



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

INKORPORACE NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH A VYSOKOMOLEKULÁRNÍCH LÁTEK DO VEZIKULÁRNÍCH SYSTÉMŮ

INCORPORATION OF LOW MOLECULAR WEIGHT AND HIGH MOLECULAR WEIGHT SUBSTANCES INTO
VESICULAR SYSTEMS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Karolína Geistová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1496/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Karolína Geistová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Inkorporace nízkomolekulárních a vysokomolekulárních látek do vezikulárních systémů

Zadání diplomové práce:

- 1) Rešerše zaměřená na způsob inkorporace nízko a vysokomolekulárních látek do liposomálních systémů
- 2) Na základě rešerše zvolit vhodné látky a prověřit možnost jejich inkorporace do modelových liposomálních systémů s příslušnými metodami studia.
- 3) Zhodnotit získané výsledky z hlediska použitelnosti systému pro farmaceutické účely.

Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

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

Bc. Karolína Geistová
student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá studiem inkorporace nízko a vysokomolekulárních látek do liposomálních systémů. Cílem práce bylo stanovit enkapsulační účinnost (EE) vybraných látek a vliv jednotlivých komponent liposomálního systému na EE. Liposomy byly připraveny z dipalmitoylfosfatidylcholinu, stabilizovány byly přidavkem cholesterolu a přidavkem kyseliny fosfatidové získaly záporný náboj. Stealth vlastnosti získaly navázáním polyethylenglykolu a přidavkem trimethylchitosanu byl umožněn vstup liposomů do krevního řečiště paracelulární cestou. K inkorporaci do liposomů byl použit vitamín C a enzym bromelain. Ke zjištění enkapsulační účinnosti liposomů připravených kombinací jednotlivých složek byla použita metoda UV-VIS spektrofotometrie. Bylo zjištěno, že vitamín C a enzym lze inkorporovat do liposomů, kdy enzym vykazuje vyšší EE. Dále bylo zjištěno, že největší vliv na EE má kyselina fosfatidová a trimethylchitosan, který zvyšuje EE vitamínu C a naopak snižuje EE enzymu.

ABSTRACT

This master's thesis deals with the study of the incorporation of low and high molecular weight substances into liposomal systems. The aim of the work was to determine the encapsulation efficiency (EE) of the active substance and the influence of individual components of the liposomal system on EE. Liposomes were prepared from dipalmitoylphosphatidylcholine. They were stabilized by cholesterol and phosphatidic acid was added to give a negative charge. Stealth properties gain the binding of polyethylene glycol and other trimethyl chitosan we enabled the entry of liposomes into the bloodstream by the paracellular pathway. Vitamin C and the enzyme bromelain were used for incorporation into liposomes. UV-VIS spectrophotometry was used to determine the encapsulation efficiency of liposomes prepared by combining the individual components. It has been suggested that vitamin C and the enzyme can be incorporated into liposomes, but an enzyme with a higher EE. Furthermore, phosphatidic acid and trimethyl chitosan have been found to affect EE, which increases the EE of vitamin C and decreases the EE of the enzyme.

KLÍČOVÁ SLOVA

Enkapsulační účinnost, liposomy, trimethylchitosan, vitamín C, bromelain, UV-VIS spektrofotometrie

KEYWORDS

Encapsulation efficiency, liposomes, trimethyl chitosan, vitamin C, bromelain, UV-VIS spectrophotometry

GEISTOVÁ, Karolína. *Inkorporace nízkomolekulárních a vysokomolekulárních látek do vezikulárních systémů*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131422>. 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 bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Filipu Mravcovi PhD. za odborné vedení, cenné rady, věcné připomínky a trefné postřehy při řešení práce. Dále bych chtěla ze srdce poděkovat Ing. Janě Szabové za její trpělivost, ochotu a pomoc při plnění zadaného tématu. Velké díky patří mé rodině, přátelům a partnerovi za jejich lásku a podporu při studiu.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Liposomy	8
2.1.1	Příprava liposomů	9
2.1.2	Stealth liposomy	10
2.2	Chitosan a N, N, N-trimethylchitosan	11
2.2.1	Chitosan a důvody modifikace	11
2.2.2	Syntéza N, N, N-trimethylchitosanu	12
2.2.3	Vlastnosti N, N, N-trimethylchitosanu	12
2.3	Způsoby podávání	12
2.3.1	Inhalační podávání	14
2.3.2	Perorální podávání	15
2.4	Přírodní organické látky	16
2.4.1	Enzymy	16
2.4.2	Vitamíny	18
2.5	UV-VIS spektrofotometrie	20
2.5.1	Instrumentace	21
2.6	Dynamický rozptyl světla	22
2.6.1	Měření velikosti částic	23
2.6.2	Instrumentace přístroje pro měření velikosti částic	24
2.6.3	Měření Zeta-potenciálu	24
2.6.4	Instrumentace přístroje pro měření zeta-potenciálu	24
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	26
3.1	TMC a jeho využití v systémech pro dodávání léčiv	26
3.2	Inkorporace nízko a vysokomolekulárních látek do liposomů pro inhalační a gastrointestinální podání	30
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
4.1	Použité chemikálie	34
4.2	Příprava vezikul	35
4.3	Příprava vezikul s TMC	36
4.4	Stanovení enkapsulační účinnosti	36

4.4.1 Stanovení enkapsulační účinnosti vitamínu C	36
4.4.2 Stanovení enkapsulační účinnosti enzymu	37
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	38
5.1 Enkapsulační účinnost	38
5.1.1 Stanovení enkapsulační účinnosti liposomů připravených z DPPC	38
5.1.2 Vliv cholesterolu na enkapsulační účinnost.....	40
5.1.3 Vliv cholesterolu a PA na enkapsulační účinnost.....	41
5.1.4 Vliv komponent stealth liposomů na enkapsulační účinnost.....	43
5.1.5 Vliv TMC na enkapsulační účinnost.....	44
6 ZÁVĚR.....	47
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	49
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	56
8.1 Seznam použitých zkratk	56
8.2 Seznam použitých symbolů.....	57
9 PŘÍLOHY	58

1 ÚVOD

Léčiva s proteinovou či peptidovou povahou nabývají v poslední době na důležitosti při léčbě různých onemocněních (např. diabetes mellitus, trombóza). Jejich neinvazivní administrace může být problémová vzhledem ke ztrátám funkčnosti těchto léčiv, protože proteinová a peptidová léčiva jsou sami o sobě nestabilní a mají krátkodobý účinek. Řešením by mohlo být začlenění léčiva do vhodného nosiče – liposomu. Enkapsulací těchto léčiv do vhodných komplexů, které jsou schopné tyto látky ochránit, se zabývá čím dál tím více výzkumů. Liposomy jsou malé vezikuly, které se skládají z fosfolipidů a jsou schopné nést jak hydrofilní, tak i hydrofobní molekuly. Dnes se poměrně hojně využívají stealth liposomy, které mají na svém povrchu hydrofilní polymer, který zabraňuje spuštění nežádoucí imunitní reakce, a tím se prodlužuje doba, kterou liposomy stráví v krevním oběhu. Pro neinvazivní administraci je nutné k liposomům přidat látku, která to umožní. Trimethylchitosan (TMC) patří mezi látky, které jsou schopny umožnit jak inhalační podávání léčiv, tak i podávání perorální. TMC je derivátem chitosanu a mezi jeho velké výhody patří schopnost rozpustit se ve fyziologickém pH. Do krevního řečiště se léčivo může dostat paracelulární cestou přes tzv. těsné spoje, které trimethylchitosan, díky svému kladnému náboji, otevírá.

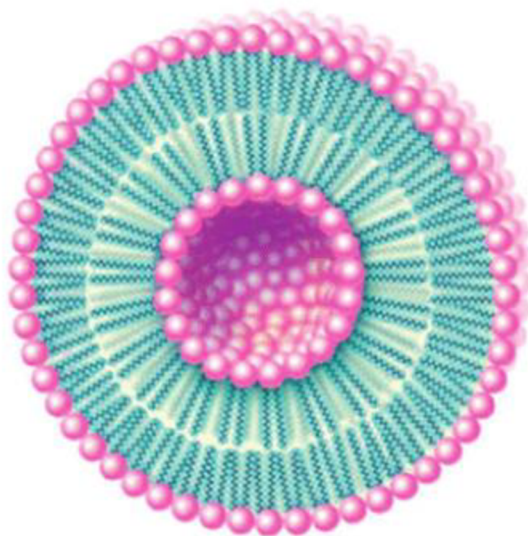
Ing. Jana Szabová se ve své diplomové práci [1] zabývala možným komplexním liposomálním systémem pro distribuci léčiv pro inhalační podání, který byl připraven kombinací stealth liposomu s trimethylchitosanem. Stealth liposom byl složen z neutrálního fosfolipidu fosfatidylcholinu, cholesterolu, záporného fosfolipidu (kyselina fosfatidová) a polyethylenglykolu navázaného na fosfatidylethanolaminu. Ing. Janě Szabové se ve své diplomové práci podařilo dokázat, že i přes vrstvu polyethylenglykolu je kyselina fosfatidová schopná pomocí elektrostatických interakcí vytvořit s trimethylchitosanem použitelný nosičový systém.

Z tohoto důvodu jsme se rozhodli v práci pokračovat a cílem této práce je tedy zjistit, zda lze inkorporovat nízkomolekulární látku (vitamín C) a vysokomolekulární látku, kterou představuje protein (enzym bromelain) do komplexního liposomálního systému, který navrhla Ing. Jana Szabová a jaký vliv mají jednotlivé složky systému na enkapsulační účinnost.

2 TEORETICKÁ ČÁST

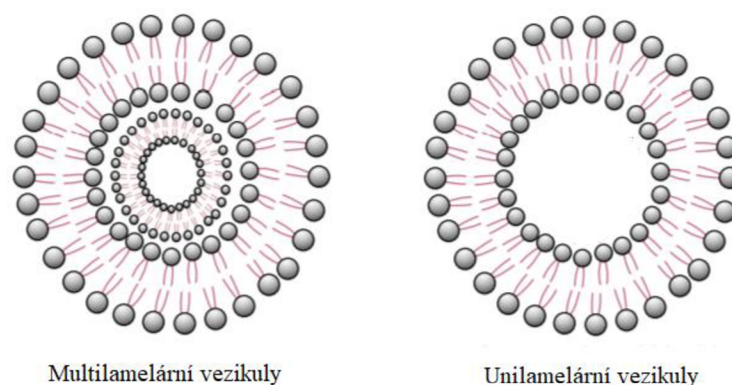
2.1 Liposomy

V 60. letech 20. století bylo zjištěno, že díky hydrataci suchého lipidového filmu vznikají uzavřené sférické vezikuly (liposomy), které se podobají miniaturním buněčným organelám s lipidovými dvojvrstvami. Tento objev a následný výzkum liposomů umožnil najít potenciální využití liposomů jako biodegradovatelných a biokompatibilních nosičů léčiv. Liposomy byly navrženy jako nosiče léčiv pro zvýšení účinnosti nebo snížení toxicity (nebo obojího) původního léčiva [2].



Obr. 1: Struktura liposomu [3].

Liposomy (obr. 1) jsou malé vezikuly kulovitého tvaru, které se skládají z biologicky odbouratelných přírodních nebo syntetických fosfolipidů. Fosfolipidy jsou amfifilní molekuly, které se vyznačují tím, že mají hydrofilní hlavou a dva hydrofobní acylové řetězce [4]. Polární hlavy se orientují směrem k vodnému prostředí a hydrofobní řetězce tvoří vnitřní oblast membrány a tvoří tak dvojvrstvu. Tato struktura jim pomáhá zapouzdřit ve vodě rozpustné složky v hydrofilní části a v tučných rozpustné složky v lipidové části. Tato vlastnost se používá ke změně farmakokinetického profilu léčiv, bylin a vitamínů i enzymů. Velikost liposomů se pohybuje v rozmezí od nanometrů až do několika mikrometrů. Velikost liposomů hraje důležitou roli při určování doby cirkulace liposomů a jak velikost, tak počet dvojvrstev ovlivňují zapouzdření léčiva uvnitř liposomů [5]. Na základě své velikosti a počtu dvojvrstev jsou liposomy rozděleny na multilamelární vezikuly (MLV) a unilamelární vezikuly [6]. Unilamelární vezikuly se dále klasifikují jako velké unilamelární vezikuly (LUV) a malé unilamelární vezikuly (SUV) [7]. Multilamelární vezikuly jsou sestaveny z několika soustředných fosfolipidových dvojvrstev oddělených vodnou fází a unilamelární jsou složeny pouze z jedné fosfolipidové dvojvrstvy obklopující jedno vodné prostředí (viz obr. 2) [8].



Obr. 2: Znárodnění struktury MLV a unilamelárních vezikul [5].

MLV vezikuly patří mezi největší a jejich velikost dosahuje hodnot 1–5 μm . Velikost SUV vezikul se pohybuje v rozmezí od 20 nm až po 100 nm, zatímco LUV vezikuly dosahují rozměrů 100–250 nm [9].

Vlastnosti liposomů se výrazně liší podle složení lipidů, povrchového náboje, velikosti a způsobu přípravy. Výběr komponent dvojvrstvy dále určuje „tuhost“ nebo „tekutost“ a náboj vezikuly. Nenasycené druhy fosfatidylcholinů z přírodních zdrojů (vaječný nebo sójový fosfatidylcholin) poskytují mnohem propustnější a méně stabilní dvojvrstvy, zatímco nasycené fosfolipidy s dlouhými acylovými řetězci (např. dipalmitoylfosfatidylcholin) tvoří tuhou, spíše nepropustnou dvojvrstvou strukturu [6].

Vzhledem k jejich velikosti, hydrofobnímu a hydrofilnímu charakteru, degradovatelnosti, biokompatibilitě a nízké toxicitě se liposomy hojně používají jako nosiče mnoha molekul v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Liposomy enkapsulované hydrofobní i hydrofilní látky chrání před degradací a zároveň umožňují jejich uvolňování na konkrétních místech, čímž zjednodušují specifické dodávání léčiv např. do nádorových tkání (pomocí EPR efektu) [6].

2.1.1 Příprava liposomů

Liposomy mohou být připraveny pomocí široké škály metod, které zahrnují kombinace lipidů s vodnými roztoky, kdy tyto metody příprav určitým způsobem ovlivňují vlastnosti liposomů (velikost, lamelarita a účinnost zapouzdření) [4]. Nejběžněji používanými metodami pro přípravu liposomů jsou rehydratace fosfolipidového filmu a nahrazení organických rozpouštědel vodným roztokem (odpařování v reverzní fázi a injekce organického rozpouštědla). Rehydratace fosfolipidového filmu následovaná mícháním, také známá jako Banghamova metoda, spočívá v rozpuštění lipidů ve vhodném organickém rozpouštědle, jako je chloroform nebo methanol (či jejich kombinace). Po tomto procesu je následně odstraněno rozpouštědlo za sníženého tlaku, rotačním odpařováním, dokud není vytvořen tenký film. Poté je tenký film hydratován vodným roztokem nad teplotou fázového přechodu, což vede k tvorbě MLV liposomů [10].

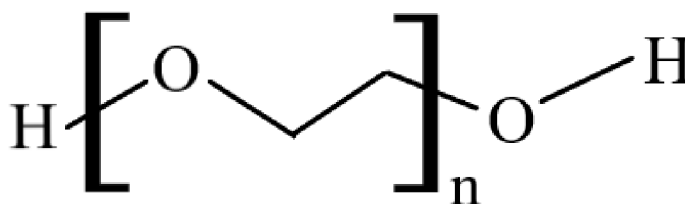
Po rehydrataci fosfolipidového filmu následuje redukce velikosti vezikul. Důvodem přípravy malých unilamelárních liposomů je, že většina liposomálních léčivých přípravků jsou menší částice, které vyžadují výrazné zmenšení velikosti z několika mikronů na průměr 50–200 nm. Nejčastěji je využívána ultrazvuková technika, obvykle používající sonifikátory typu

lázně nebo sondy, které narušují MLV. Další metody, které se používají pro zmenšení velikosti částic jsou homogenizační techniky, které spoléhají na srážky částic vysokou rychlostí a metody nízkotlaké extruze liposomů, které prostřednictvím řady filtrů s definovanými průměry pórů také snižují velikosti částic [11].

2.1.2 Stealth liposomy

Klasické liposomy jsou z krevního oběhu odstraněny velmi rychle imunitním systémem a nestačí se vstřebet z krevního řečiště do tkání. Proto bylo zapotřebí prodloužit cirkulační období liposomů. To umožnil vývoj dlouhodobě cirkulujících liposomů (stealth liposomy), kdy se do liposomové kompozice začlenil syntetický polymer polyethylenglykol (PEG). Ukázalo se, že přítomnost PEG na povrchu liposomálního nosiče prodlužuje dobu, kterou liposomy stráví v krevním oběhu a zároveň snižuje fagocytózu makrofágy [12].

PEG je lineární polymer s mnoha užitečnými vlastnostmi, jako je biokompatibilita, rozpustnost ve vodném a organickém prostředí, nízká toxicita a dobrá kinetika vylučování. Polyethylenglykol může být začleněn na liposomální povrch různými způsoby, ale v současnosti nejrozšířenější metodou je ukotvení polymeru v liposomální membráně přes zesítěný lipid (fosfatidylethanolamin) [13].



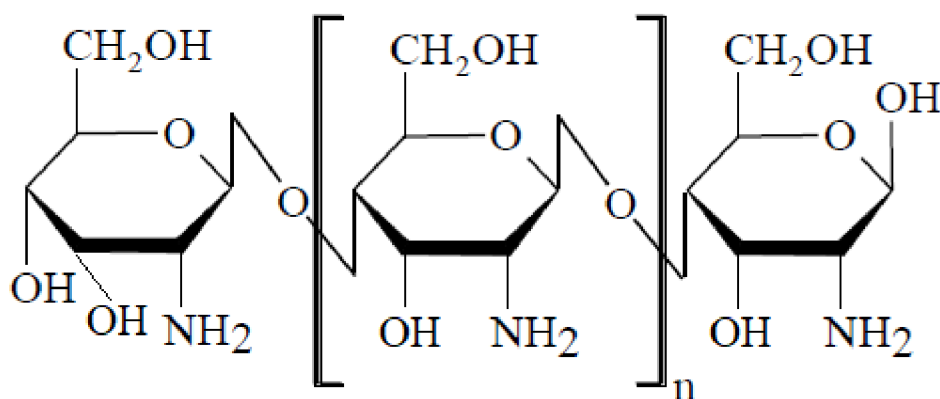
Obr. 3: Struktura polyethylenglykolu [14].

Inertní charakter PEG je založen na jeho molekulární konformaci ve vodném roztoku, kde PEG vystavuje nabitě hydrofilní skupiny a vykazuje velmi vysokou povrchovou hydrataci (sterické bránění). PEG je schopný zabránit proteinům a dalším biomolekulám přiblížit se k povrchu, který PEG obklopuje. Funkčnost PEG jako povrchového ochránce je proto interpretována jako biokompatibilita [15]. Biokompatibilita je nejčastěji používaný termín pro popis vhodných biologických požadavků na biomateriály používané ve zdravotnictví. Tento termín zahrnuje biofunkčnost, biologickou inertnost, bioaktivitu a biologickou stabilitu. Biokompatibilní látka je taková, kterou okolní tkáň a lidské tělo přijímá bez nežádoucí imunitní odpovědi, alergických reakcí, zánětlivých nebo chronických problémů, a navíc biokompatibilní látky nejsou karcinogenní [16]. Pojem „biokompatibilní povrchy“ se používá k definování povrchů, které lidské tělo přijme bez vzniku jakýchkoli nežádoucích reakcí a jednou z možností výroby takových povrchů je vytvoření permanentní chemické vazby mezi povrchem materiálu (substrátem) a PEG. PEG lze použít, právě díky biokompatibilitě, pro „maskování“ léčiv, implantátů, umělých zdravotnických prostředků, lékařských nástrojů atd. [15].

2.2 Chitosan a N, N, N-trimethylchitosan

2.2.1 Chitosan a důvody modifikace

Chitosan je netoxický, semikrystalický, biologicky rozložitelný a biokompatibilní lineární polysacharid tvořený převážně z jednotek glukosaminu a N-acetylglukosaminu, který je obsažen v chitosanu v menším množství. Obsah glukosaminu a N-acetylglukosaminu určuje stupeň deacetylace chitosanu. Čistý chitosan (složen pouze z glukosaminu) není v přírodě jako takový přítomen, a proto jej nelze přímo extrahovat z přírodních zdrojů, nejčastěji se chitosan nachází v kombinaci s chitinem, což je druhý nejrozšířenější polysacharid v přírodě po celulóze [17].



Obr. 4: Struktura chitosanu [1].

Chitosan se obvykle získává deacetylací N-acetylglukosaminových jednotek chitinu [17]. Deacetylace chitinu se provádí chemickou hydrolýzou za alkalických podmínek nebo enzymatickou hydrolýzou v přítomnosti konkrétních enzymů jako je např. *N*-deacetylasa [18]. V přírodě je chitin přítomen v živých formách a konkrétněji v hmyzu a korýších, kde představuje hlavní složku jejich exoskeletu. Chitin je také přítomen v buněčné stěně některých hub. Chitosan má pozoruhodné biologické vlastnosti, díky kterým je vhodný pro použití ve farmaceutických a biomedicínských oborech (nové systémy pro dodávání léčiv, tkáňovém inženýrství). Chitosan má dobré mukoadhezivní vlastnosti díky svému pozitivnímu náboji, který zvyšuje adhezi na sliznici a tím i dobu kontaktu při pronikání léku. Díky svým hemostatickým vlastnostem je chitosan dobrou možností pro obvazy ran. Antibakteriální vlastnost chitosanu navíc omezuje riziko infekce [15].

Chitosan je polykation, jehož hustota náboje závisí na stupni deacetylace a pH. Chitosanové řetězce jsou schopny interagovat elektrostatickými interakcemi s negativně nabitými molekulami. Chitosan není rozpustný ve fyziologickém pH (7,4), je rozpustný pouze v kyselých roztocích o pH nižším než 6,5, což je hlavní nevýhoda formulací léčiv [15]. Jako účinné řešení ke zlepšení jeho rozpustnosti a antibakteriální aktivity ve vodném prostředí byly navrženy četné modifikace chitosanu, jako je karboxymethylace, kvarternizace a alkylace. Typicky kvarternizace je asi nejslibnější modifikací díky své multifunkčnosti spolu s příznivou rozpustností ve všech hodnotách pH [19].

2.2.2 Syntéza *N, N, N*-trimethylchitosanu

N, N, N-trimethylchitosan (TMC), nejjednodušší forma kvartenizovaného chitosanu, byla obecně syntetizována chitosanovou reakcí s přebytkem methyljodidu za silných alkalických podmínek, za použití *N*-methyl-2-pyrrolidonu (NMP) jako rozpouštědla a jodidu sodného jako katalyzátoru. Dále byl syntetizován kombinací chitosanu s formaldehydem za vzniku Schiffovy báze, následovanou reakcí s redukčním činidlem a poté s methylhalogenidem. Téměř všechny reakce se však provádějí za silných zásaditých podmínek s vysokou teplotou, což vede k nežádoucí *O*-methylaci. Tento druh vedlejší reakce je téměř nekontrolovatelný a snižuje rozpustnost TMC ve vodném médiu [19].

První úspěšná syntéza ve vodě rozpustného TMC s vysokým stupněm kvaternizace a nízkou dimethylací byla dosažena Sievaem a spol. roku 1998 za použití dvoustupňové redukční methylační reakce [20].

2.2.3 Vlastnosti *N, N, N*-trimethylchitosanu

TMC, který je derivátem kationtového polymeru obohaceného o pozitivní náboj, vykazuje dobré mukoadhezivní vlastnosti, lepší pronikání a dodávání léčiva. Dále má TMC také antimikrobiální vlastnosti. V neposlední řadě je TMC účinný při zvyšování transportu malých hydrofilních sloučenin, velkých molekul a peptidových léčiv přes buněčné monovrstvy [21]. Epiteliální buňky (střevní, respirační a rohovkové) mají kolem sebe mukózní povrch přes který se peptidová a proteinová léčiva s nízkou lipofilní rozpustností obtížně dostávají. Paracelulární transport těchto léčiv lze významně ulehčit právě použitím TMC, který reverzibilně otevírá těsné spoje, které jsou umístěné mezi epitheliálními buňkami. Zlepšená propustnost bez poškození membrány epitheliálních buněk byla prokázána experimenty *in vitro* i *in vivo* [22; 23]. Důležitou roli v propustnosti hraje pozitivní náboj molekulární struktury a rozsah *N*-alkylace. TMC s vysokou pozitivní hustotou náboje vykazoval transport s vyšší efektivitou [24].

2.3 Způsoby podávání

Farmaceutické sloučeniny (léčiva) se podávají za účelem dosažení terapeutického účinku u lidí nebo zvířat. Podávání léčiva může být stabilní, řízené nebo cílené. Jsou známy různé aplikační systémy a mnoho léků se podává prostřednictvím rozmanitých konvenčních lékových forem pro dodávání léků, jako jsou roztoky, krémy, směsi, pasty, masti, prášky, čípky, suspenze, injekce, pilulky, tobolky a tablety s okamžitým uvolňováním. Nové systémy s mnohem lepším terapeutickým potenciálem zahrnují systémy s řízeným uvolňováním, rychle se dispergující dávkové formy, liposomy, systémy maskující chuť, transdermální náplasti, aerosoly a místně specifické dodací systémy [25].

Léky se do těla zavádějí různými způsoby. Volba vhodné cesty závisí na farmakokinetických a farmakodynamických vlastnostech léčiva, lékové formě, ve které je léčivo dostupné, a také na věku a podmínkách pacienta. Proto mohou být léky užívány např. orálně, sublingválně, intravenózně, intramuskulárně, rektálně, transdermálně, inhalačně atd. Každá z těchto cest má své specifické výhody a nevýhody, které jsou popsány v tab. 1 [26].

Tab. 1: výhody a nevýhody různých způsobů pro podávání léčiv [26].

Způsoby podávání	Výhody	Nevýhody
Sublingválně (podávání pod jazyk)	Vyhne se First– pass efektu Rychlá absorpce Stabilita léčiva Lze podávat lokálně	Malý limit dávky nepříjemné pro některé pacienty
Orálně (podávání ústy)	Snadné a bezbolestné Různé lékové formy (tablety, kapsle, rychlé/pomalé uvolňování) Možná vysoká dávka Velký povrch pro absorpci	Může být neúčinné (vysoká dávka, nízká rozpustnost) First pass efekt Léčivo může interagovat s potravinami Nevhodný pro pacienty v bezvědomí
Inhalačně (podávání přes plíce)	Vyhne se first pass efektu Velký absorpční povrch	Problémy s regulací přesného množství dávky Potíže s podáváním léku pomocí inhalátoru
Rektálně (podávání do konečníku)	Vyhne se first pass efektu Užitečné pro děti Léčivo se uvolňuje v pomalém, ustáleném stavu	Nepředvídatelná absorpce, pacienti jí špatně přijímají
Intravenózně (podávání do žil)	Přímý vstup do krevního řečiště Obchází trávicí systém Nepoškozuje plíce ani sliznice Rychlý nástup účinku	Zvýšené riziko infekce a předávkování Riziko poškození periferních žil nebo tepen Omezeno na vysoce rozpustné léky Strach pacientů Je nutný vyškolený personál
Intramuskulárně (podávání do svalů)	Je možný trvalý efekt	Nepředvídatelná nebo neúplná absorpce Je zapotřebí vyškolený personál
Subkutánně (podávání pod kůži)	Může být podáván samostatně Pomalé, ale úplné vstřebávání	Bolestivé Poškození tkání dráždivými léky
Transdermálně (podávání přes dermální vrstvu kůže)	Vyhne se first pass efektu Trvalé a kontrolované podávání pomocí transdermálního systému Snížení vedlejších účinků spojených se systémovou toxicitou Dobrá přijatelnost a shoda s pacientem Pohodlné a bezbolestné (neinvazivní)	Tímto způsobem lze dodat omezený výběr molekul z důvodu molekulové hmotnosti Absorpce nemocnou kůží se mění Podráždění a senzibilizace kůže

2.3.1 Inhalační podávání

Plíce jsou atraktivním cílem pro dodávání léčiv díky neinvazivnímu podávání, vyhýbání se vlivu metabolismu (tzv. first-pass efektu) a přímému dodávání na místo působení pro léčbu respiračních onemocnění [27]. Další výhodou neinvazivního dodávání biologických látek je velká absorpční plocha plic (asi 100 m²), snadno propustná membrána a nízká extracelulární a intracelulární enzymatická aktivita (v porovnání s GIT) [28].

Mezi léky, které jsou zkoumány pro lokální nebo systémové dodávání do plic patří malé molekuly, proteinová/peptidová léčiva a geny. V případě malých molekul bylo mnoho studií zaměřeno na místní aplikaci při léčbě chronických respiračních onemocnění, jako je astma a chronická obstrukční plicní nemoc (COPD). Plicní dodávání proteinových/peptidových léčiv nabízí velký potenciál jak pro lokální cílení při léčbě onemocnění dýchacích cest, tak pro systémové cílení při léčbě diabetes mellitus nebo trombózy. Dodávání genu do plic je zaměřeno hlavně na lokální dodávání biologicky aktivní látky do místa onemocnění, včetně rakoviny plic, genetických poruch ovlivňujících dýchací cesty (cystická fibróza, deficit alfa-1-antitrypsinu), obstrukčních plicních onemocnění a očkování [27].

I přes rozsáhlé zásobení krví a velkou plochu nosní dutiny je permeabilita sliznice u polárních molekul, včetně léků s nízkou molekulovou hmotností a zejména peptidů a proteinů s velkou molekulovou hmotností, obvykle nízká. Inhalační podání je účinné, ale má nižší biologickou dostupnost než např. intramuskulární nebo subkutánní injekce a je to způsobeno omezenou propustností slizničních bariér. V tomto ohledu může být absorpce zvýšena použitím vhodných nosičů léčiv. Aby nosičový systém úspěšně dodával léčivo do systémového krevního oběhu, musí ho přenášet přes vrstvu mukusu, musí chránit molekulu peptidového léčiva během celého procesu absorpce a zároveň musí být navržen tak, aby využíval některé z různých existujících epitelových transportních mechanismů (otevření těsných spojů mezi epiteliálními buňkami). Začlenění TMC do nosičového systému je vhodným prostředkem, jak zvýšit absorpci proteinového léčiva, protože otevírá těsné spoje a zlepšuje paracelulární difúzi molekul léčiva [29].

Začlenění liposomů do plicních systémů pro dodávání léčiv poskytuje atraktivní prostředek pro trvalé neinvazivní dodávání léčiv a usnadnění léčení chronických onemocnění. Plicní léčivo enkapsulované do liposomů může zvýšit retenční čas léčiva v plicích, a co je důležitější, snížení extrapulmonálních vedlejších účinků. Běžnými zařízeními, která se často používají při podávání léčiva v plicích jsou inhalátory s odměřenými dávkami (MDI) a nebulizátory [28]. Další způsob, jak podávat léčiva do plic je pomocí cíleného dodávání díky inhalátorům suchého prášku (DPI) [30].

Formulace liposomálního proteinu pro plicní podání ve formě aerosolu nesmí nepříznivě působit na plíce (vyvolávat kašel nebo bronchokonstrikci). Protein musí být v liposomálním systému dostatečně stabilizován, aby nedošlo ke ztrátě jeho účinku při procesu tvorby aerosolu. Liposomální systémy obsahující proteiny a peptidy je často složitější připravit než liposomy s malými molekulami, protože důležitou roli hraje konformace proteinů a potenciál pro cesty chemické degradace. Při navrhování účinné formulace liposomálních léčiv pro inhalační terapii je třeba vzít v úvahu problém s únikem spojeným s procesem rozprašování, stabilitou vezikul a kinetikou uvolňování v plicním prostředí a změnou farmakokinetiky zapouzdřených léčiv [28].

2.3.2 Perorální podávání

Orální cesta představuje jednu z neatraktivnějších a nepohodlnějších cest pro podávání terapeutických sloučenin. Perorální podávání léků je bezbolestné, dochází k odstranění negativních psychických stavů (strach, stres) spojené s injekcemi a také k eliminaci možností infekcí způsobených opakovaným použitím jehel. Navíc je výroba orálních přípravků méně nákladná, protože se nemusí vyrábět za sterilních podmínek [31].

Proteiny se obvykle nedodávají orálně, protože jsou štěpeny na aminokyseliny různými enzymy lokalizovanými v gastrointestinálním traktu (GI). Tyto aminokyseliny jsou pak absorbovány epitelem GI, ale nemají biologickou aktivitu původního proteinu nebo polypeptidu. Proto, navzdory skutečnosti, že stále roste počet proteinových a polypeptidových léčiv, je dodávka těchto léčiv stále zajištěna injekčně. V posledních několika desetiletích se proto velká část výzkumu zaměřila na pokusy vyvinout neinvazivní způsoby podávání proteinových léčiv, přičemž orální cesta je jednoznačně nepohodlnější a nežádanější [32].

Největší bariéry při orálním podání proteinů leží v gastrointestinálním traktu. Fyzickou bariéru pro absorpci tvoří epitelová vrstva, která leží na povrchu GI traktu. Je tvořena jedinou vrstvou sloupcových epitelálních buněk. Buňky jsou pevně spojeny k sobě těsnými spoji nebo zónovým okluzem, čímž inhibují průchod mezi buňkami (paracelulární transport). Epitel se ohýbá, aby vytvořil klky a mikroklky na apikálním povrchu epitelálních buněk. Tyto struktury zvyšují absorpční oblast střevního traktu přibližně o dva řády. Zároveň však brání absorpci proteinů, protože mikroklky také obsahují trávicí enzymy. Kromě těchto bariér leží na vrcholu epitelální vrstvy glykalyx, vrstva sulfatovaných mukopolysacharidů a vrstva hlenu sestávající z glykoproteinů, enzymů, elektrolytů a vody [32].

Kromě fyzické bariéry poskytované střevním epitelem čelí proteiny další, možná větší bariéře ve formě trávicích enzymů. Trávení proteinů proteázami začíná v žaludku a pokračuje mnoha různými enzymy lokalizovanými ve zbytku gastrointestinálního traktu. Pepsiny se nacházejí v žaludku a trypsin, chymotrypsin a karboxypeptidázy z pankreatu se nacházejí v tenkém střevě [32]. Tyto pankreatické enzymy jsou odpovědné pouze za asi 20% enzymatické degradace požitých proteinů [33]. Zbytek degradace probíhá na membráně hraničící s mikrovili (různými peptidasami) nebo uvnitř enterocytů střevního traktu. Přítomnost pouze jednoho nebo dvou těchto enzymů by mohla vést k úplné denaturaci nebo destrukci proteinového léčiva [32].

Poslední hlavní překážkou ve vývoji účinných systémů pro perorální podání proteinových léčiv je způsob výroby těchto systémů. Na rozdíl od léčiv s nízkou molekulovou hmotností mají proteiny komplexní vnitřní strukturu, která pomáhá definovat jejich biologickou aktivitu. Jakékoli narušení v primární (aminokyselinová sekvence), sekundární (dvourozměrná struktura), terciární (trojrozměrná struktura) nebo kvartérní struktura (kombinace peptidových podjednotek) může vést k deaktivaci proteinu. Tato narušení mohou být způsobena i sebemenšími změnami v prostředí (nebo dokonce mikroprostředí) proteinu. Nejpravděpodobnější proměnné, které mohou ovlivnit strukturu a stabilitu proteinu, souvisí s teplotou, pH, rozpouštědlem, dalšími rozpuštěnými látkami a stavy krystalinity proteinu [32].

Řešením těchto problémů, při podávání peptidových a proteinových léčiv, je použití orálně podávaných liposomů, a zejména použití liposomů potažených polymerem s mukoadhezivními vlastnostmi. Liposomální nosiče jsou slibnou formou pro orální podávání peptidových a proteinových léků, protože jsou schopné chránit léky před nepříznivým gastrointestinálním

prostředím a zajistit kontrolované uvolňování léku. Důležitou roli hraje, v systémech pro dodávání proteinových léčiv, potažení liposomů polymerem s mukoadhezivními vlastnostmi. Takové vylepšení prodlouží dobu pobytu liposomálních nosičů a zvýší kontakt mezi nosiči a vrstvami hlenu tak, aby se zvýšila penetrace a snížila degradace léčiv. Jako vhodný polymer pro potahování se nabízí TMC, který účinně zvyšuje penetraci hydrofilních a vysokomolekulárních molekul napříč intestinálním epitelem, a to i v neutrálním prostředí, za použití mechanismů jako jsou otevírání těsných spojů a rozšíření paracelulární dráhy [34].

2.4 Přírodní organické látky

Přírodní organické látky, jsou biologické molekuly, nazývané též jako biomolekuly a jsou velmi důležité pro fungování živých organismů. Biomolekuly mají širokou škálu velikostí, struktur a samozřejmě také funkcí. Tyto molekuly provádějí nebo spouštějí důležité biochemické reakce v živých organismech jako je například regulace správného růstu a vývoje lidského těla. Podílí se na mnoha procesech, jako je ukládání energie (sacharidy), katalyzování biochemických reakcí (hormony, enzymy), ukládání a přenos genetických kódů (RNA / DNA) nebo změna biologických a neurologických aktivit (neurotransmitery, hormony). Z hlediska molekulové hmotnosti je rozdělujeme do dvou skupin, a to na vysokomolekulární látky (bílkoviny, nukleové kyseliny, lipidy, enzymy, polysacharidy) a na nízkomolekulární látky (monosacharidy, nukleotidy, vitamíny, aminokyseliny, hormony) [35].

2.4.1 Enzymy

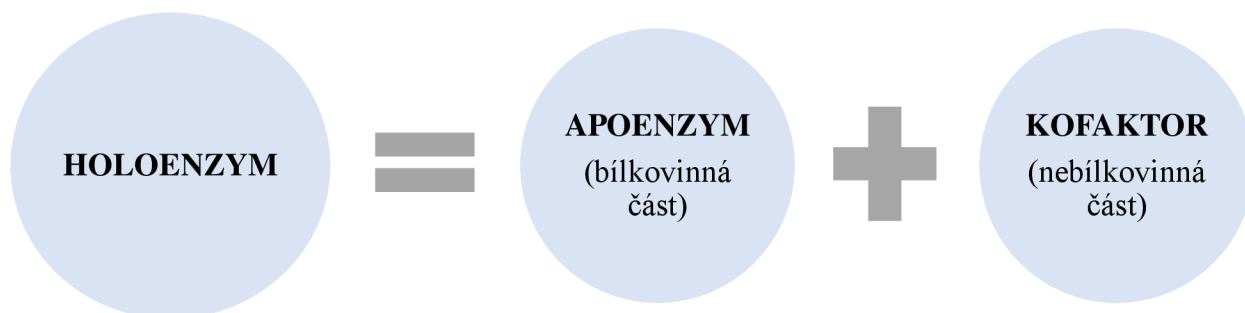
Enzymy jsou vysokomolekulární organické látky, které působí jako katalyzátory v živých organismech a regulují rychlost chemických reakcí, které v živých organismech probíhají. Enzymy z reakce vystupují, aniž by změnily svou strukturu [36].

Biologické procesy, ke kterým dochází ve všech živých organismech, jsou chemické reakce a většina z nich je regulována enzymy. Bez enzymů by mnoho z těchto reakcí neproběhlo při fyziologických podmínkách. Enzymy katalyzují všechny aspekty buněčného metabolismu, což zahrnuje například trávení jídla (velké molekuly živin (bílkoviny, tuky atd.) jsou rozštěpeny na menší molekuly) nebo tvorbu buněčných makromolekul z menších prekurzorů [36].

Enzymy jsou účinnější než většina anorganických katalyzátorů, a navíc vykazují větší specifitu účinku a katalyzují pouze specifickou chemickou reakci. Některé enzymy působí na různé látky, ale obecně se jedná o sloučeniny s podobnými strukturálními charakteristikami a katalyzovaná reakce je vždy stejného typu. Látky, které jsou modifikovány enzymy, se nazývají substráty [37].

Složení

Prakticky všechny enzymy jsou proteiny nebo konjugované proteiny, ačkoli byly identifikovány i některé katalyticky aktivní RNA molekuly [38]. Molekula proteinového enzymu se skládá z jednoho nebo více řetězců aminokyselin nazývaných polypeptidové řetězce [36]. Některé enzymy mají strukturu složených bílkovin a nazývají se holoenzymy. Obsahují neproteinovou složku nazývanou kofaktor a bílkovinou složku – apoenzym [37]. Kofaktor je přímým účastníkem katalytického děje a může jím být buď koenzym (organická molekula neproteinové povahy) nebo anorganický kovový ion. Kofaktor může být k enzymu pevně nebo volně vázán. Pokud je těsně spojen, je kofaktor označován jako prostetická skupina [39].



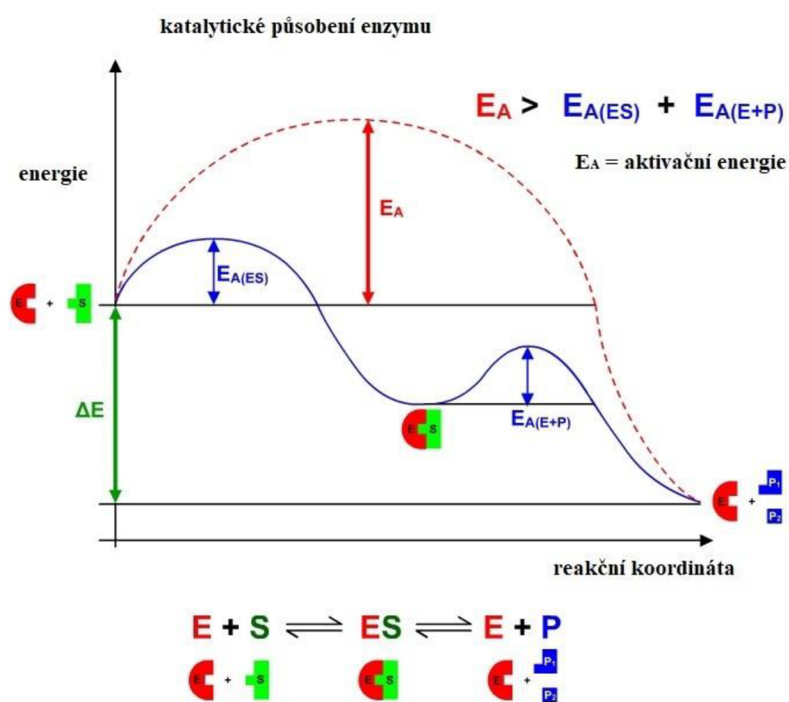
Obr. 5: Struktura složeného enzymu [37].

Aminokyselinová sekvence určuje charakteristické vzory skládání struktury proteinu, což je zásadní pro enzymatickou specifitu. Pokud je enzym podroben změnám (kolísání teploty nebo pH) může proteinová struktura ztratit svou integritu a svou enzymatickou schopnost. Tento jev se nazývá denaturace [36].

Nejdůležitější částí molekuly enzymu je aktivní místo (centrum). Aktivní místo je vytvořeno aminokyselinovými zbytky, které mají schopnost vázat reaktivní části molekuly substrátu [39]. Substráty navázané v aktivním místě jsou v něm přeměňovány pomocí katalytických skupin na produkty [40].

Funkce

Enzymy, stejně jako katalyzátory používané v chemii, urychlují reakce, aniž by při tom ovlivňovaly složení rovnovážné směsi, neboť zvyšují rychlost reakce oběma směry. Směr průběhu reakce není ovlivněn katalyzátorem, ale je dán energetickými a koncentračními poměry v reagujícím systému (obr. 6) [40].



Obr. 6: Závislost energie na průběhu chemické reakce [41].

Enzymy jsou oproti syntetickým katalyzátorům účinnější. Pracují většinou za mírných podmínek (teplota 20–40 °C, tlak 0,1 MPa, pH kolem 7). Jejich účinek lze snadno regulovat, a to dokonce na několika úrovních. Výhodou enzymů při jejich průmyslových aplikacích je i jejich netoxičita, na rozdíl od umělých katalyzátorů, které jsou většinou toxické (Pt, Pd) [40].

Enzymy se dále vyznačují značnou specifitou. Prvním příkladem je substrátová specifita. Popisuje nám, že každý enzym obvykle katalyzuje pouze určitou reakci určitého substrátu (výchozí látky). Druhým příkladem je specifita účinku, kdy určitý enzym katalyzuje pouze jednu z mnoha možných přeměn substrátu a třetím příkladem je stereospecifita. Stereospecifita je schopnost enzymu rozpoznat v racemické směsi jeden z enantiomerů a pouze ten přeměnit. Stereospecifita je důsledkem toho, že enzym (a tedy i jeho aktivní centrum) je vybudováno z chirálních monomerních jednotek, a je proto chirální jako celek [42].

Bromelain

Bromelain se řadí do skupiny proteolytických enzymů a získává se ze stonků a nezralých plodů ananasu. Konkrétně z *Ananasu comosus* z čeledi broméliovitých. Získává se ve formě surového vodného extraktu, který tvoří složitou směs různých thiol-endopeptidáz a dalších, dosud ne zcela charakterizovaných složek, jako jsou fosfatázy, glukosidázy, peroxidázy, celulázy, glykoproteiny a sacharidy [43].



Obr. 7: *Ananas comosus* [44].

Používá se jako léčivo pro orální systémovou léčbu zánětlivých, maligních onemocnění a nabízí široké spektrum terapeutických účinností. Bromelain prokazuje *in vitro* a *in vivo* protiedematické, protizánětlivé, antitrombotické a fibrinolytické účinky. Moduluje funkce adhezních molekul na krvi a endoteliálních buňkách, také reguluje a aktivuje různé imunitní buňky a jejich produkci cytokinů (cytokiny jsou malé proteiny uvolňované buňkami, které mají specifický účinek na interakce a komunikaci mezi buňkami [45]) [43].

2.4.2 Vitamíny

Vitamíny jsou nízkomolekulární organické molekuly, které jsou nezbytné pro správné fungování, růst a vývoj celého organismu nebo jeho jednotlivých orgánů. Jsou to látky, které si tělo nedokáže vyrobit samo, a proto je nutné je přijímat ve formě doplňků stravy nebo přímo

v potravě. Člověk může přijímat některé vitamíny ve formě provitaminů (neúčinná forma vitamínů), které si je sám organismus schopný přeměnit na potřebné látky. Vitamíny rozdělujeme na dvě skupiny – na vitamíny rozpustné v tucích (lipofilní) a na vitamíny rozpustné ve vodě (hydrofilní) (viz tab. 2) [46].

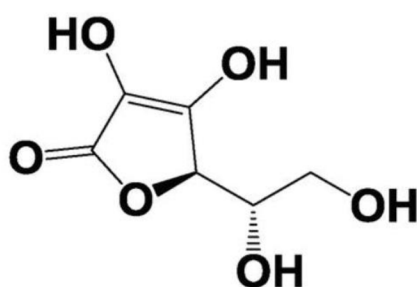
Tab. 2: Rozdělení vitamínů [47].

PŘEHLED VITAMÍNŮ	
Lipofilní	Hydrofilní
A – retinol	B – komplex (B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₅ , B ₆ , B ₁₂)
D – kalciferol	Kyselina listová – B ₉
E – tokoferol	H – biotin
K – fylochinon	C – kyselina L-askorbová

Hypovitaminóza je onemocnění, ke kterému dochází z důvodu sníženého příjmu a obsahu vitamínů v těle. Projevuje se širokou škálou poruch jednotlivých funkcí organismu až po velmi vážné onemocnění vyvolané naprostým nedostatkem daného vitamínu, které označujeme jako avitaminóza. Naopak onemocnění způsobené nadměrným příjmem anebo hromaděním daného vitamínu v organismu a jeho toxickým působením se nazývá hypervitaminóza [47].

Vitamín C

Vitamín C, také známý jako kyselina L-askorbová (obr. 8), je ve vodě rozpustný vitamín, který si tělo nedokáže uskladnit, s výjimkou zanedbatelného množství a musí se doplňovat denně. Kyselina askorbová se nachází hlavně v citrusových plodech, jako je pomeranč, kiwi, citron, guava a grapefruit. Bohatými přírodními zdroji vitamínu C je i zelenina, jako je brokolice, květák, růžičková kapusta a paprika. Mezi další ovoce bohaté na vitamín C patří papája, meloun a jahody [46].



Obr. 8: Strukturální vzorec kyseliny askorbové [46].

Kyselina askorbová pomáhá produkovat kolagen, bílkovinu potřebnou k vývoji a udržení zdravých zubů, kostí, dásní, chrupavek, plotének, kloubních obložení, kůže a cév [46]. Vitamín C má také zásadní roli při hojení těchto pojivových tkání. Důvodem je to, že vitamín C je kofaktorem prolylhydroxylázy a lysylhydroxylázy a tyto enzymy katalyzují hydroxylaci prolinových a lysinových zbytků prokolagenu a podporují správné skládání stabilní kolagenové konformace trojitě šroubovice [48]. Dále je také vitamín C silný antioxidant, který chrání buňky před poškozením volnými radikály produkovanými cigaretovým kouřem, znečištěním ovzduší, nadměrným slunečním zářením a normálním metabolismem. Předpokládá se, že volné radikály

hrají roli při rychlém stárnutí a při nemocech, jako je rakovina a srdeční choroby. Nemoc, která vzniká v důsledku nedostatku vitamínu C, se nazývá kurděje a vede k anémii, únavě, depresím a poruchám pojivové tkáně, jako je vnitřní krvácení, petechie, zhoršené hojení ran a zánět dásní [46]. Předávkování vitamínem C je extrémně vzácné. Doporučená denní dávka pro dospělého člověka je 60–100 mg vitamínu C. Nejeftivnější dávka pro udržení maximální zásoby vitamínu C v organizmu je 100 mg denně, při podávání vyšších dávek je lepší zvolit lékové formy s postupným uvolňováním. Při denním příjmu vyšším než 1 g se významně zvyšuje riziko tvorby oxalátových kamenů [47].

Je známo, že vitamín C pomáhá metabolizovat bílkoviny a jeho antioxidační aktivita může mít šanci snížit riziko některých druhů rakoviny [46]. Příkladem, jak vitamín C napomáhá snížit riziko rakoviny, může být prevence tvorby karcinogenních nitrosaminů v žaludku. Dusičnany ze stravy jsou v žaludku přeměňovány bakteriemi na dusitany, které mohou reagovat s dietními aminy za vzniku nitrosaminů. Kyselina askorbová reaguje s dusitany a přeměňuje je na oxid dusný. Tímto způsobem je zabráněno tvorbě mutagenních nitrosaminů, které mohou poškodit genetický materiál [49].

2.5 UV-VIS spektrofotometrie

UV-VIS spektrofotometrie je optická metoda, která se řadí mezi fyzikálně-chemické analytické metody a je založená na interakci elektromagnetického záření s hmotou [50]. Konkrétně se tato metoda řadí mezi spektrální optické metody jejichž podstatou je měření energetické změny, která nastává při průchodu záření látkou. Dále UV-VIS spektrofotometrie patří mezi absorpční metody, protože využívají a sledují absorpci (pohlcování) elektromagnetického záření látkami v oblasti ultrafialového a viditelného spektra [51].

Principem UV-VIS spektrofotometrie je absorpce ultrafialového a viditelného záření zředěnými roztoky molekul. Rozsah vlnových délek, při kterém metoda pracuje, je v rozmezí 200–800 nm. Princip metody je založen na skutečnosti, že se atomy a molekuly mohou nacházet v různých energetických stavech. Atom nebo molekula určitého prvku má danou elektronovou konfiguraci, která je pro něj typická. Absorpcí elektromagnetického záření molekulou dojde ke změně elektronového stavu dané molekuly – dojde k elektronovým přechodům. Za normálních podmínek mají atomy a molekuly nejnižší energii, a proto se nacházejí v základním stavu [51]. Energie základního elektronového stavu je definována součtem základní elektronové energie, vibrační energie a energie rotační [52]. Absorpcí určitého množství energie (kvanta záření) může docházet k přechodům atomů nebo molekuly do excitovaného stavu, tj. do vyššího energetického stavu. Největší rozdíl energií je mezi základní a excitovanou hladinou (10^2 kJ/mol). Elektrony přecházejí do vyšší excitační hladiny, přičemž dochází k absorpci určitého množství záření o konkrétní energii, a tedy i o konkrétní vlnové délce. 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. Elektronové absorpční spektrum je závislost absorbance na vlnové délce. Výsledné spektrum je zároveň i pásové, protože se přechody zpravidla překrývají. Je to dáno vysokou energií fotonů UV a VIS záření, pomocí které jsou schopné excitovat jak elektronové stavy, tak i stavy vibrační a rotační. Jeden pás ve spektru odpovídá jednomu typu přechodu elektronů v molekule do excitovaného stavu. Pás popisujeme pomocí vlnové délky maxima pásu. Vlnová délka maxima pásu souvisí

s energií absorbovaného záření a to tak, že je totožná s rozdílem energií hladin, mezi kterými elektron přechází. Polohu pásu určují energie orbitalů, mezi nimiž dochází k přechodu elektronů při excitaci [51].

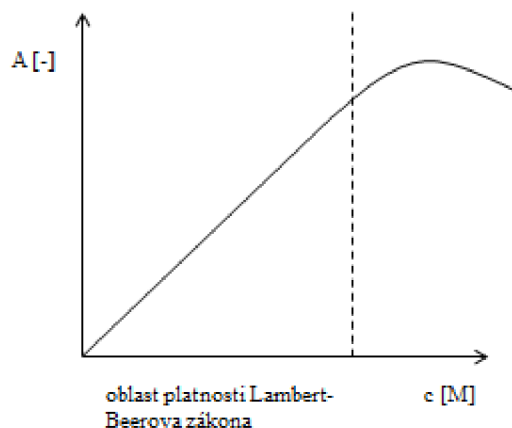
Ve spektrofotometrii se nejčastěji využívá měření absorpance. Absorpance A je záporný dekadický logaritmus transmitance T a je dán poměrem dopadajícího zářivého toku I_0 k prošlému I [51]:

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I}. \quad (1)$$

Závislost absorpance na koncentraci a tloušťce kyvety je popsána matematicko-fyzikální rovnicí vycházející Bouguer-Lambert-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l, \quad (2)$$

kde A je absorpance, ε je molární absorpční koeficient [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] a l je tloušťka absorbující vrstvy. Tento zákon platí pouze pro velmi zředěné roztoky do koncentrace zhruba 10^{-2} mol/l (viz obr. 9) [53].



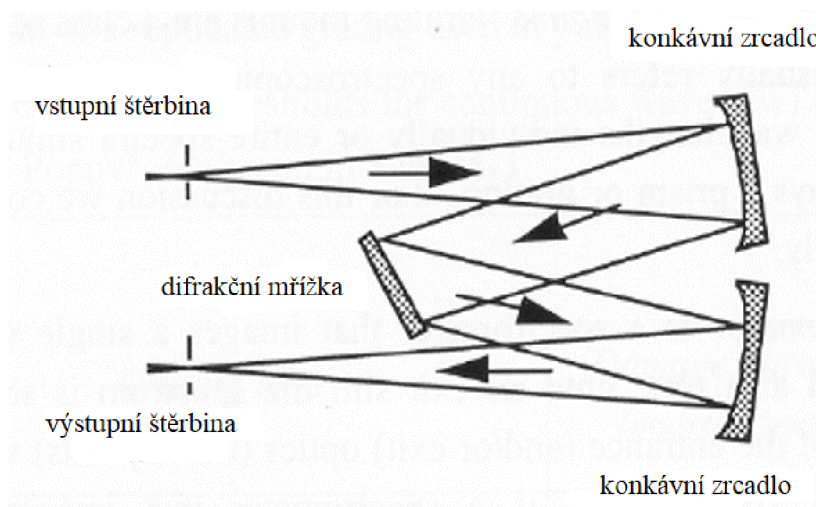
Obr. 9: Závislost absorpance na koncentraci [51].

UV/VIS spektrofotometrie nachází své využití v kvantitativní i v kvalitativní analýze a lze pomocí ní analyzovat látky anorganické i organické. Metoda je využívána především v lékařství, v biochemii, v klinickém testování léčiv, v potravinářství při kontrole jakosti či v ekologii při kontrole látek přítomných v životním prostředí. Výhodou spektrofotometrie oproti jiným analytickým metodám je jednoduchost, rychlost, dostatečná citlivost měření a nízká finanční nákladnost [50]. Více je tato metoda využívána pro kvantitativní analýzu, kdy měříme absorpaci, pomocí které jsme schopni zjistit koncentraci sloučenin. Většinou používáme metodu kalibrační křivky [51].

2.5.1 Instrumentace

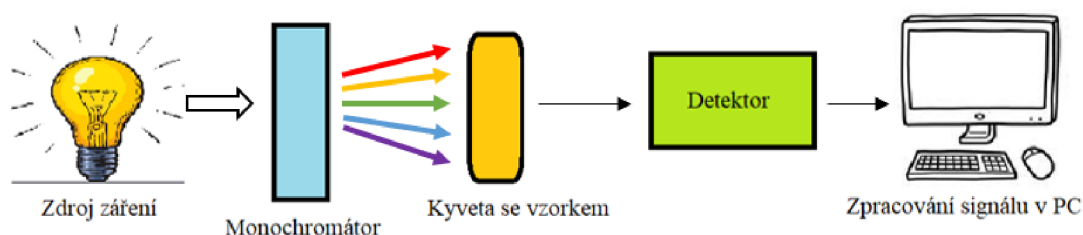
Každý spektrofotometr by se měl skládat ze zdroje záření, monochromátoru, absorbujícího prostředí (kyveta se vzorkem) a detektoru záření. Zdroj záření emituje elektromagnetické záření obvykle v rozmezí od 200 do 800 nm. Jako zdroj pro viditelnou oblast světla se používají wolframová a halogenová žárovka a pro ultrafialovou oblast deuteriová a vodíková lampa [53]. Optickým dílem spektrofotometru je monochromátor, který rozkládá dopadající

polychromatické záření na jednotlivé monochromatické paprsky, ze kterých se dále vybírá požadovaná vlnová délka pomocí štěrbin. Skládá se ze vstupní štěrbin, disperzního prvku a výstupní štěrbin a disperzním prvkem může být hranol, filtr nebo mřížka. Nejčastěji využívané uspořádání monochromátoru je Czerny-Turner (obr. 10).



Obr. 10: Uspořádání Czerny-Turner [53].

Vybraná vlnová délka dále prochází vzorkem, který je umístěn v kyvetě. Skleněná kyveta se používá pro viditelnou oblast světla a křemenná se používá pro ultrafialovou oblast [51]. Poslední součástí spektrofotometru je detektor. Ten by měl mít v ideálním případě vysokou citlivost pro měřené záření (vysoký poměr signál ku šumu) konstantní odezvu pro široký obor vlnových délek, dobrou rychlost odezvy a minimální pozadí signálu [53]. Slouží k měření intenzity záření, které vzorkem prošlo. Principem je přeměna energie světelného záření dopadajícího na detektor na elektrický signál. Detektory mohou být fotonásobiče, polovodičové fotoelektrické články, diodová pole a detektory CCD [51].



Obr. 11: Schéma spektrofotometru [54].

2.6 Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla (Dynamic light scattering – DLS), občas nazývaný také jako kvazielastický rozptyl světla, je velmi jednoduchá a neinvazivní technika proveditelná v běžných laboratorních podmínkách. Metoda se používá pro stanovení velikosti částic, a právě velikost částic je důležitým faktorem pro definování různých nanočástic, proteinů, micel,

liposomů, pigmentů atd. Dále jsme díky této metodě schopni určit distribuci částic, a pokud měření probíhá v elektrickém poli, tak můžeme změřit i zeta potenciál [55].

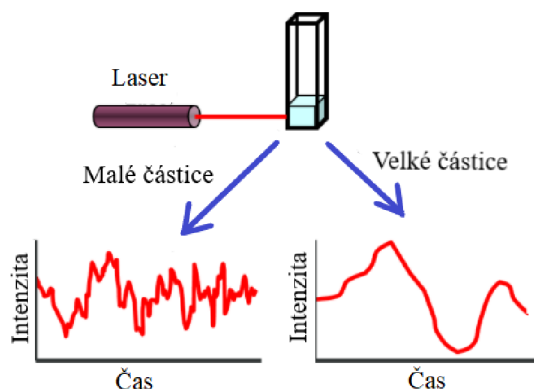
Principem techniky je měření fluktuace intenzity rozptýleného světla z laserového zdroje okolo její průměrné hodnoty. Tyto změny souvisí s interferenčním zeslabováním a zesilováním světla, které se rozptyluje na stále se náhodně pohybujících částicích (podléhají Brownovu pohybu) ve vzorku v průběhu času. Mezi výhody této metody patří, jak již bylo zmíněno, rychlý a jednoduchý průběh měření, dále je požadováno jen velmi malé množství vzorku a přístroj je komerčně dostupný. Největší výhodou této metody je možnost analyzovat částice s rozměry v rozmezí od několika nanometrů až do 1 μm [56].

2.6.1 Měření velikosti částic

Při měření velikosti částic se analyzují fluktuace intenzity rozptýleného záření, které vznikají díky tomu, že v disperzním systému se částice neustále náhodně pohybují – Brownův pohyb. Pohyb částic je závislý na aspektech jako je velikost částic, teplota a viskozita rozpouštědla. Když je sledován pohyb částic v časovém rozmezí, lze získat informace o velikosti makromolekul, protože velké částice difundují pomalu, ve srovnání s malými částicemi (jako jsou molekuly rozpouštědla), které se pohybují rychleji (viz obr. 12). Při měření posvítíme laserem na částice a dochází k nárazu na makromolekuly přítomné v roztoku, dopadající světlo se rozptyluje do všech směrů a intenzita rozptylu je zaznamenána detektorem. Rozptýlené světlo bude podléhat buď destruktivní interferenci a vzájemně se vyruší, nebo konstruktivních interferenci a dojde k vytvoření detekovatelného signálu. Signál je analyzován autokorelátorem, který koreluje kolísání intenzity rozptýleného světla s ohledem na čas, aby určil, jak rychle kolísá intenzita, což souvisí s difúzním chováním makromolekul. Dojde k vytvoření korelační křivky a z ní jsme schopni stanovit hydrodynamický průměr d_H , díky znalosti teploty při měření T a viskozity rozpouštědla η_0 pomocí Stokes-Einsteinovy rovnice:

$$d_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 D}, \quad (3)$$

kde k_B je Boltzmanova konstanta a D je difúzní koeficient [57]. Hydrodynamický průměr částice odpovídá průměru koule, která by měla za stejných podmínek difúzní koeficient stejný, jako byl naměřen pro analyzovanou částici [55].



Obr. 12: Rozdíly fluktuace intenzity rozptýleného záření v závislosti na velikosti částic [58].

2.6.2 Instrumentace přístroje pro měření velikosti částic

Přístroj pro měření dynamického rozptylu světla se skládá ze zdroje záření, detektoru, zeslabovač intenzity signálu, korelátor a PC. Jako zdroj záření se používá laser, který poskytuje stabilní paprsek monochromatického světla. Nejčastěji je využíván laser o vlnové délce 633 nm, anebo také zelený laser o vlnové délce 532 nm. Záření prochází vzorkem, který je umístěn v kyvetě a vzorek by měl být čistý, průhledný a homogenní. Světlo, které částice rozptýlí, pokračuje do detektoru. Detektor je umístěn pod úhlem 173° což umožňuje detekci zpětného rozptylu a vylučuje přebytek rozptýleného světla. To pomáhá odhalit rozptýlené světelné signály nízké intenzity pocházející z menších částic. V některých starších verzích je úhel, ve kterém je umístěn detektor, stále 90° . Nejčastěji používaným detektorem je fotodioda [55]. Pokud by detektor detekoval příliš mnoho světla, mohlo by dojít k jeho poškození, a proto se ke snížení intenzity laseru používá zeslabovač (atenuátor). Další součástí je korelátor, ve kterém dochází ke srovnávání intenzity rozptylu světla po sobě jdoucích měření. Informace o změně intenzity pokračuje do počítače, kde se v softwaru analyzují data a odvodí se velikost částic [59].

2.6.3 Měření Zeta-potenciálu

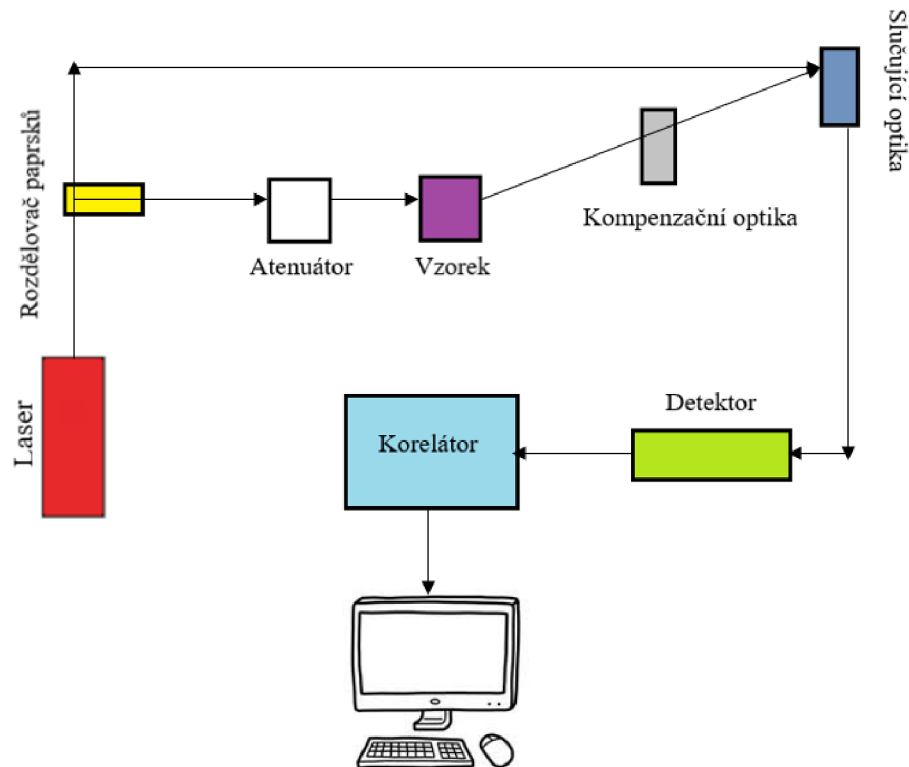
Zeta potenciál (ZP), označovaný také jako elektrokinetický potenciál, je důležitá vlastnost nano a mikročástic rozptýlených v kapalinách, protože zásadně ovlivňuje chování těchto systémů. Povrch většiny částic je nabitý, protože atomům, které jsou na povrchu částic chybí část iontů s opačným nábojem. Pokud je taková částice dispergovaná v kapalině, dojde ke vzniku elektrické dvojvrstvy a náboj na povrchu částice přitáhne ionty s opačným nábojem z roztoku [60]. Vnitřní vrstva se skládá převážně z iontů s opačným nábojem než částice (Sternova vrstva). Vnější vrstva se nazývá také difúzní vrstva, jsou zde přítomny i stejně nabitě molekuly jako je dispergovaná částice. Difúzní vrstva je vázána k částici slaběji než Sternova vrstva a její složení je dynamické a mění se v závislosti na různých faktorech, např. pH, iontové síle, koncentraci atd. Když se na takovou disperzi aplikuje elektrické pole, nabitě částice se začnou pohybovat směrem k opačně nabitě elektrodě (elektroforéza). V této difúzní vrstvě existuje hypotetická rovina, která při elektroforéze funguje jako rozhraní mezi pohybujícími se částicemi a vrstvou rozpouštědla kolem ní [55]. Když se částice pohybuje, ionty uvnitř se pohybují s ní, ale všechny ionty za rovinou s částicí neputují. Toto rozhraní se nazývá povrch hydrodynamického smyku, nebo rovina skluzu. Potenciál, který existuje na této rovině, je známý jako potenciál zeta [61].

Zeta potenciál je veličina, která určuje míru interakce částic, a tudíž i jejich vlastnosti jako je například stabilita systému. Při hodnotě vyšší nebo nižší, než je rozmezí -30 mV až $+30$ mV, se částice vzájemně silně odpuzují, nevytvářejí shluky a jejich systém je proto stabilní. Pokud stanovíme hodnotu zeta-potenciálu mezi -30 mV a $+30$ mV, tak se systém stává nestabilní. Nestabilita se projevuje širokým rozdělením velikostí částic, které se shlukují do agregátů různé velikosti [60].

2.6.4 Instrumentace přístroje pro měření zeta-potenciálu

Měření zeta-potenciálu se provádí pomocí přístroje, který je vybaven zdrojem záření, rozdělovačem paprsků, kyvetou se vzorkem, detektorem, korelátozem a PC (obr. 13). Zdrojem

je většinou laser o vlnové délce 633 nm. Záření se rozděljuje na dvě složky – první část prochází kyvetou se vzorkem a druhá část slouží jako reference. Při vložení elektrického napětí se nabitě částice budou pohybovat médiem rychlostí, která je úměrná jejich potenciálu zeta. Částice s vyšší velikostí zeta se budou pohybovat rychlou rychlostí, zatímco částice s nízkým potenciálem zeta se budou pohybovat pomaleji. Rozptyl záření na pohybujících se částicích je zaznamenán detektorem. Detektor nepřímo měří rychlost částic pomocí Dopplerova frekvenčního posunu rozptýleného světla (intenzita záření kolísá s frekvencí úměrnou rychlosti částice). Tento frekvenční posun software v PC převede na hodnotu elektroforetické mobility, pomocí které pak vypočítá zeta-potenciál [62].

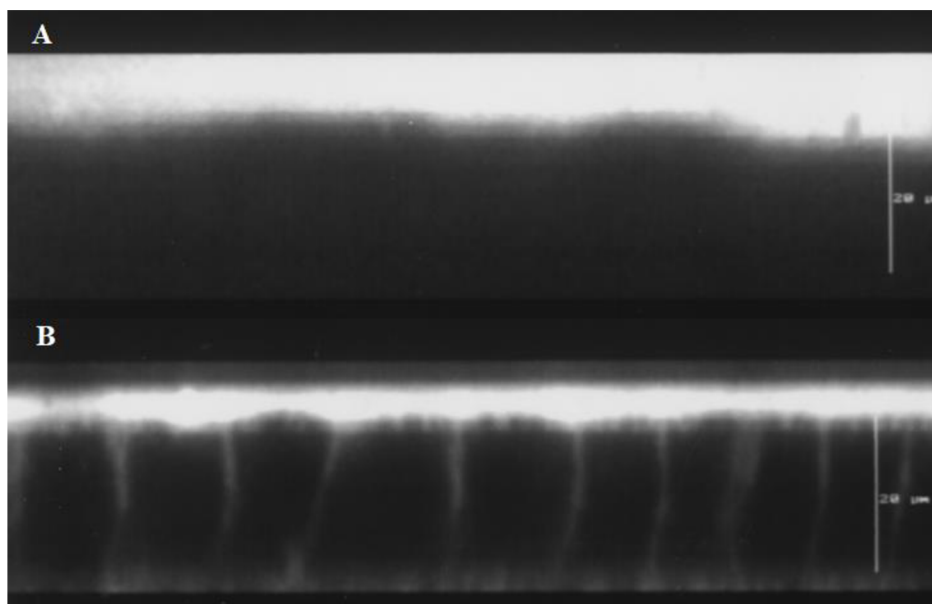


Obr. 13: Schéma zařízení pro měření zeta-potenciálu [55].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 TMC a jeho využití v systémech pro dodávání léčiv

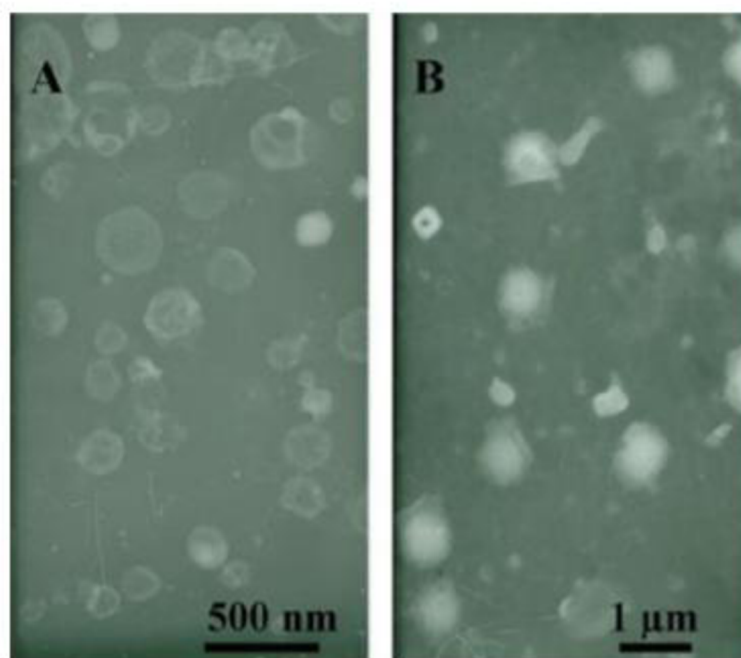
Thanou M. a spol. se zabývali ve své studii polymerem *N,N,N* - trimethylchitosanem (TMC) s různým stupněm kvartenizace (20, 40 a 60 %) v koncentraci 1,0 % (hm./obj.). TMC je schopný zvyšovat absorpci makromolekul paracelulární cestou přes slizniční epitel díky otevírání těsných spojů. Předmětem zkoumání v této studii byla bezpečnost TMC s různým stupněm kvartenizace zvyšujících absorpci, konkrétně byly provedeny studie cytotoxicity a ciliotoxicity (schopnost látek, např. tabákového kouře, zhoršovat činnost řasinek respirační sliznice). Pro studium možných účinků těchto polymerů na poškození membrány byly vybrány intestinální monovrstvy Caco-2 buněk. Vizualizace paracelulárního transportu byla provedena pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie díky jadernému barvení membránově nepropustnou fluorescenční sondou (Texas červený dextran (MW 10 000)) během transportu paracelulárního markeru. Pro studium vlivu polymerů na frekvenci ciliárního rytmu (CBF) *in vitro* byla použita tkáň průdušnice s řasinkami. TMC aplikovaný na buňky Caco-2 nezpůsobil detekovatelné poškození buněčné membrány, zatímco účinek v rámci *in vitro* CBF testu byl shledán jako mezní. Dále bylo zjištěno, že TMC60 a TMC40 zvyšují paracelulární transport texaského červeného dextranu v monovrstvách buněk Caco-2, zatímco TMC20 je neúčinný. Závěrem lze říci, že TMC s vysokým stupněm kvartenizace mohou být účinnou a bezpečnou látkou zvyšující absorpci při dodávání peptidů a proteinů [63].



Obr. 14: Snímky svislých řezů přes monovrstvy buněk Caco-2 z konfokální laserové skenovací mikroskopie. A: Buňky pouze s fluorescenčními markery Texas red dextran 10 000 B: Buňky s dodatečně přidaným 1,0% (hm./obj.) TMC60, kde lze vidět paracelulární přítomnost texaského červeného dextranu 10 000 Da [63].

Huanlei Chen a spol. se ve své práci zabývali inkorporací kurkuminu do liposomů potažených *N*-trimethylchitosanem (TMC). Kurkumin (CUR) je hydrofobní polyfenolová sloučenina, která se přirozeně vyskytuje a následně izoluje z oddenků kurkumy. Má řadu biologických a farmakologických vlastností. Jeho účinky mohou být protinádorové,

antioxidační, antiartritické, antibakteriální, hypocholesterolemické a protizánětlivé. Kromě toho se také uvádí, že kurkumin je účinnou látkou působící proti Alzheimerově chorobě a viru lidské imunodeficiency. Kurkumin má obrovský potenciál jako účinná terapeutická látka s tolerovatelnými vedlejšími účinky, ale jeho aplikaci brání špatná absorpce kvůli nízké rozpustnosti ve vodě (11 ng/ml v čistém vodném pufru; pH 5), rychlý metabolismus a eliminace kurkuminu. Vše vede k relativně nízké biologické dostupnosti při perorálním podávání, což omezovalo použití CUR v klinickém prostředí. Cílem této studie bylo studovat a vyhodnotit vlastnosti uvolňování *in vitro* a *in vivo* sledovat farmakokinetiku a biologickou dostupnost liposomů potažených TMC s inkorporovaným kurkuminem u potkanů. Studie uvolňování *in vitro* ukázala, že liposomy potažené TMC s kurkuminem vykazují vlastnosti prodlouženého uvolňování ve srovnání s roztokem CUR v propylenglykolu. Ve farmakokinetických studiích *in vivo* vykazovaly liposomy potažené TMC s kurkuminem významně zvýšenou absorpci a biologickou dostupnost ve srovnání s nepotažovanými liposomy s CUR a suspenzí CUR. Závěrem lze říci, že liposomy potažené TMC jsou slibným systémem pro perorální dodávání léčiv, které jsou ve vodě málo rozpustné podobně jako kurkumin [64].

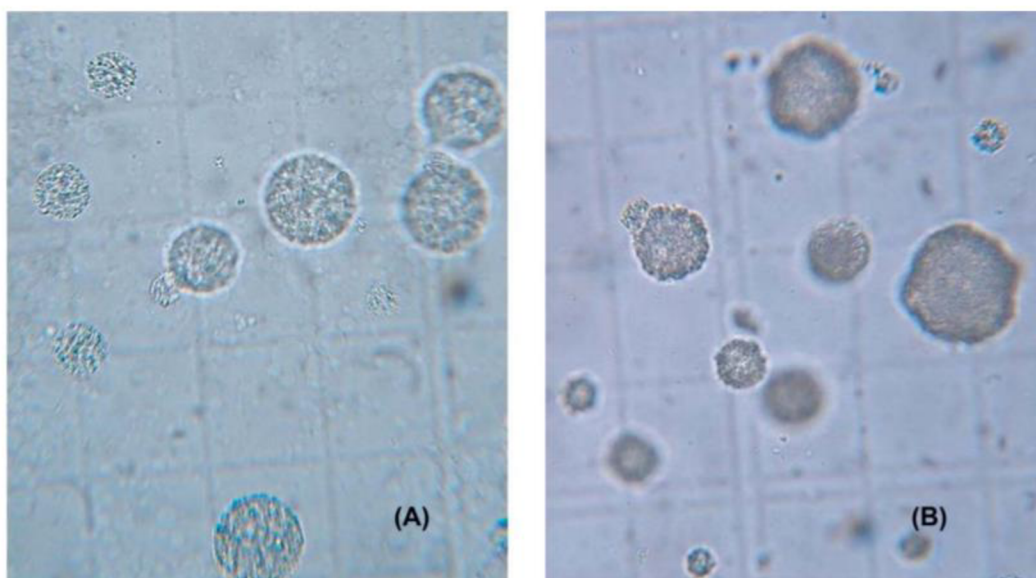


Obr. 15: Liposomy s inkorporovaným kurkuminem (A) a liposomy potažené TMC s kurkuminem (B) na snímcích z TEM [64].

Cao Jinna a spol. studovali multivezikulární liposomy, potažené a nepotažené trimethylchitosanem, z hlediska jejich použití pro podávání léčiva perorální cestou. Multivezikulární liposomy (MVL) jsou vhodnými systémy pro zapouzdření ve vodě rozpustných léčiv a následnému doručení těchto léčiv do místa účinku, díky svému vysokému vodnému objemu. V této studii bylo do multivezikulárních liposomů inkorporováno modelové léčivo oxymatrin (OM), přírodní chinolizidinový alkaloid klinicky používaný k léčbě hepatitidy B. Při perorálním podávání OM je však jeho biologická dostupnost nízká, a proto se pokusili vyvinout MVL systém pro orální podávání OM, s jeho zlepšenou absorpcí díky TMC. Výsledkem studie je nasyntetizovaný TMC, který byl charakterizován infračervenou

spektroskopií odhalující přítomnost trimethylových skupin a protonovou nukleární magnetickou rezonanční spektroskopií, která umožňuje navíc i výpočet stupně substituční kvaternizace (70,2 %). Dále se jim podařilo připravit povrchově modifikované MVL a nepotažené MVL (obr. 16) a charakterizovat je *in vitro* z hlediska jejich tvaru, velikosti, zeta potenciálu, účinnosti zachycení, účinnosti potahování, stability MVL v polymerní suspenzi a stability v simulovaných žaludečních a střevních tekutinách [65].

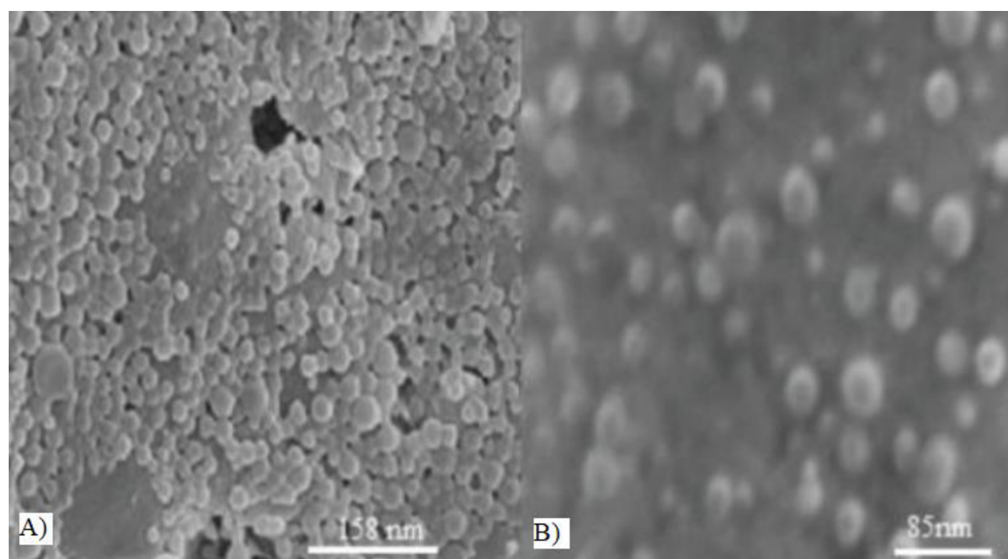
In vitro studie potvrdily, že MVL potažené TMC mohou zvýšit stabilitu MVL v kyselém roztoku ve srovnání s nepotaženými MVL. *In vivo* byla zkoumána farmakokinetika po perorálním podání roztoku OM, nepotahovaných MVL a MVL potažených TMC. U MVL potažených TMC byla stanovena přibližně 3,26krát a 1,96krát vyšší účinná koncentrace léčiva než u OM roztoku a nepotažených MVL. Vzhledem k významnému zvýšení účinné koncentrace léčiva, lze považovat MVL potažené TMC za účinné nosiče léčiv pro perorální podávání [65]



Obr. 16: Mikroskopické snímky nepotažených MVL (A) a MVL potažených TMC (B) při 400násobném zvětšení pořízených světelným mikroskopem [65].

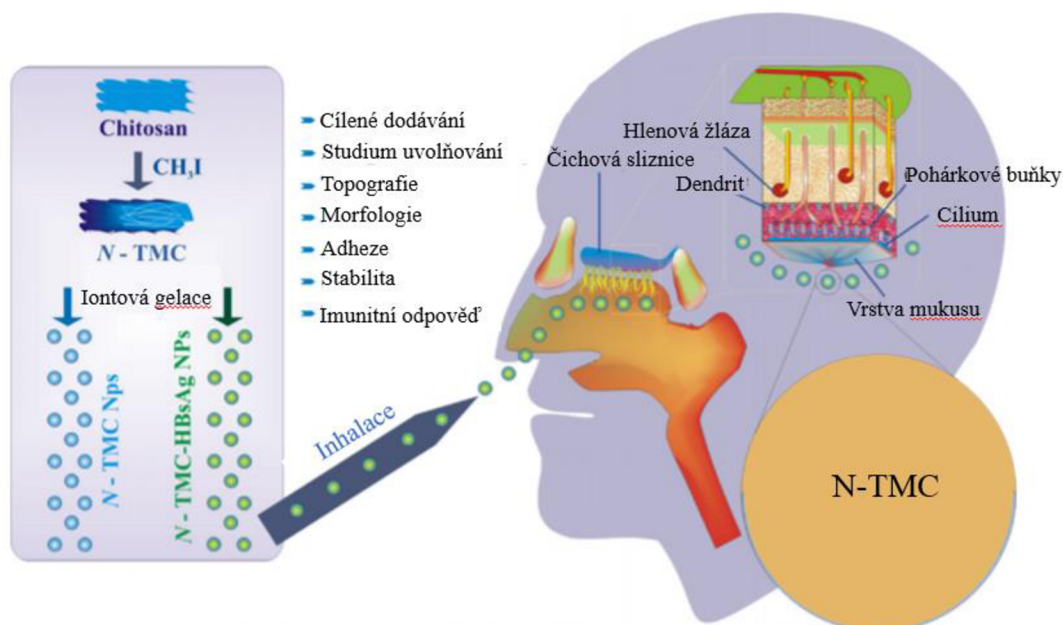
Asma Farhadian a spol. se ve své práci zabývali inkorporací antigenu proti hepatitidě B (HBsAg) do polymerních nanočástic. Nanočástice s inkorporovaným HBsAg byly vyrobeny iontovou gelací pozitivně nabitého kvartenizovaného TMC (50,9 %) s negativně nabitým polymerem hydroxypropylmethylcelulózoftalátem (HPMCP) citlivým na pH, konkrétně byl roztok HPMCP (1 mg/ml) přidán k roztoku TMC (1 mg/ml), který obsahoval různé koncentrace HBsAg (100, 300 500, 700 a 1000 $\mu\text{g/ml}$). V této práci byla studována velikost částic a jejich morfologie, zeta potenciál, účinnost inkorporace, chování nanočástic při uvolňování *in vitro* a v neposlední řadě také aktivita zavedeného antigenu. Velikost optimalizovaných nanočástic TMC/HPMCP s inkorporovaným antigenem byla 158 nm. Optimální kapacity nanočástic (76,75 %) a účinnosti inkorporace (86,29 %) bylo dosaženo při koncentraci antigenu 300 $\mu\text{g/ml}$. Díky snímkům ze SEM, bylo odhaleno, že nanočástice mají sférický tvar i hladký a téměř homogenní povrch. Výsledky studií uvolňování *in vitro* ukázaly, že nanočástice složené z HPMCP a TMC byly stabilní a chránily inkorporovaný antigen

v kyselém pH (prostředí žaludku) a rychle se rozpustily a uvolnily antigen v simulovaném střevním prostředí (zásadité pH). Antigen vykazoval dobrou aktivitu před i po inkorporaci, a proto by bylo možné nanočástice TMC/HPMCP použít k perorálnímu podání HBsAg [66].



Obr. 17: Snímky ze SEM nanočástic TMC/HPMCP s inkorporovaným HBsAg (A) a snímky ze SEM prázdných nanočástic TMC/HPMCP (B) [66].

Ramesh Subbiah a spol. studovali ve své práci přípravu *N, N, N*-trimethylchitosanových nanočástic (TMC NP) s inkorporovaným antigenem viru hepatitidy B (HBsAg) a jejich použití jako systému pro kontrolované podávání léků v horních dýchacích cestách. K syntéze TMC NP byla použita metoda iontové gelace, která je považována za jednu z nejlepších metod pro přípravu nanočástic obsahujících antigeny. Velikost a povrchové vlastnosti nanočástic byli upraveny pomocí koncentrace TMC (0,25 % hm. a 0,5 % hm.). Velikost nanočástic s 0,25 % hm. TMC byla stanovena na 66 ± 13 nm, a 76 ± 9 nm s 0,5 % hm. TMC. Do nanočástic byl inkorporován antigen (380 a 760 $\mu\text{g/ml}$) a bylo zjištěno, že velikost částic naplněných NP závisí na koncentraci antigenu. Celková velikost TMC NP byla 43 ± 33 nm (380 $\mu\text{g/ml}$) a 259 ± 47 nm (760 $\mu\text{g/ml}$). Výsledky práce ukazují možnost začlenit velké množství HBsAg do NP připravených pomocí TMC díky vysoké účinnosti inkorporace HBsAg (90–93 %) a velmi dobré optimální kapacitě nanočástic (96–97 %). Dále byla provedena *in vitro* analýza uvolňování léčiva a prokázala, že HBsAg byl stabilní v uvolňovacím médiu 0,1 M PBS pH 7,4 po dobu 42 dnů a naznačují, že 92 % nanoseného HBsAg bylo do té doby uvolněno. Imunologická studie *in vivo* byla provedena na myších BALB starých 6 až 8 týdnů a ukazuje, že účinnost adjuvans pro HBsAg je vysoce stabilní. Dalším důležitým faktorem pro intranasální podání TMC NP je prodloužená doba nanočástic v nosu, trvalé terapeutické uvolňování s významným uvolňováním v počátečních 24 hodinách. Data uvedená v této studii dokazují, že TMC NP mohou být široce používány pro intranasální dodávání terapeutik pro prevenci a léčbu onemocnění, jako je alergická rýma, astma a chronická obstrukční plicní nemoc, nebo pro vakcinaci proti hepatitidě B [67].



Obr. 18: Schématický diagram studie představuje syntézu TMC NP, inkorporaci HBsAg a intranasální dodávání TMC NP obsahujících HBsAg [67].

3.2 Inkorporace nízké a vysokomolekulárních látek do liposomů pro inhalační a gastrointestinální podání

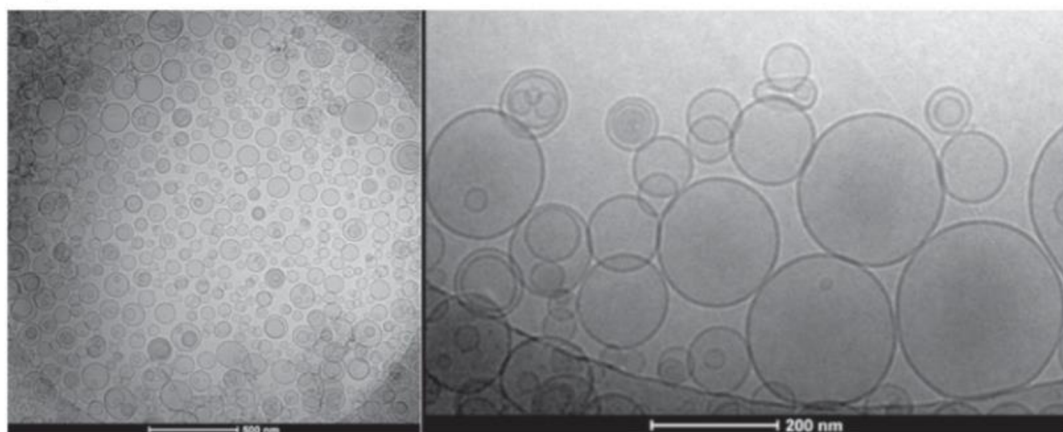
Kazunori Iwanaga a spol. ve své práci zkoumali účinnost povrchového potahování liposomů některými materiály pro orální podávání peptidových léčiv, kvůli nestabilitě liposomů v GIT traktu (jsou snadno degradovány žlučovými solemi, protože interagují s liposomy jako povrchově aktivními látkami). V této studii byl inzulin jako modelová látka inkorporován, pro povrchovou úpravu liposomů byl použit mucin a polyethylenglykol. Liposomy byly připraveny smícháním a rozpuštěním DPPC, cholesterolu a povrchových potahovacích materiálů (cetylmucin) v chloroformu. Odpařením těkavého rozpouštědla na rotační odparce vznikl lipidový film, který se dále sušil ve vakuu po dobu 8 hodin, aby se úplně odstranilo rozpouštědlo. Poté byl lipidový film hydratován fosfátovým pufrům (PBS, pH 7,4) obsahujícím inzulin. Po třech cyklech zmrazování a rozmrazování byla liposomální suspenze zředěna PBS k úpravě koncentrace lipidů. Neinkorporovaný inzulin byl odstraněn centrifugací při 15 000 otáčkách po dobu deseti minut. Tento postup nebyl proveden v případě experimentu orálního podávání *in vivo*, aby byla zachována přesnost dávky inzulinu. Účinnost zachycení inzulinu byla 20–40 % pro všechny liposomy. *In vitro* uvolňování inzulinu jako modelového peptidu, z liposomů v roztoku žlučových solí bylo výrazně sníženo potažením povrchu částí mucinového řetězce (Mucin-Lip) nebo polyethylenglykolem (PEG-Lip). Zapouzdření inzulinu do Mucin-Lip a PEG-Lip zcela potlačilo degradaci inzulinu ve střevní tekutině, zatímco nepotažené liposomy ji potlačily pouze částečně. PEG-Lip a Mucin-Lip dále způsobovaly po podání postupné snižování hladiny glukózy, tzn. že, hypoglykemický účinek PEG-Lip trval mnohem déle než u nepotažených liposomů. Tyto výsledky prokázaly, že povrchové potahování liposomů PEG nebo mucinem zvýšilo jejich stabilitu v GI traktu, odolnost vůči trávení

žlučovými solemi, a proto by mělo být povrchové potahování liposomů potenciálním nástrojem pro perorální podávání peptidových léčiv [68].

Tým **Briscoe P. a spol.** se zabýval dodáváním superoxiddismutázy (SOD) do plicního epitelu prostřednictvím liposomů citlivých na pH. Respirační nedostatečnost při léčbě kyslíkem nebo vystavení různým plicním toxinům může způsobit poškození plic v důsledku zvýšené produkce kyslíkových radikálů. Enzymy, jako je superoxiddismutáza (SOD), mohou tento patologický proces utlumit, ale intracelulárnímu dodání a antioxidačnímu účinku SOD brání jeho neschopnost procházet buněčnými membránami. Jedním z přístupů pro usnadnění intracelulárního dodávání makromolekul je zachycení SOD do liposomů. Dodání SOD do plicních buněk bylo provedeno pomocí liposomů citlivých na pH, vyrobených z 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolaminu (DOPE) a 1-oleoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-sukcinátu (DOSG), přidané ke kultivovaným buňkám plicního distálního epitelu (FRLE) potkana. Buňky FRLE, získané z plodů v 19. den těhotenství, exprimovaly vysokoafinitní receptor pro povrchově aktivní protein A (SP-A). Tento receptor byl použit pro zacílení liposomů na buňky po začlenění SP-A během tvorby liposomové membrány. Připravené liposomy měly velikost 180 ± 77 nm a jejich enkapsulační účinnost byla 10 ± 4 %. Tyto liposomy byly stabilní při 4 °C po dobu 1 týdne. Po inkubaci liposomů citlivých na pH obsahujících enkapsulovaný SOD s kultivovanými buňkami FRLE byla aktivita SOD spojená s buňkami zvýšena 5,1krát. Začlenění SP-A do liposomů zvýšilo dodání liposomálního SOD do buněk šestinásobně. Tato data naznačují, že k absorpci SP-A pH-senzitivních SOD liposomů plicními buňkami dochází částečně prostřednictvím procesu zprostředkovaného receptorem, který slouží ke zvýšení buněčné antioxidační obrany [69].

Zhipan Wu a spol. studovali přípravu nanoliposomů s inkorporovaným enzymem lysozymem. Tento enzym způsobuje hydrolyzu buněčné stěny bakterií, což zvyšuje její propustnost a způsobuje lýzu buněk. Hlavním účelem této studie bylo optimalizovat přípravu nanoliposomů s inkorporovaným lysozymem a stanovit jejich stabilitu v simulované gastrointestinální tekutině (SGF), simulované intestinální tekutině (SIF), stabilitu při určitém pH, teplotě a době působení ultrazvuku. Liposomy byly připraveny z fosfatidylcholinu a cholesterolu pomocí metody odpařování s reverzní fází, protože díky této metodě, byli schopni zapouzdřit velké makromolekuly a účinnost zapouzdření byla vysoká. Předmětem studie bylo stanovit optimální podmínky pro přípravu liposomů jako je vliv poměru fosfatidylcholinu k cholesterolu, koncentrace lysozymu, doba magnetického míchání a doba trvání ultrazvuku. Optimální podmínky pro přípravu byly následující: poměr fosfatidylcholinu k cholesterolu stanovili na 3,86, koncentraci lysozymu na 1,96 mg/ml, dobu magnetického míchání na 40,61 min a dobu trvání ultrazvuku na 14,15 min. Při optimálních podmínkách přípravy nanoliposomů bylo zjištěno, že účinnost zapouzdření je $75,36 \% \pm 3,20 \%$ a velikost částic $245,6 \text{ nm} \pm 5,2 \text{ nm}$. Dále nanoliposomy s inkorporovaným lysozymem vykazovaly přijatelnou stabilitu při určitém pH, teplotě a době působení ultrazvuku. Kromě toho byla měřena i stabilita nanoliposomů v SGF a SIF. Nanoliposomy lysozymu prokázaly určitou stabilitu v SGF a SIF při teplotě 37 °C po dobu 4 hodin. Výsledky naznačují, že připravené a optimalizované nanoliposomy s inkorporovaným lysozymem byly stabilní a mohou být vhodné pro budoucí výzkum v oblasti dodávání léčiv do organismu [70].

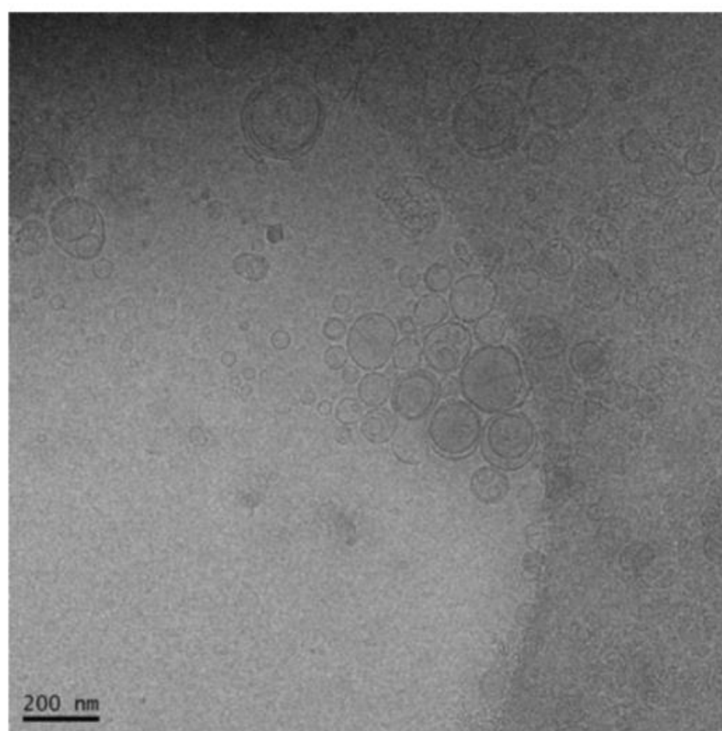
Maciej Lukawski a spol. se zabývali ve své studii inkorporací vitamínu C do liposomů. Bylo prokázáno, že je prospěšné zvyšovat dávku vitamínu C v průběhu onkologických terapií, během léčby kožních onemocnění, při snižování účinků cévní mozkové příhody nebo při eliminaci určitých poruch trávicího systému. Účinné perorální podávání vitamínu C vyžaduje snížení rychlosti jeho degradace ve střevě a usnadnění jeho absorpce. Vitamin C se obvykle podává orálně v krystalické formě nebo jako roztok, díky čemuž je citlivý na degradaci v gastrointestinálním traktu, zejména v přítomnosti kovových iontů. Degradaci vitamínu C lze účinně snížit jeho spojením s liposomy. Liposomální formulace vitamínu C byla připravena s použitím farmakologicky přijatelného glycerinu jako rozpouštědla pro lipidy. Další jedinečnou vlastností formulace byl vysoký obsah lipidů (více než 20 % hm.), protože vede k vysoké účinnosti zapouzdření. Liposomy byly formulovány smícháním dvou rozpouštědel: lipidů obsahujících glycerin (1:1) a vodného roztoku obsahujícího kyselinu askorbovou (20 % hm./hm). Liposomy byly vytvořeny spontánně po smíchání. Následně byla u liposomů měřena velikost a polydisperzita. Obsah vitamínu C v liposomech byl stanoven pomocí HPLC vybavené detektorem UV-VIS. Výsledkem studie je časově stabilní liposomální formulace s ohledem na chemické složení a fyzikálně-chemické vlastnosti. Při hodnocení účinnosti formulace se ukázalo, že pokud je určitá koncentrace kyseliny askorbové v zažívacím traktu udržována po dostatečně dlouhou dobu, bude dosažena a zachována vysoká úroveň absorpce. Dalším důležitým aspektem liposomové formulace je možnost dodávat vysoké dávky vitamínu C po delší dobu, protože lipidová tobolka zmírňuje podráždění gastrointestinálního traktu, typicky doprovázející velké perorální dávky kyseliny askorbové. Následně byla biologická dostupnost formulace prokázána v lékařském experimentu na zdravých dobrovolnících, kde liposomální vitamin C překonává tradiční formu s ohledem na maximální koncentraci i poločas v séru. Dalším důležitým rysem předkládané formulace je to, že proces tvorby liposomů nevyžaduje toxická organická rozpouštědla, protože byl místo nich použit farmakologicky přijatelný glycerin. Tato práce ukázala, že zapouzdření vitamínu C do nových typů liposomů způsobuje zvýšení biologické dostupnosti vitamínu C na fyziologické úrovni a udržuje jeho účinnost na buněčné úrovni [71].



Obr. 19: Snímky liposomů získané pomocí kryo-TEM mikroskopie s nízkým (levý obrázek) a vysokým (pravý obrázek) rozlišením [71].

Tým **Farhang B. a spol.** se zabýval ve své studii charakterizací nanoliposomů připravených z mléčných fosfolipidů pomocí mikrofluidizace a hodnocením jejich enkapsulační účinnosti

pomocí kyseliny askorbové jako modelové biomolekuly. Ačkoli se liposomy obecně získávají z fosfolipidů ze sóje nebo vajec, v posledních letech vzrůstá zájem o zdravotní přínosy a funkční vlastnosti fosfolipidů z membránových derivátů mléčných tuků (MFGM). Mléčné fosfolipidy lze extrahovat z řady vedlejších produktů, jako je např. podmásli. Příprava nanoliposomů s enkapsulovanou kyselinou askorbovou spočívala v dispergaci ve vodném pufru. Disperze složená z imidazolu (20 mM), chloridu sodného (50 mM), azidu sodného (0,02 %) jako bakterostatického činidla a kyseliny askorbové (1 % hm./hm.) byla důkladně promíchána při 7 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Fosfolipidová disperze byla poté pětkrát protlačena pomocí mikrofluidizéru. Liposomy připravené mikrofluidizací z mléčných fosfolipidů byly unilamelární a měly průměr asi 100 nm. Bezprostředně po přípravě liposomů bylo měřeno množství zapouzdřené kyseliny askorbové (enkapsulační účinnost), které bylo stanoveno na 26 %. Další výsledky ukázaly, že disperze je méně stabilní při skladování při pH 3 ve srovnání s pH 7. Po 7 týdnech skladování při 4 °C a pH 3 a pH 7 si liposomy zachovaly 67 % původně zapouzdřené kyseliny askorbové, zatímco pouze 30 % vitamínu C zůstalo inkorporováno při skladování při 25 °C. Předkládaná práce prokázala, že pomocí mikrofluidizace je možné získat malé unilamelární liposomy z mléčných fosfolipidů, stabilní při neutrálním pH a chránící kyselinu askorbovou po dobu nejméně 7 týdnů [72].



Obr. 20: Snímek nanoliposomů obsahujících kys. askorbovou pořízený pomocí KRYO-TEM [72].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

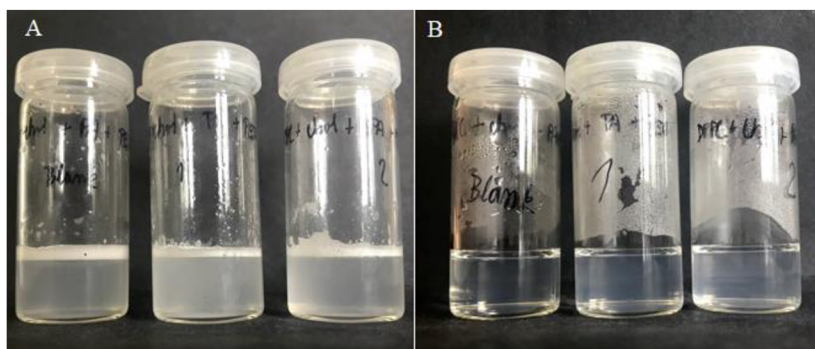
4.1 Použité chemikálie

Kyselina L-askorbová	Sigma Aldrich č. šarže: BCCD2467 CAS: 50-81-7
Dipalmitoylfosfatidylcholin	Avanti Polar Lipids, Inc. č. šarže: 160PC-319 CAS: 63-89-8
Cholesterol	Sigma Aldrich č. šarže: BCBK3087V CAS: 57-88-5
Kyselina fosfatidová	Avanti Polar Lipids, Inc. č. šarže: 840635P-200MG-A-024 CAS: 108321-06-8
Polyethylenglykol	Avanti Polar Lipids, Inc. č. šarže: 880200P-200MG-B-059 CAS: 474922-84-4
Isopropylalkohol	Lach-Ner, s.r.o. č. šarže: PP/2014/07814 CAS: 67-63-0
Chloroform	PENTA č. šarže: 2107210716 CAS: 602-006-00-4
Methanol	Sigma Aldrich č. šarže: SZBD067SV CAS: 67-56-1
Bromelain	Sigma Aldrich č. šarže: BCBW0568 CAS: 37189-34-7
Vínan sodno-draselný tetrahydrát	Lach-Ner, s.r.o. č. šarže: PP/2020/05263 CAS: 6100-16-9
Uhlíčan sodný	Lachema, a.s. č. šarže: 30686 0701 CAS: 497-19-8

Hydroxid sodný	PENTA č. šarže: 1905160514 CAS: 011-002-00-6
Síran měďnatý pentahydrát	Lach-Ner, s.r.o. č. šarže: PP/2014/10476 CAS: 7758-99-8
Folin-Ciocalteuovo činidlo	VWR Chemicals č. šarže: 20F264006 CAS: 31360.264
Hovězí sérový albumin	Sigma Aldrich č. šarže: SLBQ6589V CAS: 9048-46-8
Trimethylchitosan (střední molekulová hmotnost, stupeň kvartenizace: 40 - 60 %)	Sigma Aldrich č. šarže: MKCM0761 CAS: 52349-26-5
Deionizovaná voda	Milipore, Purelab: ELGA

4.2 Příprava vezikul

Pro enkapsulaci nízko (vitamín C) a vysokomolekulových (bromelain) látek byly použity liposomy s různým složením. Složení liposomů bylo inspirováno diplomovou prací Ing. Jany Szabové [1]. Hlavní složkou liposomů je dipalmitoylfosfatidylcholin (DPPC), jehož zásobní roztok v chloroformu byl připraven tak, aby ve finálním liposomálním systému byla jeho koncentrace 1 mM. K dipalmitoylfosfatidylcholinu byl postupně přidáván cholesterol pro stabilizaci vezikul, kyselina fosfatidová (PA) zajišťující záporný náboj a polyethylenglykol (PEG₅₀₀₀-PE) zajišťující „stealth“ vlastnosti liposomu. Tyto látky byly přidávány v takovém množství, aby ve výsledném objemu 3 ml tvořily u cholesterolu 30 mol. %, u PA 30 mol. %, a u PEG₅₀₀₀-PE 6 mol. % z celkového množství fosfolipidů. Příprava vzorků se skládala z navážení potřebného množství jednotlivých komponent samostatně nebo jejich kombinace do čistých a suchých vialek. Poté bylo navážené množství látek zalito 300 µl zásobního roztoku DPPC v chloroformu. Ke vzorkům, které obsahovaly kyselinu fosfatidovou bylo přidáno ještě 50 µl methanolu z důvodu její lepší rozpustnosti. Chloroform byl volně odpařen a na dně vialek vznikl fosfolipidový film, který byl rehydratován zásobním roztokem vitamínu C o koncentraci $1 \cdot 10^{-2}$ mol, roztokem enzymu o koncentraci 1 mg/ml a deionizovanou vodou (blank). Poté byly vzorky promíchány na vortexu a podrobeny sonifikaci. Sonifikace u vzorků, které obsahovaly DPPC, cholesterol a kyselinu fosfatidovou nebo jejich kombinaci, byla provedena pomocí ultrazvukové sondy (model HD 3 200, Bandelin Electronic GmbH & Co. KG) při amplitudě 30 % a přidáním 3 kJ a 5 kJ (DPPC s cholesterolem). U vzorků, které obsahovaly PEG₅₀₀₀-PE byla sonifikace provedena v ultrazvukové vodní lázni (model DT 31 H, Bandelin Electronic GmbH & Co. KG) při teplotě 65 °C po dobu 15 min (obr. 21). Důvodem bylo to, že u sonifikace sondou nedocházelo k vmezezení PEG₅₀₀₀-PE do liposomů, ale k tvoření micel. Takto připravené vzorky byly následně proměřeny na DLS a ELS.



Obr. 21: Vliv sonifikace ve vodní lázni na vzorky stealth liposomů. A: vzorky před sonifikací, B: vzorky po sonifikaci.

4.3 Příprava vezikul s TMC

Trimethylchitosan byl zkombinován se stealth liposomy, které byly připraveny z dipalmitoylfosfatidylcholinu, cholesterolu, kyseliny fosfatidové a polyethylenglykolu, stejným postupem, který je uveden v odstavci 4.2. U takto připravených stealth liposomů byla změřena jejich velikostní distribuce a zeta potenciál. Poté byl připraven zásobní roztok trimethylchitosanu o koncentraci 0,1 %, navážením přesného množství TMC do čisté a suché vialky a zalitím odpovídajícím množstvím deionizované vody. Připravený zásobní roztok TMC byl míchán na magnetické míchačce do úplného rozpuštění TMC.

Příprava komplexu spočívala v přikapávání 2 ml roztoku trimethylchitosanu k 1 ml roztoku stealth liposomů, který byl neustále míchán (250 rpm) ve vodní lázni s ledem. Takto připravená směs byla ponechána ve vodní lázni s ledem a míchána 60 min. Po uplynutí 1 hodiny byly připravené vzorky komplexu proměřeny na DLS a ELS pro stanovení distribuce velikostí a zeta potenciálu.

4.4 Stanovení enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost (EE) byla stanovena pomocí metody UV-VIS spektrofotometrie, kdy byly nejprve připravené liposomy s vitamínem C i enzymem po změření na DLS podrobeny dialýze v dialyzačním střevě (cut-off 50 000 Da), při které byl odstraněn neenkapsulovaný vitamín C a enzym bromelain. Po dialýze byly liposomy rozrušeny izopropylalkoholem, aby došlo k uvolnění enkapsulovaných látek, a proměřeny na UV-VIS spektrofotometru. Bez použití isopropylalkoholu rušil měření na UV-VIS lehký zákal částic.

4.4.1 Stanovení enkapsulační účinnosti vitamínu C

Pro stanovení EE vitamínu C bylo nejprve nutné si připravit koncentrační řadu, pomocí které mohla být následně vypočítána EE vitamínu C. Koncentrační řada byla připravena ze zásobního roztoku vitamínu C o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ M, kdy bylo vypočítané množství kyseliny askorbové naváženo do suché a čisté odměrné baňky o objemu 100 ml. Odměrná baňka byla následně doplněna na požadovaný objem roztokem isopropylalkoholu (IPA) ku vodě v objemovém poměru 1:1. Dále byl roztok vitamínu C v přesném množství napipetován do suchých a čistých vialek dle koncentrační řady $1 \cdot 10^{-6}$ – $2,5 \cdot 10^{-5}$ M. Zbylý objem vialky byl doplněn na 5 ml pomocí roztoku IPA:H₂O v poměru 1:1. Nakonec byly všechny vialky zavíčkovány, promíchány na vortexu a proměřeny na UV-VIS spektrofotometru Hitachi U-3900H, 2J2-0032, kdy spektrum bylo snímáno v rozmezí vlnových délek od 200 do 400 nm. Maximum absorpce

u vzorků s enkapsulovaným vitamínem C bylo při vlnové délce 265 nm (inspirováno článkem [73]) při které byla odečtena absorbance a z ní byla sestavena kalibrační křivka a následně i vypočítána EE jednotlivých vzorků.

4.4.2 Stanovení enkapsulační účinnosti enzymu

Účinnost enkapsulace enzymu byla stanovena pomocí Hartree-Lowryho metody stanovení koncentrace bílkovin. Hartree-Lowryho metoda je spektrofotometrické stanovení, které je stanovitelné ve viditelné oblasti a principem je reakce proteinů s chemickou látkou a následné vytvoření chromoforů. Pro tuto metodu jsou potřeba 3 různá činidla, z nichž první dvě činidla se používají pro biuretovu reakci. Třetím je Folin-Ciocalteuovo činidlo, které je připraveno z polykyselin fosfomolybdenové a fosfowolframové. Polykyseliny jsou redukovány pomocí tyrosinových a tryptofanových zbytků v proteinech a vzniká modré zbarvení, které je detekováno při 650 nm [74].

Při stanovení Hartree-Lowryho metodou bylo přidáno k 1 ml liposomů rozrušených izopropylalkoholem a obsahujících bílkovinu 0,9 ml činidla A. Roztok byl inkubován ve vodní lázni při 50 °C po dobu 10 min. Po uplynulé lhůtě byl roztok ochlazen na laboratorní teplotu a bylo přidáno 0,1 ml činidla B. Roztok byl inkubován při laboratorní teplotě po dobu 10 min. Jako poslední krok byly k roztoku přidány 3 ml zředěného Folin-Ciocalteuova činidla a směs byla inkubována ve vodní lázni při 50 °C po dobu 10 min. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla u vzorků změřena absorbance při 650 nm [75].

Činidlo A je složeno z 0,2 g vlnanu sodno-draselného · 4 H₂O, 10 g Na₂CO₃, 50 ml 1 M NaOH a destilované vody, díky které doplníme objem na 100 ml.

Činidlo B je složeno z 2 g vlnanu sodno-draselného · 4 H₂O, 1 g CuSO₄ · 5 H₂O, 10 ml 1 M NaOH a destilované vody pro doplnění na 100 ml.

Činidlo C je zředěné Folin-Ciocalteuovo činidlo destilovanou vodou v poměru 1:15 [74].

Příprava koncentrační řady BSA

Koncentrační řada proteinu byla připravena pro stanovení enkapsulační účinnosti enzymu bromelainu navážením přesného množství hovězího sérového albuminu (inspirováno článkem [76]) do čistých a suchých vialek dle koncentrační řady 0,025 mg/ml – 0,375 mg/ml. Zbylý objem vialky byl doplněn na 4 ml deionizovanou vodou. Následně byl odebrán 1 ml roztoku enzymu každé koncentrace a smíchán s 1 ml isopropylalkoholu, aby bylo možné stanovit enkapsulační účinnost enzymu v liposomech, které se nejprve museli rozrušit. Poté už byla příprava kalibrační řady stejným postupem jako v kapitole 4.4.2 a následovalo proměření na UV-VIS spektrofotometru, kdy spektrum bylo snímáno v rozmezí vlnových délek od 300 do 800 nm.

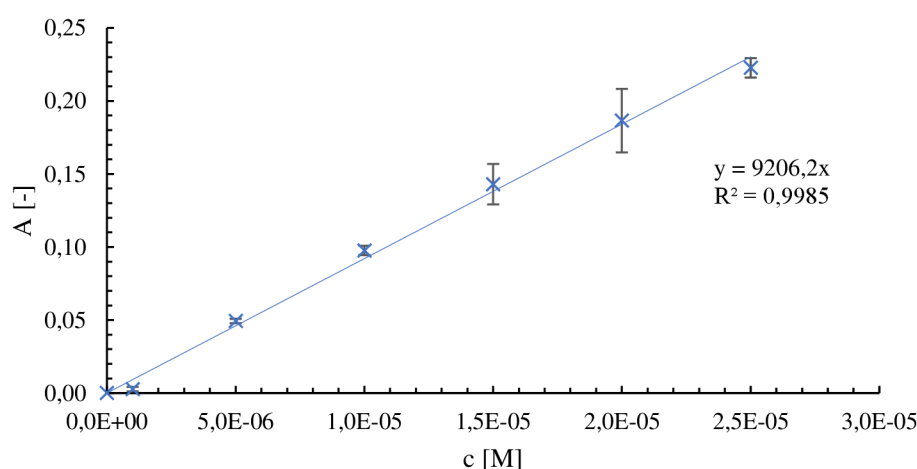


Obr. 22: Koncentrační řada vzorků s albuminem.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Enkapsulační účinnost

V této práci byla stanovena enkapsulační účinnost vysokomolekulárních (bromelain) a nízkomolekulárních (vitamín C) látek inkorporovaných do liposomů s různým složením (DPPC, kyselina fosfatidová, cholesterol, polyethylenglykol a TMC). Enkapsulační účinnost (EE) byla u liposomů složených z různých kombinací jednotlivých složek stanovena postupem popsáným v kapitole 4.4. Pro výpočet EE bylo nejprve nutné si připravit kalibrační křivku nízko a vysokomolekulárních látek a z ní získat rovnici regrese, pomocí které byla následně vypočítána účinnost enkapsulace jak vitamínu C, tak i enzymu. Na následujícím grafu (obr. 23) je na ukázkou znázorněna kalibrační křivka vitamínu C s rovnicí lineární regrese. Kalibrační křivka pro stanovení bromelainu je uvedena v přílohách (viz. Přílohy).



Obr. 23: Kalibrační křivka vitamínu C.

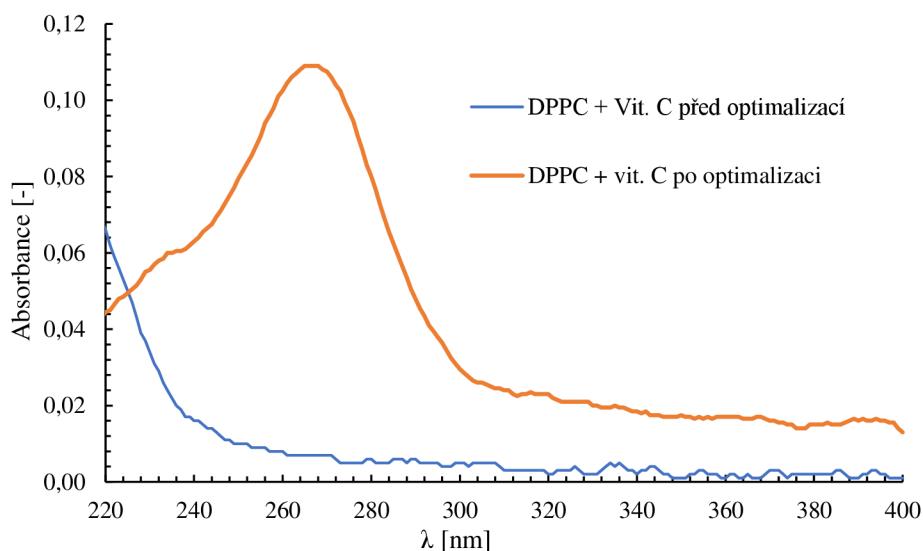
5.1.1 Stanovení enkapsulační účinnosti liposomů připravených z DPPC

Enkapsulační účinnost nízko a vysokomolekulárních látek byla nejprve sledována u částic, které byly připravené pouze z dipalmitoylfosfatidylcholinu o koncentraci 1 mM. U připravených vezikul byla také změřena velikost částic a zeta potenciál pomocí DLS a ELS. Střední velikost částic připravených pouze z DPPC byla stanovena na (102 ± 1) nm a její zeta potenciál na $(25,2 \pm 0,9)$ mV. Zeta potenciál nacházející se v kladných hodnotách můžeme vysvětlit tím, že vzniklé liposomy mají na svém povrchu pouze kladný náboj (cholinová skupina DPPC), kdy se pravděpodobně neprojevuje záporný náboj fosfátu, který je umístěn více uvnitř částice.

Jako nízkomolekulární látku vhodnou k inkorporaci do liposomů jsme zvolili roztok vitamínu C o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ M (inspirováno článkem [77]). U částic s inkorporovaným vitamínem C byla střední velikost liposomů stanovena na (92 ± 7) nm a zeta potenciál na $(27,9 \pm 1,5)$ mV, což se významně neliší od samotných liposomů a proto můžeme říci, že přídavek vitamínu C nemá vliv na velikost částice či na jejich formulaci.

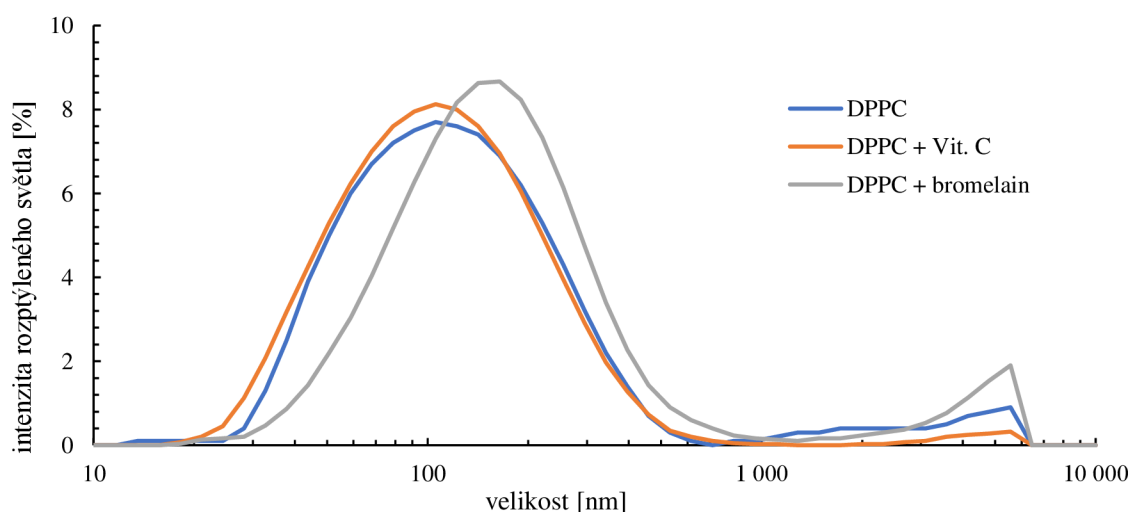
Při měření absorpčního spektra vitamínu C jsme narazili na problém – nebyla vidět absorpce vitamínu C s typickým maximem u 265 nm (maximum absorpce 265 nm je inspirováno článkem [73]). Po zjištění, že v této oblasti mohou absorbovat i jiné látky jako např. fosfatová

skupina (DPPC) jsme jako blank používali prázdné liposomy (pro odfiltrování nežádoucích absorbcí ze spektra) oproti původní vodě. Koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ M vitamínu C pro enkapsulaci se ukázala jako nedostačující, protože naměřená absorbance vitamínu C uvolněného z liposomů proti blanku na spektrofotometru byla velmi nízká, proto jsme se rozhodli koncentraci roztoku vitamínu C zvýšit na $1 \cdot 10^{-2}$ M. Na obr. 24 lze vidět rozdíl před optimalizací metody (použití deionizované vody jako blank a nízké koncentrace vitamínu C) a po optimalizaci. Tato optimalizace byla dále využita i v dalších experimentech přípravy vezikul.



Obr. 24: Graf závislosti absorbance vzorku DPPC s inkorporovaným vitamínem C na vlnové délce.

Jako vysokomolekulární látku vhodnou k inkorporaci do liposomů jsme zvolili roztok enzymu bromelainu o koncentraci 1 mg/ml (inspirováno článkem [76]). U liposomů s inkorporovaným bromelainem se nám podařilo připravit částice o velikosti (144 ± 10) nm se zeta potenciálem $(24,2 \pm 1,7)$ mV. Můžeme si všimnout, že v porovnání s prázdnými liposomy, došlo ke zvětšení částic o více než 30 nm (obr. 25). Důvodem může být navázání enzymu na povrch liposomů a/nebo ovlivnění samotné formulace liposomů díky přítomnosti bromelainu ([78]). Vzhledem k žádné výrazné změně zeta potenciálu je spíše pravděpodobná druhá varianta.



Obr. 25: Srovnání distribuce velikosti částic u připravených liposomů z DPPC.

Účinnost enkapsulace vitamínu C byla stanovena spektrofotometricky postupem popsaným v kapitole 4.4.1. Enkapsulační účinnost enzymu byla zjišťována pomocí Hartree-Lowryho metody stanovení koncentrace bílkovin popsané v kapitole 4.4.2. Jako blank byl zvolen prázdný lipozomální systém pro obě měření. V tab. 3 jsou uvedeny enkapsulační účinnosti vitamínu C a bromelainu inkorporovaných do částic složených pouze z dipalmitoylfosfatidylcholinu. Z tab. 3 je patrné, že EE vitamínu C je velmi nízká. Je to z důvodu toho, že vitamín C je hydrofilní látka a ty nemají tendenci jít z okolního vodného prostředí do hydrofilního (vodného) jádra oproti látkám hydrofobním, kdy jediné hydrofobní prostředí se nachází ve fosfolipidové dvojvrstvě. Dále z ní lze vyčíst, že lépe se do liposomů enkapsuloval enzym bromelain s účinností více než 50 % ve srovnání s vitamínem C. Je to dáno vlivem vázání enzymu nejen do hydrofilního jádra, ale pravděpodobně i na povrch liposomů, což dokazuje i měření DLS. Dalším důvodem, proč je EE tak vysoká může být obsah hydrofobních částí enzymu a je tedy možné, že se částečně enkapsuloval i do hydrofobní dvojvrstvy.

Tab. 3: Enkapsulační účinnost částic z DPPC.

	Enkapsulační účinnost [%]
Vitamín C	0,31 ± 0,02
Bromelain	52,79 ± 2,42

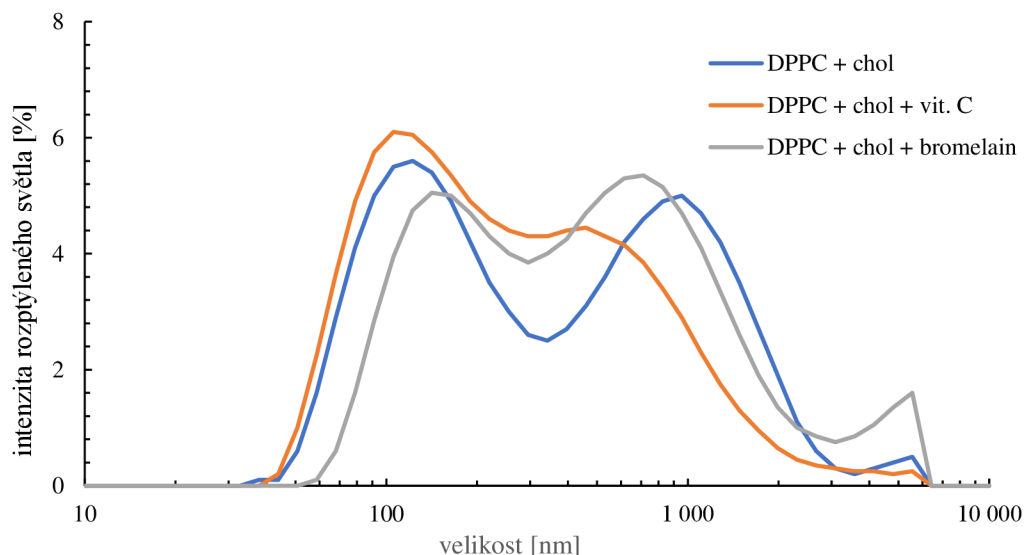
5.1.2 Vliv cholesterolu na enkapsulační účinnost

Pro zvýšení stability částic díky zvýšení tuhosti membrány byl dipalmitoylfosfatidylcholin zkombinován s cholesterolem v takovém množství, aby ve výsledném objemu tvořil 30 mol. %. Po přidavku cholesterolu se nám podařilo připravit částice o velikosti (227 ± 1) nm a zeta potenciálu ($5,0 \pm 2,1$) mV. U systému, do kterého byl přidán cholesterol se zeta potenciál pohyboval v kladných hodnotách v nestabilní oblasti. V porovnání s vezikulami připravenými pouze z dipalmitoylfosfatidylcholinu došlo ke zvětšení částic a snížení ZP z důvodu zvýšení průměrné plochy hlavní skupiny fosfolipidů a vystavení záporného náboje fosfátu a tím došlo ke změně orientace hlavní skupiny a molekul vody. Můžete tedy říci, že díky snížení ZP (menší elektrostatický náboj mezi liposomy) docházelo ke spojování částic a díky tomu vznikaly větší struktury a zvětšila se střední velikost [79]. Tento jev můžeme potvrdit i vznikem zákalu v roztoku částic z DPPC a cholesterolu, který je vidět na obr. 26.



Obr. 26: Vizuální vliv přidání cholesterolu. A: Liposomy připravené pouze z DPPC. B: Liposomy s přidavkem cholesterolu.

Střední velikost u částic s inkorporovaným vitamínem C byla stanovena na (185 ± 1) nm a zeta potenciál na $(7,3 \pm 0,2)$ mV a u vezikul s inkorporovaným bromelainem byla střední velikost stanovena na (323 ± 77) nm a zeta potenciál $(9,2 \pm 0,1)$ mV (obr. 27). Opět si můžeme všimnout, že velikost liposomů s inkorporovaným enzymem je mnohem větší, a to z důvodu navázání enzymu i na povrch liposomů (mírná změna zeta potenciálu) a/nebo ovlivnění agregačního procesu liposomů jeho přítomností.



Obr. 27: Srovnání distribuce velikosti částic u připravených liposomů z DPPC a cholesterolu.

Enkapsulační účinnost vitamínu C a bromelainu se po přidavku cholesterolu do liposomů z DPPC vzhledem k odchylkám měření nezměnila oproti účinnosti enkapsulace u vezikul připravených pouze z DPPC. Stejně jako u liposomů z DPPC se lépe inkorporoval enzym bromelain v porovnání s vitamínem C (tab. 4).

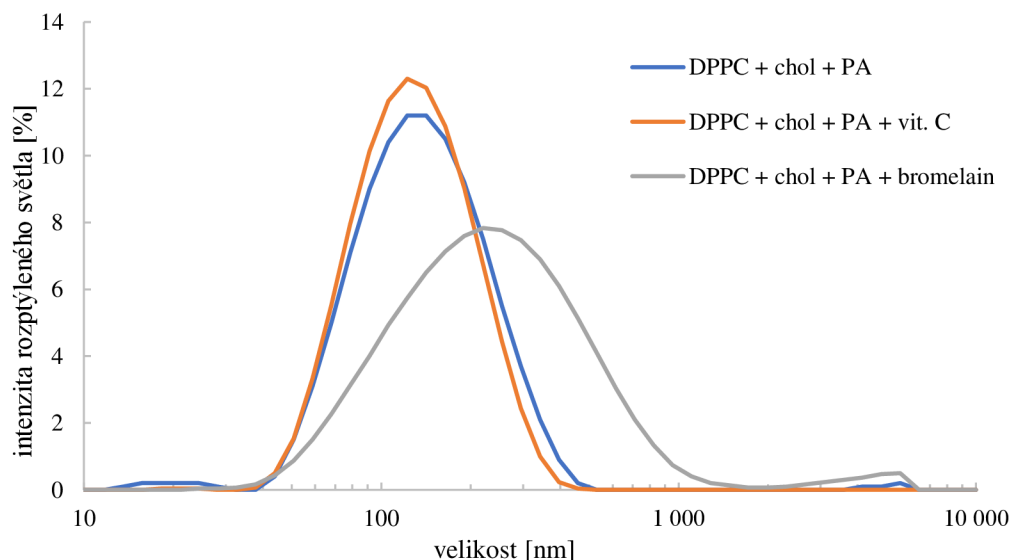
Tab. 4: Enkapsulační účinnost částic z DPPC a cholesterolu.

	Enkapsulační účinnost [%]
Vitamín C	$0,26 \pm 0,03$
Bromelain	$40,68 \pm 0,19$

5.1.3 Vliv cholesterolu a PA na enkapsulační účinnost

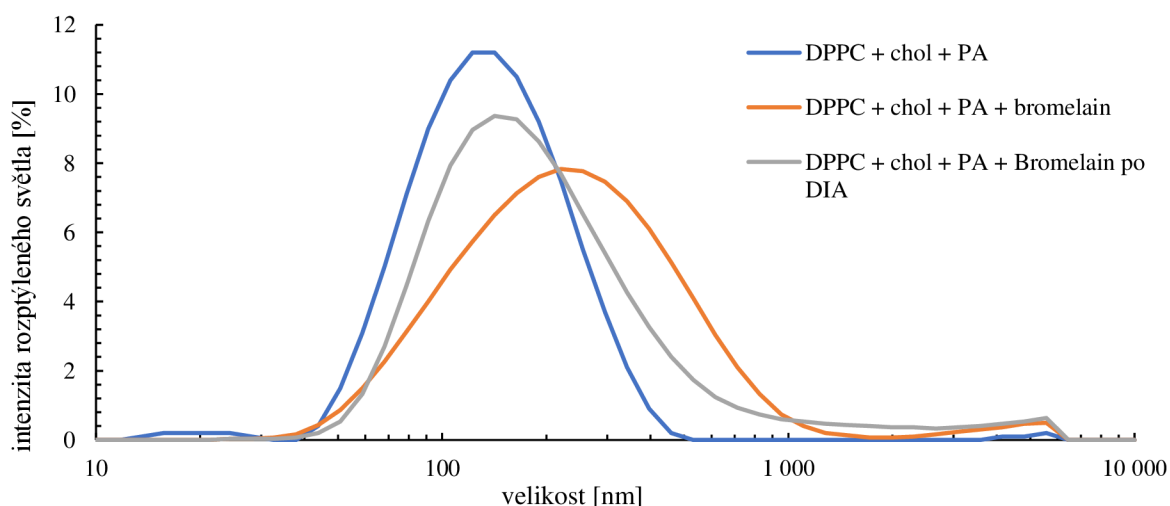
Pro dosažení záporného náboje, který je důležitý pro navázání trimethylchitosanu, byla do systému přidána kyselina fosfatidová v takovém množství, aby ve výsledném objemu liposomů tvořila 30 mol. %. Částice připravené z DPPC, cholesterolu a kyseliny fosfatidové měli střední velikost (115 ± 1) nm a zeta potenciál byl stanoven na $(-52,2 \pm 1,3)$ mV. Díky přidavku PA se zúžila distribuce velikosti částic a došlo k elektrostatické stabilizaci systému – zeta potenciál klesl do záporných hodnot z důvodu záporného náboje PA. Stejně jako u liposomů připravených pouze z DPPC se i u těchto vezikul střední velikost částic s inkorporovaným vitamínem C, která byla stanovena na (110 ± 1) nm, výrazně nelišila od prázdných liposomů. U vezikul s inkorporovaným bromelainem byla střední velikost částic stanovena na (188 ± 13) nm. Zeta potenciál u liposomů s inkorporovaným vitamínem C byl totožný jako pro prázdné vezikuly $(-52,5 \pm 2,7)$ mV. Liposomy s bromelainem měly zeta potenciál výrazně nižší

oproti prázdným liposomům a to $(-16,5 \pm 2,7)$ mV. Na obr. 28 si můžeme všimnout, že opět u liposomálního systému s bromelainem došlo ke zvýšení střední velikosti částic oproti samotným liposomům a liposomům s inkorporovaným vitamínem C. Tento nárůst je opět pravděpodobně z důvodu navázání enzymu na povrch liposomů a/nebo ovlivnění formulace liposomů přítomným enzymem. Díky výraznému snížení zeta potenciálu u liposomů s enzymem je i více pravděpodobná vazba enzymu na povrch.



Obr. 28: Srovnání distribuce velikosti částic u připravených liposomů z DPPC, cholesterolu a PA.

U částic připravených z DPPC, cholesterolu a PA s inkorporovaným bromelainem byl vidět vliv dialýzy, při které došlo k odstranění neenkapsulovaného enzymu. Na obr. 29 můžeme vidět, že došlo ke snížení velikosti částic na (161 ± 5) nm a tzn., že mohla být odstraněna část enzymu navázaného na povrch liposomu.



Obr. 29: Srovnání distribuce velikosti částic před a po dialýze.

U vezikul s inkorporovaným vitamínem C došlo ke snížení enkapsulační účinnosti v porovnání s liposomy připravenými pouze z DPPC, naopak částice s enkapsulovaným enzymem měli EE vyšší než u liposomů z DPPC. V ovlivnění EE u tohoto systému bude

s nejvyšší pravděpodobností hrát roli záporný náboj kyseliny fosfatidové. Z tab. 5 lze vyčíst, že se opět lépe inkorporoval enzym bromelain oproti nízkomolekulární látce.

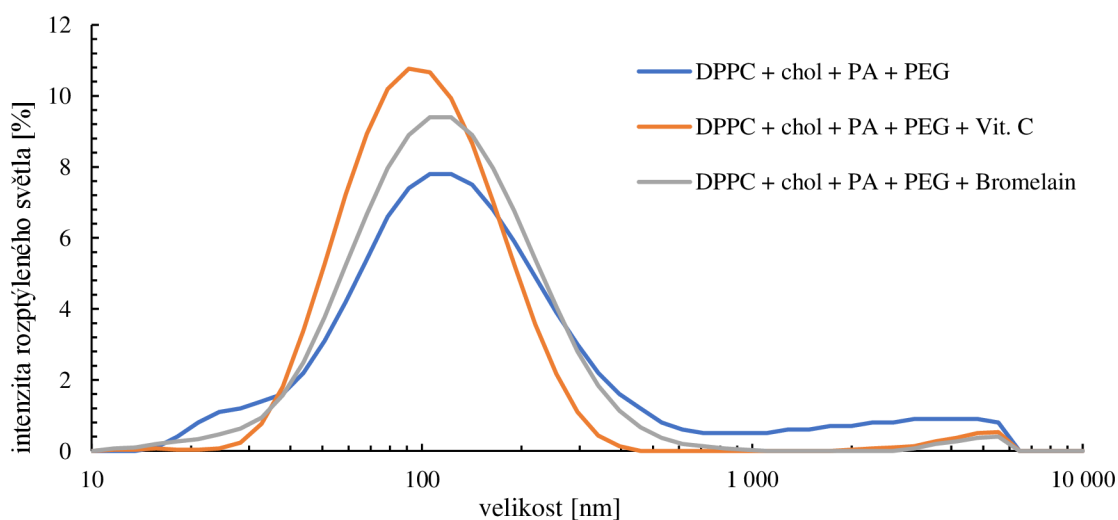
Tab. 5: Enkapsulační účinnost částic z DPPC a cholesterolu a PA.

	Enkapsulační účinnost [%]
Vitamín C	0,25 ± 0,01
Bromelain	54,83 ± 0,58

5.1.4 Vliv komponent stealth liposomů na enkapsulační účinnost

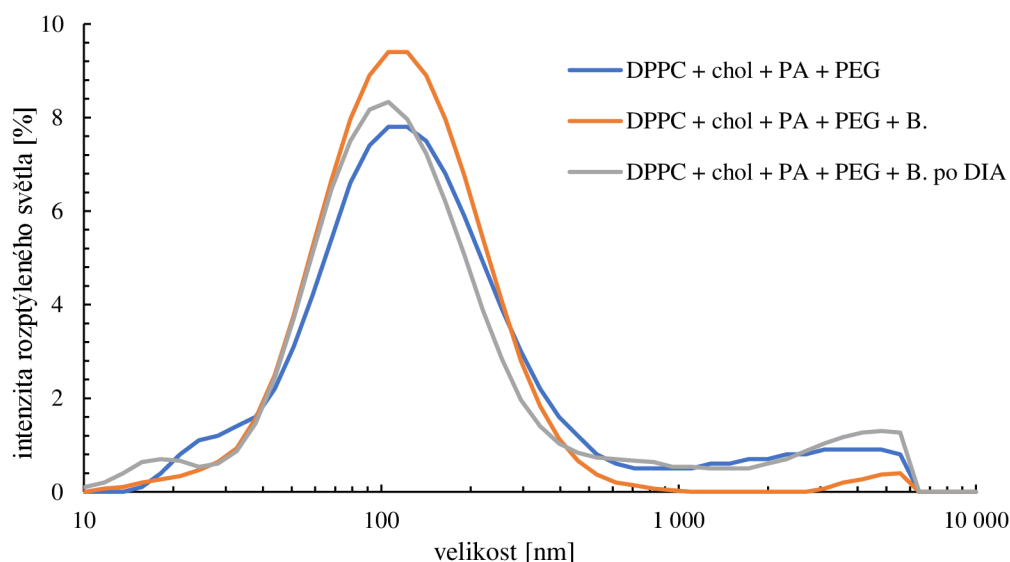
Pro přípravu stealth liposomů bylo nutné přidat do systému z DPPC, cholesterolu a kyseliny fosfatidové 6 mol. % PEG₅₀₀₀-PE. Přidáním polyethylenglykolu do vezikulárního systému by se měla prodloužit doba, kterou liposomy stráví v krevním oběhu [12]. Podařilo se nám připravit vezikuly s PEG₅₀₀₀-PE o střední velikosti částic (110 ± 2) nm a jejich zeta potenciál byl stanoven na (-16,1 ± 2,6) mV. Stanovená hodnota zeta potenciálu u prázdných liposomů se pohybovala v záporné oblasti stability okolo hodnoty -15 mV, což značí úspěšnou přípravu stealth liposomů [80]. Přidáním PEG₅₀₀₀-PE se podařilo připravit částice s elektrostatickou a stericou stabilizací.

Střední velikost liposomů s inkorporovaným vitamínem C byla stanovena na (90 ± 4) nm a velikost vezikul s inkorporovaným enzymem bromelainem byla určena na (102 ± 22) nm. Můžeme říct, že se zde neprojevuje vliv enzymu na velikost připravených částic v porovnání s liposomy z DPPC, cholesterolu a PA. To může být vysvětleno přítomností PEG₅₀₀₀-PE, který jako hydrofilní polymer znemožňuje vazbu různých částic na svůj povrch. Z Obr. 30 je patrné, že rozdíl ve velikosti částic s enkapsulovaným vitamínem C a enzymem není tak markantní jako u předchozích připravených částic. Po inkorporaci vitamínu C je zeta potenciál v rámci odchylek měření shodný s prázdnými liposomy (-13,9 ± 1,4) mV. U částic s inkorporovaným enzymem došlo ke snížení hodnoty zeta potenciálu (-25,4 ± 3,0) mV, je možné, že enzym nepodporuje zcela správnou formulaci liposomů, kdy jejich „stealth“ vlastnosti mohou být méně efektivní než u prázdných liposomů či liposomů s enkapsulovaným vitamínem C.



Obr. 30: Srovnání distribuce velikosti částic u připravených stealth liposomů.

Jak bylo výše zmíněno, hydrofilní PEG₅₀₀₀-PE brání navázání většího množství enzymu na povrch liposomů. Tuto skutečnost si můžeme potvrdit i z obr. 31, kde je znázorněna střední velikost částic před a po dialýze, při které se odstranila vysokomolekulární látka. Střední velikost částic s enkapsulovaným enzymem před dialýzou byla stanovena na (102 ± 22) nm, po dialýze byla střední velikost částic určena na (103 ± 5) nm. Můžeme říci, že velikost částic před a po dialýze se významně neliší.



Obr. 31: Srovnání distribuce velikosti stealth liposomů před a po dialýze.

Enkapsulační účinnosti vitamínu C i enzymu bromelainu jsou uvedeny v tab. 6 a lze z ní vyčíst, že se opět lépe inkorporoval enzym. V porovnání s částicemi bez PEG₅₀₀₀-PE je enkapsulační účinnost u stealth liposomů zatím nejvyšší. Lze říci, že na EE mohl mít vliv trochu jiný postup přípravy, kdy částice s PEG₅₀₀₀-PE byly připravovány v ultrazvukové vodní lázni, zatímco pro přípravu částic bez polyethylenglykolu jsme používali ultrazvukovou sondu.

Tab. 6: Enkapsulační účinnost stealth liposomů.

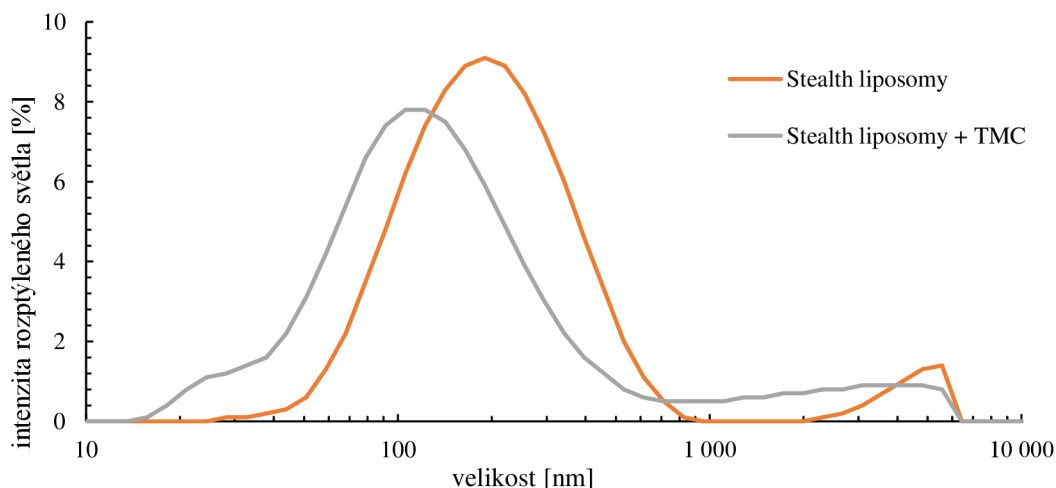
	Enkapsulační účinnost [%]
Vitamín C	$0,35 \pm 0,01$
Bromelain	$60,68 \pm 6,93$

5.1.5 Vliv TMC na enkapsulační účinnost

Jako poslední byl do systému přidán trimethylchitosan o koncentraci 0,1 %, který by měl zajistit vstup stealth liposomů do krevního řečiště paracelární cestou pomocí otevření těsných spojů, které jsou umístěny mezi epiteliálními buňkami [21]. Při přípravě jsme zkombinovali roztok stealth liposomů s roztokem TMC (konkrétní postup je popsán v kapitole 4.3). Podařilo se nám připravit komplex s TMC a inkorporovaným vitamínem C a enzymem bromelainem, protože jak můžeme z obr. 32 vidět je zde značný posun distribucí částic, a to značí navázání TMC na stealth liposom. Prázdný komplex měl střední velikost (172 ± 1) nm a zeta potenciál $(43,3 \pm 1,1)$ mV. U komplexu s inkorporovaným vitamínem C byla stanovena střední velikost částic na (147 ± 6) nm a s inkorporovaným enzymem bromelainem na (161 ± 20) nm. Po navázání TMC na stealth liposomy došlo ke zvýšení střední velikosti částic o více než 55 nm.

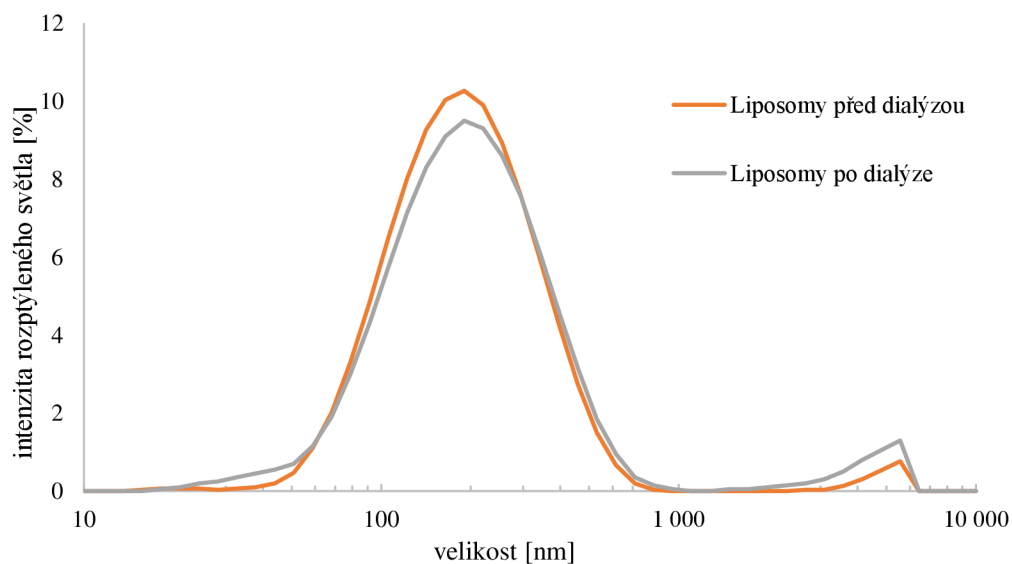
Navázání trimethylchitosanu na stealth liposom můžeme potvrdit i z hodnot zeta potenciálu, který se změnil ze záporných hodnot na kladné (tab. 7).

Menší velikost liposomálního komplexu s enkapsulovaným vitamínem C by mohla být vysvětlena díky zápornému náboji vitamínu, který se mohl navázat na TMC a snížit jeho náboj pro vazbu se stealth liposomy. Toto tvrzení je potvrzeno i snížením zeta potenciálu komplexu s vitamínem C a zvýšením EE vitamínu. Přítomnost bromelainu neovlivnila fyzikálně-chemické vlastnosti liposomálního komplexu.



Obr. 32: Posun distribuce velikosti stealth liposomů po přidavku TMC.

Dialýza neměla vliv na odstranění trimethylchitosanu ze systému, protože z následujícího obr. 33 je na ukázkou patrné, že velikost částic s inkorporovaným enzymem se po provedení dialýzy významně nezměnila, pokud bereme v potaz odchylky měření.



Obr. 33: Posun distribuce velikosti částic s bromelainem po přidavku TMC před a po dialýze.

Enkapsulační účinnost se po přidavku trimethylchitosanu výrazně změnila jak u částic s inkorporovaným vitamínem C, tak i s inkorporovaným enzymem. Z tab. 7 lze vyčíst, že účinnost enkapsulace vitamínu C se zvýšila oproti vezikulám bez TMC. Jak již bylo zmíněno výše, může to být způsobeno navázáním vitamínu C na kladný trimethylchitosan. Je tedy

možné, že vitamín C se nachází jak uvnitř liposomů, tak i na povrchu TMC, a proto je enkapsulační účinnost vyšší než u ostatních liposomů. Opačný trend nastal při enkapsulaci enzymu, kdy se účinnost významně snížila. Toto snížení by mohlo být vysvětleno vmezeřením TMC do liposomální dvojvrstvy, což mohlo usnadnit průchod enzymu přes fosfolipidovou dvojvrstvu a jeho oddialyzování. Z tab. 7 je dále patrné, že do komplexu se lépe enkapsuloval enzym bromelain jako u všech ostatních připravených částic.

Tab. 7: EE a zeta potenciál stealth liposomů s přidavkem TMC.

	Enkapsulační účinnost [%]	Zeta potenciál [mV]
Vitamín C	1,61 ± 0,59	35,1 ± 2,7
Bromelain	31,56 ± 6,54	41,9 ± 1,4

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo studium inkorporace nízko a vysokomolekulárních látek do liposomálních systémů, které byly připraveny z různých kombinací jednotlivých složek (DPPC, cholesterol, kyselina fosfatidová, polyethylenglykol a TMC) a zvolení vhodných látek pro inkorporaci s potenciálním využitím ve farmacii. Jako vhodná nízkomolekulární látka byl na základě literární rešerše zvolen vitamín C a jako zástupce vysokomolekulárních látek byl vybrán enzym bromelain. Nedílnou součástí práce bylo stanovení enkapsulační účinnosti zvolených látek pomocí metody UV-VIS spektrofotometrie, kdy EE vitamínu C byla vypočítána z absorbance odečtené při 265 nm a účinnost enkapsulace enzymu byla stanovena pomocí Hartree-Lowryho metody, stanovení koncentrace bílkovin. Dalším důležitým bodem práce byla charakterizace liposomů pomocí DLS a ELS a experimentální ověření vlivu jednotlivých složek systému na enkapsulační účinnost.

Na základě výsledků měření enkapsulační účinnosti bylo zjištěno, že lépe se do liposomů enkapsuloval enzym bromelain ($52,79 \pm 2,42$) % v porovnání s vitamínem C ($0,31 \pm 0,02$) %. Vyšší enkapsulační účinnost bromelainu byla zapříčiněna způsobem vázání enzymu, kdy docházelo k vazbě nejen do hydrofilního jádra, ale pravděpodobně i na povrch liposomů, což dokazuje i měření DLS. Dalším důvodem, proč je EE bromelainu tak vysoká, může být obsah hydrofobních částí enzymu. Je tedy možné, že se částečně enkapsuloval i do hydrofobní dvojvrstvy. Vitamín C je hydrofilní látka a ty nemají tendenci snadno přecházet z okolního vodného prostředí do hydrofilního (vodného) jádra oproti látkám hydrofobním, kdy se jediné hydrofobní prostředí nachází ve fosfolipidové dvojvrstvě, a také z tohoto důvodu dosahuje enkapsulační účinnosti vitamínu C nízkých hodnot.

U liposomů složených z dipalmitoylfosfatidylcholinu se podařilo připravit částice o velikosti (102 ± 1) nm a kladném zeta potenciálu ($25,2 \pm 0,9$) mV, který je určen kladným nábojem cholinové skupiny DPPC na povrchu liposomů. Po inkorporaci vitamínu C měli částice obdobnou velikost a zeta potenciál jako prázdné liposomy, a proto můžeme říci, že přídavek vitamínu C nemá vliv na velikost částice či na jejich formulaci. Po inkorporaci bromelainu došlo ke zvětšení částice, ale zeta potenciál se výrazně nezměnil. Dle těchto získaných výsledků můžeme usuzovat, že přítomnost bromelainu ovlivnila samotnou formulaci liposomů.

Enkapsulační účinnost vitamínu C ($0,26 \pm 0,03$) % a enzymu bromelainu ($40,68 \pm 0,19$) % se vzhledem k naměřeným odchylkám po přidavku cholesterolu nezměnila oproti liposomům složených pouze z DPPC. Přídavek cholesterolu měl vliv hlavně na velikost částic (došlo k jejich zvětšení) a zeta potenciál, který se po přidavku snížil na kladné hodnoty v nestabilní oblasti v porovnání s částicemi z DPPC. To mělo za následek snížení elektrostatického náboje mezi liposomy a díky tomu docházelo ke spojování částic, vznikaly větší struktury a zvětšila se střední velikost částic.

Přídavkem kyseliny fosfatidové došlo ke snížení enkapsulační účinnosti vezikul s inkorporovaným vitamínem C ($0,25 \pm 0,01$) % a ke zvýšení EE u liposomů s enkapsulovaným bromelainem ($54,83 \pm 0,58$) %, kdy vliv na EE měl pravděpodobně záporný náboj PA. Přidáním kyseliny fosfatidové do systému jsme docílili zúžené distribuce velikosti částic a došlo k elektrostatické stabilizaci systému, protože zeta potenciál klesl do záporných hodnot, což je dáno přídavkem záporně nabitě PA. Po inkorporaci vitamínu C nedošlo k výrazné změně

velikosti částic nebo zeta potenciálu, zatímco u enzymu se zvětšila velikost částic a významně se snížil zeta potenciál. Důvodem bylo pravděpodobně navázání enzymu na povrch liposomů.

Abychom docílili „stealth“ vlastností liposomů, přidali jsme do systému polyethylenglykol. U liposomů s přidavkem PEG₅₀₀₀-PE byla zaznamenána nejvyšší enkapsulační účinnost enzymu, která byla stanovena na $(60,68 \pm 6,93) \%$, kdy vliv na EE mohl mít postup přípravy – použití ultrazvukové vodní lázně. Podařilo se nám připravit liposomy o velikosti částic (110 ± 2) nm a jejich zeta potenciál byl stanoven na $(-16,1 \pm 2,6)$ mV, což značí částice s elektrostatickou a stericou stabilizací. Po inkorporaci vitamínu C a bromelainu nedošlo k výraznému zvětšení velikosti liposomů, tzn. že se neprojevuje vliv enzymu na velikost připravených částic jako u liposomů z DPPC, cholesterolu a PA. Pravděpodobně je to způsobeno přítomností PEG₅₀₀₀-PE, který jako hydrofilní polymer znemožňuje vazbu na svůj povrch. Jinak je tomu při stanovení zeta potenciálu, kdy u částic s inkorporovaným enzymem došlo ke snížení hodnoty zeta potenciálu, a proto jejich „stealth“ vlastnosti mohou být méně efektivní v porovnání s prázdnými liposomy či liposomy s enkapsulovaným vitamínem C.

Přidavkem trimethylchitosanu došlo ke zvýšení EE vitamínu C na hodnotu $(1,61 \pm 0,59) \%$, z důvodu navázání vitamínu na kladný TMC. Inkorporace bromelainu neměla vliv na vlastnosti liposomálního komplexu a jeho účinnost enkapsulace $(31,56 \pm 6,54) \%$ byla nižší oproti liposomům bez TMC, protože mohlo docházet k průchodu enzymu přes fosfolipidovou dvojvrstvu a jeho oddialyzování vlivem vymezení TMC do liposomální dvojvrstvy. Vytvoření komplexu s TMC o velikosti částic (172 ± 1) nm a zeta potenciálu $(43,3 \pm 1,1)$ mV jsme si potvrdili značným posunem distribucí částic a také změnou zeta potenciálu ze záporných hodnot na kladné. Po inkorporaci vitamínu C došlo ke snížení velikosti částic i zeta potenciálu. Důvodem může být záporný náboj vitamínu, který se mohl navázat na TMC a snížit jeho náboj pro vazbu se stealth liposomy.

Úspěšně bylo dosaženo cílů práce. Byly připraveny liposomy s různým složením jednotlivých komponent, jež obsahovaly vybrané nízko a vysokomolekulární látky. Enkapsulace těchto látek (vitamín C a bromelain) do liposomů je možná a jeví se jako použitelná metoda pro zajištění ochrany látek před okolním prostředím a jejich stability.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] SZABOVÁ, Jana. Příprava a charakterizace komplexních liposomálních systémů pro distribuci léčiv. Brno, 2019. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [2] LIAN, Tianshun a Rodney J.Y. HO. Trends and Developments in Liposome Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001, 90(6), 667-680. DOI: 10.1002/jps.1023. ISSN 00223549. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916307626>
- [3] NIKITENKO, N. A. a V. S. PRASSOLOV. Non-Viral Delivery and Therapeutic Application of Small Interfering RNAs. *Acta Naturae*. 2013, 5(3), 35-53. DOI: 10.32607/20758251-2013-5-3-35-53. ISSN 2075-8251. Dostupné také z: <http://actanaturae.ru/2075-8251/article/view/10579>
- [4] ISALOMBOTO NKANGA, Christian, Alain MURHIMALIKA BAPOLISI, Nnamdi IKEMEFUNA OKAFOR a Rui WERNER MAÇEDO KRAUSE. General Perception of Liposomes: Formation, Manufacturing and Applications. *Liposomes - Advances and Perspectives*. IntechOpen, 2019, 2019-9-4. DOI: 10.5772/intechopen.84255. ISBN 978-1-78984-494-8. Dostupné také z: <https://www.intechopen.com/books/liposomes-advances-and-perspectives/general-perception-of-liposomes-formation-manufacturing-and-applications>
- [5] NAGALINGAM, Arunkumar. Drug Delivery Aspects of Herbal Medicines. *Japanese Kampo Medicines for the Treatment of Common Diseases: Focus on Inflammation*. Elsevier, 2017, 2017, , 143-164. ISBN 9780128093986. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-809398-6.00015-9
- [6] AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*. 2013, 8(1). DOI: 10.1186/1556-276X-8-102. ISSN 1556-276X. Dostupné také z: <https://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-8-102>
- [7] SHARMA, A. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*. 1997, 154(2), 123-140. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5173(97)00135-X
- [8] ROOIJEN, N.van. Liposomes. *Encyclopedia of Immunology*. Elsevier, 1998, 1998, , 1588-1592. ISBN 9780122267659. Dostupné z: doi:10.1006/rwei.1999.0407
- [9] PANDEY, Himanshu, Radha RANI a Vishnu AGARWAL. Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2016, 59. DOI: 10.1590/1678-4324-2016150477. ISSN 1516-8913.
- [10] ARAJO LOPES, Svía Caldeira de, Cristiane dos SANTOS GIUBERTI, Talita Guieiro RIBEIRO, Digo dos SANTOS FERREIRA, Elaine AMARAL LEITE a Mnica CRISTINA. Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs. *Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches*. InTech, 2013, 2013-05-09. DOI: 10.5772/55290. ISBN 978-953-51-1098-9. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/cancer-treatment-conventional-and-innovative-approaches/liposomes-as-carriers-of-anticancer-drugs>

- [11] KRAFT, John C., Jennifer P. FREELING, Ziyao. WANG a Rodney J.Y. HO. Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014, 103(1), 29-52. DOI: 10.1002/jps.23773. ISSN 00223549. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915307814>
- [12] KATARIA, Sahil, Premjeet SANDHU, Bilandi AJAY, Middha AKANKSHA a Bhawna KAPOOR. Stealth liposomes: a review. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*. 2011, 2(5), 1534-1538.
- [13] IMMORDINO, Maria Laura, Franco DOSIO a Luigi CATTEL. Stealth Liposomes: Review of the Basic Science, Rationale, and Clinical Applications, Existing and Potential. *International Journal of Nanomedicine*. 2006, 1(3), 297-315. Dostupné také z: https://www.researchgate.net/publication/6122045_Stealth_Liposomes_Review_of_the_Basic_Science_Rationale_and_Clinical_Applications_Existing_and_Potential
- [14] Strukturní vzorec polyethylenglykolu. In: *Wikipedia: the free encyclopedia [online]*. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2020-10-13]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Polyethylenglykol#/media/Soubor:PEG_Structural_Formula_V1.svg
- [15] ALCANTAR, Norma A., Eray S. AYDIL a Jacob N. ISRAELACHVILI. Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000, 51(3), 343-351. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1097-4636%2820000905%2951%3A3%3C343%3A%3AAID-JBM7%3E3.0.CO%3B2-D>
- [16] CVRČEK, Ladislav a Marta HORÁKOVÁ. Plasma Modified Polymeric Materials for Implant Applications. *Non-Thermal Plasma Technology for Polymeric Materials*. Elsevier, 2019, 2019, , 367-407. ISBN 9780128131527. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-813152-7.00014-7
- [17] RIVA, Raphaël, Héloïse RAGELLE, Anne DES RIEUX, Nicolas DUHEM, Christine JÉRÔME a Véronique PRÉAT. Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery and Tissue Engineering. *Chitosan for Biomaterials II*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, 2011-8-3, (244), 19-44. *Advances in Polymer Science*. DOI: 10.1007/12_2011_137. ISBN 978-3-642-24060-7. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/12_2011_137
- [18] CROISIER, Florence a Christine JÉRÔME. Chitosan based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*. 2013, 49(4), 780-792. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009. ISSN 00143057. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305712004181>
- [19] XU, Tao, Meihua XIN, Mingchun LI, Huili HUANG a Shengquan ZHOU. Synthesis, characteristic and antibacterial activity of N,N,N-trimethyl chitosan and its carboxymethyl derivatives. *Carbohydrate Polymers*. 2010, 81(4), 931-936. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.04.008. ISSN 01448617. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861710002626>
- [20] KULKARNI, Abhijeet D., Harun M. PATEL, Sanjay J. SURANA, Yogesh H. VANJARI, Veena S. BELGAMWAR a Chandrakantsing V. PARDESHI. N,N,N-

- Trimethyl chitosan: An advanced polymer with myriad of opportunities in nanomedicine. *Carbohydrate Polymers*. 2017, 157, 875-902. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.10.041. ISSN 01448617. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861716312036>
- [21] MOURYA, V. K. a Nazma N. INAMDAR. Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2009, 20(5), 1057-1079. DOI: 10.1007/s10856-008-3659-z. ISSN 0957-4530. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-008-3659-z>
- [22] THANOU, M, J.C VERHOEF a H.E JUNGINGER. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001, 52(2), 117-126. DOI: 10.1016/S0169-409X(01)00231-9. ISSN 0169409X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X01002319>
- [23] THANOU, Maya M, J.Coos VERHOEF, Stefan G ROMEIJN, J.Fred NAGELKERKE, Frans W.H.M MERKUS a Hans E JUNGINGER. Effects of N-trimethyl chitosan chloride, a novel absorption enhancer, on Caco-2 intestinal epithelia and the ciliary beat frequency of chicken embryo trachea. *International Journal of Pharmaceutics*. 1999, 185(1), 73-82. DOI: 10.1016/S0378-5173(99)00126-X. ISSN 03785173. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037851739900126X>
- [24] WU, Meiyang, Zhu LONG, Huining XIAO a Cuihua DONG. Recent research progress on preparation and application of N, N, N-trimethyl chitosan. *Carbohydrate Research*. 2016, 434, 27-32. DOI: 10.1016/j.carres.2016.08.002. ISSN 00086215. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621516302816>
- [25] NAYAK, Amit K., Syed A. AHMAD, Sarwar BEG, Tahseen J. ARA a Mohammad S. HASNAIN. Drug delivery. *Applications of Nanocomposite Materials in Drug Delivery*. Elsevier, 2018, 2018, , 255-282. ISBN 9780128137413. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-813741-3.00012-1
- [26] ZOREC, Barbara, Véronique PRÉAT, Damijan MIKLAVČIČ a Nataša PAVŠELJ. Active enhancement methods for intra- and transdermal drug delivery: a review. *Zdravniški Vestnik [online]*. 2013, 5(82), 339-356 [cit. 2020-11-06]. Dostupné z: <https://vestnik.sz.d.si/index.php/ZdravVest/article/view/657>
- [27] MANSOUR, Heidi, HAEMOSU a Xiao WU. Nanomedicine in pulmonary delivery. *International Journal of Nanomedicine*. 2009, 4, 299–319. DOI: 10.2147/IJN.S4937. ISSN 1178-2013. Dostupné také z: <http://www.dovepress.com/nanomedicine-in-pulmonary-delivery-peer-reviewed-article-IJNHUANG>, Yi-You a Ching-Hua WANG. Pulmonary delivery of insulin by liposomal carriers. *Journal of Controlled Release*. 2006, 113(1), 9-14. DOI: 10.1016/j.jconrel.2006.03.014. ISSN 01683659. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365906001155>
- [28] WILLIS, Lauren, Don HAYES a Heidi M. MANSOUR. Therapeutic Liposomal Dry Powder Inhalation Aerosols for Targeted Lung Delivery. *Lung*. 2012, 190(3), 251-262. DOI: 10.1007/s00408-011-9360-x. ISSN 0341-2040. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00408-011-9360-x>

- [29] DU PLESSIS, L.H., J. LUBBE, T. STRAUSS a A.F. KOTZÉ. Enhancement of nasal and intestinal calcitonin delivery by the novel Pheroid™ fatty acid based delivery system, and by N-trimethyl chitosan chloride. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010, 385(1-2), 181-186. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2009.10.031
- [30] FASANO, Alessio. Innovative strategies for the oral delivery of drugs and peptides. *Trends in Biotechnology*. 1998, 16(4), 152-157. DOI: 10.1016/S0167-7799(97)01170-0. ISSN 01677799. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779997011700>
- [31] CARINO, Gerardo P a Edith MATHIOWITZ. Oral insulin delivery | Abbreviations: GI, gastrointestinal; IDDM, insulin-dependent diabetes mellitus; IU, international units; NIDDM, non-insulin-dependent diabetes mellitus; PIN, phase inversion nanoencapsulation; ZOT, zona occludens toxin.1. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1999, 35(2-3), 249-257. DOI: 10.1016/S0169-409X(98)00075-1. ISSN 0169409X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X98000751>
- [32] PAULETTI, Giovanni M., Sanjeev GANGWAR, Gregory T. KNIPP, Manoj M. NERURKAR, Franklin W. OKUMU, Kiyoshi TAMURA, Teruna J. SIAHAAN a Ronald T. BORCHARDT. Structural requirements for intestinal absorption of peptide drugs. *Journal of Controlled Release*. 1996, 41(1-2), 3-17. DOI: 10.1016/0168-3659(96)01352-1. ISSN 01683659. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168365996013521>
- [33] The Editors of Encyclopaedia Britannica. Enzyme. *Encyclopædia Britannica* [online]. Encyclopædia Britannica, 2019 [cit. 2020-04-28]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/enzyme>
- [34] HUANG, Aiwen, Abdallah MAKHLOF, Qineng PING, Yuichi TOZUKA a Hirofumi TAKEUCHI. N-trimethyl chitosan-modified liposomes as carriers for oral delivery of salmon calcitonin. *Drug Delivery*. 2011, 18(8), 562-569. ISSN 1071-7544. Dostupné z: doi:10.3109/10717544.2011.596585
- [35] SURESH, R., M. PANDIARAJ, M. SANKARALINGAM a K. GIRIBABU. Graphene–Metal Chalcogenide Modified Electrochemical Sensors. *Graphene-Based Electrochemical Sensors for Biomolecules*. Elsevier, 2019, 2019, 139-153. ISBN 9780128153949. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-815394-9.00006-6
- [36] DELUCA, D.C. a J. LYNDAL YORK. Enzymes. *Encyclopedia of Genetics*. Elsevier, 2001, 2001, , 625-626. DOI: 10.1006/rwgn.2001.0414. ISBN 9780122270802. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122270800004146>
- [37] BLANCO, Antonio a Gustavo BLANCO. Enzymes. *Medical Biochemistry*. Elsevier, 2017, 2017, , 153-175. ISBN 9780128035504. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803550-4.00008-2
- [38] KRÁLOVÁ, Blanka. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-708-0449-1.
- [39] The Editors of Encyclopaedia Britannica. Enzymes. *Encyclopaedia Britannica* [online]. Chicago, 2017 [cit. 2020-11-09]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/enzyme>

- [40] VODRÁŽKA, Zdeněk, Pavel RAUCH a Jan KÁŠ. Enzymologie. Vyd. 3. přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-708-0330-4
- [41] Přírodní látky - enzymy. In: Studium biochemie [online]. Praha: Univerzita Karlova, 2008 [cit. 2018-11-12]. Dostupné z: http://www.studiumbiochemie.cz/prirodni_latky_enzymy.html
- [42] KODÍČEK, Milan. *Studijní materiály z enzymologie*. Praha: Vysoká škola chemickotechnologická v Praze, 2003. ISBN 80-708-0523-4.
- [43] MAURER, H.R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2001, 58(9), 1234-1245. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/PL00000936
- [44] Ananas comosus (Pineapple) [online]. [cit. 2020-11-18]. Dostupné z: <https://www.gardenia.net/plant/ananas-comosus>
- [45] ZHANG, Jun-Ming a Jianxiong AN. Cytokines, Inflammation, and Pain. *International Anesthesiology Clinics*. 2007, 45(2), 27-37. ISSN 0020-5907. Dostupné z: doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e
- [46] MOUSA KAREEM, Mohanad a Majid S. JABIR. Vitamins. Malnutrition [Working Title]. *IntechOpen*, 2020, 2020-6-16. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.92074
- [47] FAJFROVÁ, Jana. Vitaminy a jejich funkce v organismu. *Interní medicína pro praxi*. 2011, 13(12), 466-468.
- [48] DEPHILLOPO, Nicholas N., Zachary S. AMAN, Mitchell I. KENNEDY, J.P. BEGLEY, Gilbert MOATSHE a Robert F. LAPRADE. Efficacy of Vitamin C Supplementation on Collagen Synthesis and Oxidative Stress After Musculoskeletal Injuries: A Systematic Review. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*. 2018, 6(10). ISSN 2325-9671. Dostupné z: doi:10.1177/2325967118804544
- [49] VAN POPPEL, Geert a Henk VAN DEN BERG. Vitamins and cancer. *Cancer Letters*. 1997, 114(1-2), 195-202. ISSN 03043835. Dostupné z: doi:10.1016/S0304-3835(97)04662-4
- [50] NĚMCOVÁ, Irena, Petr RYCHLOVSKÝ a Ludmila ČERMÁKOVÁ. *Spektrometrické analytické metody*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0776-X.
- [51] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8.
- [52] PERKAMPUS, Heinz-Helmut. *UV-VIS spectroscopy and its applications*. Berlin: Springer, 1992. Springer laboratory. ISBN 978-3-642-77479-9.
- [53] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0.
- [54] Spektrofotometrie (UV/VIS) [online]. [cit. 2020-11-18]. Dostupné z: https://home.czu.cz/storage/121996_Spektrofotometrie.pdf
- [55] BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*. 2016, 235, 337-351. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017
- [56] Petra Ševčíková, Věra Kašpárková, Pavlína Vltavská a Jiří Krejčí. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické Listy*. 2014, (108), 479-482.

- [57] STETEFELD, Jörg, Sean A. MCKENNA a Trushar R. PATEL. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*. 2016, 8(4), 409-427. ISSN 1867-2450. Dostupné z: doi:10.1007/s12551-016-0218-6
- [58] Dynamic Light Scattering - DLS. In: Nanofase [online]. [cit. 2020-11-18]. Dostupné z: http://nanofase.eu/show/dynamic-light-scattering---dls_1286/
- [59] Zet asizer Nano ZS90. Malvern Panalytical [online]. Velká Británie: Malvern Panalytical Ltd, 2015 [cit. 2020-11-18]. Dostupné z: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/zetasizer/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs90>
- [60] POLČÍK, M. Sledování nanášení barviva pomocí měření zeta-potenciálu. *Chemagazín*. 2010, XX(4), 28-29.
- [61] Zeta potenciál zeta [online]. [cit. 2020-11-18]. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>
- [62] Zeta Potential Measurements [online]. [cit. 2020-11-18]. Dostupné z: <https://nanocomposix.com/pages/zeta-potential-measurements#target>
- [63] THANOU, Maya M, J.Coos VERHOEF, Stefan G ROMEIJN, J.Fred NAGELKERKE, Frans W.H.M MERKUS a Hans E JUNGINGER. Effects of N-trimethyl chitosan chloride, a novel absorption enhancer, on Caco-2 intestinal epithelia and the ciliary beat frequency of chicken embryo trachea. *International Journal of Pharmaceutics*. 1999, 185(1), 73-82. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5173(99)00126-X
- [64] CHEN, Huanlei, Jun WU, Min SUN, et al. N-trimethyl chitosan chloride-coated liposomes for the oral delivery of curcumin. *Journal of Liposome Research*. 2011, 22(2), 100-109. ISSN 0898-2104. Dostupné z: doi:10.3109/08982104.2011.621127
- [65] CAO, Jinna, Jukui SUN, Xiaoyu WANG, Xinran LI a Yingjie DENG. N -Trimethyl chitosan-coated multivesicular liposomes for oxymatrine oral delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2009, 35(11), 1339-1347. ISSN 0363-9045. Dostupné z: doi:10.3109/03639040902902427
- [66] FARHADIAN, Asma, Naser Mohammadpour DOUNIGHI a Mohammadreza AVADI. Enteric trimethyl chitosan nanoparticles containing hepatitis B surface antigen for oral delivery. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2015, 11(12), 2811-2818. ISSN 2164-5515. Dostupné z: doi:10.1080/21645515.2015.1053663
- [67] SUBBIAH, Ramesh, Prakash RAMALINGAM, Subramaniyan RAMASUNDARAM, Do Yang KIM, Kwideok PARK, Mohan K. RAMASAMY a Kyoung Jin CHOI. N,N,N-Trimethyl chitosan nanoparticles for controlled intranasal delivery of HBV surface antigen. *Carbohydrate Polymers*. 2012, 89(4), 1289-1297. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2012.04.056
- [68] IWANAGA, Kazunori, Satoshi ONO, Kohji NARIOKA, Kazuhiro MORIMOTO, Masawo KAKEMI, Shinji YAMASHITA, Mamoru NANGO a Naoto OKU. Oral delivery of insulin by using surface coating liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*. 1997, 157(1), 73-80. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5173(97)00237-8
- [69] BRISCOE, P., I. CANIGGIA, A. GRAVES, B. BENSON, L. HUANG, A. K. TANSWELL a B. A. FREEMAN. Delivery of superoxide dismutase to pulmonary epithelium via pH-sensitive liposomes. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular*

- Physiology. 1995, 268(3), L374-L380. ISSN 1040-0605. Dostupné z: doi:10.1152/ajplung.1995.268.3.L374
- [70] WU, Zhipan, Rongfa GUAN, Fei LYU, Mingqi LIU, Jianguo GAO a Guozou CAO. Optimization of Preparation Conditions for Lysozyme Nanoliposomes Using Response Surface Methodology and Evaluation of Their Stability. *Molecules*. 2016, 21(6), 741. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules21060741
- [71] ŁUKAWSKI, Maciej, Paulina DAŁEK, Tomasz BOROWIK, Aleksander FORYŚ, Marek LANGNER, Wojciech WITKIEWICZ a Magdalena PRZYBYŁO. New oral liposomal vitamin C formulation: properties and bioavailability. *Journal of Liposome Research*. 2020, 30(3), 227-234. ISSN 0898-2104. Dostupné z: doi:10.1080/08982104.2019.1630642
- [72] FARHANG, Bitra, Yukio KAKUDA a Milena CORREDIG. Encapsulation of ascorbic acid in liposomes prepared with milk fat globule membrane-derived phospholipids. *Dairy Sci. & Technol.* 2012, 92(4), 353-366. ISSN 1958-5586. Dostupné z: doi:10.1007/s13594-012-0072-7
- [73] TOTH, M. Chemical stabilization of tetrahydrobiopterin by L-ascorbic acid: contribution to placental endothelial nitric oxide synthase activity. *Molecular Human Reproduction*. 2002, 8(3), 271-280. ISSN 14602407. Dostupné z: doi:10.1093/molehr/8.3.271
- [74] CHANG, Sam K. C. a Yan ZHANG. Protein Analysis. *Food Analysis*. Cham: Springer International Publishing, 2017, 2017-06-07, 315-331. Food Science Text Series. ISBN 978-3-319-45774-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-45776-5_18
- [75] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0586-2.
- [76] BOKROVÁ, Jitka. *Příprava enkapsulovaných enzymů pro využití v kosmetice*. Brno, 2014. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [77] KIRBY, C. J., C. J. WHITTLE, N. RIGBY, D. T. COXON a B. A. LAW. Stabilization of ascorbic acid by microencapsulation in liposomes. *International Journal of Food Science & Technol.* 1991, 26(5), 437-449. ISSN 09505423. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2621.1991.tb01988.x
- [78] ISRAELACHVILI, Jacob N., D. John MITCHELL a Barry W. NINHAM. Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1977, 470(2), 185-201. ISSN 00052736. Dostupné z: doi:10.1016/0005-2736(77)90099-2
- [79] SZABOVÁ, Jana, Ondrej MIŠÍK, Martina HAVLÍKOVÁ, František LÍZAL a Filip MRAVEC. Influence of liposomes composition on their stability during the nebulization process by vibrating mesh nebulizer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2021, 204. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2021.111793
- [80] LEVCHENKO, Tatiana S, Ram RAMMOHAN, Anatoly N LUKYANOV, Kathleen R WHITEMAN a Vladimir P TORCHILIN. Liposome clearance in mice: the effect of a separate and combined presence of surface charge and polymer coating. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002, 240(1-2), 95-102. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5173(02)00129-1

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam použitých zkratek

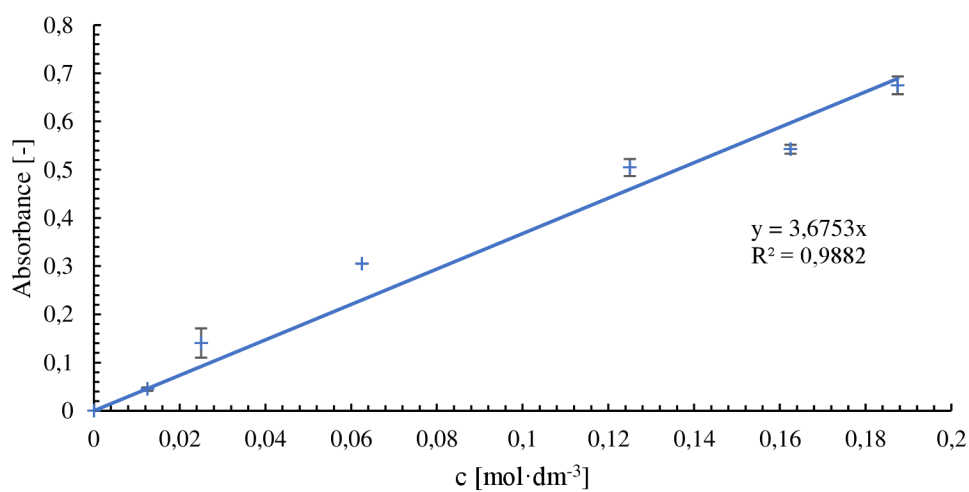
MLV	multilamelární vezikuly
LUV	velké unilamelární vezikuly
SUV	malé unilamelární vezikuly
EPR efekt	efekt zvýšené permeability a retence
PEG	polyethylenglykol
TMC	N, N, N-Trimethylchitosan
NMP	N-methyl-2-pyrrolidon
COPD	chronická obstrukční plicní nemoc
MDI	inhalátory s odměřenými dávkami
DPI	inhalátory suchého prášku
GI	gastrointestinální trakt
RNA	ribonukleová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
PCR	polymerázová řetězová reakce
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelná oblast
CCD	zařízení s vázanými náboji (Charge-Coupled Device)
DLS	dynamický rozptyl světla
ZP	zeta potenciál
MW	molekulová hmotnost
CBF	frekvence ciliárního rytmu
CUR	kurkumin
OM	oxymatrin
HBsAg	antigen proti hepatitidě B
HPMCP	hydroxypropylmethylcelulózoftalát
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
TMC NP	N, N, N-trimethylchitosanové nanočástice
PBS	fosfátový pufr
DPPC	dipalmitoylfosfatidylcholin
Mucin-Lip	liposomy potažené mucinem
PEG-Lip	liposomy potažené polyethylenglykolem
SOD	superoxiddismutáza
DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolamin
DOSG	1-oleoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-sukcinát
FRLE	buňky plicního distálního epitelu
SP-A	povrchově aktivní protein A
SGF	simulovaná gastrointestinální tekutina
SIF	simulovaná intestinální tekutina
HPLC	Vysoko účinná kapalinová chromatografie

TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
MFGM	fosfolipidy z membránových derivátů mléčných tuků
PA	kyselina fosfatidová
EE	enkapsulační účinnost
IPA	isopropylalkohol

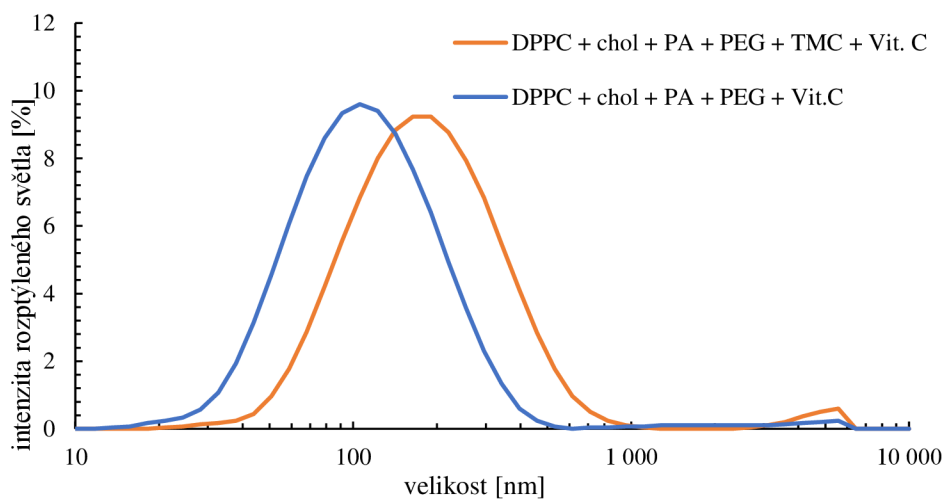
8.2 Seznam použitých symbolů

A	absorbance
T	transmitance
I_0	dopadající zářivý tok
I	prošlý zářivý tok
c	koncentrace
ε	molární absorpční koeficient
l	délka optické dráhy
d_H	hydrodynamický průměr
T	teplota
η_0	viskozita rozpouštědla
k_B	Boltzmanova konstanta
D	difúzní koeficient

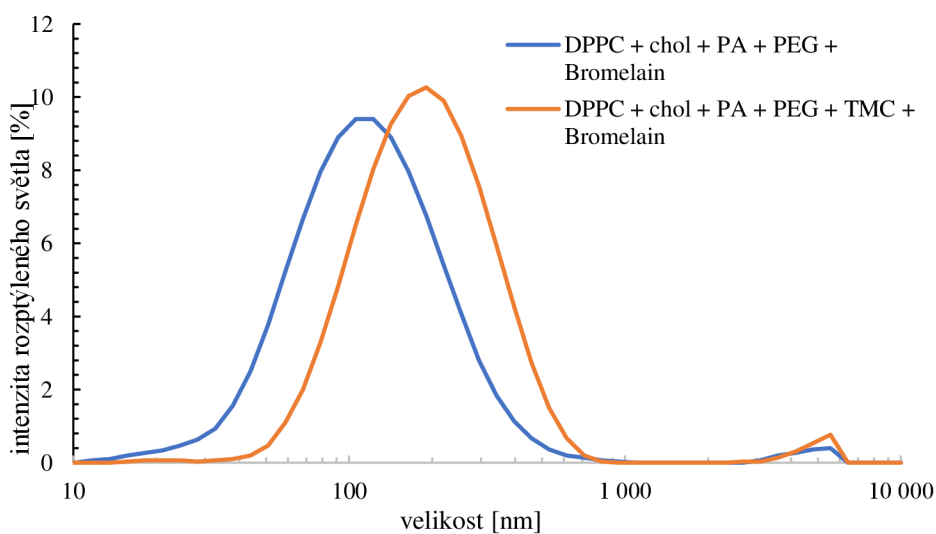
9 PŘÍLOHY



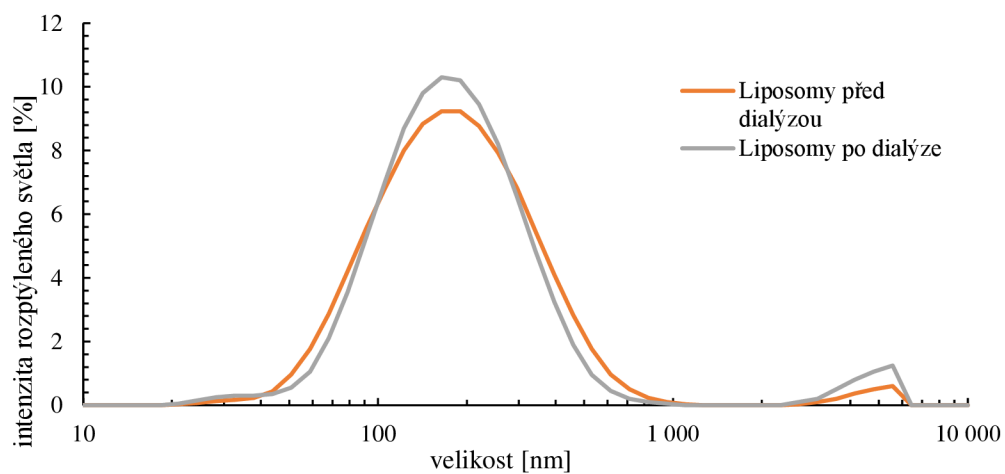
Obr. 34: Kalibrační křivka enzymu bromelainu.



Obr. 35: Posun distribuce velikosti částic s vitamínem C po přidavku TMC.



Obr. 36: Posun distribuce velikosti částic s bromelainem po přidavku TMC.



Obr. 37: Posun distribuce velikosti částic s vitamínem C po přidavku TMC před a po dialýze.