



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

LIPOSOMÁLNÍ FORMY LÉČIV PRO LÉČBU PLICNÍCH ONEMOCNĚNÍ ZPŮSOBENÝCH VYBRANÝMI DRUHY BAKTERIÍ

LIPOSOMAL FORMS OF DRUGS FOR THE TREATMENT OF LUNG DISEASES CAUSED BY SELECTED
TYPES OF BACTERIA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Vendula Janoušková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1842/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Vendula Janoušková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Procesy a materiály medicínských aplikací
Vedoucí práce: **doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Liposomální formy léčiv pro léčbu plicních onemocnění způsobených vybranými druhy bakterií

Zadání diplomové práce:

- 1) Rešerše na formulaci liposomálních systémů, způsobů inkorporace biologicky aktivních látek vhodných pro léčbu plicních onemocnění a metod charakterizace.
- 2) Na základě rešerše vybrat vhodnou formulaci, biologicky aktivní látku a testovací mikroorganismus pro studium účinnosti daného systému.
- 3) Provedení experimentů zaměřených na charakterizaci formulovaných vezikulárních systémů a popis vlivu na vybraný mikroorganismus.
- 4) Posouzení zvoleného systému jako potenciálního nosiče biologicky aktivních látek pro léčbu plicních onemocnění.

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

Bc. Vendula Janoušková
studentka

doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá studiem enkapsulační účinnosti antibiotika doxycyklinu v lipozomálních systémech s odlišným složením komponent. Pojednává i o kinetice uvolňování enkapsulovaného léčiva z těchto nosičových systémů. Lipozomální systémy pro léčbu lokálních plicních onemocnění byly vybrány na základě vhodných fyzikálně-chemických vlastností. Jako mikroorganismus, který modeluje lokální plicní onemocnění, plicní pneumonii, byla vybrána bakterie *Staphylococcus aureus*. Doxycyklin byl zvolen jako antibiotikum ideální pro léčbu stafylokokové infekce. Cílem bylo optimalizovat složení lipozomů tak, aby měly lipozomální systémy aplikační potenciál pro inhalační podávání léčiv. Byly připraveny dva vhodné lipozomální systémy skládající se z přísad cholesterolu a kyseliny fosfatidové. Podařilo se nám určit koncentraci léčiva pro enkapsulaci, která měla dostatečnou antimikrobiální účinnost pro léčbu lokálního plicního onemocnění. Ke stanovení vedlejších účinků zvolených lipozomálních systémů byly využity cytotoxické testy. Dále byly jednotlivé lipozomální systémy charakterizované z hlediska velikosti, zeta potenciálu a kinetické stability, což jsou další důležité vlastnosti ovlivňující jejich budoucí aplikační potenciál.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the study of the encapsulation efficiency of the antibiotic doxycycline encapsulated in the individual liposomal systems depending on different composition of the components. We also discussed the kinetics of the encapsulated drug releasing from the carrier systems. The liposomal systems for the treatment of local lung diseases were selected due to their suitable physicochemical properties. The bacterium called *Staphylococcus aureus* was chosen as a model of the local lung disease, pulmonary pneumonia. Doxycycline was chosen as the antibiotic ideal for the treatment of staphylococcal infection. The aim of the diploma thesis was to optimize the composition of liposomes which would have application potential for the inhalation administration of drugs. Two suitable liposomal systems have been prepared consisting of the addition of various components as cholesterol and phosphatidic acid. We have succeeded in determination of the drug concentration for the encapsulation which had sufficient antimicrobial efficacy to treat the local lung disease. The cytotoxic tests were used to determine the side effects of selected liposomal systems. Furthermore, the individual liposomal systems were characterized in terms of size, zeta potential and kinetic stability which are other important properties effecting their future application potential.

KLÍČOVÁ SLOVA

Lipozomy, enkapsulační účinnost, doxycyklin, kinetika uvolňování léčiva, *Staphylococcus aureus*, velikost lipozomů, zeta potenciál, antimikrobiální účinek, cytotoxický účinek, inhalační podávání, plicní pneumonie

KEY WORDS

Liposomes, encapsulation efficiency, doxycycline, kinetics of the drug releasing, *Staphylococcus aureus*, liposomal size, zeta potential, antimicrobial efficacy, cytotoxic efficacy, inhalation administration, pulmonary pneumonia

JANOUSHKOVÁ, Vendula. *Liposomální formy léčiv pro léčbu plicních onemocnění způsobených vybranými druhy bakterií* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-06]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/148069>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

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 použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. za jeho trpělivost a drahocenné rady. Dále bych chtěla poděkovat konzultantce Ing. Janě Szabové, Ph.D. za její čas, radu, ochotu, pomoc a přátelství. Poděkování též patří prof. RNDr. Márové, CSc. za ochotu při naší spolupráci, podporu, trpělivost a za všechny drahocenné rady. Ing. Hoové, Ph.D a Ing. Dzurické bych chtěla poděkovat za pomoc při antimikrobiálních a cytotoxických testech. V neposlední řadě patří mé poděkování mým přátelům za jejich optimismus a důvěru. Nejvíce bych však chtěla poděkovat svojí rodině za jejich lásku, pochopení a podporu při celém mém studiu.

Obsah

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Lipozomy	8
2.1.1	Fyzikálně-chemické vlastnosti a složení lipozomů	9
2.1.2	Rozdělení lipozomů	10
2.1.3	Metody přípravy lipozomů	11
2.1.4	Charakterizace lipozomů	12
2.1.5	Aplikace lipozomů v léčbě onemocnění	14
2.1.6	Enkapsulace léčiv do lipozomů	16
2.1.7	Interakce lipozomů s buňkami	16
2.1.8	Toxicita lipozomů	17
2.2	Inhalační podávání léčiv	18
2.2.1	Respirační onemocnění	19
2.3	Bakterie	21
2.3.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	22
2.4	Antibiotika	23
2.4.1	Doxycyklin	24
2.5	UV-VIS spektrofotometrie	25
2.5.1	Instrumentace	25
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	27
3.1	Lipozomální léčba infekcí vyvolaných bakterií <i>Staphylococcus aureus</i>	27
3.2	Nosičové systémy antibiotika doxycyklinu	29
3.3	Lipozomální léčba plicních infekcí	31
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
4.1	Použité chemikálie	33
4.2	Použité mikroorganismy a buněčné kultury	34
4.3	Příprava koncentračních řad doxycyklinu v PBS	34
4.4	Příprava lipozomů	35
4.5	Centrifugace	35
4.6	Dialýza	35
4.7	Charakterizace lipozomů	36
4.8	Stanovení antimikrobiálního účinku	37
4.8.1	Difuzní agarová metoda	37
4.9	Stanovení cytotoxicity	37
4.9.1	MTT test	38
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	39

5.1	Kalibrační křivka doxycyklinu v PBS	39
5.2	Optimalizace složení lipozomů v PBS	39
5.2.1	Vhodné molární zastoupení cholesterolu v lipozomech	40
5.3	Optimalizace koncentrace doxycyklinu pro enkapsulaci do lipozomů	42
5.4	Fyzikálně-chemická charakterizace lipozomů	42
5.4.2	Lipozomy z DPPC s přidavkem 30 mol. % PA.....	43
5.4.3	Lipozomy z DPPC s přidavkem 30 mol. % PA a 10 mol. % cholesterolu	44
5.4.4	Lipozomy z DPPC s přidavkem 30 mol. % PA a 30 mol. % cholesterolu	45
5.5	Enkapsulační účinnost lipozomů	46
5.6	Kinetika uvolňování doxycyklinu z lipozomů	47
5.7	Antimikrobiální účinek lipozomů	49
5.8	Cytotoxický účinek lipozomů	51
6	ZÁVĚR.....	55
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	58
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	67
8.1	Seznam zkratk.....	67
8.2	Seznam symbolů.....	68
9	PŘÍLOHY	69

1 ÚVOD

V současné medicíně se do popředí stále častěji dostává inhalační podání léčiv z důvodu vyhnutí se „first-pass“ efektu po průchodu játry, ve kterých dochází k částečné metabolizaci léčiva ještě před vstupem do krve. Velkou výhodou usnadňující transport léčiva z plic do krve je jejich velká absorpční plocha, tenká membrána a zvýšený průtok krve. Těž se výrazně upřednostňuje použití lipozomální formy léčiv, a to nejen kvůli ochraně lidského organismu před toxicitou samotného léčiva, ale také kvůli řízenému či cílenému uvolňování pouze v místě potřebného účinku.

Cílem této diplomové práce je stanovení enkapsulační účinnosti antibiotika doxycyklinu v závislosti na rozdílném složení komponent fosfolipidové dvojvrstvy lipozomálních systémů a studium kinetiky uvolňování enkapsulovaného doxycyklinu z jejich nosičové struktury. Lipozomální systémy vhodné pro inhalační podávání léčiv byly vybrány na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností. Ke splnění hlavního cíle byly stanoveny cíle dílčí, antimikrobiální a cytotoxický účinek zvolených lipozomálních systémů. Potenciální terapeutický účinek těchto lipozomálních systémů byl studován na bakterii *Staphylococcus aureus*, která byla zvolena jako modelový mikroorganismus indukující lokální plicní onemocnění, konkrétně plicní pneumonii. Dipalmitoylfosfatidylcholin (DPPC) byl zvolen jako základní komponenta všech připravovaných lipozomálních systémů díky tomu, že je nejhojněji zastoupeným fosfolipidem vyskytujícím se v surfaktantu plicních alveol. K této základní komponentě byla přidána kyselina fosfatidová a cholesterol pro zajištění stability lipozomálního systému v prostředí fyziologického pH a také kvůli snížení možného úniku enkapsulovaného léčiva z jejich nosičové struktury.

V posledním kroku diplomové práce byly ty nejvhodnější lipozomální systémy testovány na lidských keratinocytech za účelem zjištění, zda námi optimalizované lipozomální formy léčiv pro inhalační podávání a léčbu lokálních plicních onemocnění nevyvolávají negativní toxické účinky na zdravé lidské tkáně.

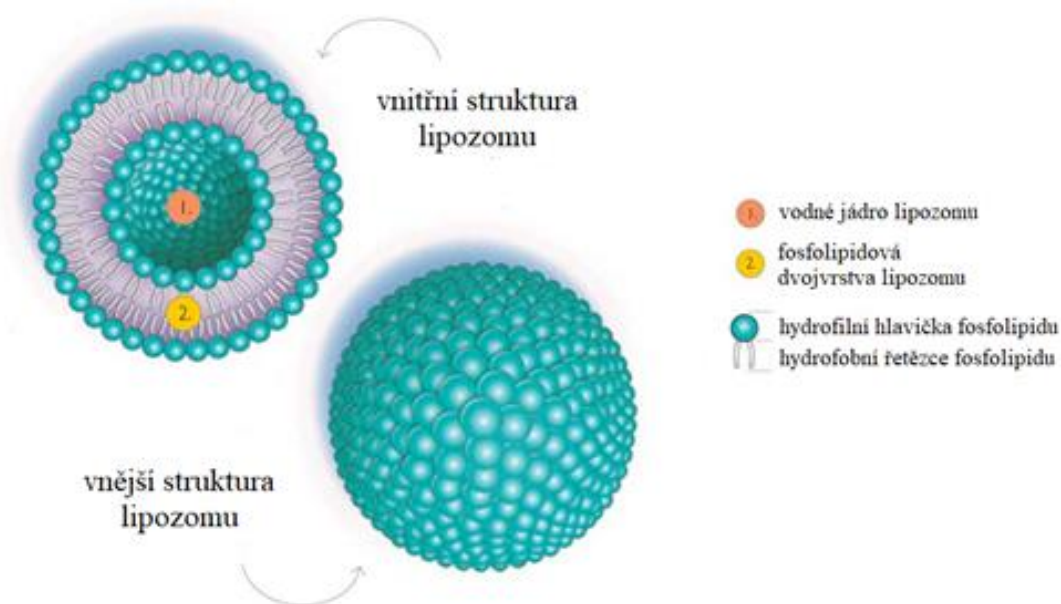
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Lipozomy

Lipozomy jsou uměle vytvořené **vezikulární systémy** skládající se z jedné nebo více fosfolipidových dvojvrstev obklopujících vnitřní vodný střed [1]. Poprvé byly popsány britským hematologem Alec Douglas Banghamem a jeho kolegy z univerzity Cambridge již v roce 1964 při testování nového elektronového mikroskopu. Pár let poté se začaly intenzivně zkoumat především jako systémy pro cílenou distribuci léčiv [2].

Lipozomy patří mezi první **nanočástice**, které byly použity v medicíně a schváleny FDA (Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv) a EMA (Evropskou agenturou pro léčiva) [3]. V dnešní době jsou lipozomy ceněny díky svým biologickým i fyzikálně-chemickým vlastnostem a jsou považovány za nejúspěšnější systémy **nosičů léčiv** (např. antibiotika, vakcíny a cytostatika). Za jejich úspěchem stojí nejen jejich vysoká biokompatibilita, neboť je jejich struktura značně podobná struktuře buněčné membrány, ale také snadná biodegradabilita v živém organismu [4].

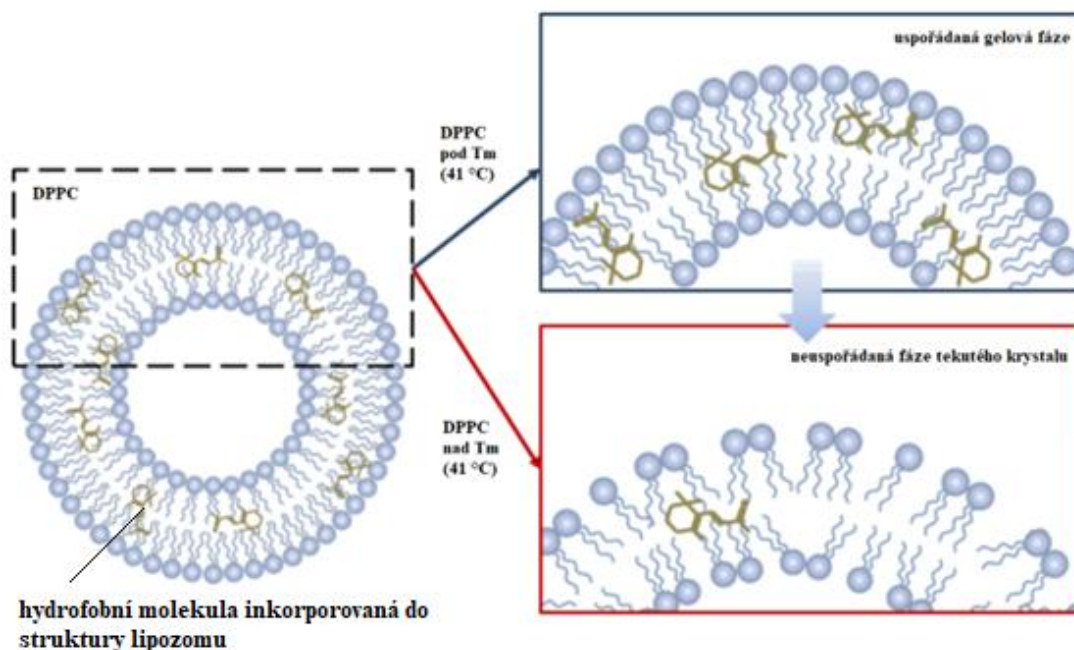
Základní stavební složkou fosfolipidové dvojvrstvy lipozomů jsou **amfifilní molekuly fosfolipidů**, které mají tendenci se ve vodě a vodném prostředí samovolně orientovat [5]. Hydrofilní části molekul fosfolipidů tvořené polárními hlavičkami jsou směřovány do vnitřního vodného středu a do extravezikulárního prostředí. Naopak hydrofobní části ve formě uhlíkatých řetězců jsou orientovány směrem k sobě. Strukturu lipozomu popisuje *obr. 1*. Díky své struktuře mají lipozomy schopnost inkorporovat širokou škálu molekul s rozličnými fyzikálně-chemickými parametry. Mohou sloužit jako **nosiče hydrofilních i hydrofobních léčiv**, přestože je jejich umístění ve fosfolipidové dvojvrstvě odlišné. Díky jejich rozdílnému umístění v nosičových systémech se liší princip inkorporace léčiva i jeho uvolňování [6, 7].



Obr. 1: Struktura lipozomu [8]

2.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti a složení lipozomů

Fyzikálně-chemické vlastnosti lipozomů jsou ovlivněny především složením lipozomální membrány určující výsledný povrchový náboj, stérické uspořádání molekul, velikost lipozomů i fluiditu lipozomální dvojvrstvy. Fluidita je charakterizována **teplotou mezifázového přechodu (T_m)**, která je definována jako teplota, při které fosfolipidy samovolně konvertují z uspořádané gelové fáze do fáze neuspořádaného tekutého krystalu (viz obr. 2). V uspořádané fázi jsou uhlovodíkové řetězce v těsné blízkosti, naopak ve fázi neuspořádané jsou řetězce pohyblivé a náhodně orientované. Při dosažení teploty mezifázového jsou obě zmíněné fáze v rovnováze. Teplota mezifázového přechodu je dána délkou a nasyceností uhlovodíkového řetězce fosfolipidů. Obecně platí, že čím vyšší je délka i stupeň nasycení řetězce, tím vyšší je i teplota mezifázového přechodu. Teplota mezifázového přechodu fosfolipidů je důležitým kritériem pro přípravu lipozomů. Je nutné dobře zvážit jejich výběr tak, aby lipozomy nebyly stabilní natolik, že dojde k nedostatečnému úniku léčiva v cílovém místě účinku, ale také aby nebyly fosfolipidy citlivé k denaturaci při zvýšených teplotách při přípravě lipozomů [9, 10].



Obr. 2: Teplota mezifázového přechodu [11]

Mezi nejčastěji se vyskytující fosfolipidy patří **fosfatidylcholin**, jehož základní kostru tvoří glycerol, na nějž jsou esterově navázány dvě molekuly mastných kyselin a jedna molekula kyseliny fosforečné. Kyselina fosforečná je dále esterifikována pomocí amonné soli tvořené uhlovodíkovými zbytky. K této skupině bývá přiřazován **dipalmitoylfosfatidylcholin (DPPC)**, který je nejčastěji vyskytujícím se fosfolipidem v surfaktantu plicních alveol. Jeho funkcí je snížení povrchového napětí na rozhraní vzduch – kapalina a zabránění alveolárnímu kolapsu během dýchání. Hodnota teploty mezifázového přechodu DPPC je stanovena na 41 °C. Mezi další a neméně známé fosfolipidy se řadí také sfingomyelin, fosfatidylserin, fosfatidylethanolamin nebo fosfatidylglycerol [9, 12].

Fluiditu lipozomální membrány lze snadno ovlivnit inkorporací lipidických molekul. Příkladem takové molekuly je **cholesterol** skládající se z tetracyklického planárního skeletu, který má ve své struktuře zabudovanou hydroxylovou skupinu, která je zásadní pro to, aby takhle jinak hydrofobní molekula získala amfifilní charakter. Cholesterol je běžně přidávanou komponentou při přípravě lipozomů z důvodu stabilizace fosfolipidové dvojvrstvy. Cholesterol v uspořádané gelové fázi způsobuje horší uspořádávání fosfolipidů, díky čemuž mají fosfolipidy nižší teplotu T_m . Naopak u neuspořádané fáze tekutého krystalu cholesterol drží fosfolipidy lépe pohromadě, tím zvyšuje stabilitu lipozomů a zamezuje úniku inkorporovaných léčiv [10, 13].

Hnací silou spontánní agregace amfifilních molekul fosfolipidů je hydrofobní efekt, kdy se nepolární části molekuly snaží minimalizovat kontakt s vodou, čímž vytvářejí termodynamicky stabilnější a energeticky výhodnější struktury. Agregace je doprovázena zvyšováním entropie systému díky uvolnění molekul vody z uspořádaných struktur solvatujících hydrofobní uhlovodíkové řetězce fosfolipidů [14]. K predikci struktury molekul amfifilů je uplatňován **kritický sbalovací parametr (CPP)** založený na geometrické úvaze. Jedná se o bezrozměrnou veličinu předpovídající pouze tvar struktury. CPP je definován jako poměr mezi objemem, který zaujímá hydrofobní řetězec molekuly, a plochou polární hlavy násobenou maximální délkou hydrofobního řetězce. Struktury fosfolipidové dvojvrstvy se formují v rozmezí hodnot 0,5–1. Lipozomy vznikají při hodnotě parametru CPP blízkého se k 0,5. Při hodnotě rovné jedné se vytváří planární fosfolipidová dvojvrstva [15].

2.1.2 Rozdělení lipozomů

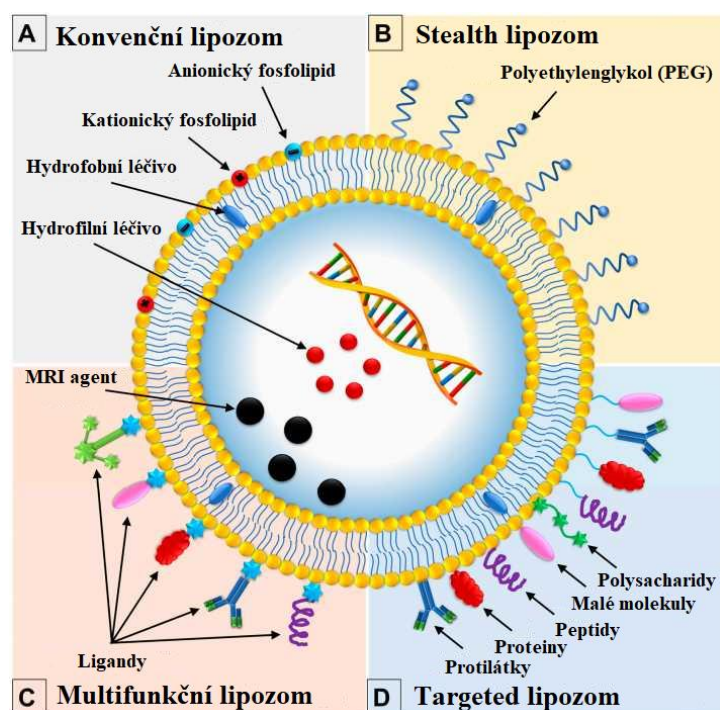
Lipozomy, které formují pouze jednu fosfolipidovou dvojvrstvu se nazývají unilamelární. **Malé unilamelární lipozomy (SUV)** zaujímají velikost přibližně 50 nm, což jim usnadňuje únik z krevního řečiště přes endotel kapilár do okolních tkání. Díky vysokému napětí způsobeného výrazným zakřivením membrány vykazují značnou nestabilitu. Tento nedostatek je vyřešen tvorbou **velkých unilamelárních lipozomů (LUV)**, jejichž průměr dosahuje 100 nm. Jako **multilamelární lipozomy (MLV)** jsou označovány lipozomy vzniklé z více fosfolipidových dvojvrstev. Při jejich přípravě může dojít k formování **multivezikulárních lipozomů (MVV)**, které mají v jednom lipozomu enkapsulováno několik lipozomů menších [16].

Mezi lipozomy „první generace“ složené pouze ze samotných fosfolipidů patří **konvenční lipozomy**, které skrze modifikaci farmakokinetiky a biodistribuce léčiva snižují jejich toxicitu *in vivo* a chrání okolní tkáně před nežádoucí kumulací léčiva, což výrazně zvyšuje terapeutický účinek léčiva v cílovém místě. V závislosti na výběru fosfolipidů mohou být lipozomy kladně nebo záporně nabitě [17]. Lipozomy nesoucí na svém povrchu jakýkoliv náboj jsou však rozpoznávány imunitním systémem jako cizorodé látky. Z tohoto důvodu jsou objektem pro vazbu specifických sérových proteinů zvaných opsoniny, které mají za následek rychlou clearance vyvolanou aktivací fagocytujícího systému složeného z monocytů a makrofágů, které jsou součástí vrozené imunity hrající klíčovou roli při fagocytóze patogenů. To lze vyřešit potažením lipozomů polyethylenglykolem (PEG), který výrazně hydratuje povrch lipozomů, čímž maskuje jejich povrchový náboj a chrání tak lipozomy před interakcí s opsoniny a následným vychytáváním makrofágy. Proces potažení lipozomů

polyethylenglykolem se nazývá PEGylace mající za následek vznik **stealth lipozomů** označovaných jako druhá generace lipozomálních nosičů, které dále zlepšují selektivní lokalizaci lipozomů v patologických místech [18].

Obrovský potenciál pro selektivní a kontrolované uvolňování léčiva v cílových buňkách představují tzv. **cílené lipozomy**, které vznikly modifikací povrchu lipozomů pomocí specifických ligandů (např. protilátek, enzymů nebo afinitních receptorů). Na základě specifické reakce mezi ligandem a cílovou buňkou se postupně uvolňuje transportovaná aktivní látka [19].

Mezi dnes ve výzkumu nejpoužívanější lipozomy patří **multifunkční lipozomy**, které jsou účinnou kombinací všech výše zmíněným lipozomů. Kromě toho mají ve struktuře zabudovanou chemickou látku, která navozuje změny ve fosfolipidové dvojvrstvě lipozomů působením vnějšího stimulu, a to fyzikálního, chemického nebo enzymatického [17, 20]. Všechny typy popisovaných lipozomů přehledně zobrazuje *obr. 3*.



Obr. 3: Typy lipozomů [21]

2.1.3 Metody přípravy lipozomů

Existuje široká škála metod pro přípravu lipozomálních systémů. Při přípravě lipozomů je nutné dbát na správný výběr metody, jelikož typ zvolené metody významně ovlivňuje nejen velikost, lamelaritu a stabilitu lipozomů, ale také jejich enkapsulační účinnost v závislosti na hydrofilní nebo hydrofobní povaze léčiva [22].

Jednou z nejstarších, nejpoužívanějších a zároveň nejjednodušších metod používaných pro přípravu lipozomů je **metoda rehydratace fosfolipidového filmu**, též nazývaná jako Banghamova metoda [15]. Pro vznik lipozomálního roztoku je nutné přesně navážené množství fosfolipidů rozpustit v organickém rozpouštědle. Obvykle se rozpouštění provádí za použití chloroformu nebo směsi chloroformu a methanolu, které je potřeba důkladně

odstranit. Pro malé objemy organického rozpouštědla postačí využít proud suchého dusíku nebo argonu v digestoři. Pro větší objemy je však výhodnější použití vakuové rotační odparky. Odpařením organického rozpouštědla vznikne na stěnách baňky tenký fosfolipidový film, pro jehož rehydrataci se jako vhodné hydratační médium volí deionizovaná voda nebo fyziologický pufr. Rehydratační proces fosfolipidového filmu trvá přibližně dvě hodiny a je žádoucí, aby probíhal při teplotách vyšších než je teplota mezifázového přechodu zvolených fosfolipidů. Během následovného míchání dochází vlivem bobtnání vícevrstvého fosfolipidového filmu k tvorbě lipozomů [23].

Prolipozomy jsou útvary volně se pohybující v prostředí, které jsou schopny ve styku s vhodnou biologickou tekutinou vytvářet lipozomy s extrémně vysokou enkapsulační účinností v porovnání s jinými metodami. Těto metoda je nazývána **metoda prolipozom-lipozom** [24]. Neméně důležitou metodou je **reverzně fázová evaporizace**, která je významná z hlediska formace lipozomů s větším objemem vodného středu schopného zvýšit enkapsulační účinnost léčiv hydrofilní povahy. Princip metody spočívá ve zhroucení gelové fáze tvořené obrácenými micelami fosfolipidů z důvodu postupného odstraňování organického rozpouštědla. Ke tvorbě lipozomů vede přebytek fosfolipidů, který vytváří kolem zbylých obrácených micel celistvou fosfolipidovou dvojvrstvu. Metodami zvanými jako **etherová a ethanolová injekce** se roztok fosfolipidů v příslušném organické rozpouštědle pomocí tenké injekční jehly vstříkuje do vodné fáze, které podporuje spontánní vznik lipozomů. U všech výše zmíněných metod přípravy se tvoří lipozomy multilamelární, které je nutné pro vznik lipozomů o požadované velikosti podrobit sekundárním úpravám [3].

Mezi široce uplatňované sekundární úpravy lipozomů patří sonifikace a extruze. **Sonifikace** k rozrušení MLV lipozomů používá zvukovou energii. Při sonifikaci pomocí sondy, která je přímo ponořena do lipozomálního roztoku, dochází k uvolnění velkého množství energie najednou, což může být nežádoucí nejen z důvodu degradace fosfolipidů i samotného léčiva, ale může vést také ke kontaminaci vzorku kovem ze sondy. Proto se jako vhodnější jeví použití vodní lázně sonifikátoru, kde je mnohem jednodušší kontrolovat teplotu vlivem průběžného uvolňování menšího množství energie [25]. V současné době je však více uplatňována **extruze**, při které se pod vysokým tlakem protlačí lipozomální roztok přes polykarbonátový filtr o přesně definované velikosti pórů. Výhodou oproti sonifikaci je produkce homogenních lipozomů s průměrem blízkým právě velikosti těchto pórů [26].

2.1.4 Charakterizace lipozomů

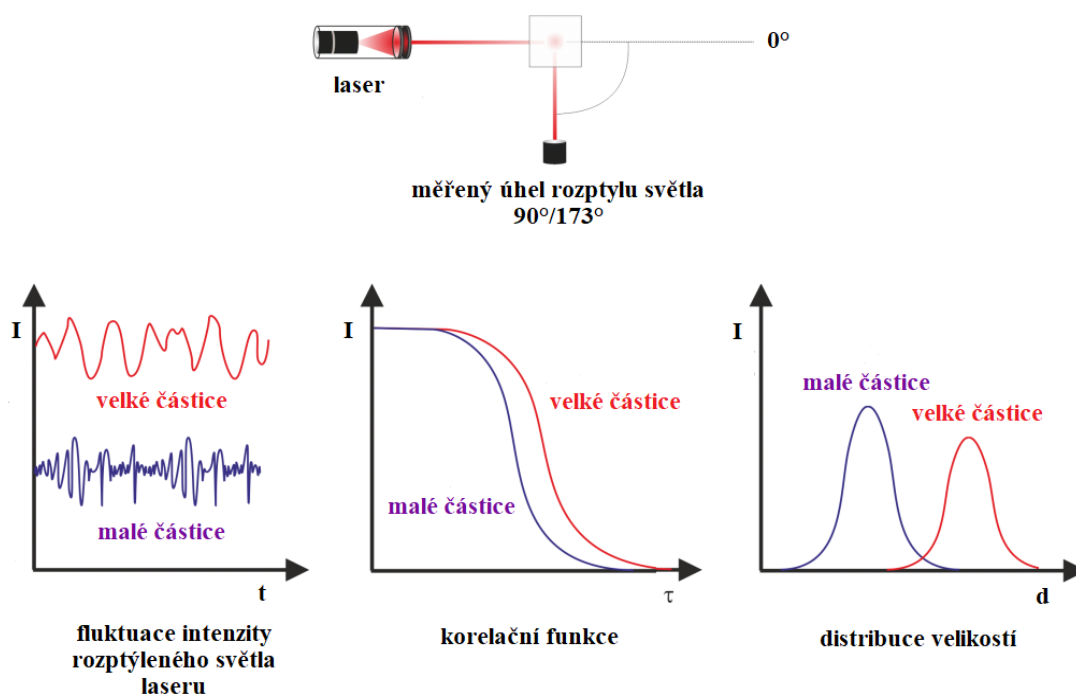
Lipozomy mohou být složeny z různých komponent v rozdílných poměrech, mohou enkapsulovat širokou škálu materiálů odlišné povahy a také mohou být připraveny různými metodami optimalizovanými pro jejich aplikační potenciál. Z tohoto důvodu je nutné lipozomy před použitím nejdříve dostatečně charakterizovat z hlediska biologického, chemického i fyzikálního. Každé z těchto skupin odpovídají konkrétní stanovované parametry i metody, kterými je možné získat co největší množství informací o připravených lipozomech. Mezi základní **biologické parametry** spadá sterilita a toxicita. **Chemická charakterizace** spočívá ve stanovení koncentrace stavebních látek lipozomů i samotného léčiva enkapsulovaného v jejich vodném středu. **Z fyzikálního hlediska** je žádoucí znát nejen velikost a distribuci velikostí lipozomů zastoupených ve vzorku, hodnotu povrchového

potenciálu blíže souvisejícího se stabilitou lipozomů a prodlouženou cirkulací v krvi (blíže popsáno v kapitole 2.1.2), ale také kinetiku uvolňování léčiva z lipozomů [27, 28].

Ke stanovení velikosti v submikronové oblasti je hojně využívána nedestruktivní technika nazvaná jako **dynamický rozptyl světla** (viz obr. 4). Princip této techniky spočívá v neustálém náhodném pohybu částic – **Brownově pohybu**, jehož rychlost je ovlivněna velikostí částic. Menší částice se pohybují rychleji než částice velké [29]. Pokud tedy na částice posvítíme koherentním paprskem laseru, dochází k rozptylu světla o povrch částic. Toto rozptýlené záření se může interferenčně zeslabovat nebo naopak zesilovat v závislosti na měnící se vzdálenosti mezi částicí a detektorem. Výsledkem měření je **fluktuační intenzity rozptýleného záření** kolem průměrné hodnoty. Čím rychleji se částice pohybují, tím rychleji se intenzita rozptýleného záření mění. Z fluktuační intenzity se získá korelační funkce udávající jak mezi sebou jednotlivé částice v průběhu měření korelují. U menších částic klesá korelační křivka dříve z toho důvodu, že malým částicím trvá kratší dobu, než změni svou pozici. Ze znalosti korelačního difuzního koeficientu odvozeného z korelační křivky je možné prostřednictvím **Stokes-Einsteinovy rovnice** vypočítat hodnotu velikosti částic zastoupených ve vzorku podle následujícího vzorce:

$$d(H) = \frac{k_b \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \mu \cdot D}, \quad (2.1)$$

kde $d(H)$ je hydrodynamický průměr částic, D je translační difuzní koeficient, k_b je Boltzmannova konstanta, T je teplota a μ je viskozita disperzního prostředí [30].



Obr. 4: Měření dynamického rozptylu světla velkých a malých částic [31]

Index polydisperzity, také známý jako PDI, je důležitý parametr, který popisuje rozpětí distribuce částic v pozorovaném vzorku, charakterizuje tedy rozsah jeho velikosti. Tento index je bezrozměrný a v adekvátním případě by měla být hodnota PDI menší než 0,3. Tato hodnota poukazuje na to, že jsou částice v roztoku monodisperzní. Hodnota větší než 0,3 naznačuje, že vzorek má širší distribuci, odkazují spíše na polydisperzitu a možnou agregaci či aglomeraci částic [32, 33].

Elektroforetický rozptyl světla je technika používaná k charakterizaci stability a určení náboje částic koloidního systému na základě stanovení zeta potenciálu na rovině skluzu nacházející se na povrchu elektrické dvojvrstvy [34]. Umístíme-li nabitou koloidní částici do vodného prostředí, opačně nabitě ionty kolem ní vytvoří pevně vázanou vrstvu zvanou jako **vrstva Sternova**. Kolem této vrstvy vzniká volnější **vrstva difuzní**, která je tvořena nahromaděním iontů nesoucích tentokrát také stejný náboj jako koloidní částice. Po aplikaci vnějšího elektrického pole se při pohybu částic k opačně nabitě elektrodě vytváří rozhraní mezi pohybem částice a rozpouštědla. Toto rozhraní se nazývá **rovinou skluzu elektrické dvojvrstvy**. Zeta potenciál je definován jako potenciálový rozdíl mezi zmíněnou rovinou skluzu a objemem rozpouštědla při pohybu v elektrickém poli [35]. Při samotném měření je paprsek laseru rozdělen na dvě části, kde jedna jeho část je fokusována na vzorek a druhá slouží jako reference. Při pohybu nabitých částic dochází ke kolísání intenzity rozptýleného záření laseru s frekvencí úměrnou rychlosti pohybu částice. Výsledkem měření je frekvenční spektrum umožňující výpočet elektrokinetického neboli zeta potenciálu podle rovnice:

$$\xi = \frac{3 \cdot \mu \cdot \eta}{2 \cdot \varepsilon \cdot F}, \quad (2.2)$$

kde ξ je zeta potenciál, μ je elektrokinetický potenciál, η je viskozita disperzního prostředí, ε je permitivita disperzního prostředí a F je funkce související s polaritou rozpouštědla [36].

Pomocí zeta potenciálu jsme schopni usuzovat, zda je koloidní disperze stabilní nebo nikoliv. Rozhodujícím je to, zda budou mezi částicemi v roztoku převažovat **síly přitažlivé (van der Waalsovy)** nebo **odpudivé (elektrostatické)**. Pokud se zeta potenciál částic nachází v rozmezí hodnot ± 30 mV, jedná se nestabilní disperzi právě z toho důvodu, že částice nemají dostatečný povrchový náboj k tomu, aby zabránily agregaci do větších útvarů. Naopak v případě že zeta potenciál částic bude dosahovat vysoké kladné nebo záporné hodnoty, můžeme disperzi označit za stabilní, jelikož jsou koloidní částice v roztoku zcela dispergovány [37].

2.1.5 Aplikace lipozomů v léčbě onemocnění

Lipozomy mají v medicíně a farmacii **diagnostické a terapeutické účely** spojené s inkorporací léčiva do jejich struktury, jejichž cílem je zlepšení terapeutické účinnosti, snížení toxicity léčiva pro okolní tkáň, zvýšení doby cirkulace v krvi a uvolnění léčiva v místě účinku. Většina antibiotik a antivirotik jsou volně dostupné v konvenční lékové formě, ale uvažuje se o jejich převedení na lipozomální formu vzhledem k nižší toxicitě. V posledních letech roste zájem o lipozomální formu cytostatik, které vykazují nižší toxicitu přibližně o 50 % v porovnání s konvenční lékovou formou [3]. Komerčně dostupné jsou již některé typy lipozomálních vakcín, jiné aktuálně prochází klinickými zkouškami [38, 39].

Výskyt onemocnění spojený s mikrobiální infekcí nadále exponenciálně roste spolu s mortalitou. Očekává se, že infekce mikroorganismy rezistentními na antibiotika se do roku 2050 stanou nejběžnější příčinou úmrtí. Převážná většina infekcí u lidí je způsobena **mikrobiálním biofilmem**, který sám o sobě poskytuje bakteriím rezistenci k léčivům v důsledku snížené možnosti penetrace léčiv. Pokud se přece jen léčivo podaří proniknout do bakteriální buňky, hrozí, že bude léčivo enzymaticky degradováno nebo může být opět vyloučeno díky nadměrné aktivitě refluxních čerpadel na povrchu jejich membrány. Lipozomy jsou schopny všechny zmíněné překážky překonat, proto se uvažuje o tom, že by se antibiotika i antivirotika převedla do formy lipozomální, a to z důvodu jejich výrazně nižší toxicity na zdravé buňky lidského organismu [40].

Hlavním omezujícím prvkem při chemoterapeutické léčbě rakoviny je její **nespecifický účinek** – působí na buňky bez rozdílu, zda jsou zdravé nebo nemocné [41]. Pasivní transport cytostatik je založen na využití **efektu zvýšené propustnosti a retence** (EPR efektu) v nádorové tkáni. Principem tohoto jevu je rychlý a nerovnoměrný růst krevního řečiště, což vede ke vzniku endoteliální tkáně s defektními buňkami zodpovědnými za vznik volných a netěsných spojů s póry, pomocí nichž si nádor kumuluje velké množství látek potřebných pro jeho růst o koncentraci výrazně větší, než je koncentrace v krevní plazmě. Přes póry mohou pasivně procházet makromolekuly s vyšší molekulovou hmotností a velikostí menší než 200 nm – léčiva na bázi nanočástic a lipozomů, které by na základě těchto charakteristických vlastností nádoru mohly cílit velké množství enkapsulovaného cytostatika pouze do nádoru, čímž by se chemoterapie mohla vyhnout ohrožení okolních zdravých buněk pacienta [42, 43].

Každoročně jsou zachráněny miliony lidských životů díky imunizaci pomocí vakcín. Tradiční vakcíny tvořené oslabenými nebo mrtvými patogeny se potýkaly s vysokým rizikem vzniku alergických a autoimunitních nežádoucích reakcí. Lipozomy se proto staly významnými jako **nosiče adjuvans** – látek schopných zvýšit nebo jinak modulovat humorální či buněčnou imunitní odpověď. Výhodou těchto nosičů je nejen jejich **multifunkčnost** z hlediska inkorporace široké škály antigenů vyvolávajících požadovaný typ imunitní odpovědi, ale hlavně jejich biokompatibilita a cílení. Proto v posledních letech vzrostl zájem o vývoj **lipozomálních vakcín** k prevenci a léčbě infekčních i onkologických onemocnění. Mezi komerčně schválené patří lipozomální vakcíny na chřipku, hepatitidu A a malárii. Klinickými zkouškami aktuálně prochází lipozomální vakcína na tuberkulózu a HIV [39].

Princip **genové terapie** spočívá v korekci genové aktivity tím, že se zavede nový gen do buňky. Vnitřní buněčný mechanismus použije tento fragment nukleové kyseliny k produkci specifického proteinu, který napravuje určitý patologický jev. Případně za pomoci části nukleové kyseliny dojde k utlumení aktivity nevhodného genu. Převážná většina současného výzkumu genové terapie se zaměřuje na choroby s letálním průběhem jako je terapie zhoubných nádorů, která zaujímá přední postavení. Významným faktorem je skutečnost, že je mnohem jednodušší buňku zničit než ji opravit, a že ke zničení nádorové buňky stačí krátkodobá exprese destruuujícího genu. Problém, který v současnosti nejvíce limituje tuto metodu je nedostatečná účinnost transportu záporně nabitého fragmentu nukleové kyseliny přes fosfolipidovou dvojvrstvu a její začlenění do jádra, což samozřejmě vyřešila inkorporace částí nukleových kyselin do lipozomů [44].

2.1.6 Enkapsulace léčiv do lipozomů

Proces **enkapsulace** zahrnuje zachycení a uzavření léčiva do lipozomů podle míry jeho rozpustnosti v polárních či nepolárních rozpouštědlech. Léčivo bývá začleněno do vodného jádra lipozomu nebo přímo do jeho fosfolipidové dvojvrstvy. Důvodem enkapsulace léčiva je převážně ochrana pacienta před toxicitou samotného léčiva (vyhnutí se negativním účinkům na organismus), dosažení řízeného nebo cíleného uvolňování léčiva a imobilizace biologického materiálu. V některých případech se enkapsulace využívá za účelem ochrany léčiva před rychlou degradací v organismu nebo kvůli maskování určitých vlastností jako je barva, chuť, zápach nebo náboj [45].

Enkapsulace léčiva je nejčastěji charakterizována pomocí **enkapsulační účinnosti** vyjadřující poměr mezi reálným a teoretickým obsahem léčiva v lipozomech. Hodnota je udávána v procentech. Jinak řečeno, jedná se o podíl léčiva skutečně enkapsulovaného uvnitř lipozomů a celkového množství léčiva, které bylo přidáno k disperzi na začátku přípravy [46].

Pro enkapsulaci hydrofobních látek jsou vhodné multilamelární lipozomy z důvodu vysokého obsahu fosfolipidové dvojvrstvy, naopak k enkapsulaci látek hydrofilních jsou vhodnější velké unilamelární lipozomy kvůli jejich objemnému vodnému středu. Inkorporací cholesterolu snižujícího propustnost membrány lze zvýšit enkapsulační účinnost hydrofobních látek. Vzrůst enkapsulační účinnosti hydrofilních látek může být ovlivněn přidáním iontu, inkorporací glykolipidů či změnou pH vodné fáze. Přebytné léčivo, které nebylo do lipozomů enkapsulováno, bývá odstraněno dialýzou nebo gelovou chromatografií [47].

2.1.7 Interakce lipozomů s buňkami

Lipozomy jsou schopny interagovat s buňkami čtyřmi různými způsoby, ve většině případů se uskutečňuje více způsobů najednou. Téměř všechny typy lipozomů primárně interagují s buňkami **absorpcí na povrch buněčné membrány**, což je velmi rychlý proces. Lipozom tak může zůstat absorbovaný delší dobu, během čehož může docházet k výměně lipidů mezi lipozomy a buněčnou membránou nebo přímo k **fúzi lipozomů s buňkou**. Fúzí se rozumí mísení lipidů lipozomů s lipidy buněčné membrány, díky čemuž se enkapsulované léčivo dobře uvolňuje do cytoplazmy buňky. V případě multilamelárních lipozomů podléhá fúzi vnější fosfolipidová membrána a do cytoplazmy se dostávají vnější lipozomy, které stejným mechanismem mohou interagovat s intracelulárními membránovými organelami. Tudíž je možné lipozomy specificky cílit nejen na buňky samotné, ale také na jednotlivé buněčné kompartmenty. Po absorpci lipozomu na buněčnou membránu může docházet k jeho **endocytóze** za vzniku endozomu. Endozomy fúzí s lysozomy a vznikají sekundární lysozomy, v nichž lysozomální enzymy v přítomnosti kyselého pH rozruší lipozomy a způsobí uvolnění aktivní látky do lysozomu. Odtud je léčivo odstraněno exocytózou nebo proniká difúzí do cytoplazmy [48].

Pro řízené uvolnění léčiva z lipozomů mohou být použity dva typy spouštěčů. Prvním typem jsou spouštěče lokální jako výskyt enzymů či změna pH v cílovém místě. Druhým typem jsou metody dálkově řízené jako teplo, světlo nebo ultrazvuk. **Hypertermie** (zahřívání nádoru) byla prvním objeveným spouštěčem, u kterého se ukázalo, že poskytuje minimálně čtyřikrát účinnější transport a uvolnění léčiva. Dodnes hypotermie zůstává nejspolehlivější metodou. Velká pozornost je věnována také **lipozomům citlivým na pH**. Začaly se využívat

kvůli okyselení postižené oblasti velkým množstvím patologických procesů v buňce (např. nádory a záněty). Přestože je tato změna často nepatrná, okolo 0,4–0,8 jednotek, byly lipozomy navrženy tak, aby reagovaly i na tento minimální rozdíl. Další často využívanou metodou je **sonoporace** vyvolaná působením ultrazvuku. Jedná se o dočasnou permeabilizaci buněčné membrány a rozklad lipozomů, díky čemuž je buňka lépe schopna přijmout uvolněné léčivo [49].

2.1.8 Toxicita lipozomů

Přítomnost nanočástic včetně lipozomů je v komerčně dostupných produktech stále běžnější. **Toxicita** je i přes jejich obrovský aplikační potenciál kritickým faktorem převážně v biomedicíně. Vzhledem k tomu, že jsou lipozomy navrhované k interakci s buňkami živého organismu, je důležité, aby nezpůsobovali vedlejší účinky. Při posuzování těchto vlastností je nevyhnutelné vzít v potaz velikost, povrch, tvar, náboj, možnost aglomerace, agregace a samozřejmě koncentraci. V neposlední řadě je potřebné vzít v úvahu abiotické faktory jako například přítomnost iontové síly a hodnotu pH. Nanočástice obecně se od částic běžné velikosti odlišují velkým specifickým povrchem a vysokou reaktivitou, což může přispívat ke zvýšení jejich toxicity. Důležité je, zda lipozomy, ať už v čisté nebo enkapsulované formě, podléhají biodegradaci v buněčném prostředí a zda jsou tyto degradační produkty pro buňku toxické. Existuje velké množství studií zabývajících se cytotoxicitou lipozomů na buněčné linii, avšak problém nastává v použití rozdílných koncentrací lipozomů, kultivaci v odlišných podmínkách a sledování terapeutického účinku v jiných časových intervalech. Z toho důvodu není možné porovnat dva odlišné výzkumy, jelikož je těžké určit fyziologickou relevantnost výsledků [50]. K pochopení toho, jak budou lipozomální systémy v organismu reagovat, se v první řadě využívají **buněčné kultury**. V porovnání s pokusy na zvířatech je testování na buňkách méně eticky problematické, lépe kontrolovatelné a levnější. Nejjednodušším cytotoxickým testem je vizuální pozorování morfologických změn v mikroskopu. Rozšířenější ve výzkumech je využití kolorimetrických metod. **Cytotoxicita** může být stanovena spektrofotometricky určením množství barviva buňkami akumulovaného nebo mikroskopicky počítáním mrtvých buněk [50, 51].

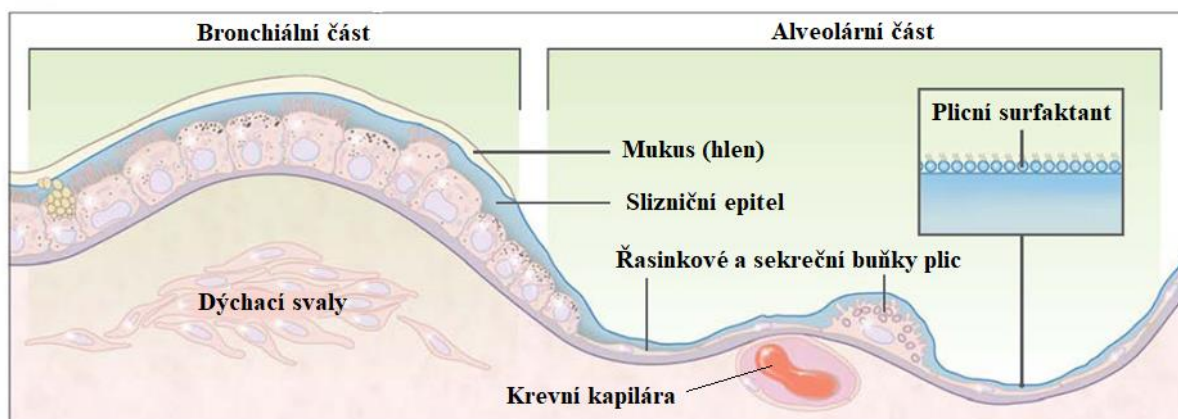
2.1.8.1 MTT test

Principem MTT testu je hodnocení viability buněk na základě stanovení mitochondriální aktivity pomocí tetrazolinových solí. Pro test se využívá slabě žlutý roztok 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromidu zvaný zkráceně jako **MTT**. Živé metabolizující buňky jsou schopny redukovat MTT na fialově zbarvený **formazan**, jehož koncentraci lze určit spektrofotometricky s maximem absorbance přibližně kolem 570 nm. Samotný mechanismus redukce MTT v buňkách stále není řádně vysvětlen, pravděpodobně je založen na reakci s NADH nebo jinými redukčními molekulami, které se podílí na **přenosu elektronů** v dýchacím řetězci mitochondrií. Tetrazolinové soli ve své struktuře obsahují tetrazoliový kruh štěpitelný právě těmito **mitochondriálními dehydrogenázami**. Formazan se akumuluje jako nerozpustná sraženina v buňkách, na jejich povrchu i v médiu. Pro spektrofotometrické stanovení je nutné sraženinu rozpustit přidávkem dimethylsulfoxidu (DMSO) nebo dodecylsírany sodného (SDS). Velikost absorbance je závislá na řadě faktorů jako dávka MTT, čas inkubace, pH, metabolická aktivita buněk i jejich počet [51].

2.2 Inhalační podávání léčiv

Inhalační podání léčiv se stalo efektivním z mnoha důvodů. Je nejen vhodnou volbou pro léčbu lokálních plicních onemocnění, ale zároveň se stalo výhodným pro systémové použití, například při léčbě rakoviny. Výhodou plic je jejich rozsáhlá **absorpční plocha** (70-140 m²), **tenká absorpční membrána** (0,1–0,2 μm) a **zvýšený průtok krve** (5 l/min) zajišťující distribuci léčiv po celém těle. Dalším důležitým faktorem je snížená enzymatická aktivita a vyhnutí se metabolismu **prvnímu průchodu játry** zodpovědného za částečnou degradaci léčiva. Mezi pozitiva se dá zařadit též snížení vedlejších účinků a vyšší dávka léčiv v místě účinku [52].

Struktura dýchacích cest je jedinečně přizpůsobena jejich primární funkci – **transportu plynů**. Dýchací cesty se kategorizují na bronchiální a alveolární část (viz obr. 5). Bronchiální část začíná tracheou, která se dělí na dvě průdušnice tvořící síť průdušek a průdušinek [53]. Slizniční epitel připojený k tenké bazální membráně obsahuje jak řasinkové a sekreční buňky, které poskytují klíčovou složku pro vrozenou imunitu dýchacích cest, tak bazální buňky uplatňující se během poranění sliznice. Mezi tracheou a alveolami se dýchací cesty třiatvacetkrát dělí. V alveolách se vstřebává největší podíl přijatého vzduchu. Důvodem je zjednodušení buněčného uspořádání, velká absorpční plocha, ale i snížená rychlost proudění vzduchu daná jejich malým průměrem. V lidských plicích se nachází přibližně 300 milionů alveolů [54].



Obr. 5: Struktura dýchacích cest [54]

Mukus neboli hlen je viskoelastický, adhezivní gel, který pokrývá většinu epitelálních povrchů. V plicích snižuje povrchové napětí při dýchání, ale také chrání epitel tím, že účinně zachycuje patogeny a nečistoty a rychle je odstraňuje z těla kašlem. Plicní hlen je zcela regenerován každých 20–25 minut [55]. Přestože je životně důležitý, představuje podstatnou překážku pro dodávání léčiv v podobě lipozomů aplikovaných inhalační cestou. Mukus je schopen s částicemi vytvářet adhezivní interakce prostřednictvím elektrostatických interakcí, van der Walsových sil, hydrofobních interakcí, vodíkových můstků nebo prostým zaplacením do zesíťovaných řetězců [56]. Bariérové vlastnosti jsou zakořeněny v jeho husté síti tvořené mucinovými vlákny. Mucin je glykoprotein zodpovědný za vznik **gelovité struktury** na základě síťování jeho postranních řetězců pomocí disulfidických můstků. Povrch mukusu

je hydrofobní a záporně nabitý [57]. Jedním z nejdůležitějších parametrů pro inhalační podávání léčiv je velikost vdechovaných částic. Ideální je velikost částic v rozmezí 0,5–5 µm. U částic větších než 5 µm dochází k usazování hlenu a následnému velmi rychlému odstranění vykašláváním. Naopak u částic menších než 0,5 µm nemusí docházet k usazování uvnitř dýchacích cest vůbec a mohou být zpětně vydechnuty [52].

Při léčbě lokálních plicních onemocnění jako je astma či chronická plicní obstrukční nemoc se využívá celá řada různých typů **inhalačních zařízení**. První skupinu tvoří inhalační zařízení používající ke své činnosti stlačený plyn. Sem patří aerosolové dávkovače s inhalačními nástavci a dechem aktivované aerosolové dávkovače. Druhou skupinu tvoří inhalátory pro práškovou formu léku a třetí skupinu představují nebulizátory produkující vlhký aerosol [53].

2.2.1 Respirační onemocnění

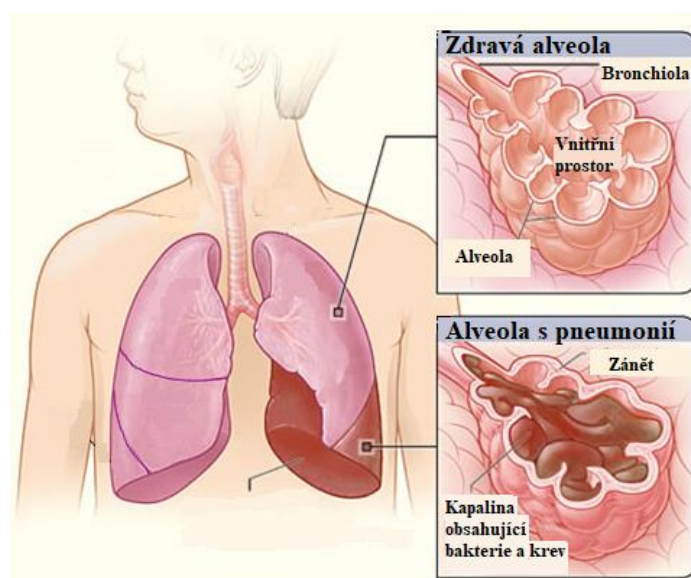
Respirační onemocnění zatěžují světovou populaci nejen svým vysokým výskytem, ale hlavně vysokou mírou trvalého postižení a úmrtnosti. Kvalifikovaný odhad hovoří o miliardě nemocných a deseti milionech mrtvých ročně. Rozlišujeme dvě skupiny onemocnění – akutní infekční stavy a chronická respirační onemocnění. Zatímco infekční nemoci jsou současným i budoucím problémem především rozvojových zemí, lze očekávat, že výskyt chronických plicních onemocnění bude exponenciálně stoupat na celém světě v důsledku nárůstu rizikových faktorů jako je industrializace, kouření a HIV [54].

Podle toho, která část dýchacích cest je akutním infekčním stavem postižena, rozlišujeme tracheiditu, bronchitidu, bronchiolitidu a nejzávažnější formu – pneumonii. Obvykle vznikají v důsledku virové nebo bakteriální infekce a odeznívají během několika týdnů. **Akutní bronchitida** se může vyskytovat v souvislosti s jinými onemocněními jako černý kašel nebo u vrozených metabolických poruch jako cystická fibróza [58]. Riziko vzniku akutní i chronické bronchitidy výrazně zvyšuje kouření. Opakování bronchitidy mohou přerůst v **chronickou bronchitidu** charakteristickou neustálým produktivním kašlem. Pokud se včas odstraní příčinné faktory, bronchitida na základě vhodné terapie odezní. Komplikací je však propuknutí plicního emfyzému nebo chronické obstrukční plicní nemoci [59].

Většina chronických onemocnění plic je spojena s přetrvávajícím zánětem vyvolaným podrážděním či poškozením plicního epitelu. Mezi spouštěče bývají zařazovány faktory jako často opakované a špatně léčené infekce, alergeny, tabákový kouř, tělesná nadváha či potraviny nebo znečištěné ovzduší. **Chronická obstrukční nemoc plic (CHOPN)** je pomalu postupující onemocnění plic, které je možné léčit, bohužel není možné zcela zvrátit všechna poškození a dosáhnout úplného uzdravení. Při vzniku i během jejího průběhu vzniká chronická bronchitida a/nebo **plicní emfyzém**, kterým se rozumí trvalé poškození či úplný zánik přepážek uvnitř plicních sklípků, což vede k nežádoucímu hromadění vzduchu v plicích. Charakteristické pro CHOPN je neustálé zužování dýchacích cest a přetrvávající kašel. Díky tomu je ztíženo dýchání, snížen příjem kyslíku a zvýšen obsah oxidu uhličitého v krvi. V důsledku nedostatečného přísunu kyslíku je oslaben celý kardiovaskulární systém, který není schopen plného výkonu. Plicní emfyzém může být podmíněn genetickou poruchou nebo může vznikat u lidí s cystickou fibrózou plic [60, 61]. **Cystická fibróza** je závažné a nevyléčitelné dědičné onemocnění postihující zejména dýchací a trávicí systém. Projevuje

se především opakovanými infekce dýchacích cest vedoucích k jejich fatálnímu poškození. Nemocní trpí dalšími závažnými komplikacemi jako cukrovka, cirhóza jater, osteoporóza a neplodnost. V současné době žije v České republice přibližně 700 pacientů dožívajících se průměrného věku 25 let [62].

Dalším neméně závažným chronickým onemocněním plic je **astma** postihující v Česku cca 12 % dětské populace, která si ho ve většině případů přenáší do dospělosti. Jedná se o složitý zánětlivý proces, který je ovlivňován řadou různých mechanismů a který nenávratně poškozuje plicní tkáň. Chronický zánět je spojen s průduškovou hyperaktivitou, která vyvolává opakované zúžení dýchacích cest, dušnosti a dechu s pískoty. Tyto projevy jsou výsledkem tří procesů – otoku střední vrstvy průdušky, zvýšenou produkcí hlenu a stahem hladké svaloviny po uvolnění látek, které jsou nositeli zánětu (např. histamin). Během astmatického záchvatu dochází k uplatnění všech zmíněných procesů najednou [63].



Obr. 6: Pneumonie [64]

Nejzávažnější formou plicních infekčních stavů blízce souvisejících s chronickými onemocněními plic je zápal plic nazývaný odborně jako **pneumonie** (viz obr. 6). V celosvětovém měřítku jsou pneumonie třetí nejčastější příčinou smrti. Pneumonie se přenáší kapénkovou infekcí a obvykle začínají infekcí horních dýchacích cest, odkud se postupně šíří do bronchů a alveol [65]. Průběh a závažnost tohoto onemocnění jsou určeny především konkrétním typem mikroba, věkem pacienta, životním stylem, fyzickým stavem a přítomností dalších onemocnění. Infekční pneumonie lékaři rozdělují na tři základní typy – komunitní, nozokomiální a vznikající u imunosuprimovaných osob. **Komunitní pneumonie** je onemocnění, které vzniklo nákazou v běžném prostředí člověka, kdy možnými pachateli mohou být běžně se v tomto prostředí vyskytující bakterie a viry. **Nozokomiální pneumonie** jsou záněty plic získané v nemocnici. Nemocniční prostředí je osídleno specifickými kmeny bakterií, které se přizpůsobily tamním podmínkám, neboť si vytvořily rezistenci vůči dezinfekcím a antibiotikům. Likvidace těchto organismů je velmi náročná a přes dodržování všech hygienických zásad se je nedaří z nemocničního prostředí odstranit. Statistiky uvádějí,

že četnost takových nákaz v České republice nepřesahuje 8 případů z 1000 hospitalizovaných. Třetím typem jsou **pneumonie vznikající u imunosuprimovaných osob**, což jsou osoby se sníženou schopností imunitní obrany způsobené závažnými onemocněními (např. rakovina, AIDS, CHOPN, cystická fibróza) nebo invazivními léčebnými postupy (např. operace nebo transplantace orgánů). V takovém případě dochází k úmrtí pacientů [66].

2.3 Bakterie

Bakterie jsou jednobuněčné **prokaryotické organismy**, které se vyskytují nejen všude kolem nás – ve vodě, vzduchu, v půdě, ale také uvnitř živých organismů. Není znám celkový počet všech druhů bakterií, jelikož díky selekci neustále vznikají druhy nové a jiné zanikají. Bakterie jsou navíc velmi adaptivní k prostředí, ve kterém žijí. Podle vztahu ke kyslíku, rozlišujeme bakterie na aerobní či anaerobní. **Aerobní bakterie** žijí v prostředí s přítomností kyslíku, který je nedílnou součástí jejich metabolické dráhy. **Anaerobní bakterie** nejsou schopny žít v prostředí s kyslíkem, což je důvodem produkce toxinů nebezpečných pro lidský organismus v případě jejich kontaktu s poraněnými prokrvenými tkáněmi [67]. Lidské tělo je v průběhu života osídlováno bakteriemi, které v optimálních podmínkách tvoří mikroflóru lidského těla, která nemá patogenní vliv na člověka. Hlavní význam tělní mikroflóry spočívá v obraně lidského organismu před mikroorganismy patogenními, které napadají lidské tělo z vnějšího prostředí. Mimo to jsou schopny produkovat vitamíny důležité pro metabolismus lidského těla [68].

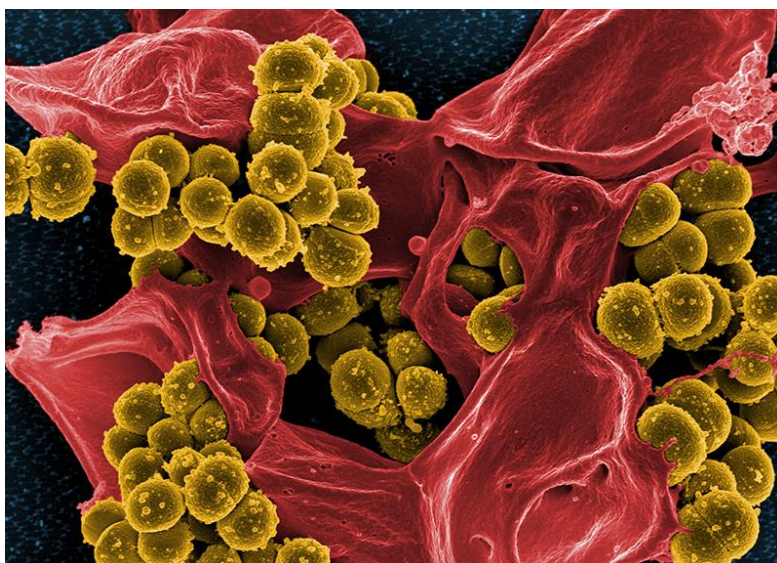
Jako **patogenita** je označována schopnost některých druhů bakterií za určitých podmínek vyvolávat onemocnění. Charakteristickými znaky těchto organismů je přenosnost z jednoho hostitele na druhého, infekčnost neboli schopnost překonat ochranné mechanismy hostitele a virulence označující schopnost patogenu poškodit hostitele. Bakterie mohou onemocnění vyvolat dvěma způsoby – invazivitou nebo toxicitou. **Invazivitou** se rozumí pronikání bakterie do tkáně, kde se pomnožením poškozuje struktura a funkce tkáně. **Toxicita** je definována jako poškození hostitelského organismu toxiny, které bakteriální buňka produkuje. Mezi taková bakteriální onemocnění dnešní doby patří tuberkulóza, angína, tetanus, borelióza, salmonelóza nebo cholera [69].

Povrch bakteriální buňky je pokryt buněčnou stěnou, pod kterou se nachází cytoplazmatická membrána uzavírající cytoplazmu, v níž se přirozeně vyskytují specifické orgány jako neohraňované jádro, plazmidy, ribozomy, inkluze a mezozomy. Buněčná stěna je permeabilní elastická ochranná bariéra mezi buňkou a okolním prostředím udělující buňce její charakteristický tvar [70]. Podle struktury buněčné stěny se bakteriální buňky rozdělují na grampozitivní a gramnegativní. **Grampozitivní bakterie** mají širokou buněčnou stěnu tvořenou z mnoha lineárních vrstev peptidoglykanu. U **gramnegativních bakterií** je tato vrstva tenká a na její vnější straně se nachází dvojmembránový útvar tvořený molekulami lipopolysacharidů, často označovaných jako endotoxiny z důvodu jejich vysoké toxicity pro lidský organismus [69]. Bakteriální buňky nabývají rozličných tvarů a velikostí. Podle tvaru je můžeme rozdělit na **koky** (kulovité), **bacily** (tyčinkovité), **spirily** (vláknité) a **spirochety** (spirálovité). Bakterie ve formě koka se může vyskytovat samostatně nebo sdruženě, tudíž může tvořit **diplokoky** (dvojice), **streptokoky** (řetízkovité útvary) nebo **stafylokoky** (hroznovité útvary) [71].

2.3.1 *Staphylococcus aureus*

Stafylokoky jsou **grampozitivní fakultativně anaerobní bakterie kulovitého tvaru**, které jsou schopny způsobit řadu infekčních onemocnění v různých tkáních lidského těla. Onemocnění související se stafylokoky mohou být jak mírné nevyžadující žádnou léčbu, tak i závažné a potenciálně smrtelné. V průběhu let si stafylokoky získaly rezistenci k široké škále běžně využívaných antibiotik, proto se řadí mezi obávané lidské patogeny [72].

Rod *Staphylococcus* zahrnuje nejméně 40 druhů, z nichž je většina nepatogenní a tvoří součást přirozené mikroflóry kůže a sliznic člověka i zvířat. Mezi biochemicky nejvýznamnější druh patří *Staphylococcus aureus* neboli **zlatý stafylokok**, který tvoří výrazný **žlutý pigment** (viz obr. 7). Ke vzniku infekcí predisponují poranění (popáleniny a pooperační rány), úrazy, virové infekce, metabolické poruchy, maligní onemocnění nebo imunodeficity [73]. U jedinců s oslabeným imunitním systémem může *Staphylococcus aureus* vyvolat onemocnění trojího druhu. Nejčastěji jsou to hnisavé infekce, méně často příznaky otravy pomocí endotoxinů. Typickým znakem infekce je vznik **abscesů**, což je zánětlivé ložisko, v němž se vytvořila dutina vyplněná hnisem. Z těchto zánětlivých lézí mohou bakterie pronikat do krevního řečiště a způsobovat tak závažnější onemocnění jako **pneumonii**, osteomyelitidu, endokarditidu, meningitidu a dokonce i **sepsi** celého organismu [74]. Zvláště nebezpečné jsou infekce získané v nemocnici, které jsou způsobeny kmeny multirezistentními k antibiotikům a dezinfekcím. Ty na novorozeneckých odděleních, jednotce intenzivní péče a na odděleních imunosuprimovaných pacientů vyvolávají lokální epidemie. Zdrojem těchto infekcí je ošetřující personál, lůžkoviny, vybavení či jiní pacienti [72].



Obr. 7: Elektronový snímek bakterie *Staphylococcus aureus* [75]

Patogenita bakterie *Staphylococcus aureus* je spojena s tvorbou široké škály enzymů a toxinů. Jedním z nich je plasmakoaguláza, která spolu s plasmatickým faktorem protrombinem vytváří stafylotrombin. Tento aktivní komplex katalyzuje přeměnu fibrinogenu na nerozpustný fibrinogen, což má za následek vznik ohraničených zánětů a sníženou rozpoznatelnost imunitním systémem. Opačný účinek má stafylokináza, která katalyzuje

přeměnu plasminogenu na plasmin rozpouštějící fibrin. Pomocí tohoto mechanismu se může *Staphylococcus aureus* šířit do okolí zánětu. Šíření napomáhá hyaluronidáza, která dokáže štěpit kyselinu hyaluronovou přítomnou v mezibuněčných materiálech a pojivových tkáních. V dnešní době dokáže většina kmenů tvořit penicilinázu snižující účinek beta-laktamových antibiotik. Mezi nejběžnější toxiny se řadí hemolyziny a leukolyziny, které způsobují nekrózu krevních buněk. Dalšími nebezpečnými toxiny je syndrom toxického šoku, enterotoxiny a exfoliatiny [72, 73].

Lékem první volby při infekcích způsobených kmeny *Staphylococcus aureus* jsou penicilinová antibiotika rezistentní vůči penicilináze (methicilin či kloxacilin). Velkým problémem je výskyt multirezistentních kmenů, mezi něž spadá **methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*** zvaný jako MRSA. Dlouhou dobu byly tyto kmeny záležitostí pouze nemocnic, ale v dnešní době se vyskytují i v komunitě. Jsou rezistentní ke všem beta-laktamovým antibiotikům včetně makrolidů, aminoglykosidů, tetracyklinů, fluorochinolonů, chloramfenikolu i rifampicinu. Antibiotikem poslední záchrany je vancomycin, avšak již byly zaznamenány kmeny odolné i proti tomuto antibiotiku zvané jako VRSA [73].

2.4 Antibiotika

Antibiotika jsou látky produkované bakteriemi nebo mikroskopickými houbami, které svými účinky usmrcují některé mikroorganismy nebo potlačují jejich růst a množení [76]. Podle rozdílného působení rozdělujeme antibiotika na baktericidní a bakteriostatické. **Baktericidní látky** bakteriální buňku přímo usmrcují v krátkém časovém intervalu. Z uvedeného důvodu se tomuto typu antibiotika dává přednost při závažných klinických stavech a při snížené obranyschopnosti nemocného. Mezi baktericidní antibiotika se řadí hlavně beta-laktamy, aminoglykosidy a glykopeptidy. Naproti tomu účinek bakteriostatických látek spočívá pouze v zastavení růstu a množení. S dalším potlačením infekce se poté lépe vypořádá naše vlastní obranyschopnost. Stejně je bakteriostatickou látku užívat pravidelně do konce léčby, jinak hrozí opětovné pomnožení bakterií. Mezi taková antibiotika spadají tetracykliny, makrolidy a linkosamidy [74].

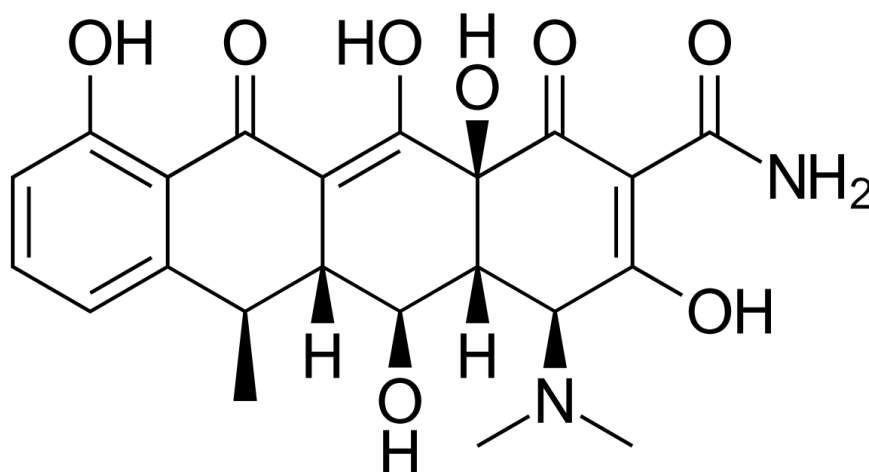
Antibakteriální látka užívaná jako léčivo musí splňovat důležitou podmínku. Dávka, kterou působí proti bakteriím nesmí zároveň poškozovat náš makroorganismus. Musí tedy být selektivně toxická pro patogenní mikroorganismy. Poměr mezi dávkou, která je toxická pro nás jako pro hostitele bakterie, a dávkou způsobující smrt bakteriální buňky se nazývá chemoterapeutický index. Čím je hodnota indexu vyšší, tím je antibiotikum pro léčbu dané infekce výhodnější, protože je méně jedovaté pro lidský organismus [74].

Existuje několik mechanismů, kterými antibakteriální látky zasahují do životního cyklu. Chemická povaha antibiotik je různorodá, a proto je jejich působení v buňce velmi rozmanité. Mechanismus účinku se liší podle odlišného tvaru a velikosti molekuly antibiotika. Pokud mají antibiotika shodnou strukturu i velikost je jejich způsob účinku identický. Nejčastěji specificky zasahují do syntézy makromolekul buňky, kdy se antibiotikum naváže na cílovou strukturu a touto vazbou poškodí a zabrání buňce v její funkci. Antibiotika mohou inhibovat syntézu buněčné stěny a proteosyntézy nebo poškodit syntézu cytoplazmatické membrány nebo nukleových kyselin [77].

2.4.1 Doxycyklin

Doxycyklin je řazen mezi antibiotika zvané jako tetracykliny objevené v roce 1943 Benjamin Minge Duggarem, který si všiml bakterie produkující dosud neznámou látku výrazně žluté barvy, která měla antimikrobiální účinky proti streptokokům a stafylokokům. Skupinu tetracyklinů tvoří jak přírodní látky produkované bakteriemi *Streptomyces*, ale také jejich syntetické deriváty odvozené od hydronaftacenového jádra obsahujícího čtyři šestičlenné kondenzované kruhy. Využití tetracyklinů v dnešní době významně klesá. Důvodem je stále se zvyšující rezistence některých běžně vyskytujících se bakterií. Tetracykliny jsou i nyní běžně využívány při infekcích dýchacích cest a mají vysoké uplatnění u pacientů s alergií na penicilin [78]. Struktura doxycyklinu je uvedena na obr. 8.

Doxycyklin představuje **širokospektrální antibiotikum** druhé generace, které působí převážně bakteriostaticky inhibicí syntézy bílkovin. Tetracykliny obecně pronikají přes buněčnou stěnu bakterií prostou difuzí a přes cytoplazmatickou membránu se dostávají do cytoplazmy bakterií aktivním transportem. V cytoplazmě bakterií se váže na malou ribozomální podjednotku 30S v místě vazby aminoacyl-tRNA na komplex tvořený ribozomem a translatovanou mRNA. Tato vazba brání přístupu nových aminokyselin do nově syntetizovaného peptidového řetězce, čímž je dočasně **narušena proteosyntéza** vedoucí k zastavení růstu bakterií [78].



Obr. 8: Struktura doxycyklinu [79]

Doxycyklin se vstřebává především v tenkém střevě a vyznačuje se **vysokou mírou absorpce** (95–100 %). K výraznému snížení přispívá potrava obsahující dvojmocné ionty, mléčné výrobky, přítomnost polyvalentních kationtů a alkalické pH [80, 81]. Tetracykliny obecně tvoří s vápníkem nerozpustné cheláty, které se ukládají v kostech a zubech, čímž dochází k jejich poškození [82]. Snadno přestupují do tkání a tělních tekutin s výjimkou mozkomíšního moku. Lze je tudíž detekovat v tkáni plic, ledvin, jater, kostí, pohlavních orgánů a ve významném množství v mateřském mléce. Proto je přísně zakázáno doxycyklin používat v těhotenství [83, 84]. Účinné plazmatické koncentrace je dosaženo 30 minut po podání. Pacienti obvykle užívají 200 mg doxycyklinu první den léčby a po 100 mg

(ve 24 hodinových intervalech) každý následující den, čímž se zajišťuje rovnovážná plazmatická koncentrace po celou dobu léčby. U člověka je doxycyklin metabolizován pouze z malé části a je vylučován především v mikrobiologicky aktivní formě ve střevech (transintestinální sekrecí a ve žluči), z menší části ledvinami. Za 24 hodin se eliminuje přibližně 41 % doxycyklinu [85].

2.5 UV-VIS spektrofotometrie

. **UV-VIS spektrofotometrie** je optická metoda založená na interakci elektromagnetického záření s hmotou [86]. Tato metoda se řadí mezi **spektrální optické metody**, jejichž podstatou je měření energetické změny, která nastane při průchodu elektromagnetického záření látkou. UV-VIS spektrofotometrie patří také mezi metody **absorpční**, jejichž princip spočívá v absorpci ultrafialového a viditelného záření zředěnými roztoky molekul. Ve spektrofotometrii se nejčastěji využívá měření **absorbance**, což je záporný dekadický logaritmus transmitance T daný poměrem dopadajícího zářivého toku I_0 a zářivého toku I prošlého na vzorek podle rovnice [87]:

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I}. \quad (2.3)$$

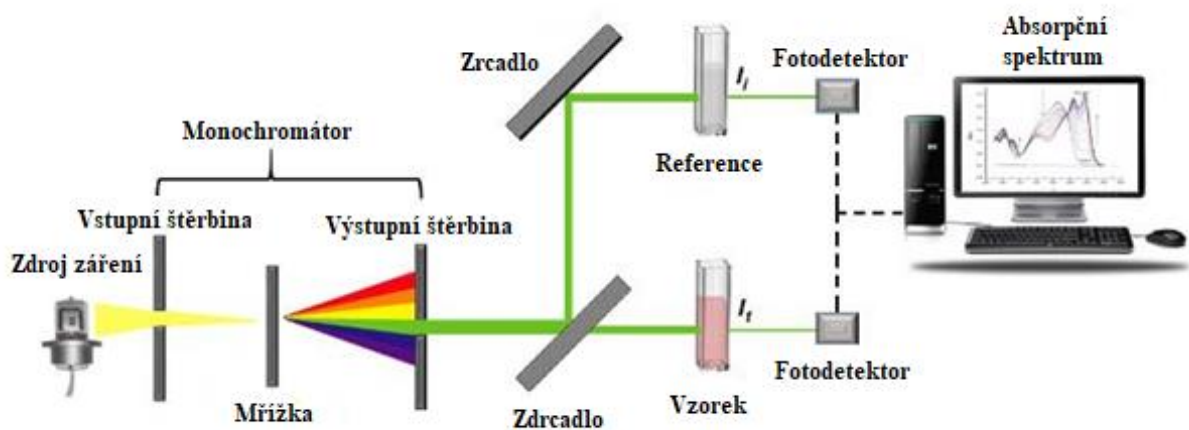
UV-VIS spektrofotometrie nachází uplatnění jak v kvalitativní, tak **kvantitativní analýze** organických i anorganických látek, pomocí níž jsme schopni jednoduše, rychle a levně zjistit koncentraci sloučenin metodou kalibrační křivky. Metoda je velmi široce využívána v lékařství, biochemii, klinickém testování léčiv, potravinářství či ekologii [86, 87].

Každý atom či molekula určitého prvku má přesně danou elektronovou konfiguraci. Za normálních podmínek se atomy či molekuly prvků vyskytují v **základním energetickém stavu** s nejnižší možnou energií, která je definována součtem základní elektronové, vibrační a rotační energie [88]. Absorpcí určitého množství elektromagnetického záření dojde ke změně elektronového stavu daného atomu či molekuly, což může vést k přechodu do vyššího energetického stavu, kterému se říká stav excitovaný. Elektrony přechází ze základní energetické hladiny do **vyšší excitované hladiny**, přičemž dochází k absorpci pouze určitého množství záření o konkrétní vlnové délce, a tedy i konkrétní energii. Je absorbována vždy jen ta část elektromagnetického záření, která svou energií odpovídá přechodu elektronu ze základní hladiny do hladiny excitované. Díky tomu jsou molekulová absorpční spektra ve své podstatě i spektra elektronová. Výsledné spektrum je **pásové**, což je dáno vysokou energií ultrafialového a viditelného záření schopného excitovat jak stavy elektronové, tak i stavy vibrační a rotační. Jeden pás ve spektru odpovídá jednomu typu přechodu elektronů do excitovaného stavu. Absorpční pás je charakterizován **absorpčním maximem**, což je vlnové délka, při které dochází k maximální absorpci záření. Tato energie je totožná s rozdílem energetických hladin, mezi kterými elektron prochází. Poloha pásu určuje energii orbitalů, mezi nimiž dochází k přechodu elektronů při excitaci [87].

2.5.1 Instrumentace

Zdrojové elektromagnetické záření je v UV-VIS spektrofotometrii obvykle generováno **výbojkou**, a to halogenovou, vodíkovou, deuteriovou či xenonovou, přičemž každá z nich je

schopna generovat elektromagnetické záření o jiné vlnové délce. Rozsah vlnových délek, ve kterých metoda pracuje, se nachází v rozmezí 200–800 nm [89]. Optickým dílem spektrofotometru je **monochromátor**, který rozkládá dopadající polychromatické záření na monochromatické paprsky, ze kterých se dále vybírá požadovaná vlnová délka pomocí štěrbin. Monochromátor se skládá ze vstupní štěrbin, disperzního prvku a výstupní štěrbin. **Disperzním prvkem** může být hranol, filtr nebo mřížka. Vybraná vlnová délka poté prochází vzorkem umístěným ve skleněné či **křemenné kyvetě**. Poslední částí je **detektor**, který slouží k měření intenzity záření, které prošlo vzorkem. Principem je přeměna energie světelného záření, které dopadá na detektor, na signál elektrický, který je zpracován počítačem. Jako detektory mohou být využity fotonásobiče, diodová pole nebo CCD detektory [87]. Instrumentace UV-VIS spektrofotometrie je zobrazena na *obr. 9*.



Obr. 9: UV-VIS spektrofotometrie [90]

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Lipozomální léčba infekcí vyvolaných bakterií *Staphylococcus aureus*

GOLDMAN O. a spol. se zabývali studiem antimikrobiálního účinku lipozomální i volné formy léčiva mupirocinu na infekci vyvolanou methicilin-rezistentní bakterií *Staphylococcus aureus*. Lipozomy byly vytvořeny z hydrogenovaného sójového lecitinu s přidavkem cholesterolu a 1,2-distearoyl-sn-glycero-fosfoethanolamin-N-[amino(polyethylenglykolu)] (DSPE-PEG) v poměru 3:1:1. K jejich přípravě byla využita metoda rehydratace fosfolipidového filmu a následná extruze přes polykarbonátový filtr. Enkapsulační účinnost lipozomální formy mupirocinu činila 5–5,7 mg/ml. Minimální inhibiční a baktericidní koncentrace lipozomální a volné formy mupirocinu na různých bakteriálních kmenech *Staphylococcus aureus* byla stanovena pomocí bujónové diluční metody. Účinek lipozomální formy léčiva byl zkoumán také na infikovaných myších samičkách rozdělených do tří skupin. Tyto skupiny byly léčeny samotným léčivem, lipozomální formou léčiva nebo samotnými volnými lipozomy. Po osmi dnech léčby byly myši usmrceny a koncentrace léčiva ve tkáních i samotných bakteriálních buňkách byla detekovaná pomocí HPLC metody. Bylo prokázáno, že inhibiční i baktericidní účinek volné i lipozomální formy léčiva je stejný, avšak lipozomální forma chrání léčivo před inaktivací v krevní plazmě, a proto vede k jeho prodlouženému uvolňování. Výsledky též naznačují, že lipozomy umožňují akumulaci léčiva pouze v postižených orgánech a umožňují léčivu lépe pronikat do bakteriálních buněk. Testy prováděné na makrofázích infikovaných myší pomocí fluorescenčně značených lipozomů podporují toto tvrzení. Výskyt lipozomální formy mupirocinu byl omezen především na makrofágy, kteří jsou infikováni bakteriemi. Navíc byla prokázána i nižší životaschopnost bakterií než u makrofágů léčených pouze volnou formou léčiva [91].

HUANG C.-M. a spol. zkoumali vliv lipozomální a volné formy kyseliny olejové na kožní infekci způsobenou methicilin-resistentní bakterií *Staphylococcus aureus*. Metodou rehydratace fosfolipidového filmu byly vytvořeny lipozomy skládající se z vaječného fosfatidylcholinu, cholesterolu a kyseliny olejové v poměru 5:1:4. Na požadovanou velikost byly lipozomy upraveny sonifikací a extruzí. Enkapsulační účinnost lipozomální formy kyseliny olejové byla rovna 14,7 %. Ke studiu fúze lipozomů s cytoplazmatickou membránou bakterií byly využity lipozomy značené fluorescenční sondou Rhodamin B. *In vitro* antimikrobiální aktivita lipozomální a volné formy léčiva byla stanovena pomocí agarové diluční metody. *In vivo* antimikrobiální testy byly provedeny na povrchu infikované kůže myší, do které byly injekčně vpraveny lipozomy s enkapsulovanou kyselinou olejovou nebo volné lipozomy bez přítomnosti léčiva. Po 48 hodinách byly odebrány vzorky kůže, zhomogenizovány, suspendovány a takto zředěné vzorky byly nanášeny na agarovou plotnu a kultivovány přes noc. Testy cytotoxicity samotného léčiva, lipozomální formy léčiva a volných lipozomů byly posouzeny na zdravé kůži myší. Po 24 hodinách byly odebrány vzorky kůže, které byly následně fluorescenčně barveny a pozorovány pod mikroskopem. Výsledky naznačují, že lipozomy velmi ochotně fúzí s povrchem bakterií. Potvrdilo se, že lipozomální forma kyseliny olejové je až dvanáctkrát účinnější než volná forma. To je přisuzováno právě schopnosti rychlé fúze lipozomů s bakteriemi, čímž se do nich uvolní obrovské množství léčiva najednou. Histologická i antimikrobiální analýza infikované kůže

myši prokázala až 500x vyšší antimikrobiální účinek lipozomální formy kyseliny olejové. Barvené buňky zdravé myši kůže po aplikaci samotného léčiva, lipozomální formy léčiva a volných lipozomů ani v jednom případě neprokázali zvýšenou míru apoptických buněk [92].

PUMERANTZ, A. a spol. se zabývali antimikrobiálním účinkem lipozomální formy vankomycinu na methicilin-resistentní bakterii *Staphylococcus aureus*, jejíž častou příčinou je rozvoj plicní pneumonie. Metodou rehydratace fosfolipidového filmu byly připraveny konvenční lipozomy skládající se z 1,2-distearoylfosfatidylcholinu (DSPC) a cholesterolu v poměru 3:1. K enkapsulaci byl využit vankomycin o koncentraci 50 mg/ml. Enkapsulační účinnost byla stanovena pomocí metody HPLC na 9 %. Ke studiu antimikrobiálního účinku byly použity lidské leukemické makrofágy, které byly infikovány methicilin-resistentní bakterii *Staphylococcus aureus*. Makrofágy byly inkubovány s bakteriemi a poté kultivovány v přítomnosti volného antibiotika, jeho lipozomální formy či prázdných lipozomů. Po 1, 3 a 24 hodinách inkubace byly makrofágy zlyzovány a jejich vzorky byly umístěny na agar za účelem kultivace přes noc. Detekce koncentrace vankomycinu uvnitř bakterií byla prokázána lyzí infikovaných makrofágů a následnou analýzou pomocí metody HPLC. Výsledky poukazují na to, že minimální inhibiční koncentrace volného antibiotika v porovnání s jeho lipozomální formou je natolik vysoká, že u pacientů způsobuje nepříznivé účinky jako například nefrotoxicitu. Léčba lipozomálním vankomycinem vedla k výraznému snížení životaschopnosti bakterií již při nižších koncentracích enkapsulovaného léčiva, a to pravděpodobně i kvůli zvýšené schopnosti penetrace vankomycinu do cytoplasmy bakterií vyvolané snadnou fúzí lipozomů s jejich cytoplazmatickou membránou [93].

LI, Y. a spol. se zabývali studiem antimikrobiálního vlivu lipozomální formy antibiotika daptomycinu a lipozomální formy klarithromycinu na životaschopnost biofilmu tvořeného methicilin-resistentní bakterii *Staphylococcus aureus*. Pomocí rotační vakuové odparky byly připraveny lipozomy složené z lecitinu, cholesterolu a DSPE-PEG v poměru 15:10:1. Poměr množství daptomycinu ku množství fosfolipidů činilo 1:320, poměr klarithromycinu ku množství fosfolipidů naopak činil 10:1. Byly připraveny lipozomy enkapsulované jak oběma léčivy, tak lipozomy obsahující pouze jedno enkapsulované antibiotikum. Enkapsulační účinnost stanovená metodou HPLC u daptomycinu odpovídala hodnotě 92 %, u klarithromycinu 94 %. Minimální inhibiční a baktericidní koncentrace lipozomální i volné formy antibiotik na bakterii *Staphylococcus aureus* byla stanovena pomocí bujónové diluční metody. Biofilm byl ošetřen lipozomálními formulacemi a po 24 hodinách kultivace byly pozorovány morfologické změny biofilmu pomocí elektronové mikroskopie. *In vivo* farmakodynamická studie byla provedena na myších, které byly randomizovány do skupin neošetřených či ošetřených všemi druhy uvedených lipozomálních systémů nebo samotnými léčivy. Myši byly po týdnu pozorování usmrceny a jejich vzorky krve a orgánů byly homogenizovány, suspenzovány a kultivovány na plotnách přes noc při 37 °C. Histologické vzorky tkáně byly fluorescenčně značeny a pozorovány pod světelným mikroskopem. *In vitro* i *in vivo* testy uvádějí totožné výsledky, a že koenkapsulace antibiotik do lipozomů je antimikrobiálně účinnější než lipozomy obsahující enkapsulované pouze jedno antibiotikum, přesto všechny lipozomální systémy vykazovaly vyšší účinnost než samotné volné antibiotikum [94].

3.2 Nosičové systémy antibiotika doxycyklinu

FRANKLIN R. K. a spol. zkoumali antimikrobiální účinnost lipozomální i volné injektovatelné formy doxycyklinu na bakterii *Mycobacterium smegmatis*, která v případě imunopresivních osob může vyvolat infekce ran. Lipozomy byly připraveny metodou využívající gradientu kyseliny sírové. Byly vytvořeny dva typy lipozomálních systémů skládajících se z DPPC/sfingomyelinu a cholesterolu v poměru 2:1. Enkapsulační účinnost lipozomů činila 98 % a 44 %. Farmakokinetika uvolňování z lipozomů byla zkoumána pomocí tandemové metody HPLC/MS na odebraných jaterních a krevních vzorcích krys, které byly ošetřeny buď čistým antibiotikem nebo oběma lipozomálními formulacemi. Cytotoxicita volné i lipozomální formy doxycyklinu byla ověřena na vzorcích kůže odebraných v místě vpichu, které byly podrobeny histologické analýze, nebo na krevních makrofázích krys. Antimikrobiální aktivita byla zkoumána na krevních makrofázích, které byly infikovány bakterií *Mycobacterium smegmatis* a ponechány kultivovat s přidavkem čistého antibiotika nebo dvěma lipozomálními systémy. Po 24 a 48 hodinách byla účinnost detekována pomocí počítání bakterií pod mikroskopem nebo fluorescenčním barvením infikovaných makrofágů. Výsledky uvádějí, že míra uvolňování léčiva u obou lipozomálních systémů je velmi podobná (cca 20 %) a byl potvrzen také jejich delší výskyt v krevním řečišti. Volná forma antibiotika doxycyklinu byla označena za cytotoxickou, navíc žádná z použitých koncentrací nebyla schopna dosáhnout minimální inhibiční koncentrace. Oba typy lipozomů s enkapsulovaným doxycyklinem nevykazovaly toxicitu pro normální zdravé buňky, zároveň však vyvolaly výraznou antimikrobiální inhibici již ve velmi nízkých koncentracích enkapsulovaného léčiva a to převážně po 48 hodinách experimentu [95].

MATSEMAKERS W.-J. a spol. zkoumali vliv biodegradabilní polymerní lipidové matrice s enkapsulovaným doxycyklinem proti bakteriím rezistentním na doxycyklin jako methicilin-citlivý kmen *Staphylococcus aureus* a methicilin-rezistentní kmen *Staphylococcus aureus* vyvolávajících osteomyelitidu spojenou s kostními implantáty. Lipidová matrice byla připravena z kopolymeru polylaktidu a polyglykolidu, DPPC, DSPC, cholesterolu a doxycyklin hydrochloridu. *In vivo* studie pomocí metody HPLC odhadovaly, že 25 % enkapsulovaného doxycyklinu se uvolnilo první den, každý následující již pouze 3 % doxycyklinu. Bakterie obou kmenů byly inkubovány v přítomnosti prázdných matic nebo těch, které obsahovaly inkorporovaný doxycyklin. Počet životaschopných bakterií byl stanoven po 20 hodinách inkubace, kdy se buněčná suspenze zředila a nanasla na agarové plotny. Výzkum *in vivo* byl prováděn na myších a králících s implantáty, jejichž povrch byl potažen lipidovou maticí. Okamžitě po implantaci byl do tohoto místa injekčně vpraven pouze roztok PBS nebo roztok doxycyklinu. Den po implantaci byli myši i králíci usmrceni a vzorky kůže, podkožní tkáň a suspenze získané z povrchu implantátu byly homogenizovány a vysety na agarové plotny pro kultivaci. U králíků bylo v krevní plazmě měřeno množství doxycyklinu v různých časových intervalech metodou HPLC. Po jejich usmrcení bylo hodnoceno množství antibiotika vyskytujícího se na povrchu implantátu. Výsledky potvrzují, že matrice spojená s inkorporací doxycyklinu a jeho postupným uvolňováním vede k výrazné antimikrobiální účinnosti poskytující tak úplnou ochranu proti vzniku osteomyelitidy v kostech u obou rezistentních kmenů. Okolní tkáň na histologických řezech navíc vykazovala normální fyziologii [96].

MISRA R. a spol. se zabývali rozdílem mezi antimikrobiálním účinkem volného antibiotika doxycyklinu a jeho enkapsulovanou formou na patogenní kmen bakterie *Escherichia coli*. Doxycyklin byl metodou dvojité emulze enkapsulován do nanočástic připravených z kopolymeru polylaktidu a polykaprolactonu v poměru 80:20. Enkapsulační účinnost těchto nanočástic byla stanovena metodou HPLC a jejich hodnota se pohybovala kolem 47 %. Stejným způsobem byla měřena i kinetika uvolňování doxycyklinu v čase. Minimální inhibiční a baktericidní koncentrace volného antibiotika i nanočástic s enkapsulovaným doxycyklinem byla stanovena na základě bujónové diluční metody na bakteriálních koloniích *Escherichia coli*. Potvrdilo se, že nanočástice poskytují prodloužené a postupné uvolňování léčiva, čímž se zvyšuje terapeutická účinnost léčiva. K uvolnění 90 % léčiva došlo až po 15 dnech experimentu. Minimální inhibiční i baktericidní koncentrace enkapsulovaného doxycyklinu v nanočásticích byla o něco nižší, což opět potvrzuje lepší terapeutickou účinnost nanočástic. Přesto výsledky poukazují, že použití stejné koncentrace volné a enkapsulované formy má přibližně stejnou antimikrobiální účinnost, avšak v případě volné formy se terapeutický účinek brzy vytratí, což vede k opětovnému nárůstu bakteriální populace *Escherichia coli*. Nanočástice vydrželi stabilní přibližně 10 dní, zatímco volný doxycyklin ztratil aktivitu již po dvou dnech [97].

PEDRINI F. a spol. zkoumali antimikrobiální chování doxycyklinu enkapsulovaného do mikrosfér tvořených kopolymerem polylaktidu a polyglykolidu na bakteriální populaci *Staphylococcus aureus*. Mikrosféry byly vytvořeny metodou emulzní evaporizace v poměru 80:20. Enkapsulační účinnost mikrosfér byla měřena UV-VIS spektrofotometricky a její hodnota byla stanovena na 83 %. Studium kinetiky uvolňování doxycyklinu z mikrosfér bylo měřeno též spektrofotometricky a prokázalo, že se během pěti dní uvolní 30–40 % enkapsulovaného doxycyklinu. Testy cytotoxicity byly prováděny na mezenchymálních kmenových buňkách, které byly kultivovány v přítomnosti mikrosfér s enkapsulovaným doxycyklinem, popřípadě bez něj. Životaschopnost mezenchymálních kmenových buněk byla vyhodnocena pomocí MTT testu. Mikrobiologické testy volné i enkapsulované formy doxycyklinu byly provedeny pomocí agarového difuzního testu na bakterii *Staphylococcus aureus*, který byl vyhodnocen na základě měření inhibičních zón. Zjistilo se, že enkapsulovaná forma doxycyklinu výrazně napomáhá přežití mezenchymálních kmenových buněk při stejně vysoké dávce doxycyklinu jako v případě použití pouze samotného léčiva. Navíc se prokázal zvýšený antimikrobiální účinek doxycyklinu enkapsulovaného do mikrosfér díky jeho postupnému uvolňování, což mnohonásobně zvýšilo terapeutický účinek a zamezilo opětovnému nárůstu bakteriální populace [98].

COVER N. a spol. studovali antibakteriální aktivitu chitosanových nanočástic obsahujících enkapsulovaný doxycyklin na životaschopnost bakteriálního kmene *Escherichia coli*. Chitosanové nanočástice s přítomností či bez přítomnosti doxycyklinu byly připraveny gelací. Enkapsulační účinnost nanočástic byla stanovena spektrofotometricky na hodnotu rovnou 53 %. Kinetika uvolňování doxycyklinu z nanočástic byla určena v různých časových intervalech spektrofotometricky. Minimální inhibiční a baktericidní koncentrace volných chitosanových nanočástic, chitosanových částic s enkapsulovaným doxycyklinem a samotného léčiva byly stanoveny na základě bujónové diluční metody. Cytotoxické testy byly provedeny na lidských epiteliálních buňkách vaječníku, které byly kultivovány spolu

s prázdnými nanočásticemi, enkapsulovanými chitosanovými nanočásticemi nebo samotným doxycyklinem. Test cytotoxicity byl vyhodnocen mikroskopicky pozorováním morfologie buněk nebo testem WST-1, kdy byla životaschopnost buněk určena spektrofotometricky na základě množství přeměněného formazanu v buněčné kultuře. Přestože byla pro volný a enkapsulovaný doxycyklin pozorována podobná hodnota minimálního inhibičního i baktericidního účinku, chitosanové nanočástice prokázali pomalé a postupné uvolňování léčiva, čímž se zvýšila pravděpodobnost úplné eliminace patogenu bez možného opětovného nárůstu bakteriální populace. Výsledky buněčné cytotoxicity ukázaly, že ošetření buněk vaječníku samotným antibiotikem vede k jejich výrazné úmrtnosti, naopak chitosanové částice s enkapsulovaným doxycyklinem ani po pěti dnech neindukovaly žádnou toxicitu [99].

HOSSEINI S. M. a spol. se zabývali syntézou lipidových nanočástic s enkapsulovaným doxycyklinem a jeho antibakteriálním vlivem na infekci fagocytů zvanou jako Brucelóza způsobenou nejčastěji bakteriálním kmenem *Brucella melitensis*. K přípravě lipidových nanočástic byl využit palmový olej, lecitin a poloxamer v poměru 100:10:1. Metodou dvojité emulze byly připraveny nanočástice s přítomností nebo bez přítomnosti doxycyklinu. Enkapsulační účinnost lipidových nanočástic zjištěna metodou HPLC se pohybovala kolem 95 %. Stejnou metodou byla zkoumána kinetika uvolňování doxycyklinu z lipidových nanočástic v různých časových intervalech, což potvrdilo jeho postupné a pomalé uvolňování spojené s lepšími terapeutickými účinky. Minimální inhibiční koncentrace volné i enkapsulované formy doxycyklinu byla zkoumaná měřením inhibičních zón, které vznikly na agaru po kultivaci těchto forem léčiva s bakterií *Brucella melitensis*. *In vitro* test cytotoxicity volné a enkapsulované formy doxycyklinu byla studována na fagocytech, jejichž životaschopnost byla měřena MTT testem. *In vitro* studium antimikrobiálního vlivu volného a enkapsulovaného doxycyklinu na infekci probíhalo na bakterií infikovaných fagocytech, které byly po kultivaci zlyzovány a vzorky byly vysety na agar ke zjištění míry životaschopnosti bakteriálních buněk. *In vivo* antimikrobiální studium infekce naopak probíhalo na bakterií infikovaných krysách, které byly rozděleny do čtyř skupin. První z nich byla neléčená, zbylé tři byly léčeny volným antibiotikem, antibiotikem enkapsulovaným do lipidové nanočástice nebo volnými nanočásticemi. Po dvou dnech byly křasy usmrceny a extrahované vzorky jater a ledvin byly vysety na agar. Výsledky prokázaly, že doxycyklin enkapsulovaný do nanočástic vykazuje vyšší antimikrobiální účinek spojený právě s jeho postupným uvolňováním z nanočástic. MTT test prokázal sníženou toxicitu enkapsulované formy doxycyklinu v porovnání s jeho volnou formou. Studie antimikrobiálního vlivu *in vitro* potvrzují zvýšenou terapeutickou účinnost nanočástic díky jejich schopnosti výrazně ovlivnit životaschopnost bakterií nacházejících se uvnitř fagocytů. Stejně tak studie antimikrobiálního vlivu *in vivo* na krysách potvrdila lepší terapeutický účinek související s potlačením opětovného růstu infekce způsobené bakteriální populací *Brucella melitensis* [100, 101].

3.3 Lipozomální léčba plicních infekcí

LI M. a spol. se zabývali inhalačním podáním lipozomální formy andrografolidu pro léčbu plicní pneumonie způsobené bakterií *Staphylococcus aureus*. Lipozomy tvořené sójovým lecitem a cholesterolem v poměru 6:1 byly připraveny ethanolovou injekcí a do podoby suchého prášku byly převedeny lyofilizací. Enkapsulační účinnost lipozomů měřená metodou

HPLC byla stanovena na 95 %. Metodou HPLC bylo potvrzeno postupné a pomalé uvolňování aktivní látky z vodného středu lipozomů. Antimikrobiální aktivita samotného léčiva a jeho lipozomální formy byla detekována na bakterii *Staphylococcus aureus* pomocí bujónové diluční metody. Plíce krys byly infikovány vstříkem bakteriální suspenze díky dlouhé plastové trubici. Krysy byly rozděleny do čtyř skupin. První byla ošetřena pouze fyziologickým roztokem, druhá samotným andrografolidem, třetí jeho lipozomální formou a poslední samotným penicilinem sloužícím jako pozitivní kontrola. Po třech dnech léčby byly krysy usmrceny a jejich homogenizované vzorky plic byly nanесeny na agar. Myším byla odebrána i krev pro posouzení vlivu volné a lipozomální formy bioaktivní látky na zánětlivé reakce zkoumané imunohistochemicky a imunofluorescenčně. Lipozomální forma andrografolidu vykazovala desetkrát silnější antimikrobiální účinek proti bakterii *Staphylococcus aureus* v případě *in vivo* i *in vitro* testů než jeho volná forma. Enkapsulovaný andrografolid rychle a výrazně snížil množství prozánětlivých cytokinů díky tomu, že lipozomy jsou schopny lépe interagovat s buněčnými membránami. Postupné uvolňování z lipozomů eliminovalo opětovný nárůst kolonií a vznik infekce [102].

PATIL J. S. a spol. zkoumali antibakteriální vliv lipozomální formy rifampicinu na tuberkulózu způsobenou bakterií *Mycobacterium tuberculosis*. Metodou rehydratace fosfolipidového filmu pomocí vakuové odparky byly připraveny lipozomy skládající se ze sójového lecitinu a cholesterolu v poměru 60:40. Připravené lipozomy byly lyofilizovány do podoby suchého prášku. Enkapsulační účinnost byla stanovena spektrofotometricky a její hodnota odpovídala 79 %. Spektrofotometricky bylo též potvrzeno postupné uvolňování rifampicinu z vodného středu lyofilizovaných lipozomů. *In vitro* test antimikrobiální aktivity byl proveden na kultuře *Mycobacterium tuberculosis*, která byla kultivována po dobu čtyř týdnů s lyofilizovanými lipozomy a volným rifampicinem. *In vivo* testy byly provedeny na infikovaných krysách, které byly randomizovány do čtyř skupin. První dvě skupiny byly inhalačně ošetřeny volným a lipozomálním rifampicinem. Druhým dvěma skupinám byl volný a enkapsulovaný rifampicin podán orálně. V několika časových intervalech byla krysám z ocasní žíly odebrána krev, léčivo bylo extrahováno a jeho množství bylo určeno chromatograficky. Studie *in vitro* prokázala, že lipozomální forma rifampicinu vykazuje lepší antituberkulární aktivitu a navíc vykazovala maximální účinnost již při malých koncentracích enkapsulovaného rifampicinu. Studie *in vivo* provedená na krysách potvrdila prodlouženou cirkulaci lipozomů v krvi při inhalační i orální administraci. V případě inhalačního podání se však ve stejných časech v krvi objevovalo vyšší množství antibiotika, což je pravděpodobně způsobeno vyhnutím se „first-pass“ efektu při průchodu játry, ve kterých dochází k částečné metabolizaci léčiva [103].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Lipidy	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfatidylcholin (PC 16:0) - DPPC Anti Polar Lipids, Inc. CAS: 63-89-8 Číslo šarže: 160PC-319 Mr: 734,05
	1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-fosfát (sodná sůl PC 12:0) Anti Polar Lipids, Inc. CAS: 108321-06-8 Číslo šarže: 840635P-200MG-A-024 Mr: 558,661
	Cholesterol Sigma Aldrich CAS: 57-88-5 Číslo šarže: 26732-25G-F Mr: 386,65
	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolamin-N-[methoxy(polyethylenglykol)-5000] (amonná sůl – PEG₅₀₀₀-PE) Anti Polar Lipids, Inc. CAS: 474922-84-4 Číslo šarže: 880200P-200MG-A-059 Mr: 5744,965
Pufry	Fosfátový pufr (PBS) – pH 7,4 PacReac AppliChem CAS: 86-35-3 Číslo šarže: 271504-01
Antibiotikum	Doxycyklin hydrochlorid Sigma Aldrich CAS: 6358-69-6 Číslo šarže: BCBG0703V Mr: 524,38
Rozpouštědla	Chloroform Penta s.r.o. CAS: 67-66-3 Číslo šarže: 2107210716 Mr: 119,38
	Methanol Sigma Aldrich CAS: 67-56-1 Číslo šarže: 154903-2L Mr: 32,04

Rozpouštědla	Deionizovaná voda (ELGA)
Média a agary	LB Broth (Lennox) Sigma Aldrich CAS: 63-12-5 Číslo šarže: 189903-26
	Agar Powder HiMedia CAS: 9002-188-0 Číslo šarže: 0000454043
	DMEM médium (Sigma Aldrich)
Ostatní	MTT (Duchefa Biochemie)
	Trypsin (Versene EDTA)
	Fetální bovinní sérum (HyClone)
	Dodecylsírán sodný (Serva)
	Dimethylsulfoxid (Sigma Aldrich)

4.2 Použité mikroorganismy a buněčné kultury

V této diplomové práci byl pro stanovení antimikrobiálního účinku jednotlivých lipozomálních forem doxycyklinu určených pro léčbu lokálních plicních onemocnění zvolen gram pozitivní bakteriální kmen *Staphylococcus aureus* CCM 885. Zmíněná bakteriální kultura byla získána z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

Ke stanovení cytotoxicity vybraných lipozomálních forem léčiv byly využita buněčná linie humánních keratinocytů zvaná HaCaT (Human Keratinocytes Cell Line, permanent cell line) pocházejících ze sbírky buněčných kultur Cell Lines Service z Eppelheim v Německu.

4.3 Příprava koncentračních řad doxycyklinu v PBS

Ke stanovení enkapsulační účinnosti antibiotika doxycyklinu a určení kinetiky jeho uvolňování z jednotlivých lipozomálních systémů byla sestrojena koncentrační řada v rozmezí 0,1–0,01 mg/ml doxycyklinu v PBS. Zásobní roztok PBS o hodnotě pH 7,4 vznikl rozpuštěním PBS tablety ve 200 ml deionizované vody. Nejdříve byl připraven roztok doxycyklinu o koncentraci 0,1 mg/ml. Jeho přesným ředěním díky PBS vznikly jednotlivé roztoky koncentrační řady tohoto léčiva. Toto rozmezí koncentrací doxycyklinu bylo zvoleno kvůli nízké enkapsulační účinnosti hydrofilních látek [47] a postupnému uvolňování enkapsulovaného doxycyklinu (viz kapitola 5.6).

Ke stanovení optimální koncentrace doxycyklinu pro enkapsulaci do vybraných lipozomálních systémů byla proměřena absorpční spektra doxycyklinu v PBS v rozmezí koncentrací odpovídajících hodnotám 50–0,1 mg/ml. Ředěním nejkonzentrovanejšího roztoku doxycyklinu byly připraveny jednotlivé roztoky koncentrační řady tohoto léčiva. Toto rozmezí koncentrací bylo zvoleno kvůli zjištění koncentrace, kterou by byl UV-VIS spektrofotometr po enkapsulaci a postupném uvolňování doxycyklinu schopen detekovat.

4.4 Příprava lipozomů

Nejprve byl připraven zásobní roztok DPPC v chloroformu o koncentraci 20 mM. Do suché a čisté vialky bylo naváženo přesné množství DPPC, které bylo zalito příslušným objemem chloroformu. Tento zásobní roztok byl využit při přípravě všech typů lipozomálních systémů, které se skládaly ze samotného DPPC, ale také z přísad 30 mol. % kyseliny fosfatidové, kombinací přísady kyseliny fosfatidové s 10 mol. nebo 30 mol. % cholesterolu. Zmíněné molární zastoupení přísad a jejich kombinací bylo zvoleno na základě diplomové práce Ing. Jany Szabové, Ph.D [104].

Pro přípravu jednotlivých lipozomálních systémů o různém složení byly do suchých a čistých vialek naváženy konkrétní přísady komponent tak, aby jejich výsledná koncentrace ve vzorku odpovídala zmíněným molárním procentům z celkového množství fosfolipidů. Přesné navážky komponent byly rozpuštěny v zásobním roztoku DPPC v chloroformu. V případě přítomnosti kyseliny fosfatidové v připravovaném vzorku byl pro její úplné rozpuštění přidán methanol. Poměr chloroformu ku methanolu ve vzorku je roven 5:1. Volné odpařování organických rozpouštědel probíhalo v digestoři. Na stěnách vialky vznikl tenký fosfolipidový film, který byl následně rehydratován deionizovanou vodou, PBS nebo připraveným roztokem doxycyklinu v PBS o různých koncentracích (2, 5 a 10 mg/ml). Výsledná koncentrace DPPC ve vzorku činila 1 mM. Takto vzniklý roztok byl promíchán na vortexu a sonifikován. Energie sonifikace činila 3 kJ, pokud byl však ve vzorku přítomen cholesterol, byla energie navýšena na 5 kJ. Sonifikace byla provedena pomocí ultrazvukové sondy při amplitudě 30 % [105].

Dalším krokem byla příprava „stealth lipozomů“ z DPPC a 6 mol. % polyethylenglykolu vázaného na fosfatidylethanolamin (PEG₅₀₀₀-PE). Navážka PEG₅₀₀₀-PE byla rozpuštěna v takovém množství zásobního roztoku DPPC, aby výsledná koncentrace polyethylenglykolu odpovídala zmíněným molárním procentům z celkového množství fosfolipidů. PEG₅₀₀₀-PE je schopen ve vodném prostředí samovolně tvořit micely. Tomu zabráníme přísadou nižšího množství energie během delší doby sonifikace (po dobu 20 minut) ve vodní lázni při teplotě 40–45 °C [105, 106].

4.5 Centrifugace

Pro odstranění neenkapsulovaného podílu doxycyklinu z jednotlivých lipozomálních roztoků s odlišným složením komponent byla použita centrifugace. Centrifugační zkumavka (cut off: 30 kDa) byla naplněna připraveným roztokem lipozomů, uzavřena víčkem a vložena do centrifugy tak, aby nebyly membrány po stranách centrifugační zkumavky umístěny směrem k ose otáčení. Lipozomální roztoky byly centrifugovány při 4 000 ot/min po dobu 15 min [105]. Následně byly změřeny objemy koncentrátu a permeátu, které byly dále využity nebo podstoupily kvantitativní analýzu pomocí UV-VIS spektrofotometrie (viz kapitola 4.7).

4.6 Dialýza

Ke stanovení kinetiky uvolňování doxycyklinu z jednotlivých lipozomálních systémů byla využita dialýza při teplotě 37 °C (teplota lidského těla). Dialyzátory (cut off: 50 kDa) byly naplněny roztoky koncentrátů vzniklých po centrifugaci lipozomů, uzavřeny víčkem a vloženy do plastové nádoby naplněné PBS. Kinetika uvolňování doxycyklinu byla měřena

v časovém rozmezí 1–6 hodin od přípravy lipozomálních systémů. Pravidelně po hodinách od přípravy byly z dialyzátorů odebírány vzorky lipozomů, které byly následně vhodně naředěny tak, aby nebyl v roztoku patrný sebemenší zákal. Takto naředěné vzorky byly podrobeny UV-VIS spektrofotometrii (viz kapitola 4.7) za účelem určení množství uvolněného doxycyklinu z lipozomů.

4.7 Charakterizace lipozomů

Pro charakterizaci a potvrzení vzniku lipozomálních systémů s enkapsulovaným doxycyklinem bylo využito měření distribuce velikosti částic a zeta potenciálu na přístroji ZetaSizer Nano (Malvern Instruments). Ke stanovení enkapsulační účinnosti jednotlivých lipozomálních systémů a ke studiu kinetiky uvolňování doxycyklinu byl použit UV-VIS spektrofotometr (Hitachi U-3900H).

Měření distribuce velikosti částic zastoupených v lipozomálním roztoku probíhalo ve skleněných kyvetách při teplotě 25 °C. Kalibrace vzorku probíhala 60 sekund. Každý vzorek byl proměřen třikrát a z těchto hodnot byl vytvořen průměr. Výsledkem měření byla závislost intenzity rozptýleného světla na velikosti částic.

Zeta potenciál na povrchu lipozomů byl měřen ve skleněných kyvetách při teplotě 25 °C za pomoci dip cell elektrody. Kalibrace vzorku probíhala 60 sekund. Každý vzorek byl proměřen pětkrát. Výsledná hodnota zeta potenciálu odpovídala průměru těchto pěti měření.

Měření na UV-VIS spektrofotometru probíhalo v křemenných kyvetách při laboratorní teplotě 25 °C. Byla měřena absorpční spektra všech roztoků v rozmezí vlnových délek 200–600 nm. Nejdříve byla proměřena absorpční spektra jednotlivých roztoků koncentrační řady doxycyklinu připravených v PBS. Absorbance byla odečítána při vlnové délce rovné 350 nm [107]. Z těchto hodnot byla sestrojena kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci roztoků doxycyklinu. Výsledkem měření byla lineární regresní přímka a k ní příslušející regresní rovnice vzniklá proložení všech naměřených dat (viz kapitola 5.1). Absorpční spektra jednotlivých lipozomálních systémů byla měřena jak po odstranění neenkapsulovaného podílu doxycyklinu pomocí centrifugace, tak pravidelně po hodinách od přípravy v průběhu šestihodinového dialyzačního procesu při 37 °C. Po centrifugaci byla na spektrofotometru měřena absorpční spektra permeátů, ve kterých byl přítomen pouze doxycyklin rozpuštěný v PBS. Během dialýzy byla naopak měřena absorpční spektra lipozomů, tedy koncentrátů vzniklých při centrifugaci. Jako reference při měření absorpčních spekter lipozomů byly využity lipozomy o totožném složení komponent bez enkapsulovaného doxycyklinu. Ze znalosti regresní rovnice byla stanovena koncentrace doxycyklinu uzavřeného v lipozomech v různých časových bodech z hodnoty absorbance odečtené při vlnové délce rovné 350 nm. Hodnota enkapsulační účinnosti byla vypočítána jako poměr koncentrace doxycyklinu enkapsulovaného v lipozomech a celkové koncentrace doxycyklinu použitého při rehydrataci fosfolipidové dvojvrstvy. Rovnice výpočtu enkapsulační účinnosti lipozomů má tvar:

$$EE (\%) = \frac{C_E}{C_R} \cdot 100, \quad (2.4)$$

kde EE značí enkapsulační účinnost, C_E je vyjadřuje koncentraci enkapsulovaného doxycyklinu a C_R je koncentrace doxycyklinu, kterým byl při přípravě lipozomálního systému rehydratován fosfolipidový film [46].

4.8 Stanovení antimikrobiálního účinku

Pro kultivaci bakteriálního kmene *Staphylococcus aureus* CM 885 bylo připraveno tekuté LB médium, jehož koncentrace činila 15 g/l. Do 100 ml sterilního média byl napipetováním přeočkován 1 ml bakteriální kultury. Po začkování byly mikroorganismy kultivovány v inkubačním boxu s třepáním při teplotě 37 °C, která probíhala 24 hodin. Veškerá manipulace s mikrobiální kulturou probíhala za přesně definovaných a přísně kontrolovaných hygienických podmínek.

4.8.1 Difuzní agarová metoda

Navážka Agar Powder (20 g/l) a LB Broth (15 g/l) byla rozpuštěna v deionizované vodě. Takto připravená směs byla sterilizována v tlakovém hrnci při teplotě 120 °C po dobu 35 minut a následně byla rozlita na sterilní plastové Petriho misky. Po ztuhnutí a vychladnutí byla každá agarová plotýnka naočkována 100 µl tekutého LB média s bakteriální kulturou *Staphylococcus aureus* (koncentrace 10⁸ buněk/ml). Po vsáknutí bakteriální suspenze do agaru bylo do agarových plotýnek pomocí obrácené pipetové špičky vyhloubeno šest jamek, do nichž bylo napipetováno 50 µl testovaného vzorku. První dvě jamky sloužily jako negativní a pozitivní kontrola, do nichž bylo napipetováno PBS a 100 % dimethylsulfoxid. Nejdříve byly na zbývajících jamkách prověřeny jednotlivé koncentrace antibiotika doxycyklinu v rozmezí 5–0,008 mg/ml. Teprve následně byly testovány dva lipozomální systémy složené z DPPC a přídatku 30 mol. % kyseliny fosfatidové a lipozomy z DPPC, 30 mol. % kyseliny fosfatidové a 10 mol. % cholesterolu. Zároveň byly testovány lipozomální systémy jak s enkapsulovaným antibiotikem, tak i bez přítomnosti antibiotika jako jejich kontrola. Agarové plotny byly umístěny do inkubačního boxu s třepáním a kultivovány při teplotě 37 °C po dobu 24 h. Následující den byly změřeny inhibiční zóny všech testovaných vzorků. Měření antimikrobiální aktivity všech testovaných vzorků bylo provedeno v triplikátech za účelem stanovení průměru inhibiční zón.

4.9 Stanovení cytotoxicity

Humánní keratinocyty linie HaCaT byly kultivovány v komerčním médiu DMEM, do kterého bylo přidáno 10 % fetálního bovinního séra (FBS) a 1 % antibiotika. Při kultivaci bylo využito médium a fosfátový pufr uchované v chladu, proto je nutné tyto roztoky před použitím vytemperovat na teplotu 37 °C, aby nedošlo k tepelnému šoku buněk. Samotná kultivace buněk byla prováděna v inkubátoru nastaveném na teplotu 37 °C, s relativní vlhkostí 90 % a obsahem CO₂ 5 %. Veškerá manipulace s buněčnými liniemi probíhala za přesně definovaných hygienických podmínek. Buňky byly denně pozorovány pod mikroskopem spolu s celým obsahem kultivační lahvičky.

Při dosažení konfluency nad 80 % nebo v případě změny barvy média (z červené na oranžovožlutou) bylo přistoupeno k pasážování buněk. Nejprve bylo z kultivačních lahviček vylito médium a buňky byly třikrát promyty v PBS. Poté byl přidán trypsin z důvodu uvolnění přisedlých buněk ode dna kultivační lahvičky. Ta byla vložena do inkubátoru, kde

byla ponechána 10 minut při teplotě 37 °C. K uvolněným buňkám bylo přidáno 5 ml PBS a celý obsah kultivační lahvičky byl převeden do centrifugační zkumavky. Po stočení buněk byl vzniklý pelet na dnu zkumavky rozsuspendován v 5 ml čerstvého DMEM média. Médium s buňkami bylo rozděleno do dvou nových kultivačních lahviček, které byla doplněny na požadovaný objem a opět patřičně zkontrolovány pod mikroskopem.

4.9.1 MTT test

Cytotoxicita byla měřena prostřednictvím stanovení aktivity mitochondriální sukcinátdehydrogenázy. Prvotní postup byl shodný s pasážováním buněk, kdy byl obsah kultivační lahvičky obsahující uvolněné keratinocyty převeden do centrifugační zkumavky a vzniklý pelet byl rozsuspendován v 5 ml čerstvého média DMEM. Následně byla mikroskopicky stanovena koncentrace buněk, kdy byl v poměru 1:1 smíchán vzorek suspenze buněk s trypanovou modří. Vytvořená suspenze byla převedena pod krycí sklíčko na Bürkerově komůrce. Buněčná kultura byla naředěna na koncentraci $2-5 \cdot 10^5$ buněk/ml a rozpipetována na 96-jamkovou mikrotitrační destičku. Do každé jamky bylo napipetováno 100 μ l buněčné suspenze. Takto připravené destičky byly kultivovány v inkubátoru po dobu 24 hodin.

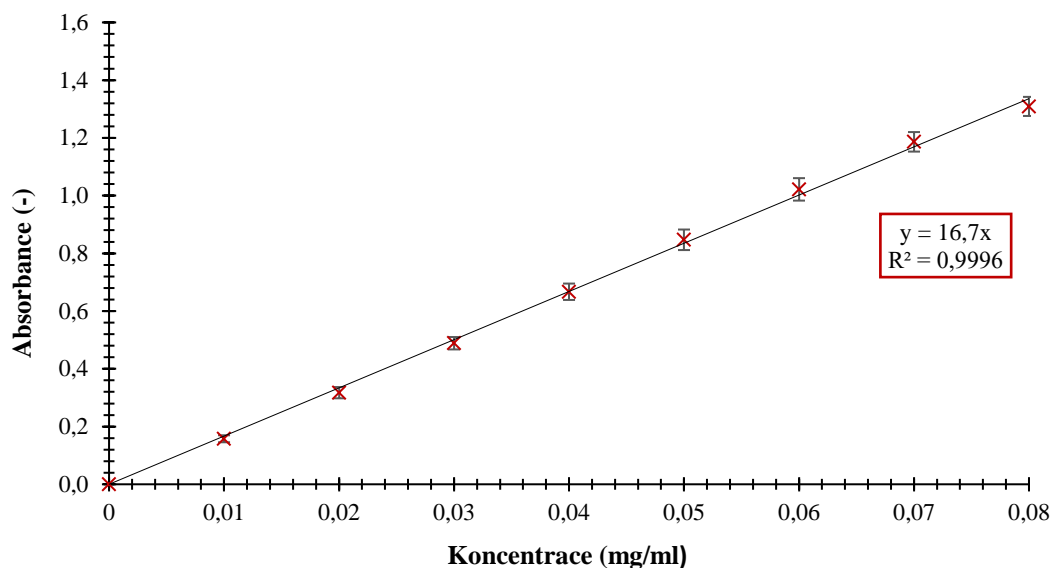
Následující den bylo médium z každé jamky odstraněno a nahrazeno stejným objemem čerstvého DMEM média. Do jednotlivých jamek bylo přidáno 100 μ l připravených lipozomálních systémů, které byly v rámci koncentrační řady postupně ředěny v poměru 1:1. Jako kontrola sloužilo kultivační médium, PBS a 40% ethanol. Testovány byly dva lipozomální systémy – lipozomy z DPPC s přidavkem 30 mol. % kyseliny fosfatidové a lipozomy z DPPC s přidavkem 30 mol. % kyseliny fosfatidové a 10 mol. % cholesterolu (viz kapitola 5.8). Byly využity jak lipozomy s enkapsulovaným léčivem, tak lipozomy prázdné bez doxycyklinu. Prázdné lipozomální systémy byly vhodně naředěny tak, aby koncentrace lipozomů byla stejná jako v jednotlivých roztocích koncentrační řady lipozomální formy doxycyklinu. Na cytotoxicitu bylo otestováno i samotné antibiotikum. Takto připravené destičky byly opět kultivovány v inkubátoru po dobu 24 hodin.

Třetí den bylo z jamek odpipetováno médium spolu se vzorky a do jednotlivých jamek bylo přidáno sterilní barvivo MTT v PBS o koncentraci 2,5 mg/ml. Po třech hodinách inkubace byly vzniklé formazanové krystalky rozpuštěny přidavkem 10% dodecylsírany sodného v PBS. Za 24 hodin byl cytotoxický test spektrofotometricky vyhodnocen pomocí měření absorbance při vlnové délce rovné 540 nm. Nakonec byla metabolická aktivita keratinocytů inkubovaných s lipozomálními systémy porovnána s mitochondriální aktivitou keratinocytů inkubovaných pouze v čistém kultivačním médiu. Při poklesu absorbance pod 50 % hodnoty absorbance buněčné kontroly byl daný vzorek vyhodnocen jako cytotoxický.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Kalibrační křivka doxycyklinu v PBS

Ke stanovení enkapsulační účinnosti jednotlivých lipozomálních systémů a ke studiu kinetiky uvolňování doxycyklinu z jejich lipozomální struktury byla sestrojena kalibrační křivka závislosti absorbance při 350 nm na koncentraci doxycyklinu v jednotlivých roztocích koncentrační řady. Každý roztok v rozmezí 0,08–0,01 mg/ml byl proměřen třikrát, z čehož byl vytvořen průměr, který byl včetně směrodatných odchylek vyneseno do grafické závislosti.



Obr. 10: Kalibrační křivka závislosti absorbance při 350 nm na koncentraci jednotlivých roztoků doxycyklinu

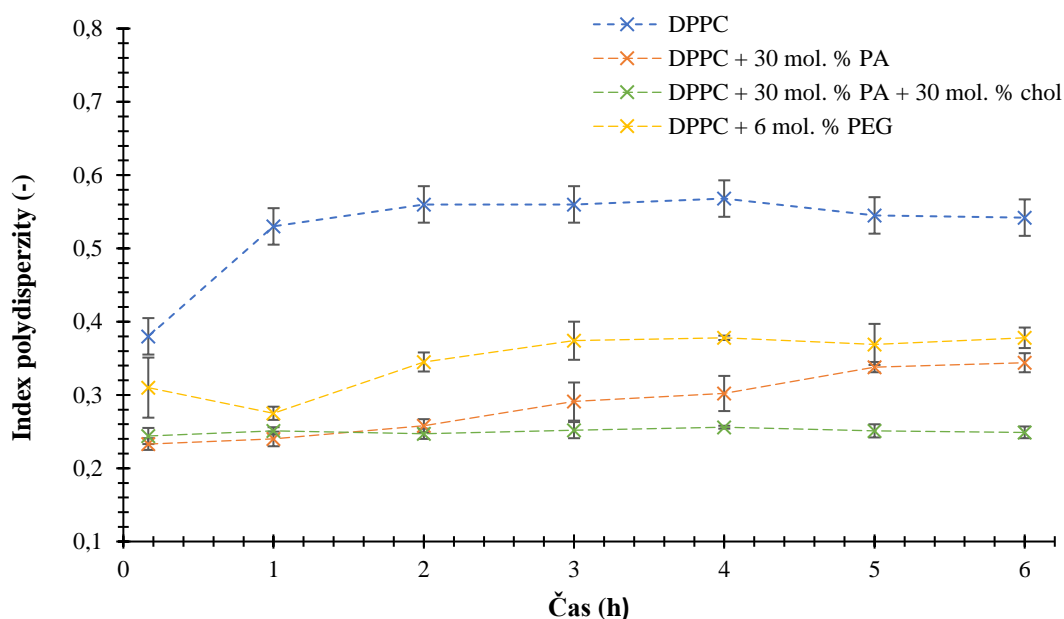
Z obr. 10 je patrné, že kalibrační křivka v oblasti měřených koncentrací vykazuje lineární charakter, proto byla sestrojena lineární regresní přímka, jejíž přesná hodnota byla rovna:

$$y = 16,698 x \quad (2.5)$$

5.2 Optimalizace složení lipozomů v PBS

Nejdříve bylo nutné optimalizovat složení lipozomů tak, aby byly z hlediska jejich fyzikálně-chemických vlastností vhodné pro inhalační podávání léčiv a léčbu lokálních plicních onemocnění. Cílem bylo stanovit stabilitu všech připravovaných lipozomálních systémů ve fyziologickém pH, aby mohl být vybrán lipozomální systém s takovým složením komponent, který by zajistil v požadovaném časovém rozmezí dostatečnou stabilitu, než dojde k jeho reorganizaci a vyšší míře uvolňování enkapsulovaného léčiva. Výběr vhodného lipozomálního systému probíhal na základě měření kinetické stability prázdných lipozomálních systémů v průběhu šesti hodin od jejich přípravy. Časové rozmezí experimentu bylo zvoleno z důvodu opakovaného terapeutického podávání léčiv. Stabilita jednotlivých lipozomálních systémů byla posuzována na základě naměřených indexů polydisperzity

zjištěných při měření distribuce velikosti lipozomů zastoupených v roztoku PBS. Grafického znázornění závislosti indexu polydisperzity jednotlivých lipozomálních systémů na čase, který uplynul od jejich přípravy, si můžete všimnout na následujícím *obr. 11*.



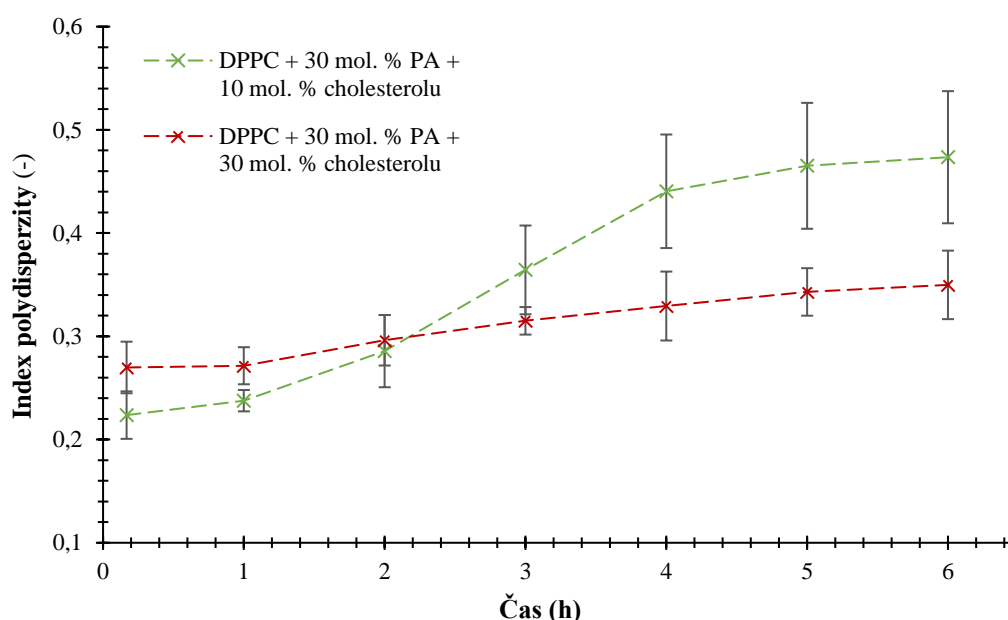
Obr. 11: Indexy polydisperzity všech připravených prázdných lipozomálních systémů

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.1.4, hodnota indexu polydisperzity poukazující na monodisperzní systémy by měla mít hodnotu menší než 0,3. To je v našem případě žádoucí, jelikož potřebujeme, aby byly naše lipozomální systémy za fyziologických podmínek stabilní. Naopak hodnoty indexu polydisperzity nad 0,3 odkazují na možnou agregaci lipozomů z důvodu jejich nestability. V případě lipozomů složených ze samotného DPPC a lipozomů z DPPC s přídavkem 6 mol. % polyethylenglykolu došlo v průběhu první hodiny experimentu k výrazným změnám polydisperzity, což vypovídá o vysoké míře reorganizace jejich struktury. Z tohoto důvodu byly jako systémy vhodné pro inhalační podávání léčiv a léčbu lokálních plicních onemocnění vybrány dva lipozomální systémy, jejichž hodnota polydisperzity se měnila pozvolněji a byla rovna nebo nižší než 0,3. Těmito systémy byly lipozomy tvořené z DPPC s přídavkem 30 mol. % kyseliny fosfatidové a lipozomy skládající se z DPPC a přídavku 30 mol. % kyseliny fosfatidové a 30 mol. % cholesterolu. Proto byly následující experimenty prováděny pouze na těchto vybraných lipozomálních systémech.

5.2.1 Vhodné molární zastoupení cholesterolu v lipozomech

Domníváme se, že inkorporace léčiva do lipozomálních systémů může ovlivnit jejich stabilitu, proto jsme se rozhodli zaměřit také na stanovení kinetické stability lipozomálních systémů s enkapsulovaným léčivem. V případě lipozomálního systému složeného z DPPC s přídavkem 30 mol. % kyseliny fosfatidové a 30 mol. % cholesterolu v prostředí PBS se nám podařilo připravit lipozomy, které byly po celou dobu jejich studia charakteristické velmi úzkou distribucí velikosti. Současně se u těchto lipozomálních systémů vyskytoval pouze

malý podíl lipozomů, které nabývaly větších velikostí či v průběhu experimentu agregovaly (viz obr. 20 v příloze). Zastoupení těchto lipozomů s větší velikostí se v čase nijak výrazně nezměnilo. Z tohoto důvodu, jsme si dovolili usuzovat, že relativně vysoká koncentrace cholesterolu inkorporovaného ve fosfolipidové dvojvrstvě snížila její fluiditu, což vedlo k vyšší stabilitě částic. Příliš vysoká stabilita lipozomálního systému není zcela žádoucím jevem kvůli zpomalení uvolňování léčiva a snížení terapeutického účinku samotného léčiva. Rozhodli jsme se snížit zastoupení cholesterolu ve fosfolipidové dvojvrstvě, a to nejen kvůli požadovanému zvýšení rychlosti uvolňování léčiva, ale také proto, že vysoké zastoupení cholesterolu v lipozomech by mohlo být při terapeutickém použití pro lidský organismus potenciálně toxické [108]. Z těchto důvodů jsme připravili lipozomy s přidavkem 30 mol. % kyseliny fosfatidové a 10 mol. % cholesterolu, které byly při přípravě rehydratovány připraveným roztokem doxycyklinu. Jak je patrné z grafického znázornění uvedeného na obr. 12, index polydisperzity lipozomů s nižší koncentrací cholesterolu se v průběhu časového intervalu postupně zvyšuje.



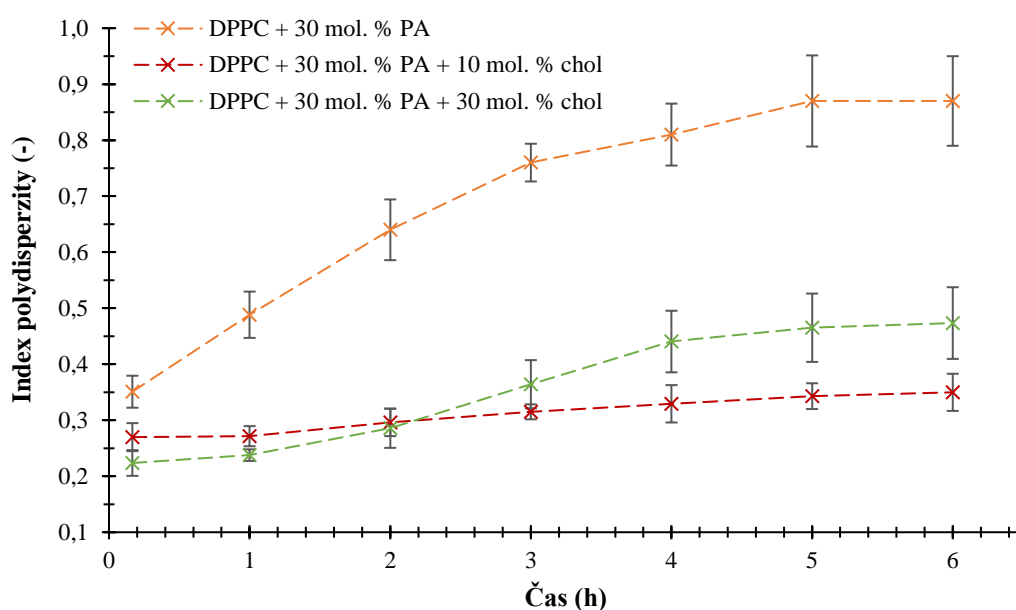
Obr. 12: Indexy polydisperzity lipozomálních systémů v přítomnosti léčiva s různým množstvím inkorporovaného cholesterolu

Tento efekt by mohl poukazovat na skutečnost, že snížené množství inkorporovaného cholesterolu negativně ovlivnilo stabilitu lipozomálního systému. Toto množství nebylo schopno v tak vysoké míře snížit fluiditu fosfolipidové dvojvrstvy lipozomů jako v předchozím případě a zvýšit tak jejich stabilitu. Tímto krokem by mohlo být zajištěno zvýšené uvolňování doxycyklinu. I přes jejich mírnou agregaci jsou lipozomy z DPPC s přidavkem 30 mol. % kyseliny fosfatidové a 10 mol. % cholesterolu v daném časovém intervalu stále dostatečně stabilní pro jejich lokální terapeutické využití. Proto do následujících experimentů za účelem stanovení enkapsulační účinnosti lipozomů a kinetiky uvolňování doxycyklinu bude zahrnut i tento zmíněný lipozomální systém. Distribuce velikosti částic zastoupených v obou roztocích je uvedena na obr. 20 a obr. 21 v příloze.

5.3 Optimalizace koncentrace doxycyklinu pro enkapsulaci do lipozomů

Ke stanovení optimální koncentrace doxycyklinu pro enkapsulaci do lipozomálních systémů bylo proměřeno absorpční spektrum doxycyklinu při různých koncentracích. K optimalizaci byly využity lipozomální systémy, které vykazovaly nejvyšší míru kinetické stability. Nejvyšší měřitelná koncentrace doxycyklinu odpovídala koncentraci 1 mg/ml (viz obr. 22 v příloze). Na základě literární rešerše a detekce pomocí UV-VIS spektrofotometrie byly ke studiu optimální koncentrace doxycyklinu pro enkapsulaci do lipozomů zvoleny koncentrace odpovídající 2, 5 a 10 mg/ml.

Na základě měření kinetické stability vybraných lipozomálních systémů v průběhu šesti hodin od jejich přípravy, během níž byly lipozomy rehydratovány třemi vybranými koncentracemi doxycyklinu a jejichž neenkapsulovaný podíl zatím nebyl z roztoků odstraněn, byla jako ideální koncentrace doxycyklinu pro enkapsulaci do lipozomálních systémů zvolena koncentrace odpovídající 2 mg/ml. Důvodem je to, že v prostředí s vyššími koncentracemi doxycyklinu jsou lipozomy natolik nestabilní, že dochází k jejich výrazné agregaci okamžitě po přípravě. Tato skutečnost je pro prodloužené uvolňování a opakované lokální plicní použití nežádoucím jevem. Grafické znázornění indexu polydisperzity tří vybraných lipozomálních systémů při měření kinetické stability po enkapsulaci doxycyklinu o koncentraci 2 mg/ml naleznete na následujícím obr. 13. Distribuce velikosti lipozomů o stejném složení komponent rehydratovaných vyššími koncentracemi doxycyklinu (5 a 10 mg/ml) jsou znázorněny v příloze na obr. 23 až obr. 26.



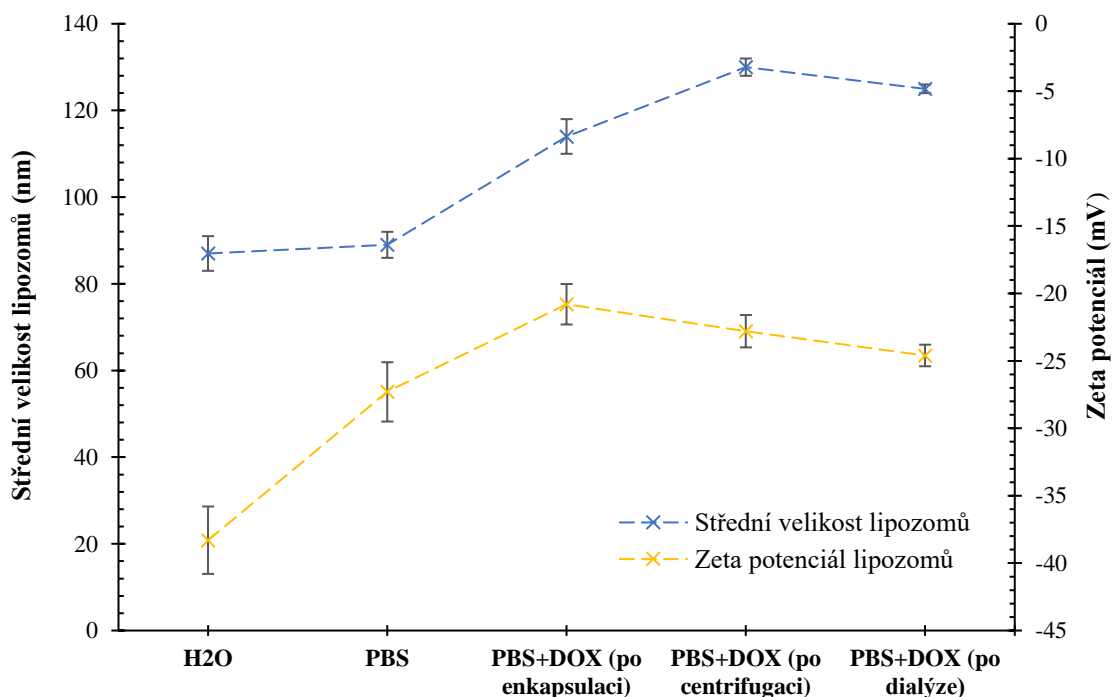
Obr. 13: Indexy polydisperzity vybraných lipozomálních systémů s enkapsulovaným doxycyklinem o koncentraci 2 mg/ml

5.4 Fyzikálně-chemická charakterizace lipozomů

Pro posouzení vlivu PBS a enkapsulovaného léčiva na chování lipozomů o různém složení komponent fosfolipidové dvojvrstvy byly jednotlivé lipozomální systémy rehydratovány deionizovanou vodou, čistým PBS nebo roztokem doxycyklinu o koncentraci 2 mg/ml v PBS.

5.4.2 Lipozomy z DPPC s přidavkem 30 mol. % PA

Po rehydrataci fosfolipidového filmu s přidavkem 30 mol. % kyseliny fosfatidové deionizovanou vodou vznikly lipozomy o střední velikosti odpovídající (87 ± 4) nm a zeta potenciálu o hodnotě $(-38,3 \pm 2,5)$ mV. Nárůst zeta potenciálu do záporných hodnot oproti lipozomům tvořeným pouze samotným DPPC ve vodě – střední velikost (93 ± 5) nm a zeta potenciál $(28,2 \pm 2,8)$ mV – souvisí se záporným nábojem kyseliny fosfatidové, která se asymetricky inkorporovala na vnitřní a vnější fosfolipidovou dvojvrstvu. Asymetrické rozdělení je způsobeno tvarem molekuly kyseliny fosfatidové, která se ochotněji inkorporuje na vnitřní dvojvrstvu lipozomů vzhledem k jejímu většímu zakřivení [105]. Při rehydrataci roztokem PBS se vytvořily lipozomy se střední velikostí odpovídající (89 ± 3) nm a zeta potenciálu o hodnotě $(-27,8 \pm 2,2)$ mV. V obou prostředích vznikly systémy, které se v rámci odchylek nelišily velikostně, výrazně se však lišily v rámci jejich zeta potenciálu. Předpokládáme, že navýšení hodnoty zeta potenciálu blíže k nulové hodnotě je způsobeno změnou iontové síly v lipozomálním roztoku v důsledku přítomnosti PBS. Mírný pokles velikosti je patrný mezi lipozomy tvořenými samotným DPPC a lipozomy s přidavkem kyseliny fosfatidové v obou prostředích. Střední velikost lipozomů z DPPC vytvořených rehydratací roztokem PBS činila (100 ± 4) nm a zeta potenciál odpovídal hodnotě $(-1,1 \pm 0,5)$ mV. Pokles velikosti může být vysvětlen zvýšeným elektrostatickým odpuzováním mezi jednotlivými souhlasně nabitými povrchy lipozomů s inkorporovanou kyselinou fosfatidovou. Grafické znázornění změn střední velikosti a zeta potenciálu lipozomů v jednotlivých krocích kinetického experimentu je uvedeno na *obr. 14*. Distribuce velikosti částic zastoupených v lipozomálním roztoku je uvedena na *obr. 27* v příloze.



Obr. 14: Změna střední velikosti a zeta potenciálu lipozomů z DPPC s přidavkem 30 mol. % PA

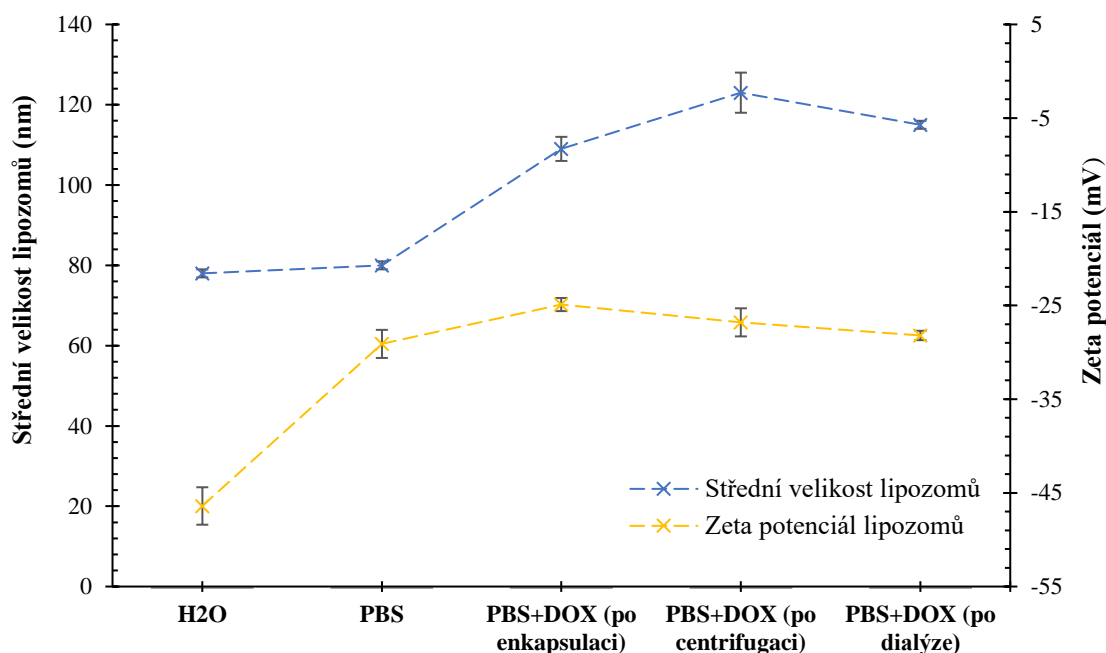
Po rehydrataci roztokem doxycyklinu o koncentraci 2 mg/ml se vytvořily lipozomy se střední velikostí odpovídající (114 ± 4) nm se zeta potenciálem o hodnotě $(-20,8 \pm 1,5)$ mV. Je nutné zmínit, že v našem experimentu byl využit doxycyklin ve formě hydrochloridu, jehož disociace zvýšila iontovou sílu lipozomálního roztoku. Lécivo pravděpodobně ovlivnilo samotný agregační proces lipozomů, který vedl k nárůstu střední velikosti lipozomů v roztoku. Ze struktury doxycyklinu uvedené na *obr. 8* vyplývá, že doxycyklin může současně vykazovat, jak hydrofilní, tak částečně hydrofobní charakter, který může být jedním z důvodů nárůstu střední velikosti lipozomů [106]. Poté co byl odstraněn neenkapsulovaný podíl doxycyklinu pomocí centrifugace se střední velikost lipozomů zvýšila na (130 ± 2) nm a zeta potenciál se posunul k zápornějším hodnotám na $(-22,8 \pm 1,2)$ mV. Po šesti hodinách dialýzy se střední velikost lipozomálních částic mírně snížila na hodnotu (125 ± 1) nm. V tomto případě byla hodnota zeta potenciálu změněna na $(-24,6 \pm 0,8)$ mV. Změny střední velikosti lipozomů jsou způsobeny samotným centrifugačním a dialyzačním procesem. V jejich průběhu pravděpodobně došlo ke změnám iontové síly v lipozomálním roztoku, které mohly souviset se změnami zeta potenciálu na povrchu lipozomů.

5.4.3 Lipozomy z DPPC s přidavkem 30 mol. % PA a 10 mol. % cholesterolu

Přídavek 10 mol. % cholesterolu a 30 mol. % kyseliny fosfatidové po rehydrataci fosfolipidového filmu deionizovanou vodou zformoval lipozomy se střední velikostí částic rovné (78 ± 1) nm s hodnotou zeta potenciálu $(-46,4 \pm 2,0)$ mV. Při použití PBS jako rehydratačního činidla se nám podařilo připravit lipozomy o hodnotě střední velikosti, která činila (80 ± 1) nm, a zeta potenciálu rovnému $(-29,5 \pm 1,5)$ mV. V tomto případě vznikly systémy s rozdílnými zápornými hodnotami zeta potenciálu, jejichž střední velikosti se od sebe v rámci odchylek nelišily. Usuzuje, že za změnou zeta potenciálu stála změna iontové síly lipozomálního roztoku v důsledku použití PBS k rehydrataci fosfolipidového filmu. Změny si můžeme všimnout v porovnání s lipozomy tvořenými pouze přidavkem kyseliny fosfatidové. Za nárůst hodnot zeta potenciálu směrem k zápornějším hodnotám je zodpovědný přídavek cholesterolu, který je schopný obnažovat záporně nabitě části (fosfátové skupiny) fosfolipidových hlaviček DPPC sousedících s inkorporovaným cholesterolem. Ke zmenšení lipozomů může přispívat zvýšené elektrostatické odpuzování mezi souhlasně nabitými povrchy lipozomů či jiný agregační mechanismus lipozomálních částic [106].

Rehydratace fosfolipidového filmu roztokem doxycyklinu o koncentraci 2 mg/ml vedlo ke tvorbě lipozomů o střední velikosti odpovídající hodnotě (109 ± 3) nm a zeta potenciálu rovnému hodnotě $(-24,9 \pm 0,7)$ mV. Ke zvýšení střední velikosti lipozomů pravděpodobně vedl jiný agregační mechanismus vyvolaný přítomností doxycyklinu, který je schopen se díky svému částečně hydrofobnímu charakteru inkorporovat do fosfolipidové dvojvrstvy. Disociace doxycyklinu hydrochloridu zvyšuje iontovou sílu v lipozomálním roztoku, která se mohla podílet na změně zeta potenciálu mezi lipozomálním prostředím a povrchem lipozomů [106]. Po centrifugaci použité k odstranění neenkapsulovaného podílu doxycyklinu z roztoku lipozomů se střední velikost částic zvýšila na hodnotu rovnou (123 ± 5) nm a zeta potenciál činil $(-26,8 \pm 1,0)$ mV. Po dialýze se střední velikost lipozomálních částic snížila na (115 ± 1) nm. V tomto případě byla hodnota zeta potenciálu změněna na $(-28,3 \pm 0,5)$ mV.

Změny střední velikosti lipozomů po centrifugaci a po dialýze jsou způsobeny samotnými procesy centrifugace a dialýzy. Během nich může docházet i ke změně iontové síly lipozomálního roztoku, který má vliv na zeta potenciál nacházející se na povrchu lipozomů. Grafické znázornění změn střední velikosti a zeta potenciálu lipozomů v jednotlivých krocích kinetického experimentu je uvedeno na *obr. 15*. Distribuce velikosti částic zastoupených v lipozomálním roztoku je znázorněna na *obr. 28* v příloze.



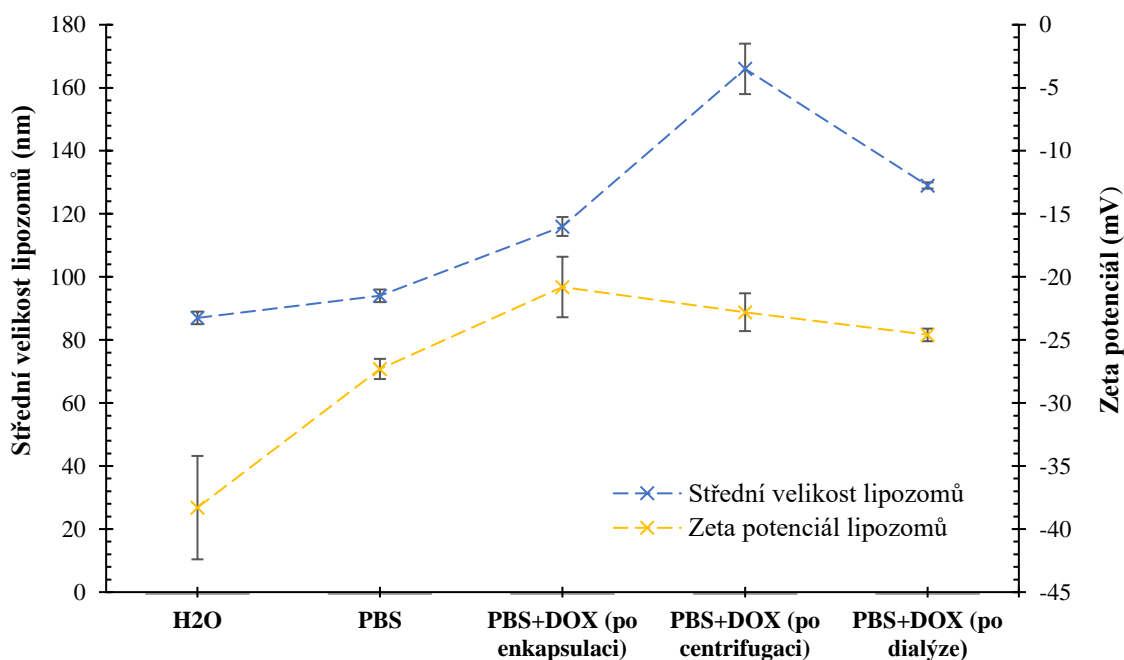
Obr. 15: Změna střední velikosti a zeta potenciálu lipozomů z DPPC s přidavkem 30 mol. % PA a 10 mol. % cholesterolu

5.4.4 Lipozomy z DPPC s přidavkem 30 mol. % PA a 30 mol. % cholesterolu

Po přidavku 30 mol. % cholesterolu a 30 mol. % kyseliny fosfatidové se nám rehydratací fosfolipidového filmu za použití deionizované vody podařilo připravit lipozomy se střední velikosti částic o hodnotě (91 ± 2) nm a hodnotou zeta potenciálu rovnou $(-60,5 \pm 7,1)$ mV. Střední velikost částic vzniklých rehydratací fosfolipidového filmu čistým roztokem PBS činila (94 ± 2) nm a zeta potenciál byl roven $(-32,1 \pm 0,8)$ mV. Hodnoty zeta potenciálů se pohybují ve stabilních záporných hodnotách, které jsou způsobeny přítomností vysokého množství cholesterolu a kyseliny fosfatidové. Předpokládáme, že změna zeta potenciálu při formulaci lipozomů v odlišných prostředích náleží změně iontové síly. Velikostně se mezi sebou lipozomy v rámci odchylky nelišily. Cholesterol má tendenci obnažovat záporně nabitě fosfátové skupiny základní komponenty DPPC. Čím vyšší je množství cholesterolu, tím vyšší míra obnažení náleží těmto fosfátovým skupinám na DPPC, proto je zeta potenciál lipozomů s vyšším molárním množstvím cholesterolu zápornější než u předešlých lipozomálních systémů. Vysoké molární zastoupení cholesterolu ve fosfolipidové dvojvrstvě je pravděpodobně zodpovědné za nárůst střední velikosti těchto lipozomů v porovnání s lipozomy tvořenými

pouze přidavkem kyseliny fosfatidové. V úvahu připadá také jiný agregační mechanismus lipozomů vyvolaný přítomností obou komponent [105, 106].

Rehydratace lipozomů roztokem doxycyklinu vede ke vzniku částic o střední velikosti rovné ($116 \pm 2,7$) nm s hodnotou zeta potenciálu rovnou ($-27,5 \pm 2,4$) mV. Lécivo ovlivnilo agregační mechanismus lipozomálních částic, který vedl k nárůstu střední velikosti lipozomů v roztoku. Z jeho struktury je patrný částečný hydrofobní charakter doxycyklinu, jehož inkorporace do fosfolipidové dvojvrstvy může být důvodem vyšší střední velikosti lipozomů. Jeho disociace ovlivnila i iontovou sílu roztoku, s čímž může souviset změna zeta potenciálu. Po odstranění neenkapsulovaného podílu doxycyklinu pomocí centrifugace byly v roztoku pozorovány lipozomy se střední velikostí odpovídající hodnotě (166 ± 8) nm, jejichž zeta potenciál činil ($-27,3 \pm 1,5$) mV. Po dialýze se střední velikost lipozomálních částic snížila na (129 ± 1) nm. V tomto případě byla hodnota zeta potenciálu změněna na ($-28,4 \pm 0,5$) mV. Střední velikosti lipozomů jsou ovlivněny samotným centrifugačním a dialyzačním procesem. Změny hodnot zeta potenciálu souvisejí s iontovou silou PBS, popřípadě s jejími změnami v průběhu centrifugace či dialýzy. Grafické znázornění změn střední velikosti a zeta potenciálu lipozomů v jednotlivých krocích kinetického experimentu je uvedeno na *obr. 16*. Distribuce velikostí částic zastoupených v lipozomálním roztoku je uvedena na *obr. 29* v příloze.



Obr. 16: Změna střední velikosti a zeta potenciálu lipozomů z DPPC s přidavkem 30 mol. % PA a 30 mol. % cholesterolu

5.5 Enkapsulační účinnost lipozomů

Po odstranění neenkapsulovaného podílu doxycyklinu ze tří vybraných lipozomálních systémů byla stanovena jejich enkapsulační účinnost měřením absorpčních spekter doxycyklinu na UV-VIS spektrofotometru (viz kapitola 4.7). Absorpční spektra doxycyklinu

byla stanovena měřením permeátu vzniklého po centrifugaci všech jednotlivých lipozomálních roztoků. Měření každého vzorku proběhlo třikrát v rozmezí vlnových délek 200–600 nm. Jako referenční vzorek sloužil čistý roztok PBS v deionizované vodě. Absorbance byla z absorpčních spekter odečtena při 350 nm [107]. Z těchto hodnot byl stanoven průměr, z něhož byla na základě znalosti kalibrační křivky uvedené v kapitole 5.1 zjištěna koncentrace doxycyklinu enkapsulovaného uvnitř lipozomů složených z odlišných komponent. Enkapsulační účinnost lipozomálních systémů byla stanovena po 1 hodině od jejich přípravy z důvodu časové náročnosti dílčích kroků, které měření předcházely. Hodnota enkapsulační účinnosti lipozomů byla spočítána podle vzorce uvedeného v kapitole 4.7. Výsledky přehledně uvádí následující *tab. 1*.

Tab. 1: Enkapsulační účinnost jednotlivých lipozomálních systémů

LIPOZOMÁLNÍ SYSTÉM	EE (%)
DPPC + 30 mol. % PA	48,2 ± 2,7
DPPC + 30 mol. % PA + 10 mol. % cholesterolu	20,8 ± 1,3
DPPC + 30 mol. % PA + 30 mol. % cholesterolu	23,9 ± 1,6

Jak si můžeme všimnout, nejvyšší enkapsulační účinnost byla naměřena u lipozomálního systému skládajícího se z DPPC a přídatku 30 mol. % kyseliny fosfatidové. Struktura doxycyklinu vypovídá o jeho hydrofilním i částečně hydrofobním charakteru. Inkorporace doxycyklinu do fosfolipidové dvojvrstvy měla za následek vysokou enkapsulační účinnost v porovnání s čistě hydrofilními léčivy. Kombinace základní komponenty s přídatkem kyseliny fosfatidové a cholesterolu vedla v porovnání s těmito lipozomy ke snížení enkapsulační účinnosti. Tato skutečnost je spojena s přítomností cholesterolu, jehož inkorporace do fosfolipidové dvojvrstvy lipozomů omezila prostor pro inkorporaci samotného antibiotika [106]. Můžeme si všimnout, že molární zastoupení cholesterolu má mírný vliv na enkapsulační účinnost lipozomů. Cholesterol má tendenci ztuzit lipozomální membránu tím, že vyplní prostor mezi nedokonale sbalenými fosfolipidy, drží je pohromě a brání jejich pohybu, čímž zabraňuje úniku enkapsulovaného léčiva [10]. Čím vyšší je tedy množství inkorporovaného cholesterolu, tím lepší ochrana je cholesterolem poskytnuta před únikem doxycyklinu enkapsulovaného uvnitř vodného středu lipozomů ihned po jeho enkapsulaci.

5.6 Kinetika uvolňování doxycyklinu z lipozomů

Kinetika uvolňování doxycyklinu z jednotlivých lipozomálních systémů byla studována na základě dialyzačního experimentu v časovém rozmezí 1-6 hodin od jejich přípravy (viz kapitola 4.6). Dialýza probíhala v prostředí PBS při teplotě lidského těla – 37 °C. Do dialyzátoru byl umístěn koncentrát vzniklý po centrifugaci lipozomálních systémů a z něj byl pravidelně po hodinách odebírán vzorek, který byl podroben snímání absorpčních spekter pomocí UV-VIS spektrofotometru v rozmezí hodnot vlnových délek 200–600 nm. Absorpční spektra doxycyklinu byla proměřena třikrát u každého lipozomálního systému. Jako referenční vzorek sloužily lipozomy o stejném složení bez přítomnosti doxycyklinu. Absorbance byla z absorpčního spektra odečtena při 350 nm [107] a z těchto hodnot byl vytvořen průměr. Na základě znalosti kalibrační křivky uvedené v kapitole 5.1 byla zjištěna

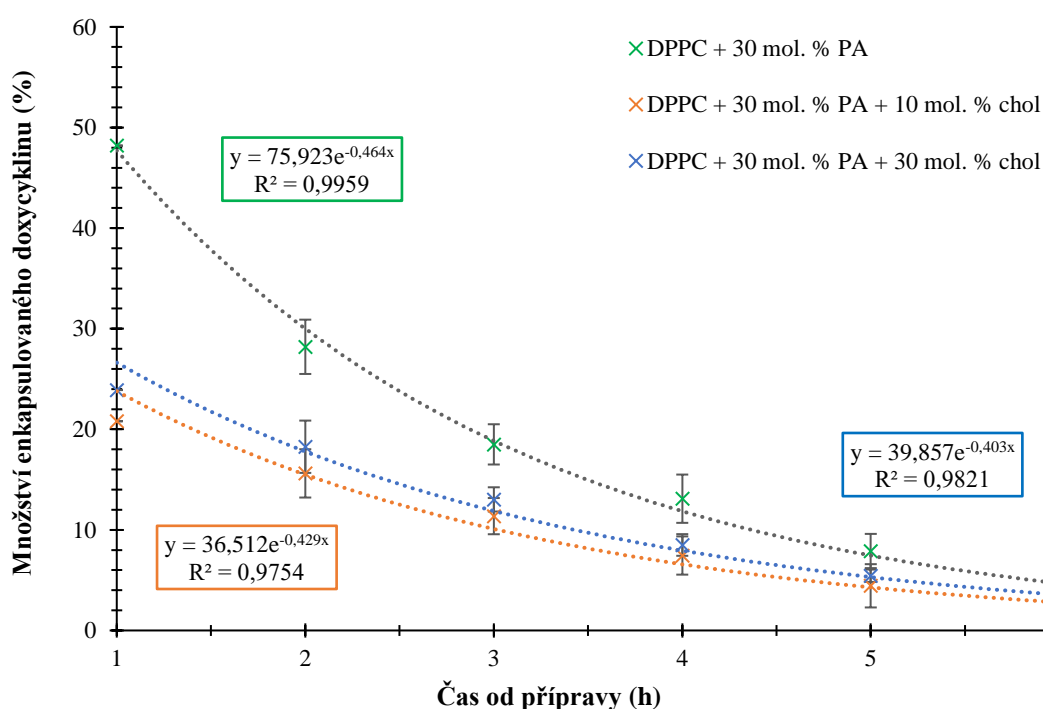
zbylá koncentrace doxycyklinu enkapsulovaného uvnitř lipozomů složených z odlišných komponent. Množství zbylého enkapsulovaného doxycyklinu bylo určeno z poměru koncentrace doxycyklinu enkapsulovaného v lipozomech po určeném čase dialýzy a koncentrace doxycyklinu, kterou byl rehydratován fosfolipidový film během jejich přípravy. Procentuální zastoupení doxycyklinu, který zůstal enkapsulovaný uvnitř lipozomů o odlišném složení komponent, je uvedeno v *tab. 2*. Grafické znázornění kinetiky uvolňování doxycyklinu z jednotlivých lipozomálních systémů je uvedeno na *obr. 17* spolu s exponenciálními regresními přímkami, ze kterých je možné určit zůstatek doxycyklinu uvnitř lipozomů v jakémkoliv časovém bodě dialyzačního experimentu.

Tab. 2: Zůstatek doxycyklinu v jednotlivých lipozomálních systémech

ČAS (h)	ENKAPSULAČNÍ ÚČINNOST (%)		
	LIPOZOMÁLNÍ SYSTÉM Z DPPC		
	+ 30. mol % PA	+ 30 mol. % PA + 10 mol. % chol	+ 30 mol. % PA + 30 mol. % chol
1	48,2 ± 2,7	20,8 ± 2,6	23,9 ± 2,4
2	28,2 ± 2,0	15,6 ± 1,2	18,3 ± 1,8
3	18,5 ± 2,4	11,4 ± 1,1	13,0 ± 1,9
4	13,1 ± 1,7	7,5 ± 0,6	8,5 ± 2,2
5	7,9 ± 2,0	4,4 ± 0,2	5,4 ± 1,4
6	4,3 ± 0,8	2,4 ± 1,5	3,2 ± 1,1

Nejenže lipozomální systém z DPPC s přidavkem 30 mol. % kyseliny fosfatidové vykazuje nejvyšší enkapsulační účinnost, ale také vykazuje nejvyšší míru uvolňování doxycyklinu v průběhu kinetického experimentu. Během první hodiny dialýzy se uvolnilo cca 42 % původně enkapsulovaného léčiva, což značí, že tento lipozomální systém nijak nebrání uvolňování léčiva. S klesajícím množstvím enkapsulovaného léčiva klesá i rychlost jeho uvolňování, přesto se však během šesti hodin experimentu uvolní většina enkapsulovaného doxycyklinu (přibližně 91 %). Únik léčiva z lipozomů je způsoben jejich postupnou reorganizací v závislosti na měnícím se indexu polydisperzity. Tohoto trendu si můžeme všimnout v grafickém znázornění na *obr. 13*. Přídavek cholesterolu k těmto lipozomálním systémům způsobuje ztužení fosfolipidové dvojvrstvy díky jeho schopnosti vyplnit prostor mezi nedokonale sbalenými fosfolipidy, držet je blíže pohromadě a bránit jejich vzájemnému pohybu [10]. Proto je během dialýzy pro doxycyklin těžší projít přes ztuženou fosfolipidovou dvojvrstvu v lipozomální membráně. Díky přítomnosti cholesterolu nebyla míra inkorporace doxycyklinu do fosfolipidové dvojvrstvy lipozomů až tak výrazná. Z těchto zmíněných důvodů je uvolňování doxycyklinu z lipozomálních systémů s přidavkem cholesterolu v porovnání s přechozím typem lipozomů mnohem pomalejší a pozvolnější. Nehledě na to, že lipozomy s přidavkem 30 mol. % cholesterolu mají mírně vyšší enkapsulační účinnost, rozdíl v kinetice uvolňování doxycyklinu v jednotlivých časových bodech dialýzy se zdá být minimální, téměř totožný. Během první hodiny dialýzy se z lipozomálního systému s přidavkem 10 mol. % cholesterolu uvolní přibližně 25 % původně enkapsulovaného či inkorporovaného doxycyklinu, u lipozomů s přidavkem 30 mol. % cholesterolu je hodnota

velmi podobná, činí cca 23,5 %. V obou případech se po ukončení kinetického experimentu uvolnilo přibližně 87 % původně enkapsulovaného doxycyklinu. Rychlost uvolňování klesá mnohem pozvolněji, než je tomu u přechozích lipozomů. Lipozomy s přidavkem kyseliny fosfatidové i cholesterolu prokázaly schopnost pomalého a postupného uvolňování léčiva, což blízce souvisí s jejich potenciálním terapeutickým účinkem. Jelikož zvýšené molární množství inkorporovaného cholesterolu nijak výrazně neovlivňuje kinetiku uvolňování léčiva z lipozomů, nebudou lipozomy s vyšší koncentrací cholesterolu z důvodu jejich pravděpodobného toxického účinku na lidský organismus zahrnuty do antimikrobiálních ani do cytotoxických testů [108].



Obr. 17: Kinetika uvolňování doxycyklinu z lipozomů

5.7 Antimikrobiální účinek lipozomů

Antimikrobiální aktivita byla stanovena pomocí difuzní agarové metody na bakteriálním kmeni *Staphylococcus aureus* CCM 885. Testovány byly vzorky volné formy antibiotika doxycyklinu, z něhož byla připravena koncentrační řada, dva vybrané lipozomální systémy s enkapsulovaným antibiotikem a dva typy lipozomů s totožným složení komponent bez přítomnosti doxycyklinu. Jako kontrola bylo použito PBS a 100% DMSO. Kolem jamky se sterilním PBS se nevytvořila žádná inhibiční zóna, v případě 100% DMSO byla viditelná pouze minimální inhibiční zóna o velikosti $(0,5 \pm 0,1)$ mm. Nejdříve bylo na antimikrobiální aktivitu testováno samotné antibiotikum doxycyklin v rozmezí koncentrací 0,008–5 mg/ml. Všechny získané průměrné hodnoty inhibičních zón vyskytujících se kolem jednotlivých jamek s testovanými vzorky jsou přehledně uvedeny v následující tab. 3.

Minimální inhibiční koncentrace doxycyklinu schopná usmrtit 90 % bakteriální populace se v závislosti na přítomnosti bakteriálního kmene *Staphylococcus aureus* pohybuje v koncentracích okolo 8–32 µg/ml [109]. Proto byla antimikrobiální aktivita jednotlivých koncentrací antibiotika doxycyklinu porovnána s průměrnou hodnotou těchto minimálních inhibičních koncentrací doxycyklinu, která je rovna 16 µg/ml. Jak si tedy můžeme všimnout, se zvyšující koncentrací antibiotika výrazně roste i jeho antimikrobiální aktivita, jelikož se zvyšuje velikost inhibičních zón nacházejících v okolí jamek.

Tab. 3: Antimikrobiální aktivita volné formy doxycyklinu

KONCENTRACE DOX (mg/ml)	VELIKOST INHIBIČNÍ ZÓNY (mm)
5	16,6 ± 0,6
2	15,3 ± 0,7
1	14,0 ± 0,3
0,5	13,8 ± 0,4
0,25	13,3 ± 0,4
0,125	12,7 ± 0,5
0,063	11,9 ± 0,8
0,032	11,0 ± 0,6
0,016	9,5 ± 0,8
0,008	7,2 ± 0,3

Následně byly současně testovány dva typy lipozomálních systému s enkapsulovaným doxycyklinem i dva typy lipozomálních systémů s totožným složením komponent bez přídavku doxycyklinu. Výsledné hodnoty průměrů inhibičních zón jsou uvedeny v tab. 4.

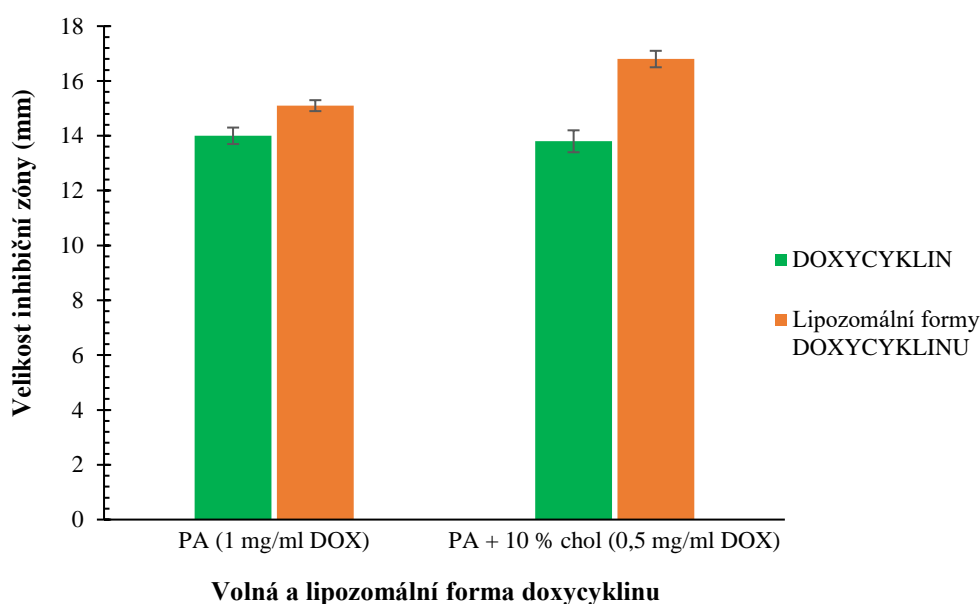
Tab. 4: Antimikrobiální aktivita jednotlivých lipozomálních systémů

LIPOZOMÁLNÍ SYSTÉM	KONCENTRACE DOX (mg/ml)	VELIKOST INHIBIČNÍ ZÓNY (mm)
DPPC + 30 mol. % PA	1	15,1 ± 0,2
DPPC + 30 mol. % PA	0	0
DPPC + 30 mol. % PA + 10 mol. % cholesterolu	0,5	16,8 ± 0,3
DPPC + 30 mol. % PA + 10 mol. % cholesterolu	0	0

Prázdné formy lipozomů nevykazovaly žádný antimikrobiální účinek, jelikož kolem jejich jamek po difuzi lipozomálního roztoku do agaru nevznikla žádná viditelná inhibiční zóna. V případě lipozomálního systému z DPPC s přídavkem 30 mol. % kyseliny fosfatidové, jejichž enkapsulační účinnost činila přibližně 50 % (tedy 1 mg/ml doxycyklinu), se po 1 dni inkubace objevila inhibiční zóna s poloměrem (15,1 ± 0,2) mm. V předchozí tab. 3 můžeme všimnout, že oproti samotnému antibiotiku o stejné koncentraci došlo k nárůstu poloměru inhibiční zóny o 1,1 mm, což poukazuje na zvýšenou antimikrobiální aktivitu lipozomální formy doxycyklinu proti bakteriálnímu kmeni *Staphylococcus aureus* CCM 885. Toto tvrzení nám podporuje i druhý lipozomální systém skládající se z DPPC s přídavkem 30 mol. %

kyseliny fosfatidové a 10 mol. % cholesterolu, jejichž enkapsulační účinnost se pohybovala okolo 25 % (0,5 mg/ml doxycyklinu). Nárůst inhibiční zóny je v tomto případě oproti samotnému doxycyklinu o stejné koncentraci ještě výraznější a jeho rozdíl činí cca 3 mm.

Důvodem zvýšené aktivity lipozomálních forem antibiotika doxycyklinu je možnost pozvolného a postupného uvolňování léčiva z lipozomů, jak již bylo experimentálně potvrzeno v předchozí kapitole 5.6. Lepší terapeutický účinek lipozomálního systému z DPPC s přídavkem 30 mol. % kyseliny fosfatidové a 10 mol. % cholesterolu proti bakteriálnímu kmeni *Staphylococcus aureus* je vyvolán přítomností cholesterolu, který je schopen ztužit fosfolipidovou dvojvrstvu lipozomů a lépe tak regulovat uvolňování léčiva. Výhoda postupného uvolňování léčiva z lipozomů tkví také v tom, že delší působení antibiotika na bakteriální buňky zamezí jejich možnému opětovnému pomnožení. Pokud se zvolí dostatečně vysoká koncentrace antibiotika, bude i v lipozomální formě možné předejít případnému rozvoji rezistence. Lipozomy jsou navíc schopny v určité míře fúzovat s cytoplazmatickou membránou bakterií a přenášet tak léčivo přímo do jejich cytoplazmy [93]. Grafické znázornění velikosti inhibičních zón volné a dvou lipozomálních forem doxycyklinu se stejnou koncentrací enkapsulovaného léčiva je uvedeno na obr. 18.



Obr. 18: Inhibiční zóny volné a lipozomální formy doxycyklinu se stejnou koncentrací léčiva

5.8 Cytotoxický účinek lipozomů

Cytotoxicita připravených lipozomů byla stanovena za účelem posouzení bezpečnosti vůči buňkách lidského organismu. Testována byla pomocí standardního MTT testu na zdravých lidských keratinocytech zvaných HaCaT. Testovány byly vzorky volné formy antibiotika doxycyklinu, dva vybrané lipozomální systémy s enkapsulovaným antibiotikem a dva typy lipozomů s totožným složením komponent bez přítomnosti doxycyklinu. Prázdné lipozomální systémy byly vhodně naředěny tak, aby koncentrace lipozomů byla stejná jako v roztoku lipozomální formy doxycyklinu. Všechny vzorky byly v rámci koncentrační řady

postupně ředěny v poměru 1:1. Jako negativní kontrola bylo použito čerstvé kultivační médium („cell control“) a PBS („vehicle control“), jako pozitivní kontrola 40% ethanol („kill control“). Po 1 dni kultivace testovaných vzorků s MTT byla spektrofotometricky změřena absorbance kultivačního média při vlnové délce odpovídající hodnotě 540 nm. Absorbance keratinocytů inkubovaných s volnou a lipozomálními formou doxycyklinu včetně prázdných lipozomů byla porovnána s absorbancí keratinocytů inkubovaných pouze v čistém kultivačním médiu. Při poklesu absorbance pod 50 % absorbance buněčné kontroly s čistým kultivačním médiem byl daný vzorek vyhodnocen jako cytotoxický. Výsledky cytotoxického testu shrnuje následující *tab. 5*.

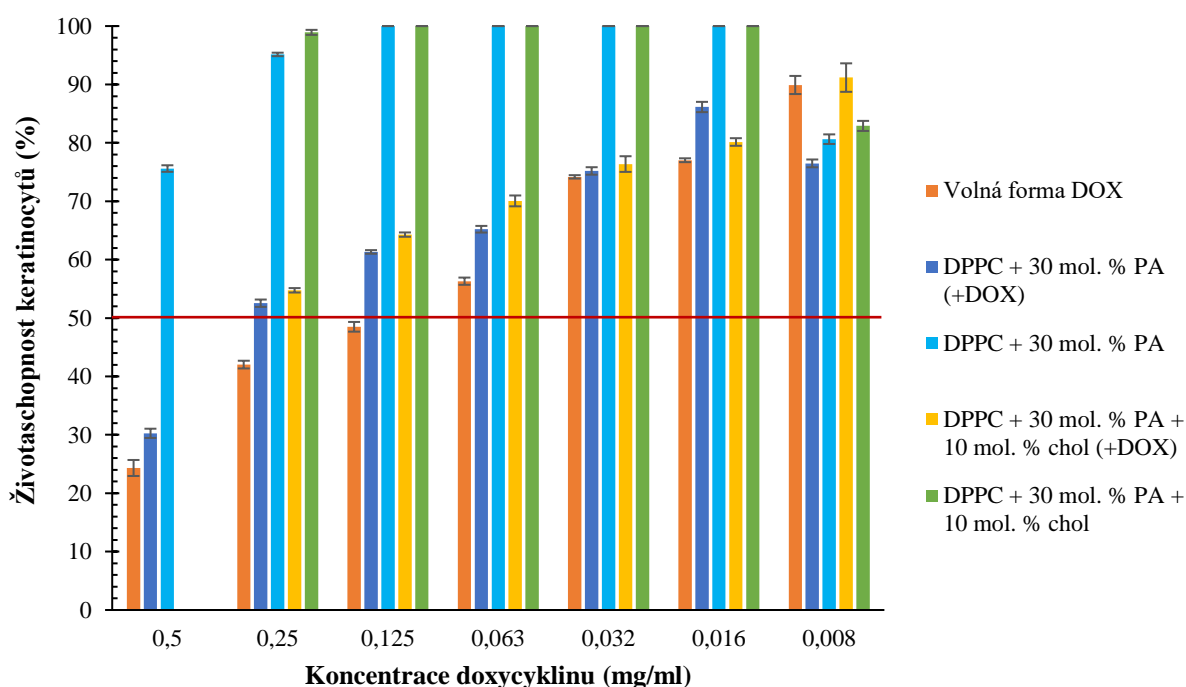
Tab. 5: Výsledky cytotoxického testu volné i lipozomální formy doxycyklinu

Koncentrace DOX (mg/ml)	ŽIVOTASCHOPNOST KERATINOCYTŮ (-)				
	Volná forma DOX	LIPOZOMÁLNÍ SYSTÉM Z DPPC			
		S enkapsulovaným DOX		Prázdné bez DOX	
		+ 30. mol % PA	+ 30 mol. % PA + 10 mol. % chol	+ 30. mol % PA	+ 30 mol. % PA + 10 mol. % chol
0,5	24,3 ± 1,4	30,3 ± 0,8	-	75,6 ± 0,6	-
0,25	42,0 ± 0,7	52,5 ± 0,6	54,8 ± 0,4	95,1 ± 0,3	98,9 ± 0,4
0,125	49,5 ± 1,4	61,3 ± 0,3	64,3 ± 0,4	100	100
0,063	56,3 ± 0,6	65,2 ± 0,6	70,1 ± 0,9	100	100
0,032	74,2 ± 1,3	75,2 ± 0,6	76,4 ± 1,3	100	100
0,016	77,0 ± 0,3	86,1 ± 0,9	80,2 ± 0,7	100	100
0,008	89,9 ± 1,6	76,5 ± 0,7	91,2 ± 2,4	80,6 ± 0,9	89 ± 0,9

Vzorek negativní kontroly („vehicle control“) s PBS zachoval 100% životaschopnost keratinocytů, zatímco životaschopnost keratinocytů inkubovaných se 40% ethanolem (pozitivní kontrola) klesla na hodnotu (14,3 ± 0,7) %. S klesající koncentrací volné formy antibiotika doxycyklinu v roztoku PBS postupně klesá i jeho toxicita. Neenkapsulovaný doxycyklin je pro keratinocyty toxický v rozmezí koncentrací 0,125–0,5 mg/ml. Z *tab. 5* je dále patrné, že ani jeden typ prázdných lipozomálních systémů nevykazuje toxicitu, jelikož poměr absorbancí vzhledem k negativní buněčné kontrole v každém případě překračuje 50 %. Životaschopnost buněk v přítomnosti prázdných lipozomů neklesla pod 75 %. S klesající koncentrací lipozomů vzrůstá životaschopnost lidských kožních buněk. Jedinou výjimku tvoří vysoce zředěné roztoky prázdných lipozomů, které z důvodu snížené stability mohly na buňky působit nepříznivě (viz koncentrace 0,008 mg/ml), avšak ani v tom případě nevykazovaly cytotoxicitu. Ze srovnání životaschopnosti keratinocytů ošetřených stejnými koncentracemi volné a lipozomální formy doxycyklinu je patrné, že lipozomální forma léčiva výrazně přispívá k ochraně zdravých kožních buněk před cytotoxicitou samotného léčiva. Lze se domnívat, že tato skutečnost opět souvisí s pozvolným a postupným uvolňováním doxycyklinu z lipozomů. K přežití keratinocytů během kultivace s testovanými vzorky je nutná přítomnost kultivačního média, proto již při prvotním ošetření testovanými vzorky vycházíme z ředění 1:1

Enkapsulační účinnost lipozomálních systémů složených z DPPC a 30 mol. % kyseliny fosfatidové činí přibližně 50 %, v lipozomech je tedy enkapsulována koncentrace doxycyklinu

odpovídající cca 1 mg/ml. Tato enkapsulační účinnost byla ředěna v poměru 1:1 s kultivačním médiem, proto počáteční koncentrace v cytotoxickém testu činila 0,5 mg/ml. Z grafického znázornění výsledků cytotoxického testování uvedeného na *obr. 19* vyplývá, že tato koncentrace enkapsulovaného doxycyklinu je pro keratinocyty stále toxická. Avšak při dalším naředění doxycyklinu na koncentraci 0,25 mg/ml již lipozomální systém převyšuje hranici životaschopnosti kožních buněk, viabilita činí cca 53 %. Další ředění léčiva spolu s lipozomy s přidavkem kyseliny fosfatidové dále zvyšuje životaschopnost keratinocytů. Enkapsulační účinnost lipozomálních systémů z DPPC s přidavkem 30 mol. % kyseliny fosfatidové a 10 mol. % cholesterolu byla v porovnání s předchozím typem lipozomů poloviční, činila přibližně 25 %. V lipozomech tedy zůstalo enkapsulováno množství doxycyklinu odpovídající koncentraci cca 0,5 mg/ml. Za účelem přežití keratinocytů během kultivace a získání relevantních výsledků byla tato koncentrace doxycyklinu enkapsulovaná v lipozomech opět naředěna stejným objemem kultivačního média na koncentraci 0,25 mg/ml. Jak si můžeme všimnout, prvotní koncentrace doxycyklinu nepůsobí na kožní buňky toxicky, tudíž by pro terapeutické podání pravděpodobně nebylo potřeba dané vzorky dále ředit. S dalším ředěním lipozomální formy doxycyklinu se dále zvyšuje životaschopnost kožních buněk.



Obr. 19: Životaschopnost keratinocytů ošetřených volnou a lipozomální formou doxycyklinu

Z porovnání hodnot životaschopnosti dvou typů lipozomálních forem léčiv s totožnou koncentrací enkapsulovaného doxycyklinu je patrné, že vyšší míra životaschopnosti keratinocytů je spojena s lipozomálním systémem z DPPC s přidavkem kyseliny fosfatidové a cholesterolu. Opět se zde projevuje pomalejší uvolňování doxycyklinu z lipozomů vlivem přítomnosti cholesterolu, který má tendenci stabilizovat fosfolipidovou dvojvrstvu a lépe tak zamezit úniku enkapsulovaného léčiva. Zdá se, že lipozomy tvořené pouze přidavkem

kyseliny fosfatidové s koncentrací doxycyklinu 0,016 mg/ml vykazují při této koncentraci maximální životaschopnost buněk, avšak s dalším ředěním viabilita buněk klesla. Tato velmi nízká koncentrace lipozomů pravděpodobně z důvodu snížené stability lipozomálního systému vedla k reorganizaci jejich struktury, což mělo negativní vliv na buňky, a to pravděpodobně i z důvodu rychlého uvolnění veškerého enkapsulovaného léčiva. Proto byly lipozomy s enkapsulovaným doxycyklinem toxicitější než jejich prázdné analogy. Negativní vliv nízké koncentrace lipozomů potvrzují i lipozomy prázdné. Naopak lipozomální systémy, v jejichž struktuře byl inkorporován také cholesterol, vykazují i při takto nízké koncentraci lipozomů v porovnání s volnou formou doxycyklinu o stejné koncentraci léčiva toxicitu nižší, a to v celém koncentračním rozmezí. Důvodem je vyšší stabilita tohoto lipozomálního systému vyvolaná právě inkorporovaným cholesterolem.

6 ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na studium lipozomálních systémů funkcionalizovaných cíleným léčivem vhodných pro inhalační aplikaci. Hlavní náplní diplomové práce bylo určení enkapsulační účinnosti doxycyklinu v závislosti na odlišném složení komponent fosfolipidové dvojvrstvy vybraných lipozomálních systémů a studium kinetiky uvolňování doxycyklinu z jejich struktury. V rámci potenciální aplikace zkonstruovaných lipozomů byl dále hodnocen antimikrobiální a cytotoxický účinek vyvíjených lipozomálních systémů. Jako mikroorganismus, který modeloval lokální plicní onemocnění, plicní pneumonii, byla na základě literární rešerše vybrána bakterie *Staphylococcus aureus* a jako antibiotikum doporučené pro léčbu této stafylokokové infekce byl zvolen doxycyklin. Z fyzikálně-chemických charakteristik připravených lipozomálních systémů se podařilo optimalizovat složení lipozomů tak, aby byly vhodné pro inhalační podávání léčiv a léčbu lokálních plicních onemocnění. Na základě předchozích experimentálních studií byla jako základní komponenta lipozomů zvolena sloučenina DPPC, jelikož je nejhojněji zastoupeným fosfolipidem nacházejícím se v surfaktantu plicních alveol. K této základní komponentě byl přidán cholesterol a záporně nabitá kyselina fosfatidová za účelem zajištění stability lipozomálního systému a zamezení úniku inkorporovaného či enkapsulovaného léčiva. Dále se podařilo vytvořit standardní operační postup pro enkapsulaci antibiotika do nosičových systémů a zvolit vhodnou koncentraci léčiva pro enkapsulaci, která měla dostatečnou antimikrobiální účinnost pro léčbu plicní infekce vyvolané bakterií *Staphylococcus aureus*. Fyziologické pH nacházející se uvnitř plic simuloval fosfátový pufr.

První optimalizovaný lipozomální systém vhodný pro inhalační podávání léčiv byl složen ze základní komponenty DPPC a přídavku 30 mol. % kyseliny fosfatidové. Enkapsulační účinnost lipozomů činila $(48,2 \pm 2,7)$ % z původního množství doxycyklinu o koncentraci 2 mg/ml, kterým byl při přípravě rehydratován fosfolipidový film. Tato relativně vysoká hodnota enkapsulační účinnosti odpovídá tomu, že doxycyklin má schopnost enkapsulovat se jak do vodného středu lipozomů, tak do fosfolipidové dvojvrstvy. Uvolňování doxycyklinu ze struktury bylo postupné, avšak během první hodiny dialýzy se uvolnilo přibližně 42 % původně enkapsulovaného doxycyklinu. Míra uvolňování klesala spolu s klesajícím množstvím enkapsulovaného doxycyklinu. Po šesti hodinách dialýzy zůstalo uvnitř lipozomů enkapsulováno $(4,3 \pm 0,8)$ %, což odpovídá režimu spíše krátkodobé aplikace.

Kombinace 10 mol. % cholesterolu a 30 mol. % kyseliny fosfatidové vedla k poklesu enkapsulační účinnosti oproti předchozímu lipozomálnímu systému. Enkapsulační účinnost činila $(20,8 \pm 1,3)$ % z množství doxycyklinu, který byl použit při přípravě lipozomů. Tato skutečnost je spojena s přítomností cholesterolu, jehož inkorporace do fosfolipidové dvojvrstvy lipozomů omezila prostor pro inkorporaci samotného antibiotika. Kinetické experimenty potvrdily velmi pomalé a postupné uvolňování doxycyklinu z jejich lipozomální struktury. V lipozomálním systému s přídavkem cholesterolu po šesti hodinách dialýzy zůstalo enkapsulováno $(2,4 \pm 1,5)$ % doxycyklinu z původně enkapsulovaného množství. Inkorporovaný cholesterol má tendenci stabilizovat fosfolipidovou membránu tím, že vyplňuje prostor mezi nedokonale sbalenými fosfolipidy, drží je lépe pohromadě a brání jejich pohybu. Díky tomu je schopen lépe zabránit uvolňování enkapsulovaného doxycyklinu.

Poslední optimalizovaný lipozomální systémem pro léčbu lokálních plicních onemocnění byl složen z DPPC a přídavku 30 mol. % kyseliny fosfatidové a 30 mol. % cholesterolu. U těchto lipozomálních systémů oproti lipozomům s přídavkem nižšího množství cholesterolu dochází k mírnému navýšení enkapsulační účinnosti na $(23,9 \pm 1,6) \%$ z množství doxycyklinu, kterým byl rehydratován fosfolipidový film. Navýšení enkapsulační účinnosti pravděpodobně souvisí s vyšším množstvím cholesterolu, jehož inkorporace zvýší stabilitu lipozomálního systému a lépe tak zabrání úniku enkapsulovaného léčiva. Po šesti hodinách dialýzy zůstalo v lipozomech enkapsulováno $(3,2 \pm 1,1) \%$ doxycyklinu z původně enkapsulovaného množství. Míra uvolňování doxycyklinu se mezi lipozomy s různým molárním množstvím cholesterolu nijak významně nelišila, proto byly lipozomy s přídavkem 30 mol. % cholesterolu z důvodu potenciální toxicity pro lidský organismus vyloučeny z antimikrobiálních a cytotoxických testů.

Antimikrobiální testy obou typů lipozomálních systémů s enkapsulovaným léčivem prokázaly výrazně vyšší míru inhibiční účinnosti vůči bakteriálnímu kmeni *Staphylococcus aureus* oproti volné formě antibiotika, která měla stejnou koncentraci. Velikost inhibiční zóny po vystavení bakteriální populace lipozomálnímu systému složenému z DPPC a přídavku 30 % kyseliny fosfatidové s enkapsulovaným doxycyklinem (koncentrace 1 mg/ml) činila $(15,1 \pm 0,2)$ mm. Velikost inhibiční zóny volného antibiotika s koncentrací odpovídající 1 mg/ml nabývala hodnoty $(14,0 \pm 0,6)$ mm. Můžeme zde pozorovat nárůst o 1,1 mm. V případě lipozomálního systému tvořeného z DPPC s přídavkem 30 % kyseliny fosfatidové a 10 mol. % cholesterolu, které mají uvnitř jejich struktury enkapsulovaný doxycyklin o koncentraci 0,5 mg/ml, velikost inhibiční zóny činila $(16,8 \pm 0,3)$ mm. Zóna čistého antibiotika byla menší o cca 3 mm, činila tedy $(13,8 \pm 0,4)$ mm. Důvodem zvýšené antimikrobiální aktivity lipozomálních forem doxycyklinu je možnost jejich pozvolného a postupného uvolňování léčiva. Výhoda lipozomální formy doxycyklinu dále tkví v tom, že jsou lipozomy schopny v určité míře fúzovat s cytoplazmatickou membránou bakterií a přenášet tak léčivo přímo do jejich cytoplazmy.

Z cytotoxických testů vyplývá, že obě připravené lipozomální formy léčiva jsou schopny ochránit životaschopnost zdravých lidských keratinocytů před toxicitou samotného antibiotika. Vyvinuté lipozomální systémy se vyznačují vysokými enkapsulačními účinnostmi doxycyklinu, jehož uvolnění je i přes jejich lipozomální formulaci pro buňky toxické. Koncentrace doxycyklinu, při které nejsou lipozomální systémy vyhodnoceny jako cytotoxické, byla stanovena na 0,25 mg/ml. Volná forma doxycyklinu byla stanovena jako netoxická při koncentraci 0,063 mg/ml.

Na základě všech uvedených výsledků lze konstatovat, že se podařilo připravit přímo dvě lipozomální formy léčiva doxycyklinu s odlišným složením komponent, které by byly z hlediska fyzikálně-chemických vlastností, enkapsulační účinnosti, kinetiky uvolňování léčiva a jejich antimikrobiálního účinku vhodné pro inhalační podávání léčiv i léčbu lokálních plicních onemocnění. Jako nejvhodnější byl vyhodnocen lipozomální systém tvořený z DPPC s přídavkem 30 % kyseliny fosfatidové a 10 mol. % cholesterolu. Důvodem je mnohem pomalejší a postupnější uvolňování doxycyklinu z lipozomální struktury, což velmi blíže souvisí s potenciálně lepším terapeutickým účinkem spojeným s vyšší mírou antimikrobiální aktivity, přestože je jejich enkapsulační účinnost poloviční oproti lipozomům tvořeným pouze

přídavkem kyseliny fosfatidové. Kombinace kyseliny fosfatidové a cholesterolu také lépe chrání životaschopnost keratinocytů, a to při stejné koncentraci enkapsulovaného léčiva, což se opět pojí s pomalejším a pozvolnějším uvolňováním doxycyklinu z lipozomů. Z hlediska fyzikálně-chemických vlastností mají vyvinuté lipozomální systémy vhodnou velikost i kinetickou stabilitu v oblasti fyziologického pH, což je další pozitivem potvrzujícím jejich aplikační potenciál.

Výstupem diplomové práce je návrh vhodného nosičového systému pro antibiotikum doxycyklin určené pro léčbu lokálního plicního onemocnění, plicní pneumonie, nicméně v práci nebyl řešen transport částic přímo do plic. Samotný transport ač už díky nebulizátorům nebo inhalátorům, by mohl ovlivnit složení navrženého lipozomálního systému. Právě do oblasti cíleného transportu lipozomálních částic do plic by mohl na tuto diplomovou práci navazovat další výzkum.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] NOVÁKOVÁ, Kateřina. Modelové biologické membrány: jejich charakterizace a využití. *Chemické listy* [online]. 2015, 109, 166-175 [cit. 2022-09-25]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2015_03_166-175.pdf
- [2] DUA, J. S., A.C. RANA, A. K. BHANDARI. Liposome: methods of preparation and application. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research* [online]. 2012, 3(2), 14-20 [cit. 2022-09-25]. ISSN: 20229-4619. Dostupné také z: <https://romanpub.com/resources/ijpsr%20v11-2020-6.pdf>
- [3] AKBARZADEH, A., R. REZAEI-SADABADY, S. DAVARAN, S. W. JOO, N. ZARGHEMI, Y. HANIFEHPOUR, K. NEJATI-KOSHKI. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2013, 8(1), 102 [cit. 2022-09-26]. DOI: 10.1186/1556-276x-8-102.
- [4] BOZZUTO, G., A. MOLINARI. Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2013, 8(1), 102 [cit. 2022-09-26]. DOI: 10.2147/IJN.S68861
- [5] ÇAĞDAŞ, Melis a kol. Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery. *Intech* [online]. 2014, 2014(6), 1-50 [cit. 2022-02-27]. DOI: 10.5772/58459.
- [6] MASHAGHI, Samaneh, Tayebeh JADIDI, Gijsje KOENDERINK, Alireza MASHAGHI. Lipid Nanotechnology. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. The Netherlands, 2013, 14(2), 4242-4282 [cit. 2022-09-27]. DOI: 10.3390/ijms14024242.
- [7] FANG J. Y., T. L. HWANG and Y. L. HUANG. Liposomes as vehicles for enhancing drug delivery via skin routes. *Current Nanoscience* [online]. 2006, 2(1), 55–70 [cit. 2022-09-27]. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/55230/article>
- [8] Benefits of liposomes as delivery system. *Liposoma nutraceuticals* [online]. 2022 [cit. 2023-03-08]. Dostupné také z: <https://liposomanutraceuticals.com/liposomes-as-delivery-system/>
- [9] KRAFT, J. C., J. P. FREELING, Z. WANG, R. J. Y. HO. Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2014, 103(1), 29-52 [cit. 2022-09-28]. DOI:10.1002/jps.23773
- [10] PANDEY, H., R. RANI, V. AGARWAL. Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. *Brazilian Archives of Biology and Technology* [online]. 2016, 59(0), 1-10 [cit. 2022-09-28]. DOI:10.1590/1678-4324-2016150477. ISSN 1678-4324.
- [11] CHEN, L., R. LIANG, Y. WANG. W. YOKOYAMA, M. CHEN. Characterizations in the Stability and Release Properties of beta-ionone Loaded Thermosensitive Liposomes (TSLs). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* [online]. 2018, 66(31), 8336-8345 [cit. 2023-03-08]. DOI: 10.1021/acs.jaafc.7b06130
- [12] KUROKI, Y., T. AKINO. Pulmonary surfactant protein A (SP-A) specifically binds dipalmitoylphosphatidylcholine. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 1991, 266(5), 3068-3073 [cit. 2022-09-28].
- [13] OHVO-REKILÄ, Henna, Bodil RAMSTEDT, Petra LEPPIMÄKI a J. Peter SLOTTE. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid*

- Research* [online]. 2002, 2001, 41(1), 66-97 [cit. 2022-09-28]. DOI: 10.1016/S0163-7827(01)00020-0. ISSN 0163-7827.
- [14] KODÍČEK, M., V. KARPENKO. *Biofyzikální chemie. 2. přepracované a rozšířené vydání*. Praha: Academia, 2000, 337 s. ISBN: 80-200-0791-1.
- [15] VOCETKOVÁ, K., A. MÍČKOVÁ a T. JAROŠÍKOVÁ. Liposomes—their characterization, preparation and embedding into nanofibers. *Lékař a technika* [online]. 5/2014, roč. 44, s. 11-18 [cit. 2022-09-28], DOI: 10.14311/CTJ.2014.2.%X. ISSN 0301-5491.
- [16] HADAŠOVÁ, Eva. Liposomální léčivé formy. *Remedia* [online]. 2006, 16(4), 433–437 [cit. 2022-09-28]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Lekoveformy/Lipozomalni-lekove-formy/6-H-gC.magarticle.aspx>
- [17] RIAZ, M. K., M. A. RIAZ, X. ZHANG, C. LIN et al. Surface Functionalization and Targeting Strategies of Liposomes in Solid Tumor Therapy: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, 19, 1-27 [cit. 2022-09-28]. DOI: 10.3390/ijms19010195
- [18] MARWA, M., A. S. A. LILA, T. SHIMIZU, et. Al. PEGylated liposomes: immunological responses. *Science and Technology of Advances Materials* [online]. 2019, 20(1), 710-724 [cit. 2022-09-28]. DOI:10.1080/14686996.2019.1627174
- [19] NOBLE, G. T., J. F. STEFANICK, J. D. ASHLEY. Ligand-targeted liposomes design: challenges and fundamental consideration. *Trends in Biotechnology* [online]. 2014, 32(1), 32-45 [cit. 2022-09-30]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.09.007
- [20] GÓMEZ-HENS, A., J. FERNÁNDEZ-ROMERO. Analytical methods for the control of liposomal delivery systems. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2/2006, roč. 25, s. 167–178 [cit. 2022-10-02], ISSN 0165-993. DOI: 10.1016/j.trac.2005.07.006.
- [21] LE, N. T. T., V. D. CAO, T. N. Q. NGUYEN, T. T. H. LE, T. T. TRAN, T. T. H. THI. Soy Lecithin-Derived Liposomal Delivery Systems: Surface Modification and Current Applications. *International Journal of Molecular Science* [online]. 2019, 1-27 [cit. 2023-03-09]. DOI: 10.3390/ijms20194706
- [22] PATIL, Y. P. a Sameer JADHAV. Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids* [online]. Indian Institute of Technology Bombay, Powai, Mumbai 400 076, India, 2014, 177, 8-18 [cit. 2022-10-02]. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2013.10.011.
- [23] PATTNI, B. S., V. V. CHUPIN, V.P. TORCHILIN. New developments in liposomal drug delivery. *Chemical Reviews* [online]. 2015; 115, 10938-10966 [cit. 2022-10-02]. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00046
- [24] MUNEER, S., Z. MASOOD, S. BUTT, S. ANJUM, H. ZAINAB, et al. Proliposomes as Pharmaceutical Drug Delivery System: A Brief Review. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology* [online]. 2017, 8(3), 1-5 [cit. 2022-10-02]. DOI: 10.4172/2157-7439.1000448. ISSN 2157-7439.
- [25] LAPINSKY, M. M., A. CASTRO-FORERO, A. J. GREINER, R. Y. OFOLI, G. J. BLANCHARD. Comparison of Liposomes Formed by Sonication and Extrusion: Rotational and Translational Diffusion of an Embedded Chromophore. *Langmuir* [online]. 2007, 23(23), 11677–11683 [cit. 2022-10-02]. DOI:10.1021/la7020963.

- [26] ONG, S., M. CHITNENI, K. LEE, L. MING, K. YUEN. Evaluation of Extrusion Technique for Nanosizing Liposomes. *Pharmaceutics* [online]. 2016, 8(4) [cit. 2022-10-02]. DOI:10.3390/pharmaceutics8040036.
- [27] VEMURI, S., C. RHODES. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutical Acta Helvetiae* [online]. 1995, 70(2), 95-111 [cit. 2022-10-04]. DOI:10.1016/0031-6865(95)00010-7
- [28] SAMAD, A., Y. SULTANA, M. AQIL. Liposomal Drug Delivery Systems: An Update Review. *Current Drug Delivery* [online]. 2007, 4(4), 297-305 [cit. 2020-10-04]. DOI:10.2174/156720107782151269
- [29] ŠEVČÍKOVÁ, Petra, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Jiří KREJČÍ, Pavlína VLTAVSKÁ. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické listy* [online]. 2017, 108, 479-482 [cit. 2022-10-04]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/common/content-issue_5-volume_108-year_2014.html
- [30] Optické vlastnosti koloidních soustav: (fyzikální princip metody měření velikosti částic a zeta potenciálu). *Krystalografická společnost* [online]. Praha, 2005. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/texty-ulohy-uvod.pdf>.
- [31] Particle size measurement using multiangle dynamic light scattering. 3P instruments [online]. 2019 [cit. 2023-03-11]. Dostupné také z: <https://www.3p-instruments.com/measurement-methods/dynamic-light-scattering/>
- [32] DANAEI, M., M. DEHGANKHOLD, S. ATAEI, F. HASANZADEH DAVARANI, R. JAVANMARD, A. DOKHANI, S. KHORASANI a M. MOZAFARI. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* [online]. 2018, 10(2) [cit. 2023-03-09]. DOI: 10.3390/pharmaceutics10020057
- [33] RAVAL, N., R. MAHESHWARI, D. KALYANE, S. R. YOUNGREN-ORTIZ, M. B. CHOUGULE, R. K. TEKADE. Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. *Basic Fundamentals of Drug Delivery* [online]. 2019, 369-400 [cit. 2023-03-09]. DOI: 10.1016/B978-0-12-817909-3.00010-8
- [34] Zeta potenciál a molekulová hmotnost. *ANAMET* [online]. 2020 [cit. 2022-10-04]. Dostupné také z: <https://www.anamet.cz/techniky/zeta-potencial-molekulova-hmotnost>
- [35] XU, By Renliang. *Particle characterization: light scattering methods*. Digital print. Dordrecht [u.a.]: Kluwer, 2001. ISBN 14-020-0357-9.
- [36] BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and they are not? *Journal of Controlled Release* [online]. 2016, 1-37 [cit. 2022-10-04]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017
- [37] Stabilita suspenzí a disperzí – Proč jsou parametry jako velikost částic, zeta potenciál a reologické vlastnosti tak důležité? *ANAMET* [online]. 2020 [cit. 2022-10-04]. Dostupné také z: https://www.anamet.cz/odborne_akce/stabilita-suzpenzi-disperzi-proc-jsou-parametry-jako-velikost-castic-zeta-potencial
- [38] DARAEE, H., A. ETEMADI, M. KOUHI, S. ALIMIRZALU, A. AKBARZADEH. Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* [online]. 2014, 44(1), 381–391 [cit. 2022-10-10]. DOI:10.3109/21691401.2014.953633.

- [39] TRETIAKOVA, D. S., E. L. VODOVOZOVA. Liposomes as Adjuvants and Vaccine Delivery Systems. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology* [online]. 2022, 16, 1-20 [cit. 2022-10-13]. DOI:10.1134/S1990747822020076
- [40] WANG, Y. Liposomes as a delivery system for the treatment of biofilm-mediated infection. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2021, 1-14 [cit. 2022-10-10]. DOI:10.1111/jam.15053
- [41] PŘIBYLOVÁ, Marie, Marcela DVOŘÁKOVÁ a Tomáš VANĚK. Deriváty paklitaxelu pro cílený transport cytostatik. *Chemické listy*. 2010, roč. 104, 1023-1028
- [42] SVOBODA, Jan, Kamila SYSLOVÁ a Petr KAČER. Cílený transport platinových cytostatik. *Chemické listy*. 2016, roč. 110, č. 12, 909-916.
- [43] Enhanced permeability and retention effect. *Wikipedia* [online]. 2019 [cit. 2022-10-10]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Enhanced_permeability_and_retention_effect
- [44] DRAŠAR, Lukáš, Miroslav LEDVINA. Genová terapie: Kationové lipidy pro konstrukci nevirálních vektorů nukleových kyselin. *Chemické listy*. 2012, roč. 106, 646-652.
- [45] PIACENTINI, E. Encapsulation Efficiency. *Encyclopedia of Membranes* [online]. 2016, 706–707 [cit. 2020-03-31]. DOI:10.1007/978-3-662-44324-8_1945.
- [46] BAJEROVÁ, M., K. DVOŘÁČKOVÁ, J. GAJDZIOK, R. MASTEIKOVÁ. Mikročástice na bázi oxycelulosity – vliv procesních proměnných na enkapsulační účinnost. *Čes. slov. Farm.* [online]., 2010; 2(59), 67-73 [cit. 2023-03-09]. Dostupné z: <https://www.prolekarniky.cz/casopisy/ceskaslovenska-farmacie/2010-2-6/mikrocastice-na-bazi-oxycelulosity-vliv-procesnich-promennychna-enkapsulacni-ucinnost-32521>
- [47] KULKARNI, S. B., G. V. BETAGERI, M. SINGH. Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes. *Journal of Microencapsulation* [online]. 1995, 12(3), 229–246 [cit. 2020-03-31]. DOI:10.3109/02652049509010292.
- [48] TULKENS, J., L. LIPPENS, G. VERGAUWEN. Extracellular vesicles to diagnose and treat cancer. *BJMO* [online]. 2017, 11(3), 92-105 [cit. 2020-05-11]. Dostupné také z: <file:///C:/Users/42060/Downloads/BJMOreview.pdf>
- [49] ALLENI, T.M. and P.R. CULLIS. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2013, 65, 36-48 [cit. 2020-04-15]. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.037.
- [50] LEWINSKI, N., V. COLVIN, R. DREZEK. Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small* [online]. 2008, 4(1), 26-49 [cit. 2023-03-30]. DOI:10.1002/sml.200700595
- [51] FOTAKIS, G., J. A. TIMBRELL, R. DREZEK. In vitro cytotoxicity assay: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letter* [online]. 2006, 160(2), 171-177 [cit. 2023-03-30]. DOI:10.1016/j.toxlet.2005.07.001
- [52] PILCER, G., K. AMIGHI. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2010, 392(1-2), 1–19 [cit. 2022-10-13]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.03.017.
- [53] KAŠÁK, Viktor. Nové inhalační systémy užívané v léčbě chronických nemocí dýchacího ústrojí s obstrukcí dýchacích cest. *Remedia* [online]. 2007, 17, 26-38 [cit.

- 2022-10-13]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-formy/Nove-inhalacni-systemy-uzivane-v-lecbe-chronicky-nemoci-dychacih-ustroji-s-obstrukci-dychacih-cest/6-H-hf.magarticle.aspx>
- [54] FAHY, J., B. DICKEY. Airway mucus function and dysfunction. *The New England journal of medicine* [online]. 2010, 363(23), 2233-2247 [cit. 2022-10-13]. DOI: 10.1186/s13036-018-0108-5
- [55] NETSOMBOON, K., A. BERKOP. Mucoadhesive vs. Mucopenetrating particulate drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2016, 98, 76-89 [cit. 2022-10-16]. DOI: 10.1016/J.EJPB.2015.11.003
- [56] Phase Transition Temperatures for Glycerophospholipids. *Avanti, Polar lipids, Inc.*[online]. Alabama, 2016 [cit. 2022-10-16]. Dostupné z: <https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/phase-transition-temps/>
- [57] MURGIA, X., B. LORETZ, O. HARWIG. The role of mucus on drug transport and its potential to affect therapeutic outcomes. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2018, 12(4), 82-97 [cit. 2022-10-16]. DOI: 10.1016/J.ADDR.2016.10.009
- [58] Akutní zánět průdušek (akutní bronchitida). *Národní zdravotnický informační portál* [online]. Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR a Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2022 [cit. 2022-10-16]. ISSN: 2695-0340. Dostupné také z: <https://www.nzip.cz/clanek/1113-akutni-zanet-prudusek-akutni-bronchitida>
- [59] Chronický zánět průdušek (chronická bronchitida). *Národní zdravotnický informační portál* [online]. Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR a Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2022 [cit. 2022-10-16]. ISSN: 2695-0340. Dostupné také z: <https://www.nzip.cz/clanek/1114-chronicky-zanet-prudusek-chronicka-bronchitida>
- [60] CHOPN: co to je? *Národní zdravotnický informační portál* [online]. Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR a Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2022 [cit. 2022-10-16]. ISSN: 2695-0340. Dostupné také z: <https://www.nzip.cz/clanek/1102-chopn-co-to-je>
- [61] Rozedma plic (plicní emfyzém). *Národní zdravotnický informační portál* [online]. Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR a Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2022 [cit. 2022-10-16]. ISSN: 2695-0340. Dostupné také z: <https://www.nzip.cz/clanek/1124-rozedma-plic-plicni-emfyzem>
- [62] Co je cystická fibróza. Klub cystické fibrózy [online]. 2020 [cit. 2022-10-16]. Dostupné také z: <https://klubcf.cz/o-cysticke-fibroze/o-nemoci/co-je-cysticka-fibroza/>
- [63] KONDURI, K. S., S. NANDEDKAR, D. A. RICKABY et al. The Use of Sterically Stabilized liposomes to Treatment Asthma. *Liposomes* [online]. 2005, 413-427 [cit. 2022-10-16]. DOI: 10.1016/s0076-6879(05)91023-9
- [64] What Is Pneumonia? *National Institutes of Health* [online]. 2022 [cit. 2023-03-27]. Dostupné také z: <https://www.nhlbi.nih.gov/health/pneumonia>
- [65] Pneumonie. *WikiSkripta* [online]. 2022 [cit. 2022-10-16]. Dostupné také z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Pneumonie>
- [66] Zápal plic. *Vitalion* [online]. 2012 [cit. 2022-10-16]. Dostupné také z: <https://nemoci.vitalion.cz/zapal-plic/>

- [67] RNDR. SEDLÁČEK, I. *Taxonomie Prokaryot*. 1. vyd. Brno: Typo Art Přes, 2007. ISBN 80-210-4207-9.
- [68] DOBIÁŠ, L. a kolektiv. *Obecná a speciální mikrobiologie*. 1. vad. Ostrava: Multex Soft, 2003, 218 s.
- [69] JELÉNEK, J., V. ZICHÁČEK. *Biologie pro gymnázia*. 3. dopl a opr. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 1998, 19-20. ISBN: 80-7182-070-9.
- [70] HRSTKA, M. *Obecná biologie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně. 2007, s. 29-31. ISBN: 978-80-214-3646-6.
- [71] ROSYPAL, S. *Bakteriologie a virologie*. 1. vyd. Praha: Scientia, 1994, s. 67, ISBN: 80-85827-16-6.
- [72] BEDNÁŘ, M., A. SOUČEK, V. FRAŇKOVÁ. *Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Triton, 1996, ISBN: 80-238-0297-6
- [73] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN: 80-902-8966-5
- [74] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie – vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010. ISBN: 978-808-6850-048
- [75] Lasting Effect. *Harvard Medical School* [online]. 2018 [cit. 2023-03-27]. Dostupné také z: <https://hms.harvard.edu/news/lasting-effects>
- [76] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, 2005. ISBN: 80-86850-00-5.
- [77] SIMON, C., W. STILLE. *Antibiotika v současné lékařské praxi*. Havlíčkův Brod: Grada Publishing. ISBN: 80-7169-268-9.
- [78] RAMACHANDERAN, R., B. SCHAEFER. Tetracycline antibiotics. ChemTexts [online]. 2021, 17(3), 1-42 [cit. 2023-02-20]. DOI: 10.1007/s40828-021-00138-x
- [79] Doxycyklin. *WikiSkripta* [online]. 2021 [cit. 2023-03-27]. Dostupné také z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Doxycyklin>
- [80] HYNIE, S. *Speciální farmakologie: Protiinfekční léčba*. 2. přeprac. vyd. Praha: Karolinum, 2003. 239 s. ISBN 80-246-0657-7.
- [81] KVĚTINA, J., HERINK, J., VOPRŠALOVÁ, M. *Farmakologie pro farmaceuty, 1. díl: Obecná farmakologie*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická universita Brno, 2003. 109 s. ISBN 80-7305-457-4.
- [82] SIMON C., STILLE W. *Antibiotika v současné lékařské praxi*. 1. vyd, Praha: Grada Publishing, 1998. 712 stran, ISBN 80-7169-268-9
- [83] WEXLER P.: *Encyclopedia of toxicology*. Volume 3, 2. vyd, Oxford: Elsevier, 2005. 748 stran. ISBN 0-12-745355-5.
- [84] HARTL, J., DOLEŽAL, M., MILETÍN, M., OPLETALOVÁ, V., ZIMČÍK, P. *Farmaceutická chemie IV*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006. 166s. ISBN 80-246-1169-4.
- [85] Doxycyclin. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. 2012 [cit. 2023-03-07]. Dostupné také z: <https://www.sukl.cz/download/spc/SPC27391.pdf>
- [86] NĚMCOVÁ, I., P. RYCHLOVSKÝ, L. ČERMÁKOVÁ. *Spektrometrické analytické metody*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0776-X.

- [87] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8.
- [88] PERKAMPUS, H. H. *UV-VIS spectroscopy and its applications*. Berlin: Springer, 1992. Springer laboratory. ISBN 978-3-642-77479-9.
- [89] SOMMER, L. *Základy analytické chemie*. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0.
- [90] BRAGA, M. S., O. GOMES, R. F. V. V. JAIMES, E. BRAGA. Multispectral colorimetric portable system for detection metal ions in liquid media.). *INSCIT* [online]. 2019 [cit. 2023-03-27]. DOI:10.1109/inscit.2019.8868861
- [91] GOLDMAN, O., A. CERN, M. MUESKEN, M. ROHDE, W. WEISS, Y. BARENHOLZ, E. MEDINA. Liposomal mupirocinu holds promise for systematic treatment of invasive Staphylococcus aureus infection. *Journal of Controlled Release* [online]. 2019, 292-301 [cit. 2023-04-01]. DOI:10.1016/j.jconrel.2019.11.007
- [92] HUANG, CH.-M., CH.-H. CHEN, L. ZHANG. Eradication of Drug Resistant Staphylococcus aureus by Liposomal Oleic Acids. *Biomaterials* [online]. 2011, 32(1), 214-221 [cit. 2023-04-01]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.076
- [93] PUMERANTZ, A., K. MUPPIDI, S. AGNIHOTRI, C. GUERRA, V. VENKETARAMEN, J. WNAG, G. BETAGERI. Preparation of liposomal vancomycin and intracellular killing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. 2011, 37(2), 140-144 [cit. 2023-04-01]. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2010.10.011
- [94] LI, Y., T. SU, Y. ZHANG, X. HUANG, J. LI, CH. LI. Liposomal co-delivery of daptomycin and clarithromycin at an optimized ratio for treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. *Drug delivery* [online]. 2015, 22(5), 627-637 [cit. 2023-04-01]. DOI: 10.3109/10717544.2014.880756
- [95] FRANKLIN, R. K., S. A. MARCUS, A. M. TALLAT, B. K. KUKANICH, R. SULLIVAN, L. A. KRUGNER-HIGBY, T. D. HEATH. A Novel Loading Method for Doxycycline Liposomes for Intracellular Drug Delivery: Characterization of In Vitro and In Vivo Release Kinetics and Efficacy in a J774A.1 Cell Line Model of Mycobacterium smegmatis Infection. *Drug Metabolism and Disposition* [online]. 2015, 45(8), 1236-1245 [cit. 2023-04-01]. DOI: 10.1124/dmd.115.063602
- [96] METSEMAKERS, W.-J., N. EMANUEL, O. COHEN, M. REICHARD, I. POTAPOVA, T. CHMID. D. SEGAL. A doxycycline-loaded polymer-lipid encapsulation matrix coating for the prevention of implant-related osteomyelitis due to doxycycline-resistant methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Journal of Control Release* [online]. 2015, 47-56 [cit. 2023-04-01]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.04.022
- [97] MISRA, R., S. ACHARYA, F. DILNAWAZ, S. K. SAHOO. Sustained antibacterial activity of doxycycline-loaded poly(D, L-lactide-co-glycolide) and poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles. *Nanomedicine* [online]. 2009, 519-530 [cit. 2023-04-01]. DOI: 10.2217/nm.09.28
- [98] PEDRANI, F., V. S. NAZATO, M. A. HAUSEN, D. KOMATSU, S. S. PEÑA, A. L. M. ALMEIDA, F. J. C. PIROLA, M. P. FRANCOSE. E. A.R. DUAK. In Vitro Cell Behavior and Antibiotic Activity under Sustained Release of Doxycycline-Loaded

- Poly(lactic-co-glycolic acid) Microspheres. *Antibiotics* [online]. 2022, 11(7), 945-958 [cit. 2023-04-03]. DOI: 10.3390/antibiotics11070945
- [99] COVER, N. F., S. LAI-YUEN, A. K. PARSONS, A. KUMAR. Synergetic effects of doxycykline-loaded Chitosan nanoparticles for improving drug delivery and efficacy. *Journal of Nanomedicine* [online]. 2012, 2411-2419 [cit. 2023-04-04]. DOI: 10.2147/ijn.s27328
- [100] HOSSEINI, S. M., R. ABBASALIPOURKABIR, S. S. ASL, A. FARMANY, A. MOURIAN, M. R. ARABESTANI. Doxycycline-encapsulated solid lipid nanoparticles for the enhances antibacterial potential to treta the chronic brucellosis and preventing its repalce: in vivo study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* [online]. 2019, 8(1), 1-12 [cit. 2023-04-04]. DOI: 10.1186/s13756-019-0504-8
- [101] HOSSEINI, S. M., A. FARMANY, R. ABBASALIPOURKABIR, F. A. JULILIN, S. S. ASL, G. ROSHERAEI, M. R. ARABESTANI. Doxycycline-encapsulated solid lipid nanoparticles as promising tool against *Brucella melitensis* enclosed in macrophage: a pharmacodynamics study on J774A.1 cell line. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* [online]. 2019, 18(1), 1-10 [cit. 2023-04-04]. DOI: 10.1186/s12941-019-0333-x
- [102] LI, M., T. ZHANG, L. ZHU, R. WANG, Y. JIN. Liposomal andrographolide dry powder inhalers for tretment of bacterila penuonia via anti-inflammatory pathway. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2017, 528, 163-171 [cit. 2023-04-04]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.06.005
- [103] PATIL, J. S., V. K. DEVI, K. DEVI, S. SARASIJA. A novel approach for lung deliver of rifampicin-loaded liposomes in dry powder from for the treatment of tuberculosis. [online]. 2015, 32(4), 331-338 [cit. 2023-04-04]. DOI: 10.4103/0970-2113.159559
- [104] SZABOVÁ, J. *Příprava a charakterizace komplexních liposomálních systémů pro distribuci léčiv*. Brno, 2019. [cit. 2023-04-21] Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zavprace/detail/113578>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec
- [105] SZABOVÁ, J., O. MIŠÍK, M. HAVLÍKOVÁ, F. LÍZAL, F. MRAVEC. Influence of liposomes composition on their stability during nebulization process by vibrazing mesh nebulizer. *Coloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2021, 204, 1-7 [cit. 2021-07-13]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2021.111793
- [106] SZABOVÁ, J., O. MIŠÍK, J. FUČÍK, K. MRÁZOVÁ, L. MRAVCOVÁ, J. ELCNER, F. LÍZAL, F. KRZYŽÁNEK, F. MRAVEC. Liposomal formo f erlotinib for local inhalation administration and efficiency of its transport to the lungs. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2023, 634 [cit. 2023-04-25]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2023.122695
- [107] RAMESH, P. J., B. KANAKAPURA, M. R. DIVYA, N. RAJENDRASAD. Simple UV and Visible Spectrophotometric Method for the Determination of Doxycycline Hyclate in Pharmaceuticals. *Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2011, 66(5), 482-489 [cit. 2023-04-30]. DOI: 10.1134/S1061934811050157

- [108] AHMAD, I., A. K. SARKAR, B. K. BACHHAWAT. Effect of cholesterol in various liposomal compositions on the in vivo toxicity, therapeutic efficacy, and tissue distribution of amphotericin B. *Biotechnol. Appl. Biochem.* online]. 1990, 12(5), 550-556 [cit. 2023-04-30]. DOI: 10.1111/j.1470-8744.1990.tb00128.x
- [109] ABDALRAHMAN, L. S., A. STANLEY, M. FAKHR. Isolation, Virulence, and Antimicrobial Resisitance of Methicillin-Resisitant Staphylococcus aureus (MRSA) and Methicillin-Sensitive Styphylococcus aureus (MSSA) Strain from Oklahoma Retail Poultry Meats. *International Journal of Enviromental Research and Public Health* [online]. 2015, 12, 6148-6161 [cit. 2023-04-25]. DOI: 10.3390/ijerph120606148

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

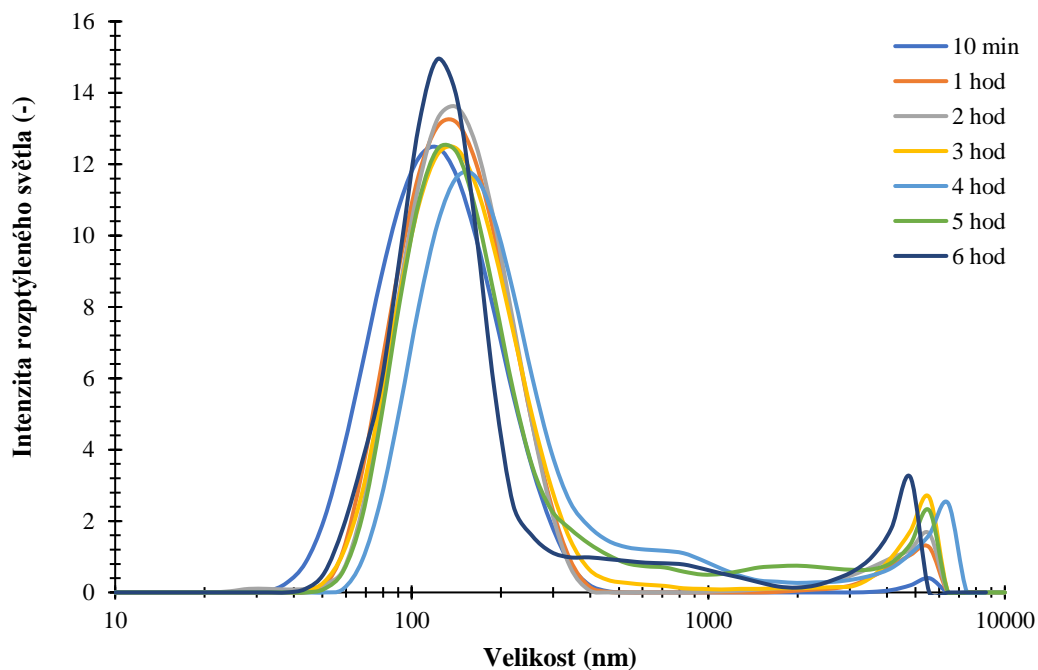
8.1 Seznam zkratek

DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfocholin
DOX	doxycyklin (hydrochlorid)
pH	vodíkový exponent
CPP	kritický sbalovací parametr
T _m	teplota mezifázového přechodu
SUV	malá unilamelární vezikula
LUV	velká unilamelární vezikula
MLV	velká multilamelární vezikula
MVV	multivezikulární vezikula
PDI	index polydisperzity
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
EMA	Evropská agentura pro léčiva
EPR	zvýšená propustnost a retence
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
CHOPN	chronická obstrukční nemoc plic
PA	kyselina fosfatidová
PEG ₅₀₀ -PE	polyethyleglykol o Mr 5000 navázaný na PE
PE	fosfatidylethanolamin
AIDS	syndrom získaného selhání imunity
30S	sedimentační koeficient 30
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
mRNA	messengerová ribonukleová kyselina
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
EE	enkapsulační účinnost
CCD	multikanálový fotodetektor
HPLC	vysokoúčinná kapalná chromatografie
DSPE-PEG	1,2-distearoyl-sn-glycero-fosfoethanolamin-N-[amino(polyethylenglykol)]
DSPC	1,2-distearoylfosfatidylcholin
HSPC	hydrolyzovaný sójový fosfatidylcholin (lecitin)
PC	fosfatidylcholin
PBS	fosfátový pufr
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
VRSA	vancomycin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
UV-VIS	oblast ultrafialového a viditelného světla
HaCaT	human keratinocytes cell line (lidské keratinocyty)
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
FBS	fetální bovinní sérum
CO ₂	oxid uhličitý

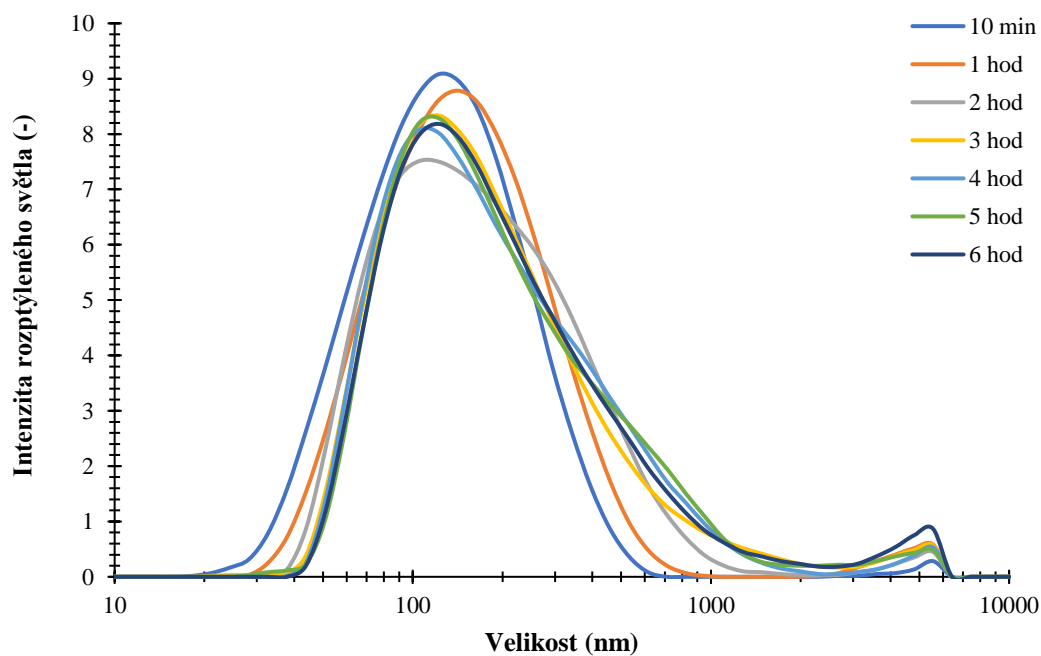
8.2 Seznam symbolů

$d(H)$	hydrodynamický průměr částic
D	translační difuzní koeficient
k_b	Boltzmannova konstanta
T	termodynamická teplota
μ	viskozita disperzního prostředí
η	elektrokinetický potenciál
ε	permitivita prostředí
ξ	zeta potenciál
F	funkce související s polaritou rozpouštědla
A	absorbance
T	transmitance
I	dopadající zářivý tok
I_0	prošlý zářivý tok
C_E	koncentrace HPTS po enkapsulaci
C_R	koncentrace HPTS při rehydrataci fosfolipidového filmu
EE	enkapsulační účinnost

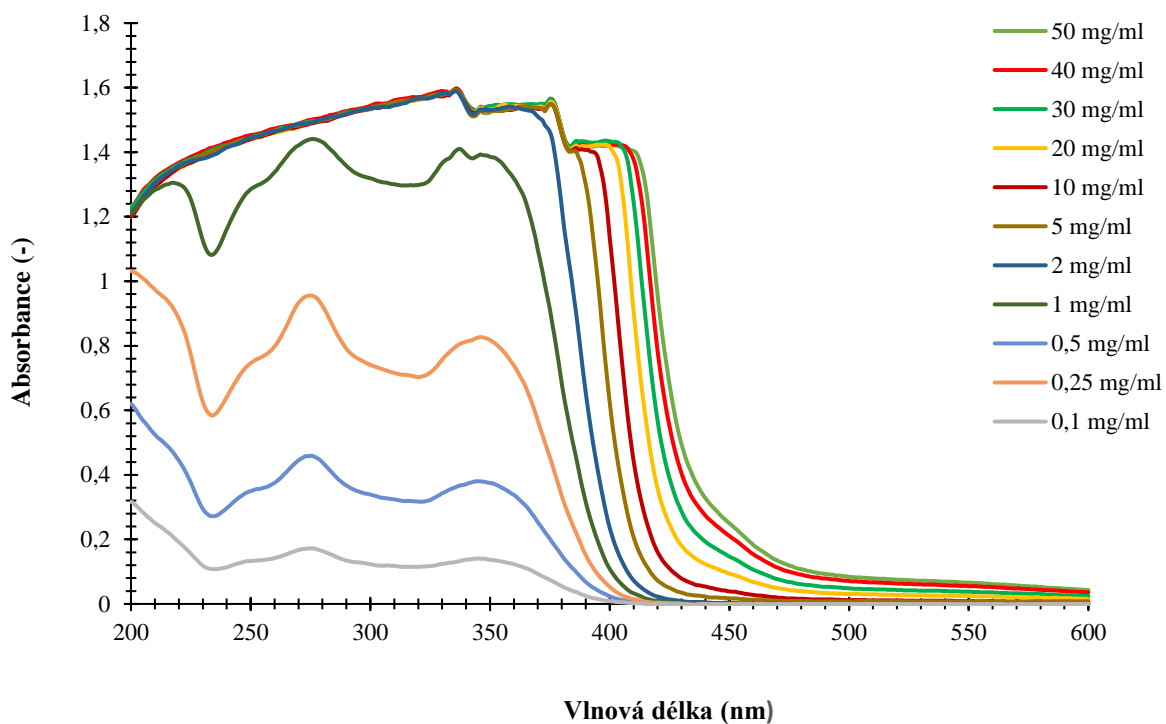
9 PŘÍLOHY



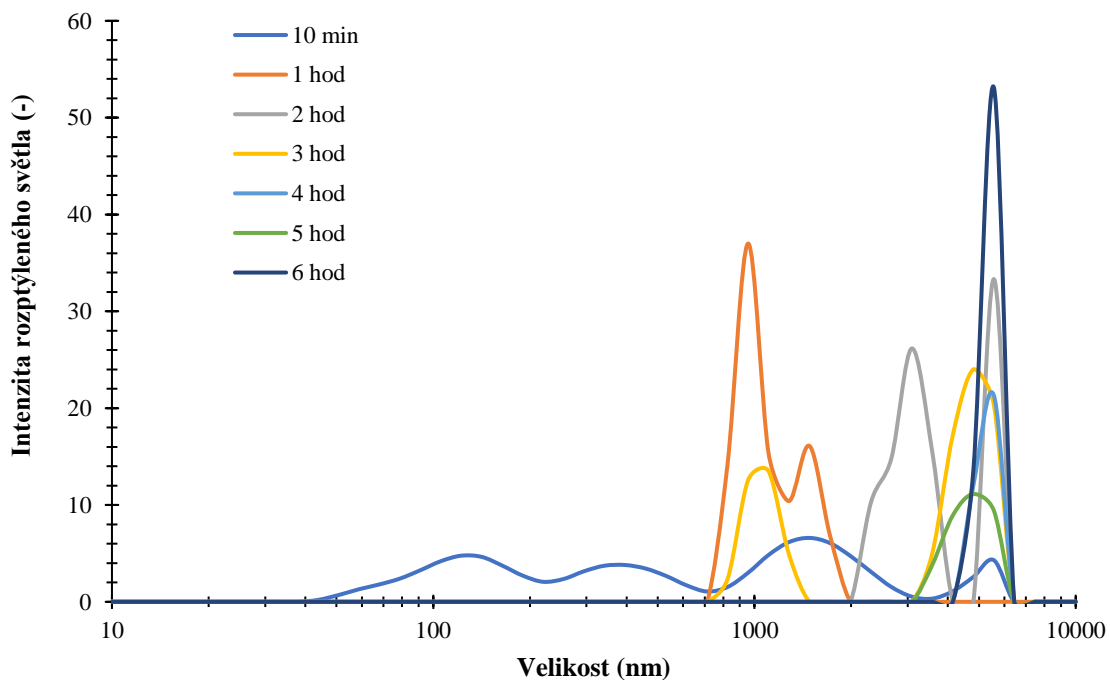
Obr. 20: Distribuce velikosti lipozomů (DPPC + 30 mol. % PA + 30 mol. % cholesterolu) s enkapsulovaným doxycyklinem o koncentraci 2 mg/ml v čase



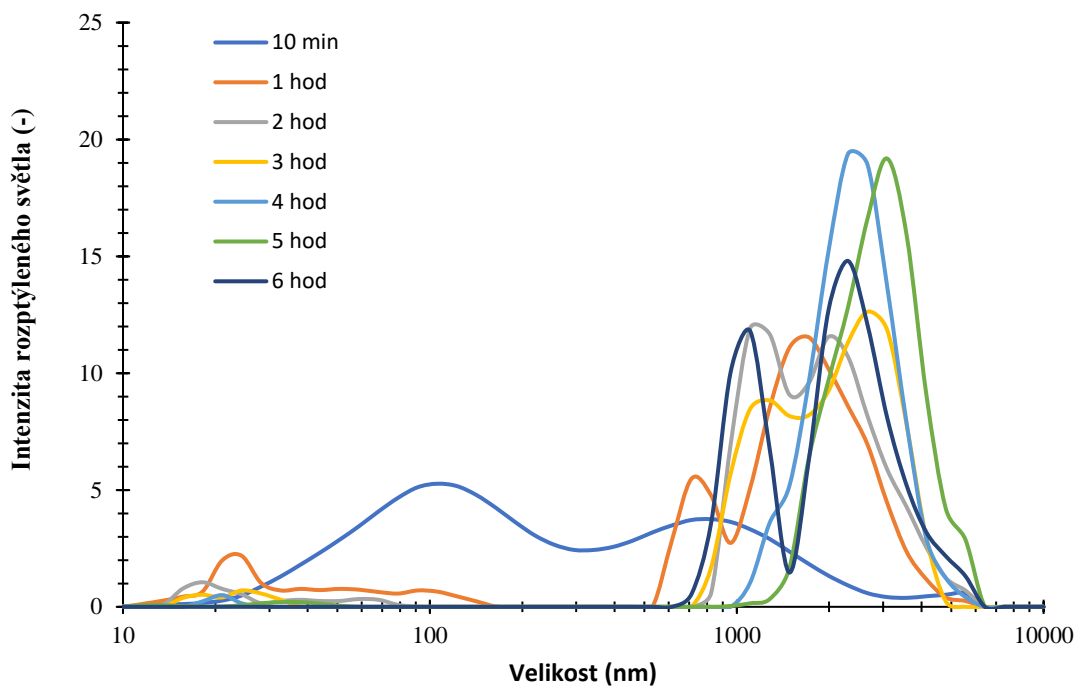
Obr. 21: Distribuce velikosti lipozomů (DPPC + 30 mol. % PA + 10 mol. % cholesterolu) s enkapsulovaným doxycyklinem o koncentraci 2 mg/ml v čase



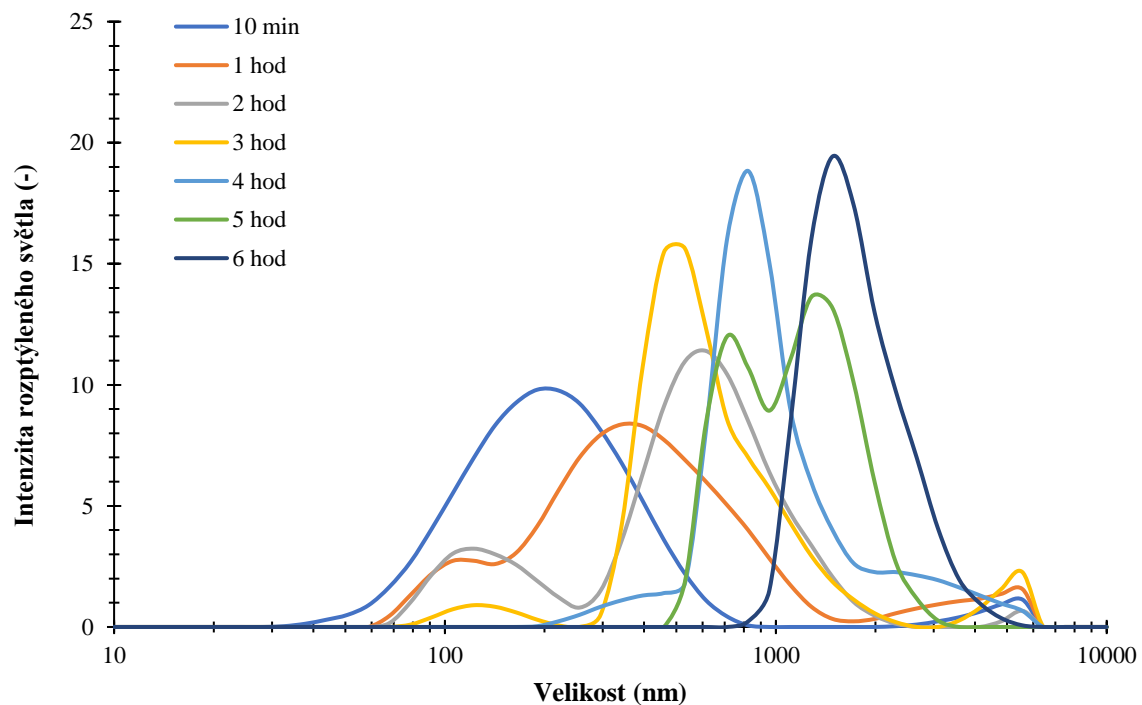
Obr. 22: Absorpční spektra doxycyklinu při různých koncentracích



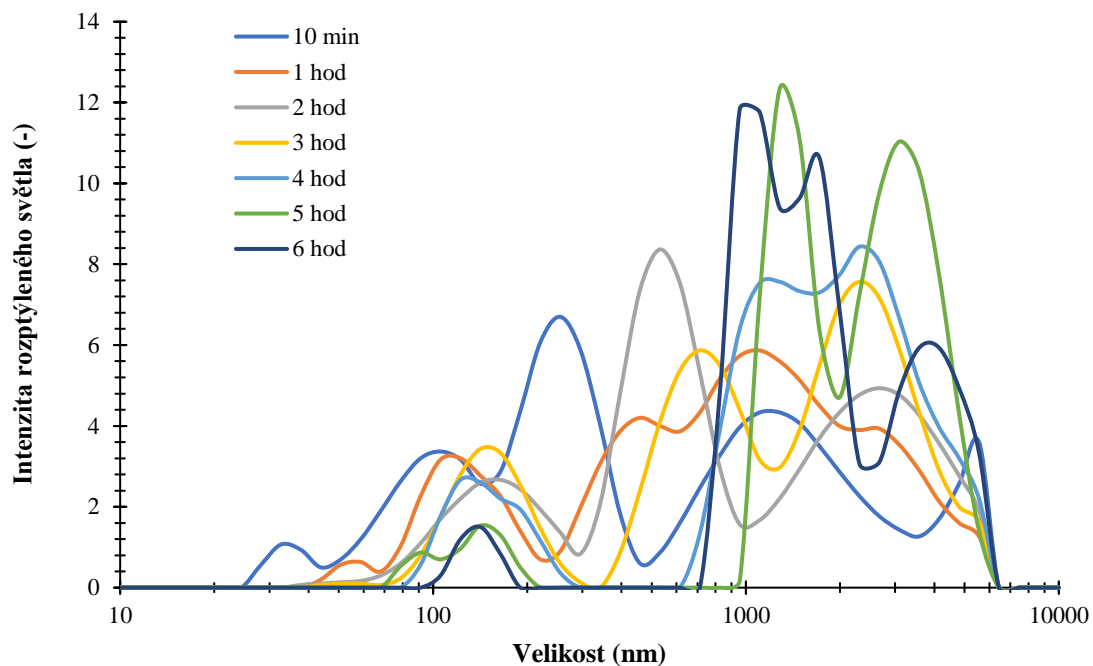
Obr. 23: Distribuce velikosti lipozomů (DPPC + 30 mol. % PA) s enkapsulovaným doxycyklinem o koncentraci 5 mg/ml v čase



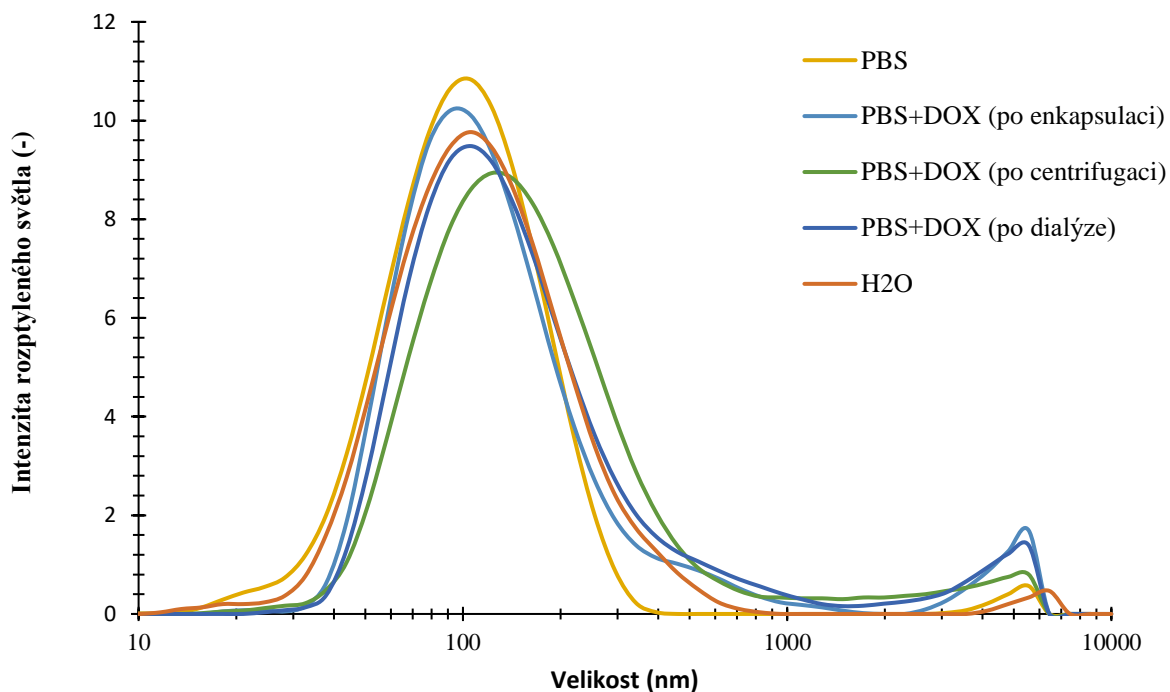
Obr. 24: Distribuce velikosti lipozomů (DPPC + 30 mol. % PA) s enkapsulovaným doxycyklinem o koncentraci 10 mg/ml v čase



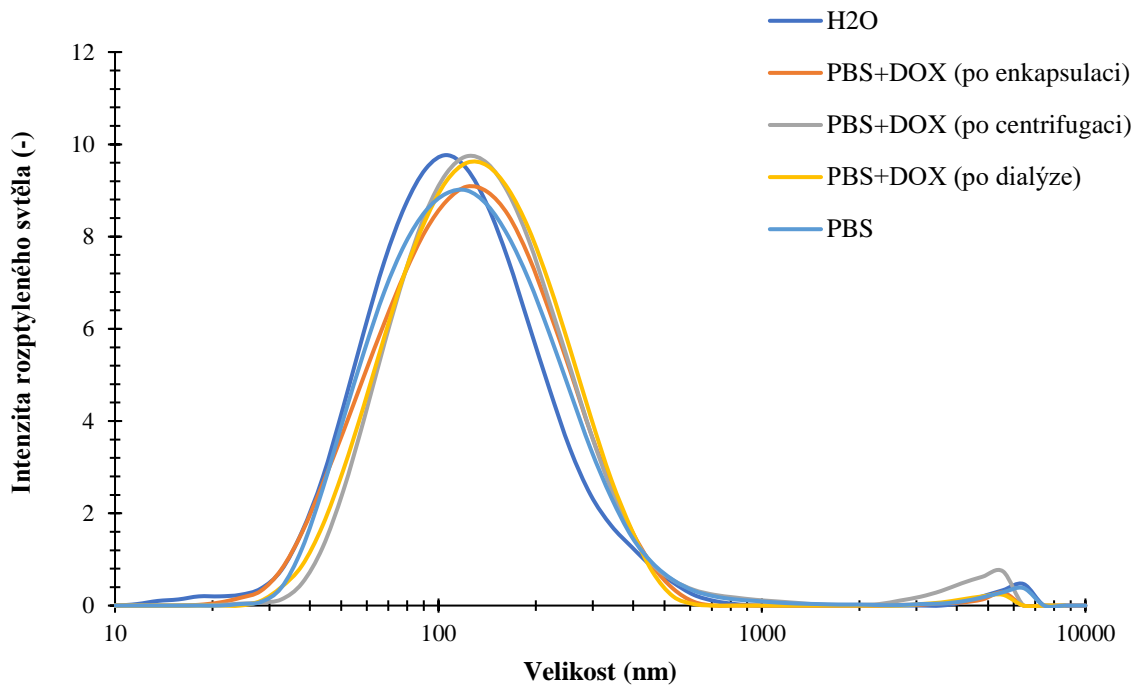
Obr. 25: Distribuce velikosti lipozomů (DPPC + 30 mol. % PA + 30 mol. % cholesterolu) s enkapsulovaným doxycyklinem o koncentraci 5 mg/ml v čase



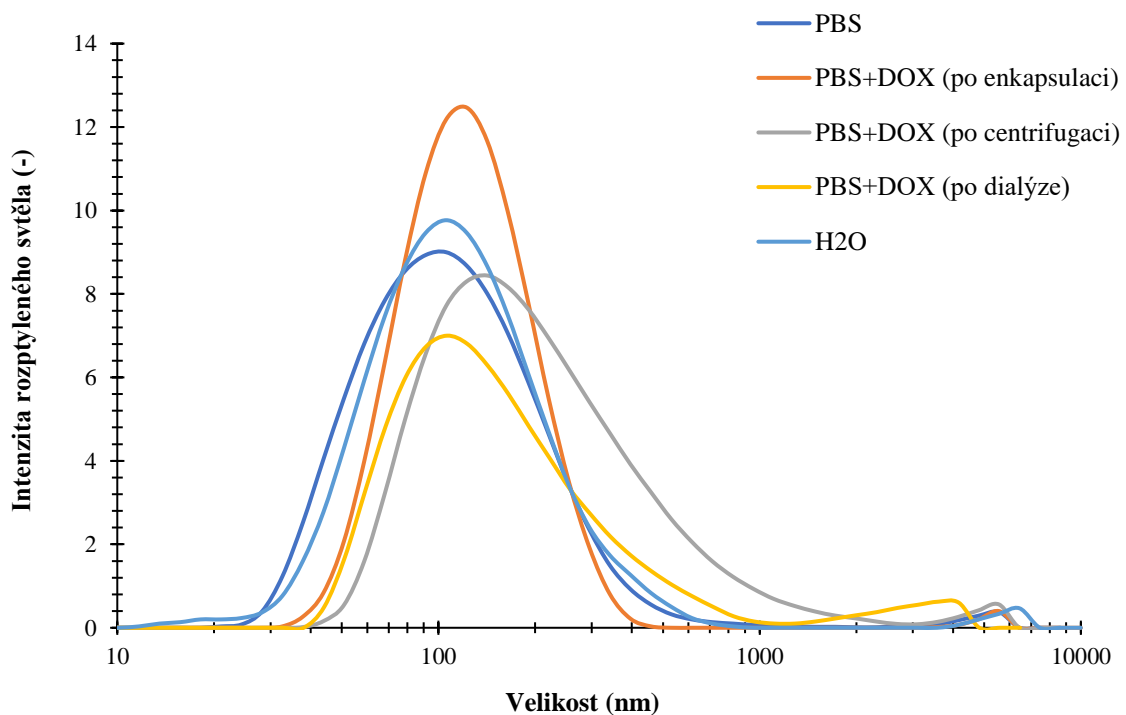
Obr. 26: Distribuce velikosti lipozomů (DPPC + 30 mol. % PA + 30 mol. % cholesterolu) s enkapsulovaným doxycyklinem o koncentraci 10 mg/ml v čase



Obr. 27: Distribuce velikosti lipozomů z DPPC s přidavkem 30 mol. % PA



Obr. 28: Distribuce velikosti lipozomů z DPPC s přidavkem 30 mol. % PA a 10 mol. % cholesterolu



Obr. 29: Distribuce velikosti lipozomů z DPPC s přidavkem 30 mol. % PA a 30 mol. % cholesterolu