30 mol% cholesterolu, 10 mol% α -TOS a 60 mol% EPC v 5 mM Tris o pH 7, jsem přidala kryoprotektant sacharózu v molárních poměrech 5:1, 7:1 a 9:1. Jeden vzorek jsem připravila bez přidavku kryoprotektantu. Připravené vzorky byly zmrazeny na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně lyofilizovány. Poté jsem vzorky hydratovala 1 ml 5 mM Tris pH 7 a proměřila jsem jejich stabilitu za pomoci přístroje Zetasizer Nano ZSP. U lyofilizovaných vzorků jsem proměřila i obsah zbytkové vody, která má také vliv na stabilitu liposomů, za použití titrace dle Karl-Fischera. Z výsledků je patrné, že po hydrataci lyofilizátů došlo k zvětšení velikosti liposomů, což je způsobeno jejich fúzí. Sacharóza jako kryoprotektivum byla schopna potlačit výrazně fúzi liposomů při molárním poměru sacharóza ku lipidu 9:1. Data jsou zaznamenána v tabulce 6 a na obrázku 46.

Tabulka 6: Charakterizace liposomů před a po lyofilizaci

Vzorek po 1 týdnu	Z-Ave [nm]	PdI	ζ -potenciál [mV]
Před lyofilizací	78,8	0,384	-37,6
Vzorek bez sacharózy	220,5	0,812	-40,9
Sacharóza 5:1	191,5	0,429	-36,7
Sacharóza 7:1	139,1	0,382	-35,9
Sacharóza 9:1	101,8	0,379	-36,4



Obrázek 46: Porovnání velikosti liposomů s různým obsahem kryoprotektantu v modu přepočtu na množství částic

Z obrázku 46 je patrné, že nejlepší molární poměr kryoprotektantu a vzorku byl 9:1, jelikož nejvíce udržoval velikost a nízkou polydisperzitu liposomů.

5.7 Stanovení obsahu vody

U lyofilizovaných vzorků jsem stanovila obsah vody pomocí Karl-Fischerovy titrace. Vzorky jsem rozpustila v titračním činidle a přenesla do titrátoru, kde byl stanoven obsah vody. Obsah vody v liposomech by dle literatury neměl překročit hodnotu 1,6 hm%, jelikož při takto vysokém obsahu vody v lyofilizovaných vzorcích může docházet k hydrolyze lipidů a tím ke snížení stability uchovávaných vzorků [55]. V tabulce 7 jsou zaznamenány hodnoty naměřeného obsahu vody v jednotlivých vzorcích. Z dat vyplývá, že limitní hodnota obsahu vody nebyla překročena ani u jednoho ze vzorků. Dále nám tyto výsledky ukazují, že nejnižší obsah vody byl obsažen u molárního poměru kryoprotektantu a vzorku 9:1.

Tabulka 7: Obsah vody v jednotlivých vzorcích liposomů

Vzorek	Obsah vody [%]
Sachoróza 5:1	0,55 ± 0,055
Sachoróza 7:1	0,49 ± 0,015
Sachoróza 9:1	0,45 ± 0,010

5.8 Stanovení obsahu fosfolipidů

Obsah fosfolipidů v připravovaných liposomech jsem stanovovala pomocí Stewardova testu. Proměřovaný vzorek lipomů byl složen z 60 mol% EPC, 30 mol% cholesterolu a 10 mol% α -TOS. Vzorek jsem připravovala v 5 mM Tris, pH 7 a jeho výsledná koncentrace byla 0,1 mg·ml⁻¹. Tato metoda je schopna detekovat organický fosfát ve vzorku, což znamená, že v našem případě bude reagovat pouze EPC, který jako jediný z použitých složek obsahuje ve své molekule fosfátovou skupinu.

Ze závislosti absorbance na koncentraci jsem sestrojila kalibrační křivku, kterou jsem proložila lineární regresí, ze které jsem vypočetla koncentrace vzorku. Kalibrační křivka je průměrem dvou hodnot absorbance.

Rovnice regrese kalibrační křivky: $y = 1,0655 \cdot x - 0,0021$, absorbance vzorku (průměr dvou hodnot): 0,031485

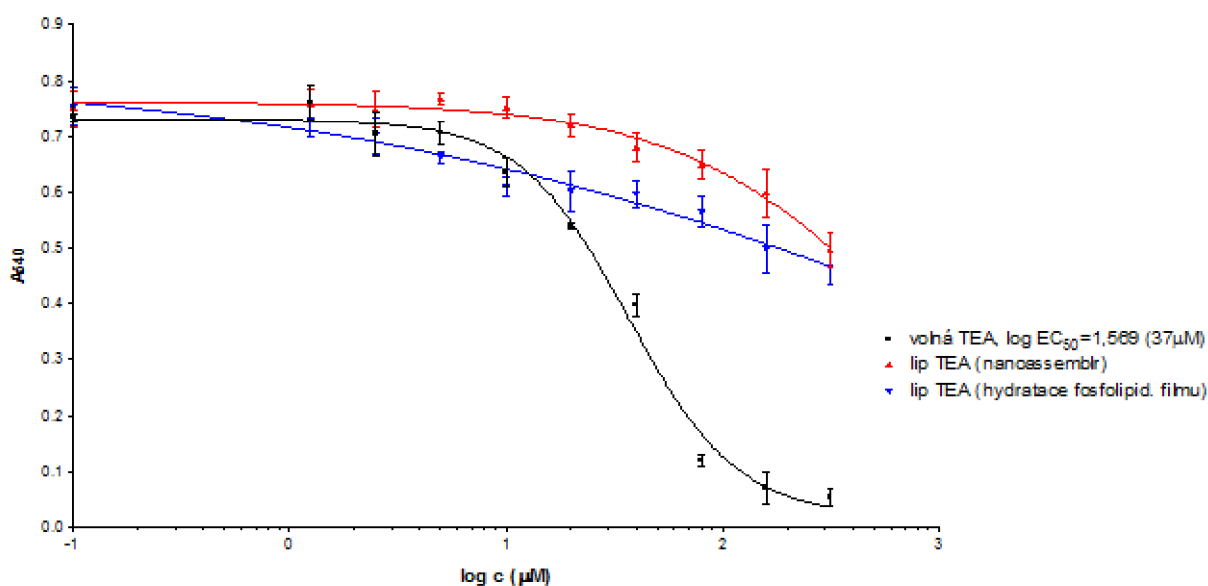
Koncentraci jsem vypočetla dle následujícího výpočtu:

$$c = \frac{0,031485 + 0,0021}{1,0655} = 0,0314 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$$

Teoretický obsah fosfolipidů v proměřovaném vzorku činil 0,0315 mg·ml⁻¹. Obsah fosfolipidů stanovený pomocí metody Stewardova testu se od teoretického obsahu fosfolipidu ve vzorku lišil minimálně. Tento výsledek je ve velmi přesné korelaci s navázkou. Malý rozdíl hodnot může být způsoben například nepřesností vah a ztrátami vzorku v důsledku manipulace při přípravě a měření.

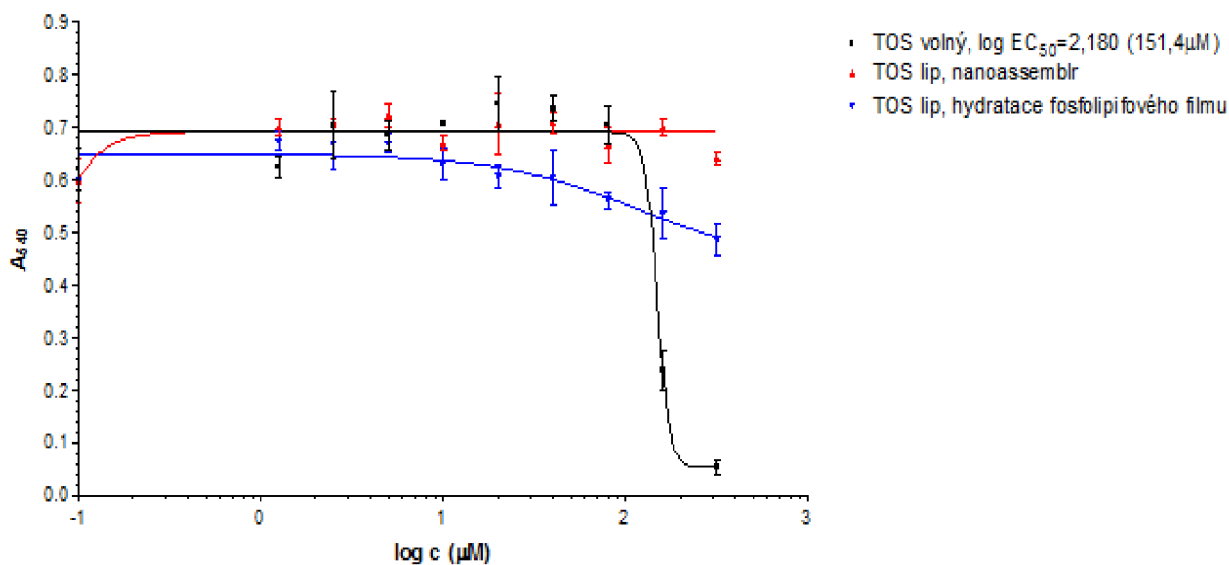
5.9 Testy cytotoxicity

Cytotoxicitu derivátů vitamínu E jsem testovala na dvou buněčných liniích za použití MTT testů. První byla lidská plicní nádorová linie A549, druhá byla lidská nádorová linie prsu MFC-7. Na nádorové linie jsem aplikovala dva deriváty vitamínu E α -TOS a α -TEA. Tyto deriváty jsem připravila ve třech různých variantách. První variantou byly volné deriváty VE, druhou variantou byly liposomy připravené metodou nanofluidizace a obsahující 10 mol% derivátu VE, třetí variantou byly liposomy připravené metodou hydratace lipidového filmu obsahující rovněž 10 mol% derivátu VE.



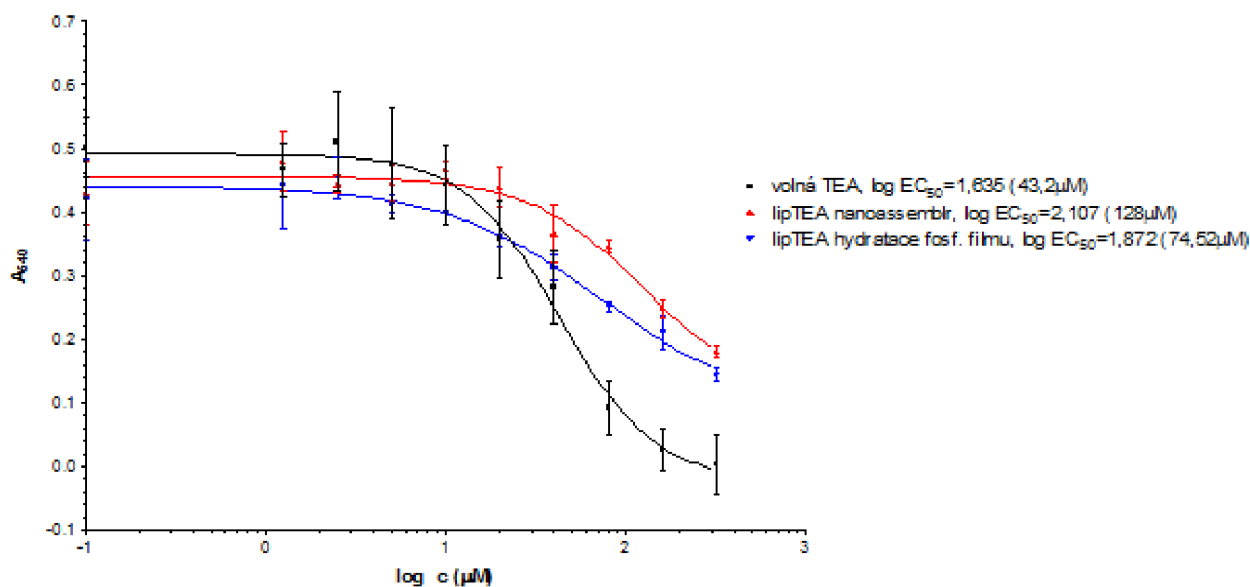
Obrázek 47: Cytotoxicita α -TEA na buněčnou linii A549 po expozici 48 hodin.

Na obrázku 47 jsou znázorněny výsledky MTT testu prováděném na buňkách A549. Jako derivát VE byla použita α -TEA v rozmezí koncentrací 320 μ M–1,25 μ M. Z grafu je patrné, že volná α -TEA způsobuje apoptózu buněk. Liposomální α -TEA vykazuje výrazné zpoždění cytotoxického účinku. Liposomy připravené hydratací lipidového filmu snižovaly proliferaci buněk více, nežli liposomy připravené nanofluidizací. Tento rozdíl je zřejmě způsoben tím, že liposomy připravené hydratací jsou multilamelární, mají tedy více lamel, do kterých se může α -TEA inkorporovat (vyšší enkapsulační kapacita), zatímco liposomy připravené nanofluidizací jsou unilamelární a tudíž je jejich enkapsulační kapacita pro hydrofobní látky nižší.



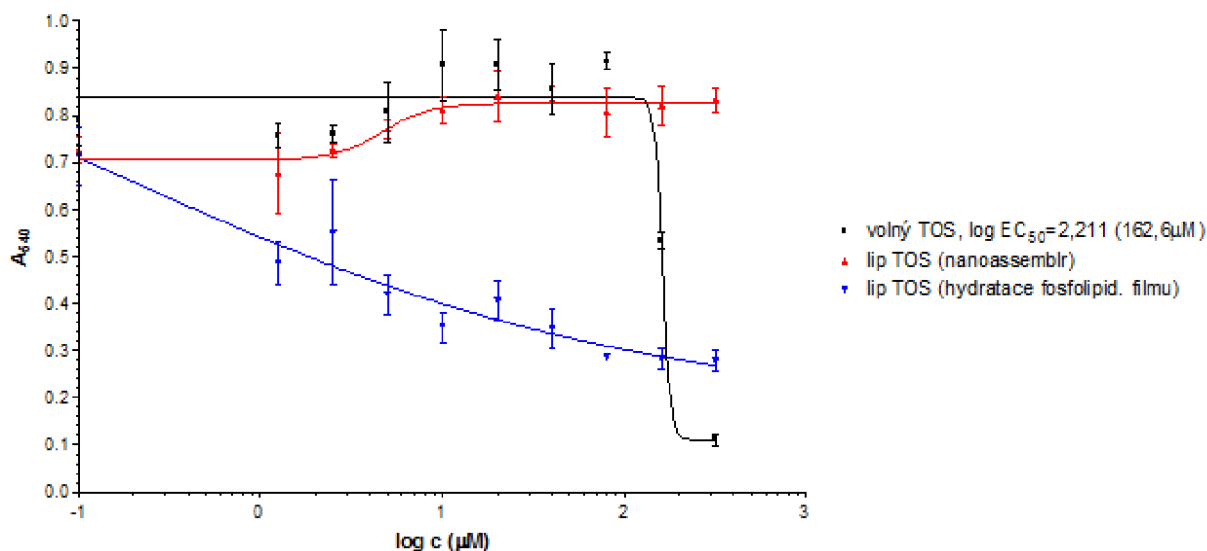
Obrázek 48: Cytotoxicita α -TOS na buněčnou linii A549 po expozici 48 hodin.

Na obrázku 48 jsou zobrazeny výsledky MTT testu prováděném na buňkách A549. Jako derivát VE byl použit α -TOS v rozmezí koncentrací $320\ \mu\text{M}$ – $1,25\ \mu\text{M}$. Z grafu je patrné, že volný α -TOS způsobuje apoptózu buněk při EC_{50} $151\ \mu\text{M}$. Liposomy připravené hydratací lipidového filmu snižovaly opět proliferaci buněk více nežli ty připravené nanofluidizací. Dále je z výsledků patrné, že α -TEA byla účinnější nežli α -TOS, jelikož měla nižší hodnotu EC_{50} .



Obrázek 49: Cytotoxicita α -TEA na buněčnou linii MFC-7 po expozici 48 hodin.

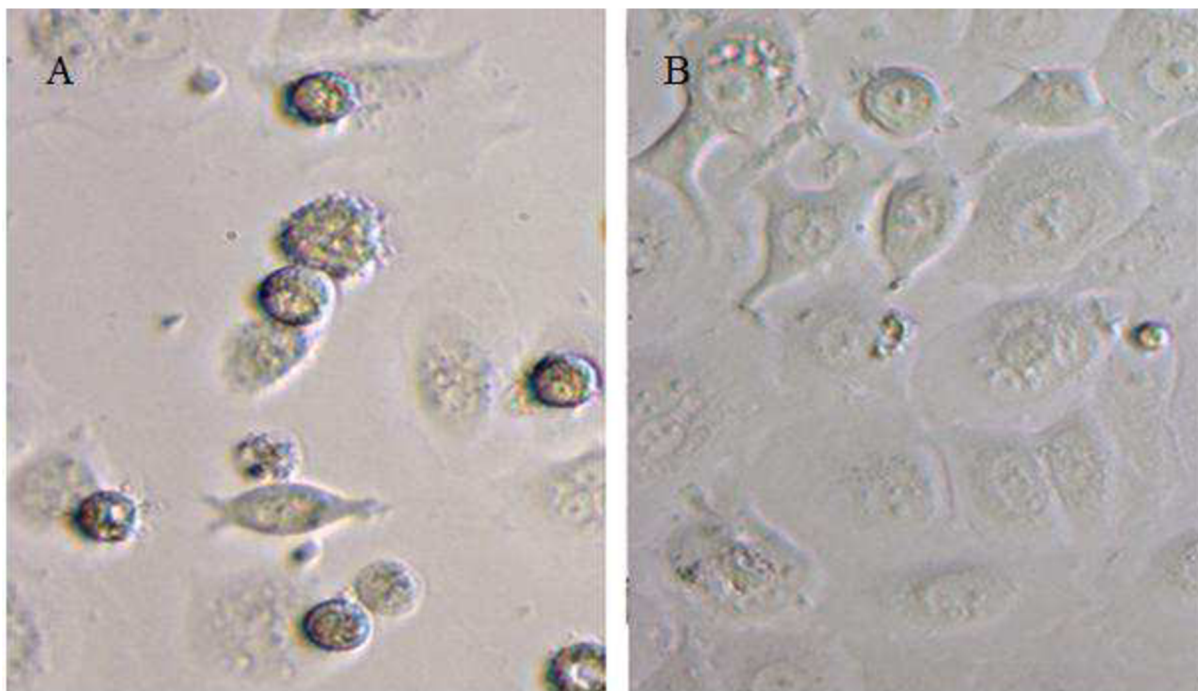
Na obrázku 49 jsou zaznamenány výsledky MTT testu prováděném na buňkách MCF-7. Jako derivát VE byla použita α -TEA v rozmezí koncentrací 320 μM –1,25 μM . Z grafu je patrné, že volná α -TEA způsobuje apoptózu buněk (EC_{50} 43 μM). Liposomální α -TEA opět vykazuje zpoždění účinku. Liposomy připravené hydratací lipidového filmu snižovaly proliferaci buněk více nežli připravené nanofluidizací. Z grafu také vyplývá, že buňky MCF-7 jsou vůči derivátům VE citlivější nežli buňky A549.



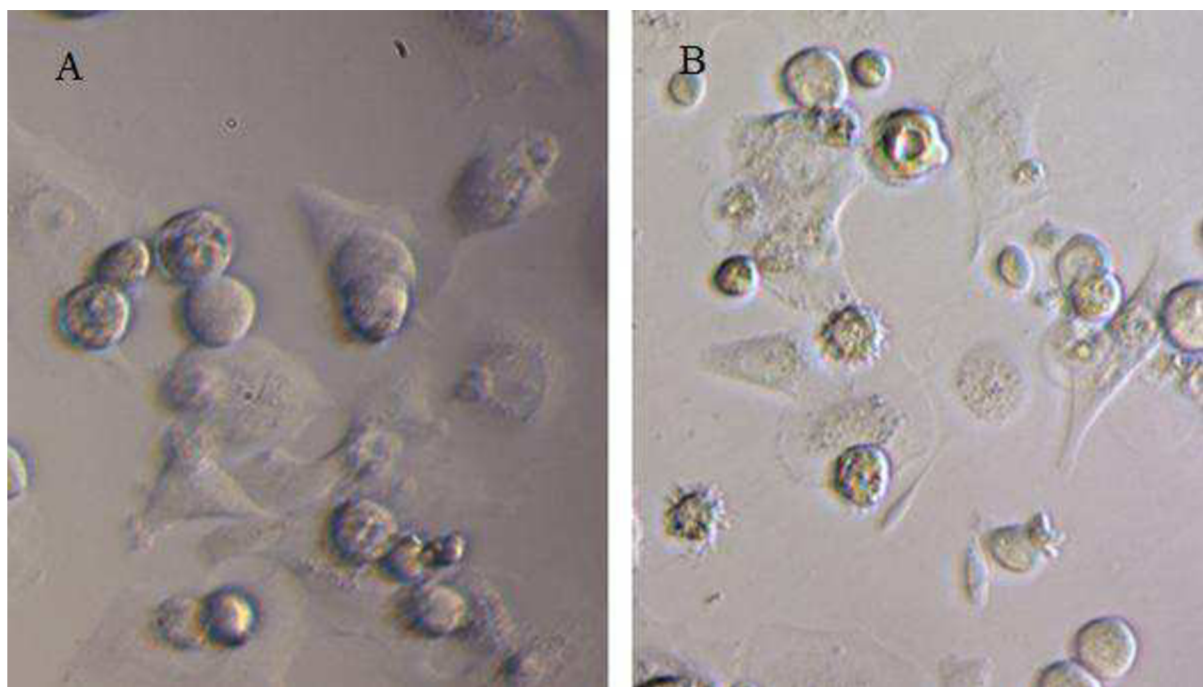
Obrázek 50: Cytotoxicita α -TOS na buněčnou linii MFC-7 po expozici 48 hodin.

Na obrázku 50 jsou znázorněné výsledky MTT testu prováděném na buňkách MCF-7. Jako derivát VE byl použit α -TOS v rozmezí koncentrací 320 μM –1,25 μM . Z grafu je patrné, že volný α -TOS způsobuje apoptózu buněk až ve vysokých koncentracích (162 μM). Liposomální α -TOS (hydratace lipidního filmu) na těchto buňkách vykazoval rychlejší nástup účinku již v mikromolárních koncentracích. Liposomy připravené nanofluidizací nevykazovaly cytotoxický účinek ve sledované škále koncentrací. Z grafu je také zřetelné, že buňky MCF-7 jsou vůči derivátům VE citlivější nežli buňky A549.

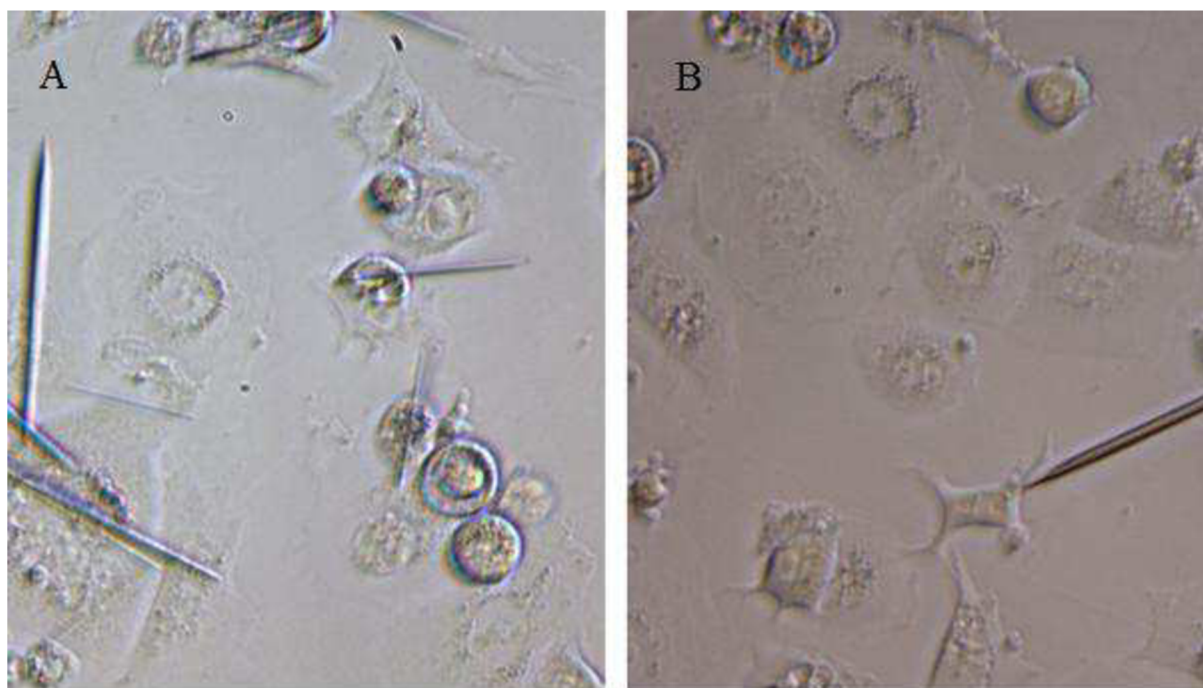
Liposomy nesoucí inkorporovaný paclitaxel byly složeny z 60 mol% SOPC, 20 mol% POPG, 20 mol% MOPC a 5 mol% PTX. Tato kompozice byla převzata z literatury [53]. Liposomy byly připravovány do PBS a následně ředěny médiem a aplikovány na buňky MCF-7. Byly připraveny dvě různé řady. První byla v rozmezí 320 μm –2,5 μm PTX a druhá 10 μm –10 nm PTX v jamce. Obě řady byly připraveny s volným PTX i liposomálním PTX. Liposomy byly opět připravovány dvěma metodami a to nanofluidizací a hydratací lipidového filmu. U paclitaxelu nebylo možné použít pro stanovení cytotoxicity MTT test, jelikož docházelo k nežádoucím vedlejším reakcím, vedoucím k falešné negativě výsledků. Proto byla úmrtnost buněk zaznamenána pouze vizuálně za použití světelného mikroskopu a to po 24 hodinách působení PTX. Z fotek z mikroskopu lze vidět, že při přípravě liposomů pomocí nanofluidizace docházelo ke krystalizaci paclitaxelu uvolněného z liposomů. U vzorku připravovaných metodou hydratace lipidového filmu nedocházelo ke krystalizaci paclitaxelu.



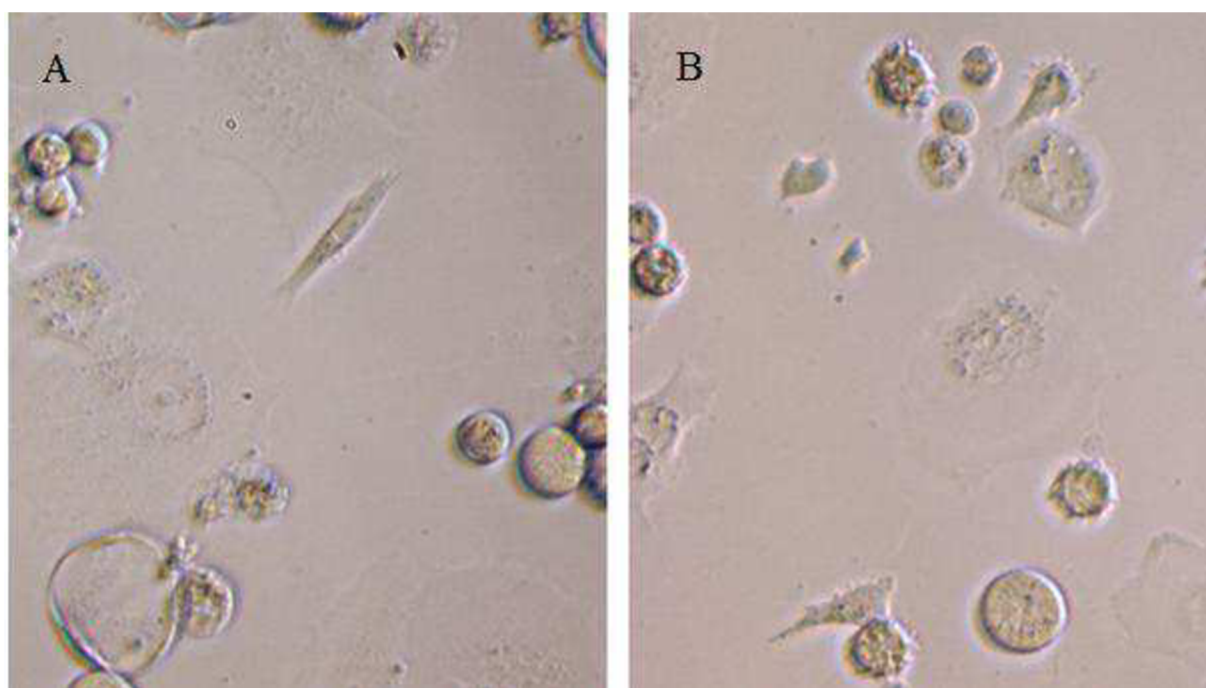
Obrázek 51: Obrázek ze světelného mikroskopu zachycující kontrolu a mrtvé buňky. Je zde patrný rozdíl mezi živými a mrtvými buňkami. Živé buňky jsou adherovány na dno jamky a mají nepravidelný tvar (B), zatímco mrtvé buňky jsou v jamce volně a jejich tvar je kulovitý s četnými apoptickými tělísky (A).



Obrázek 52: Snímek ze světelného mikroskopu zachycující buňky po aplikaci liposomálního PTX. Liposomy byly připraveny metodou hydratace lipidového filmu. Na obrázku A jsou buňky po aplikaci 1,25 μM PTX. Tyto buňky jsou již mrtvé. Na snímku B jsou buňky po aplikaci 4,5 nM PTX. Ze snímku je patrné, že tyto buňky již také začínají umírat. Expozice PTX na buňky byla 24 hodin.



Obrázek 53: Snímek ze světelného mikroskopu zachycující působení liposomálního PTX na buňky MCF-7 po dobu 24 hodin. Liposomy byly připraveny metodou nanofluidizace. Na obou snímcích jsou patrné krystalky PTX. Na obrázku A jsou vyfocené buňky po působení 1,25 μM PTX, tyto buňky jsou již mrtvé. Na snímku B jsou buňky po aplikaci 4,5 nM PTX, i u těchto buněk již dochází k apoptóze.

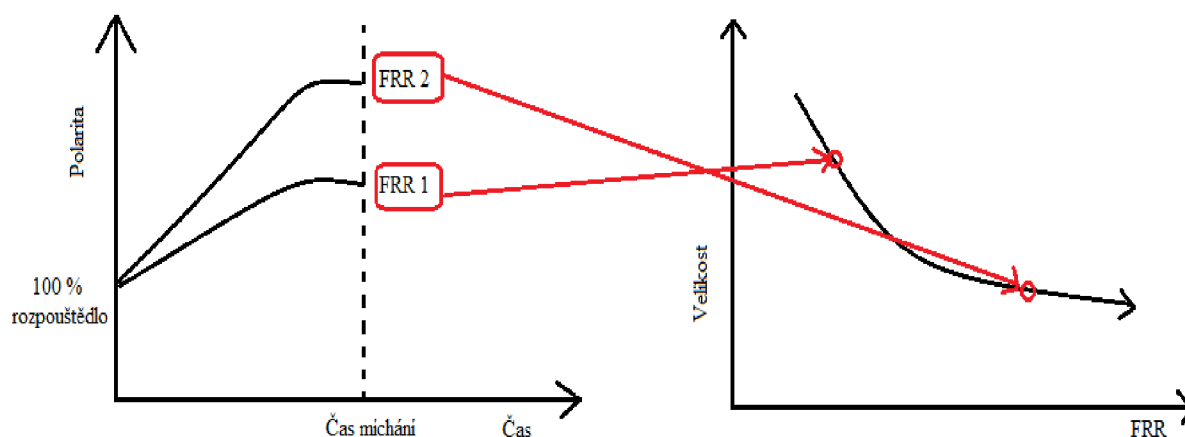


Obrázek 54: Snímek ze světelného mikroskopu zachycující buňky po přidavku volného PTX. Na snímku A jsou buňky po expozici 13 nM PTX a na snímku B po expozici 4,5 nM PTX. Na obou dvou snímcích jsou zachyceny již mrtvé buňky.

6 DISKUSE

Příprava nanočástic metodou nanofluidizace je ovlivňována řadou faktorů, mezi něž patří i parametry FRR a TFR. Při nanofluidizaci dochází k mísení organické fáze obsahující rozpuštěné lipidy a vodné fáze v mikrokanálcích kazety, které jsou opatřené drážkami podporujícími mísení tekutin. V důsledku míchání rozpouštědla a vodného média se zvyšuje polarita prostředí, což způsobuje to, že se postupně snižuje rozpustnost lipidů a dochází k jejich samouspořádání do rovinných lipidových dvojvrstev. S rostoucí velikostí těchto rovinných dvojvrstev, roste velikost povrchu hydrofobních řetězců, které se snaží minimalizovat kontakt s vodným prostředím. Dochází tedy k postupnému ohýbání dvojvrstev a jejich následné vezikulaci za tvorby liposomů. Při nízkých FRR např. 1:1 se mění polarita v kanálku pomaleji, oba proudy (organické i vodné fáze) tak mají více času spolu interagovat a tím dochází k produkci větších liposomů. Tento efekt je posilován vysokou koncentrací etanolu, jak bude diskutováno níže. Při zvýšení FRR např. na 3:1 dochází ke změně polaritry rychleji a snižuje se tak pravděpodobnost tvorby větších liposomů, neboť stabilita fragmentů lipidních dvojvrstev je nižší a mají tendenci k rychlé vesikulaci. Rychlejší změnou polaritry, a tedy vyšším FRR tedy dochází k tvorbě menších částic [23], což jsem také experimentálně prokázala.

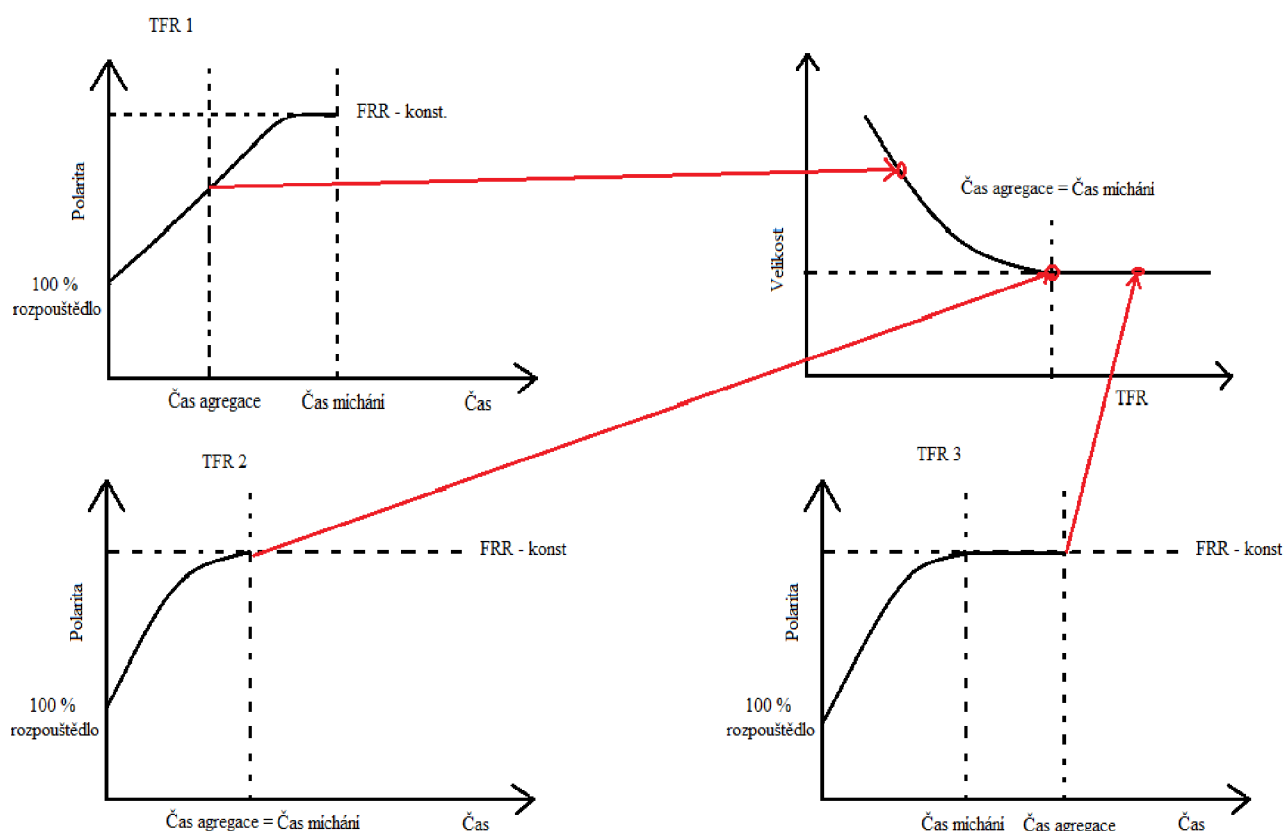
Další faktor, který může mít vliv na velikost liposomů je přítomnost etanolu. V současných studiích bylo prokázáno, že etanol je schopen proniknout do membrány liposomů. Přítomnost etanolu v membráně může ovlivňovat povrchové napětí na rozhraní lipid-voda. Penetrace alkoholů uvnitř dvojvrstvy a jejich vázání na ni způsobuje snížení ohybové tuhosti a podporuje fúzi vezikul. Zbytkový etanol v suspenzi liposomu může tedy podporovat fúzi vezikul [[60]. Na druhou stranu zvýšená koncentrace etanolu při FRR 1:1 stabilizuje fragmenty lipidní dvojvrstvy, zpomaluje jejich vesikulaci a usnadňuje jejich fúzi a v konečném důsledku vede ke tvorbě liposomů z větších fragmentů lipidní dvojvrstvy, což vede k formování liposomů s větším průměrem. Graficky je tento efekt zobrazen na obrázku 55.



Obrázek 55: Závislost velikosti liposomů na FRR. Na obrázku je znázorněno, že při vyšším poměru FRR 2 je v daném čase vyšší i polarita směsi, a proto vznikají liposomy o menších

velikostech, zatímco při nižším FRR1 je polarita směsi v daném čase nižší, což vede k tvorbě větších vezikul, jelikož tyto vezikuly mají čas fúzovat.

Rychlost průtoku TFR ovlivňuje velikost liposomů pouze v případě, že čas potřebný k smísení obou fází je delší než čas, při kterém dochází k agregaci lipidů a tvorbě fragmentů fosfolipidové membrány. Po překročení této hranice nemá TFR na velikost liposomů nijak významný vliv [23].



Obrázek 56: Závislost velikosti liposomů na TFR. Z obrázku je patrné, že při TFR 2 je čas agregace a čas potřebný k dokonalému smísení stejný. Tato hodnota je tedy hraniční. Při TFR 1 je čas agregace menší nežli čas míchání, stejně tak je menší i polarita v čase agregace, proto dochází k vzniku větších vezikul. Při TFR 3 je čas agregace větší než čas míchání a TFR 3 tedy nemá vliv na velikost liposomů.

Velikost připravovaných liposomů nám ovlivňuje také použitý lipid. Z výsledků měření vyplývá, že liposomy složené z DSPC mají mnohem větší velikost, nežli liposomy složené z EPC a SoyPC. Tento rozdíl velikostí, může být způsoben hodnotou teploty fázového přechodu. Tato teplota je u DSPC rovna přibližně 55 °C a u SoyPC a EPC je pod pokojovou teplotou (přibližně 4 °C). Předchozí výzkumy o použití nanofluidiky pro přípravu liposomů prokázaly, že velikost vezikul je ovlivňována teplotou v případě lipidů s vysokou teplotou fázového přechodu. Bylo zjištěno, že lipidy s vysokou teplotou fázového přechodu vykazují

vysoký modul elasticity membrán, což znamená, že mají méně flexibilní („tužší“) membránu. Proto liposomy vytvořené pod nebo blízko teploty fázového přechodu lipidů mají tendenci být větší. Naproti tomu u liposomů vytvořených při teplotě, která je daleko nad teplotou fázového přechodu, je závislost velikosti na teplotě mnohem menší, protože modul pružnosti membrány je v této oblasti teplot již poměrně konstantní [61]. Obecně lze říci, že rychlost agregace lipidů je ovlivněna teplotou a to velmi rozdílně nad a pod bodem fázového přechodu, což je třeba brát v potaz při nastavení parametrů FRR, TFR a teploty mísení. Teplota, při které dochází k mísení vodné a organické fáze, nutně tak změní rozdíl mezi časem agregace a časem mísení. Detailnější prozkoumání vlivu jednotlivých parametrů je dalším úkolem pro mé následovníky.

Přítomnost cholesterolu v liposomové membráně také ovlivňuje výslednou velikost liposomů. Způsobuje totiž zvýšení stability membrány a tím i modulu pružnosti u lipidní membrány tvořené nenasycenými fosfolipidy, proto jsou liposomy obsahující ve své struktuře cholesterol větší nežli liposomy bez obsahu cholesterolu. Jako nevhodnější obsah cholesterolu jsem zvolila 30 mol%, protože řada předchozích studií prokázala, že vysoký obsah cholesterolu v liposomech inhibuje inkorporaci hydrofobního léčiva do lipidové membrány a vede k fázové separaci lipidů a léčiva [23].

Liposomy složené z EPC mohly přijmout až 15 mol% α -TOS bez ovlivnění stability dvojrůstvy, nad tuto hodnotu již dochází k fázové separaci a destabilizaci liposomů. To vede k velkému nárůstu polydisperzity, což bylo patrné při dosažení koncentrace α -TOS 20 mol%. Složení 90% EPC a 10% α -TOS představuje tedy dobrý kompromis mezi stabilitou liposomálního preparátu a dostatečnou enkapsulační kapacitou. Tuto lipidní kompozici jsem zvolila pro další experimenty jako optimální z hlediska morfologické stability liposomů. K podobným výsledkům dospěli i další autoři [62].

Lze tedy shrnout, že pomocí metody nanofluidizace jsme schopni připravit homogenní preparáty, jejichž velikost lze dále upravovat pomocí sekundárních metod jako je např. extruze. Tato metoda nám umožňuje přípravu malých unilamelárních liposomů v jednom kroku bez nutnosti sonikace, které mohou být využity pro další aplikace jako je např. zabudování proteinů, inkorporace léčiv nebo dalších látek. Velikost těchto liposomů také lze upravovat hydratací a rehydratací. Nanofluidizace se tak jeví jako metoda vhodná pro průmyslové využití při přípravě liposomálních terapeutik.

Pro přípravu liposomů obsahující paclitaxel nebyla metoda nanofluidizace vhodná, jelikož docházelo ke krystalizaci paclitaxelu. Tento jev je patrně způsoben rozdílnou rychlostí agregace paclitaxelu a lipidů, což vede nejen k zabudování paclitaxelu do liposomálních struktur, ale také ke tvorbě krystalů paclitaxelu. Ke krystalizaci paclitaxelu z unilamelárních liposomů dochází také při jeho rychlém uvolňování z liposomů. Multilamelární liposomy jsou z tohoto hlediska daleko stabilnější a zřejmě vhodnější pro vývoj výsledné lékové formy. Optimalizace lipidní kompozice a parametrů přípravy liposomů metodou nanofluidního mísení by mohla vést ke tvorbě stabilnějších liposomů. Z hlediska dalšího vývoje lékového nosiče pro paclitaxel budou zřejmě výhodnější částice typu „soli-lipid nanoparticles“, které je principiálně možné také připravit metodou nanofluidního mísení.

Ve své práci jsem použila dvě buněčné nádorové linie, které se liší svojí citlivostí k použitým cytostatikům. Je třeba předeslat, že *in vitro* testovací systém se liší od podmínek,

kteřé jsou v nádorové tkáni a obecně v komplexním prostředí organismu. Nanočasticové systémy, jak již bylo popsáno v teoretické části, uvolňují enkapsulované léčivo postupně, a to buď v nádorové tkáni, nebo při internalizaci je léčivo uvolňováno v buňce. Výsledky testování na nádorových liniích ukázaly, že léčivo je uvolňováno postupně, což odráží tvar křivek koncentrační závislosti. Pro volné látky jsem dostala klasické křivky sigmoidního tvaru. Liposomální deriváty vitamínu E vykazovaly odchylky od takové křivky, což je typický rys pro postupné uvolňování léčiva z nosiče, které je doprovázeno postupným zvyšování koncentrace volného léčiva v mediu. Dalším faktorem, který ovlivňuje průběh křivky koncentrační závislosti je inkorporace nanočastic do buněk. Tato oblast bude předmětem dalšího studia mechanismu cytotoxického účinku a nebyla předmětem předložené diplomové práce. Dalším rysem typickým pro testování nanočastic v *in vitro* systémech je jejich omezená sedimentace a tím i interakce s adherovanými buňkami. Tento faktor se také projeví na průběhu křivek koncentračních závislostí a může vést k snižování EC_{50} , což jsem také pozorovala pro lipofilní deriváty vitamínu E.

V této práci jsem prokázala, že metodou nanofluidního mísení lze reprodukovatelně připravit liposomy nesoucí hydrofobní cytostatika a tato oblast je perspektivní pro další výzkum a vývoj. Mé výsledky také ukazují, že tato technologie je vhodná obecně pro přípravu liposomálních nanočasticových nosičů léčiv a vakcín. Z tohoto hlediska je významné zjištění, že liposomy připravené nanofluidním mísením lze stabilizovat sacharidovými kryoprotektivy v procesu lyofilizace, což jsem ověřila experimentálně. Tento krok je důležitým předpokladem pro širší využití při vývoji komerčních liposomálních preparátů.

Věřím, že jsem svojí prací přispěla k zavedení a rozvoji této nové unikátní technologie v České Republice.

7 ZÁVĚR

Diplomová práce popisuje vypracování optimalizace přípravy monodispersní nanliposomů s nízkým stupněm polydispersity metodou nanofluidního směšování na přístroji Nano-Assemblr™.

Metoda byla použita na přípravu liposomů s enkapsulovanými hydrofobními cytostatiky (deriváty vitamínu E a paclitaxel). V případě paclitaxelu dochází při přípravě liposomální formulace k nežádoucí krystalizaci cytostatika. V případě derivátů vitamínu E byla vyvinuta stabilní liposomální formulace a byl ověřen proces lyofilizace v přítomnosti kryoprotektiva.

Liposomální preparáty testovaných cytostatik vykazovaly cytotoxický účinek na testovaných nádorových liniích (A549 a MCF-7). Průběh křivek koncentrační závislosti cytotoxicity byl pro liposomální preparáty derivátů vitamínu E odlišný od křivek pro volné látky, což naznačuje pozvolné uvolňování léčiva z liposomů. Tento efekt je žádoucí pro aplikaci *in vivo* v protinádorové terapii.

Další studium této problematiky bude zaměřeno na modifikaci povrchových struktur liposomů a jejich cílení k nádorovým liniím. Konečným cílem je preklinické testování na myších nádorových modelech.

8 SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

Výzkumný ústav veterinárního lékařství	VÚVeI
Small interfering ribonukleová kyselina	siRNA
Deoxyribonukleová kyselina	DNA
Unilamelární vezikuly	ULV
Multilamelární vezikuly	MLV
Multyvezikulární vezikuly	MMV
Malé unilamelární vezikuly	SUV
Velké unilamelární vezikuly	LUV
Vaječný fosfatidylcholin	EPC
Sojový fosfatidylcholin	SoyPC
Fosfatidylcholin	PC
2-distearoyl-sn-glycerophosphocholine	DSPC
Polyethylenglykol	PEG
Teplota fázového přechodu, tranzitní teplota	T _c
Molární procenta	mol%
The staggered herringbone micromixer	SHM
Dynamický rozptyl světla	DLS
Děřjaginova, Landauemova, Verweymova a Overbeekemova teorie	DLVO
Nanoparticle Tracking Analysis	NTA
Elektronový mikroskop	EM
Transmisní elektronový mikroskop	TEM
Skenovací elektronový mikroskop	SEM
Rastovací elektronový mikroskop	REM
Retinoblastomový protein	pRB
Transforming grow factor beta	TGFβ
Fas associated death domain protein	FADD
Death including signalling complex	DISC
B-cell lymphoma 2	BCL-2
BCL-2 associated X protein	BAX
BCL-2 antagonist killer	BAK
Enhanced permeability and retention effect	EPR efekt
Koenzym A	CoA
Nikotinamidadenindinukleotid	NADH
Flavinadenindinukleotid	FADH ₂
Adenosintrifosfát	ATP
Ligand pro FAS	FasL
Vitamín E	VE
Volné kyslíkové radikály	ROS
Protein kináza C	PKC
Proteinová fosfatáza 2A	PP2A

JUN-N-terminální kináza	JNK
α -tokoferyl sukcinát	α -Tos
α -tokoferyl ester kyseliny octové	α -TEA
α -tokoferyl maleamid	α -TAM
Paclitaxel	PTX
Di-(2-etylhexyl)ftalátu	DEHP
Polyvinylchlorid	PVC
1-oleoy-2-hydroxy-sn-glycerol-3-fosfatidylcholin	MOPC
1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-fosfocholin	SOPC
1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)	POPG
Fosfátový pufr	PBS
Etanol	EtOH
3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid	MTT
dodecylsulfát	SDS
Flow rate ration	FRR
Total flow rate	TFR

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ÇAĞDAŞ, Melis a kol. Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery. *Intech* [online]. 2014, 2014(6), 1-50 [cit. 2016-08-15]. DOI: 10.5772/58459. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/application-of-nanotechnology-in-drug-delivery/liposomes-as-potential-drug-carrier-systems-for-drug-delivery>
- [2] DUA, J.S. a kol. Liposome: Methods of preparation and applications. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*. 2/2012, roč. 3, s. 14-20, ISSN 2229-4619.
- [3] MEIJER, CATHARINA. Green werkzame stof in creme zonder goede aflevertechniek. *Beauty Journaal* [online]. 2015, 2015(6) [cit. 2016-08-23]. Dostupné z: <http://www.beautyjournaal.nl/2015/07/07/geen-werkzame-stof-in-creme-zonder-goede-aflevertechniek/>
- [4] HADAŠOVÁ, Eva. Liposomální lékové formy. *Remedia* [online]. 2006, 16(4), 433–437 [cit. 2016-08-16]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Lekove-formy/Lipozomalni-lekove-formy/6-H-gC.magarticle.aspx>
- [5] MONTEIRO, N. a kol. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of the royal society interface* [online]. 2014, 29(10) [cit. 2016-08-16]. DOI: 10.1098/rsif.2014.0459. Dostupné z: <http://rsif.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsif.2014.0459>
- [6] PANDEY, Himanshu a kol. Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. *Brazilian Archives of Biology and Technology* [online]. 2016, 59(8) [cit. 2016-08-18]. DOI: 10.1590/1678-4324-2016150477. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132016000100303&lang=pt
- [7] GUBERNATOR, Jerzy. Active methods of drug loading into liposomes: recent strategies for stable drug entrapment and increased in vivo activity. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2011, 8(5) [cit. 2016-08-18]. DOI: 10.1517/17425247.2011.566552. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/51050362_Active_methods_of_drug_loading_into_liposomes_Recent_strategies_for_stable_drug_entrapment_and_increased_in_vivo_activity
- [8] TORCHILIN, Vladimír a kol. Liposomes: A Practical Approach. 2. New York: Oxford university press, 2003. ISBN 0199636540.
- [9] AGARWAL, Renu. Liposomes in topical ophthalmic drug delivery: an update. *Drug Delivery* [online]. 2014, 23(4), 1-17 [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.3109/10717544.2014.9433. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/264676648_Liposomes_in_topical_ophthalmic_drug_delivery_an_update

- [10] Cytologie – nauka o buňkách. *Masarykova univerzita přírodovědecká fakulta* [online]. Brno: Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, 2011 [cit. 2016-08-24]. Dostupné z: <http://www.sci.muni.cz/ptacek/CYTOLOGIE6.htm>
- [11] Liposome Preparation. Avanti [online]. 2016: Alabama, 2016 [cit. 2016-08-09]. Dostupné z: <https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/>
- [12] AKBARZADEH, Abolfazl, a kol. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2013, 8(1) [cit. 2016-08-09]. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102. Dostupné z: <http://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-8-102>
- [13] Liposome Extrusion. *Biopharma process systems* [online]. Anglie: Copyright, 2015 [cit. 2016-08-09]. Dostupné z: <http://biopharma.co.uk/blog/2013/09/24/liposome-extrusion/>
- [14] WALDE, Peter a kol. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. *Biomolecular Engineering* [online]. 2001, 18(4), 143–177 [cit. 2016-08-09]. DOI: 10.1016/S1389-0344(01)00088-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389034401000880>
- [15] WAGNER, Andreas a kol. Liposome Technology for Industrial Purposes. *Journal of Drug Delivery* [online]. 2011, 2011(Article ID 591325), 1-9 [cit. 2016-08-09]. DOI: 10.1155/2011/591325. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jdd/2011/591325/>
- [16] BARENHOLZT, Y. a kol. A new method for preparation of phospholipid vesicles (liposomes) - french press. *FEBS Letters* [online]. 1979, 99(1), 210-214 [cit. 2016-08-09]. DOI: 10.1016/0014-5793(79)80281-1. Dostupné z: [http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793\(79\)80281-1](http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793(79)80281-1)
- [17] LAOUNI, A., a kol. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *JOURNAL OF COLLOID SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY* [online]. 2012, 2012(1), 147–168 [cit. 2016-08-09]. DOI: 10.1166/jcsb.2012.1020. ISBN 10.1166/jcsb.2012.1020. Dostupné z: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article>
- [18] CHARCOSSET, Catherine a kol. Preparation of liposomes at large scale using the ethanol injection method: Effect of scale-up and injection devices. *Chemical Engineering Research and Design* [online]. 2015, 94(1), 508-515 [cit. 2016-08-09]. DOI: 10.1016/j.cherd.2014.09.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263876214004092>
- [19] DUA, J.S. a kol. Liposome: Methods of preparation and applications. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research* [online]. 2012, 3(2), 14-20 [cit. 2016-08-09]. Dostupné z: <http://www.technicaljournalsonline.com/ijpsr/VOL%20III/IJPSR%20VOL%20III%20ISSUE%20II%20APRIL%20JUNE%202012/Article%204%20April%20June%202012.pdf>

- [20] AFZAL, Arshad a kol. Three-objective optimization of a staggered herringbone micromixer. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2014, 192(3), 350-360 [cit. 2016-08-09]. DOI: 10.1016/j.snb.2013.10.109. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400513013117>
- [21] Staggered Herringbone Mixer designed for micro EDM milling. Itálie, 2010. Dostupné z: <http://lab.fs.uni-lj.si/lat/uploads/edm/bibJoze/10-imbt.pdf>
- [22] KASTNER, Elisabeth a kol. High-throughput manufacturing of size-tuned liposomes by a new microfluidics method using enhanced statistical tools for characterization. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2014, 477(1-2), 361-368 [cit. 2016-08-09]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.10.030. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037851731400753>
- [23] CARUGO, Dario, a kol. Liposome production by microfluidics: potential and limiting factors. *Scientific Reports*. 2016, 6(5), 25876. DOI: 10.1038/srep25876. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/srep25876>
- [24] JOSHI, Sameer a kol. Microfluidics based manufacture of liposomes simultaneously entrapping hydrophilic and lipophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016, 514(1), 160–168. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.09.027. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517316308481>
- [25] The NanoAssemblr Platform: Microfluidics-Based Manufacture of Nanoparticles. *Nepagene* [online]. Tokio: Copyright, 2015 [cit. 2016-08-24]. Dostupné z: http://www.nepagene.jp/pdf/PNI_Japan_Teikyo_U_July_2015.pdf
- [26] STROOCK, A. D. Chaotic Mixer for Microchannels. *Science* [online]. 2002, 295(25), 647-651 [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1126/science.1066238. ISBN 10.1126/science.1066238. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11809963>
- [27] ŠEVČÍKOVÁ, Petra a kol. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické listy: Laboratorní přístroje a postupy*. 2014, č. 108, s. 479-482. Dostupné z: http://www.chemickelisty.cz/docs/full/2014_05_479-482.pdf
- [28] Zeta Potenciál: Potenciál zeta a elektrická dvojvrstva. In: *Xray* [online]. Praha: Czech and Slovak Crystallographic Association (CSCA), 2014 [cit. 2016-07-12]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>
- [29] Instruments, Malven. Stabilita suspenzí a disperzí – proč jsou parametry jako velikost částic, zeta potenciál a reologické vlastnosti tak důležité? *Chemmagazin*. 2011, XXI, č. 2. Dostupné z: http://www.anamet.cz/sites/all/storage/Anamet_Suspenze.pdf
- [30] Overview of DLVO theory. *Laboratory of Colloid and Surface Chemistry* [online]. Švýcarsko: Creative Commons Attribution, 2014 [cit. 2016-08-09]. Dostupné z: <http://www.colloid.ch/index.php?name=dlvo>
- [31] How can Nanoparticle Tracking Analysis assist in the production of nanoparticles. *Malvern* [online]. Anglie: Copyright, 2016 [cit. 2016-08-09]. Dostupné z:

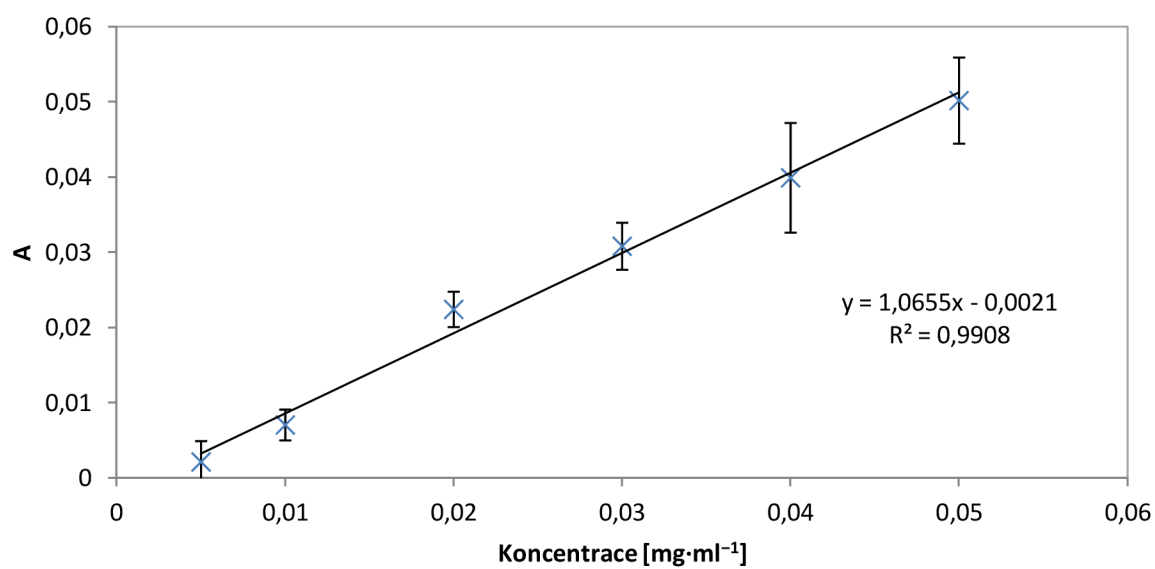
http://www.nanodiara.eu/fileadmin/nanodiara/download/Public_Conf_Bern_9.2013/Uhlig.pdf

- [32] CARR, Bob a kol. Nanoparticle Tracking Analysis. NanoSight Ltd [online]. Londýn: Copyright, 2013 [cit. 2016-08-09]. Dostupné z: http://particularsciences.ie/psl/brochures/supplier_brochures_pdf/nta_brochure.pdf
- [33] Particle sizing try using nanosight. Microscopy analysis [online]. United Kingdom: Copywriting, 2016 [cit. 2016-08-25]. Dostupné z: <http://www.microscopy-analysis.com/blog/blog-articles/particle-sizing-try-using-nanosight><http://ncore.web.unc.edu/nanosight/>
- [34] Fyzikální principy transmisní a skenovací elektronové mikroskopie. *Laboratoř elektronové mikroskopie* [online]. České Budějovice: Nebe Net, 2007 [cit. 2016-08-25]. Dostupné z: http://www.paru.cas.cz/lem/bak/1_1.htm
- [35] TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE. Atmilab [online]. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci., 2011 [cit. 2016-08-25]. Dostupné z: <http://atmilab.upol.cz/texty/TEM-teorie.pdf>
- [36] SEM ve službách biologie [online]. Olomouc, 2010 [cit. 2016-08-25]. Dostupné z: https://docs.google.com/file/d/0B_qpB0hwjTB7ZGZiMGQxMGUtMDlmZC00NW FkLTk5YjAtZmY5ZWVhOTU0Y2Q4/view?pli=1
- [37] Transmission Electron Microscopy. *Central microscopy reasearch facility* [online]. Iowa: The University of Iowa, 2017 [cit. 2017-02-19]. Dostupné z: <https://cmrf.research.uiowa.edu/transmission-electron-microscopy>
- [38] KOUDELKA, Stepan a kol. Liposomal delivery systems for anti-cancer analogues of vitamin E. *Journal of Controlled Release* [online]. 2015, **207**, 59-69 [cit. 2017-02-28]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.04.003. Dostupné z: http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=3E68dJPBEx8s6wHeKld&page=1&doc=1
- [39] Základy toxikologie pro farmaceuty; PharmDr. Marie Vopršalová, CSc., Doc. RNDr. Pavla Žáčková, CSc.; Karolinum 2000
- [40] KLENER, Pavel. *Principy systémové protinádorové léčby*. Praha: Grada Publishing, 2013. ISBN 978-80-247-4171-0.
- [41] HANAHAN, Douglas a kol. The Hallmarks of Cancer. *Cell* [online]. 2000, **100**(1), 57-70 [cit. 2017-02-28]. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400816839>
- [42] KLENER, Pavel. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Praha: Grada Publishing, 2010. ISBN 978-80-247-2808-7.
- [43] HANAHAN, Douglas a kol. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [online]. 2011, **144**(5), 646–674 [cit. 2017-02-28]. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867411001279>
- [44] GIDWANI, Bina a Amber VYAS. A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer

- Drugs. *BioMed Research International* [online]. 2015, **2015**(ID 198268), 15 [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.1155/2015/198268. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/198268>
- [45] *Pharmaceutical perspectives of cancer therapeutics* [online]. USA: Springer science, 2009 [cit. 2017-04-19]. ISBN 978-1-4419-0131-6. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=mUrIqpdTHy4C&pg=PA98&lpg=PA98&dq=epr+effect+electron+microscopy&source=bl&ots=WtazbzP8pq&sig=RVWdyCoHrU5bHfvBd9FAVcr6VyE&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwjWqrO0nbHTAhUpAcAKHQlaD8gQ6AEIXjAJ#v=onepage&q=epr%20effect%20electron%20microscopy&f=false>
- [46] HOŘEJŠÍ, Václav. *Základy imunologie*. 4. Praha: TRITON, 2009. ISBN 978-80-7387-280-9.
- [47] RIZVI, Salih a kol. The Role of Vitamin E in Human Health and Some Diseases. *Sultan Qaboos University Medical Journal* [online]. 2014, **14**(2), 157–165. [cit. 2017-02-12]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3997530>
- [48] GORNSTEIN, Erica a kol. The paradox of paclitaxel neurotoxicity: Mechanisms and unanswered questions. *Neuropharmacology* [online]. 2014, **76**(23), 175–183 [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.08.016. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002839081300381X>
- [49] DONG, L.-F. a kol. Vitamin E Analogues Inhibit Angiogenesis by Selective Induction of Apoptosis in Proliferating Endothelial Cells: The Role of Oxidative Stress. *Cancer Research* [online]. 2007, **67**(24), 11906-11913 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-3034. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/67/24/11906>
- [50] WEBER, Tobias. Vitamin E succinate is a potent novel antineoplastic agent with high selectivity and cooperativity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Apo2 ligand) in vivo. *Clinical Cancer Research* [online]. 2002, **8**(3) [cit. 2017-03-01]. Dostupné z: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/8/3/863>
- [51] NOVOSAD, J. a kol. Protein BCL-2 a jeho funkce v maligní transformaci buňky. *Klin Onkol*, 2002, 15, č. 1, s 2-6. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/23/456.pdf>
- [52] ANDERSON, K. Differential Response of Human Ovarian Cancer Cells to Induction of Apoptosis by Vitamin E Succinate and Vitamin E Analogue, - TEA. *Cancer Research* [online]. 2004, **64**(12), 4263-4269 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-03-2327. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/64/12/4263>
- [53] KOUDELKA, Štěpán a TURÁNEK, Jaroslav. Liposomal paclitaxel formulations. *Journal of Controlled Release* [online]. 2012, **163**(3), 322–334 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.09.006. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365912006785>

- [54] CROSASSO, Paola a kol. Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes. *Journal of Controlled Release* [online]. 2000, **63**(1-2), 19–30 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1016/S0168-3659(99)00166-2. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365999001662>
- [55] KOUDELKA, Štěpán a kol. Lyophilised liposome-based formulations of α -tocopheryl succinate: Preparation and physico-chemical characterisation. *Journal of pharmaceutical sciences* [online]. 2010, **5**(99), 2434-2443 [cit. 2017-03-22]. DOI: 10.1002/jps.22002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915326472>
- [56] STEWART, John Charles Marshall. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Analytical Biochemistry* [online]. 1980, **104**(1), 10-14 [cit. 2017-03-22]. DOI: 10.1016/0003-2697(80)90269-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269780902699>
- [57] Basic Principles of Freeze Drying. *Sp scientific* [online]. New York, 2012 [cit. 2017-03-22]. Dostupné z: <http://www.spscientific.com>
- [58] *Karl Fischer Volumetrická titrace Teorie a praxe* [online]. Praha: SCANLAB SYSTEMS, 2015 [cit. 2017-03-22]. Dostupné z: http://mujweb.cz/voracek/files/kf_voltitr_brozura_tim580_1110a.pdf
- [59] RISS, Terry. Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual* [online]. 2013, **5**(1) [cit. 2017-03-22]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- [60] PATRA, Michael a kol. Under the Influence of Alcohol: The Effect of Ethanol and Methanol on Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* [online]. 2006, **90**(4), 1121–1135 [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1529/biophysj.105.062364. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349506723049>
- [61] ZOOK, Justin a kol. Effects of temperature, acyl chain length, and flow-rate ratio on liposome formation and size in a microfluidic hydrodynamic focusing device. *Soft Matter* [online]. 2010, (6), 1352-1360 [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1039/B923299K. Dostupné z: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2010/sm/b923299k#!divAbstract>
- [62] TURÁNEK, Jaroslav a kol. Liposomal formulation of α -tocopheryl maleamide: In vitro and in vivo toxicological profile and anticancer effect against spontaneous breast carcinomas in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2009, **237**(3), 249–257 [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1016/j.taap.2009.01.027. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X09000593>

10 PŘÍLOHY



Obrázek 57: Kalibrační křivka použitá pro výpočet stanovení obsahu fosfolipidů Stewardovou metodou