



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

PEVNÁ FORMA LIPOSOMÁLNÍCH SYSTÉMŮ PRO INHALAČNÍ PODÁNÍ

SOLID FORM OF LIPOSOMAL SYSTEMS FOR INHALATION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Lucie Fardová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1840/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Lucie Fardová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Procesy a materiály medicínských aplikací
Vedoucí práce: **doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Pevná forma liposomálních systémů pro inhalační podání

Zadání diplomové práce:

- 1) Rešerše na téma příprava a stanovení vlastností pevné formy liposomálních systémů.
- 2) Na základě rešerše vybrat vhodné liposomální systémy a techniky jejich sušení.
- 3) Připravit pevné liposomální formy, charakterizovat je a ověřit na základě rehydratace schopnost opětné tvorby vezikulárních systémů.
- 4) Zhodnotit dosažené výsledky z hlediska inhalačního podávání biologicky aktivních látek.

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

Bc. Lucie Fardová
studentka

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na přípravu pevných liposomálních systémů pro inhalační podávání. Liposomální systémy byly připraveny metodou rehydratace fosfolipidového filmu z dipalmitoylfosfatidylcholinu. Pro rehydrataci filmu byl použitý roztok sacharózy, která sloužila jako protektant při sprejovém sušení. Další vzorky liposomů obsahovaly navíc pro lepší stabilizaci cholesterol, kyselinu fosfatidovou nebo polyethylenglykol. Připravené roztoky liposomů byly zkoumány metodami skenovací elektronové mikroskopie, dynamickým rozptylem světla a elektroforetickým rozptylem světla. Vysušené prášky byly podrobeny měření pomocí metod infračervené spektroskopie, termogravimetrické analýzy, rastrovací transmisní elektronové mikroskopie a zjištění aerodynamické velikosti částic. Výsledky dokazují úspěšnou přípravu všech typů liposomálních systémů jejich vysušení do formy prášku a následnou rekonstrukci po rehydrataci vodou i pufrem. Na základě získaných vlastností se jako nejhodnější jevíly liposomy s polyethylenglykolem.

ABSTRACT

This thesis deals with the preparation of solid liposomal systems for inhalation delivery. Liposomal systems were prepared by rehydration of a phospholipid film from dipalmitoylphosphatidylcholine. A sucrose solution used for film rehydration served as a protectant during spray drying. Additional liposome samples contained cholesterol, phosphatidic acid, or polyethylene glycol for better stabilization. The prepared liposome solutions were examined using scanning transmission electron microscopy, dynamic light scattering, and electrophoretic light scattering methods. Dried powders were measured using infrared spectroscopy, thermogravimetric analysis, scanning electron microscopy, and determination of particle aerodynamic size. The results demonstrate the successful preparation of all liposomal systems, their drying into powder form, and subsequent reconstruction after rehydration with water or buffer. Based on the observed properties, liposomes with polyethylene glycol appeared to be the most suitable.

KLÍČOVÁ SLOVA

Liposom, sprejové sušení, dipalmitoylfosfatidylcholin (DPPC), cholesterol, kyselina fosfatidová (PA), polyethylenglykol (PEG), sacharóza, rehydratace

KEYWORDS

Liposome, spray drying, dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), cholesterol, phosphatidic acid (PA), polyethylene glycol (PEG), sucrose, rehydration

FARDOVÁ, Lucie. *Pevná forma liposomálních systémů pro inhalační podání* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-01]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148072>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. za cenné rady při konzultacích a možnost pracovat pod jeho vedením. Velké poděkování patří PharmDr. Andree Pešťálové z Farmaceutické fakulty Masarykovy univerzity za její ochotu a všechen věnovaný čas při sušení liposomů i měření aerodynamické velikosti částic. Současně děkuji Ing. Kateřině Mrázové z Ústavu přístrojové techniky AV ČR za zobrazení liposomů metodou STEM. Z Fakulty chemické VUT v Brně bych chtěla moc poděkovat zejména paní Leoně Kubíkové, Ing. Monice Trudičové a doc. Ing. Vojtěchovi Enevovi, Ph.D za věnovaný čas při měření různých vlastností připravených systémů. Největší poděkování patří konzultantce Ing. Janě Szabové za její nekonečný optimismus, podporu, trpělivost, skvělé nápady, cenné rady a pomoc při zpracování celé diplomové práce. V neposlední řadě z celého srdce děkuji své rodině, partnerovi a přátelům za jejich podporu a trpělivost při celém studiu.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Fosfolipidy.....	8
2.1.1	Kyselina fosfatidová	9
2.1.2	Dipalmitoylfosfatidylcholin.....	9
2.1.3	Fosfolipidové membrány	10
2.2	Liposomy	12
2.2.1	Příprava liposomů	14
2.2.2	Typy liposomů	15
2.3	Inhalační podávání léčiv.....	17
2.3.1	Liposomy pro inhalační podávání	18
2.4	Sprejové sušení.....	18
2.4.1	Princip metody sprejového sušení	19
2.4.2	Parametry sušení	20
2.5	Dynamický rozptyl světla.....	21
2.6	Elektroforetický rozptyl světla	22
2.7	Termogravimetrická analýza	24
2.8	Aerodynamická velikost částic.....	25
2.9	Skenovací elektronová mikroskopie.....	26
2.10	Rastrovací transmisní elektronová mikroskopie	28
2.11	Infračervená spektroskopie.....	28
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	30
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
4.1	Chemikálie.....	37
4.2	Příprava vzorků	38
4.2.1	Liposomy k sušení	38
4.2.2	Sprejové sušení	39
4.2.3	Rehydratace	39
4.3	Měření a zpracování výsledků.....	40
4.3.1	Velikost liposomů a zeta potenciál	40
4.3.2	Zobrazení liposomů metodou STEM.....	40
4.3.3	Zbytková vlhkost prášku.....	40
4.3.4	Aerodynamická velikost prášku	40
4.3.5	Zobrazení prášku metodou SEM	41
4.3.6	Složení prášku metodou IČ.....	41
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	42
5.1	Liposomy v roztoku.....	42
5.1.1	Připravené liposomy z DPPC před sušením a po rehydrataci	42

5.1.2	Připravené liposomy z DPPC a cholesterolu před sušením a po rehydrataci	45
5.1.3	Připravené liposomy z DPPC a kyseliny fosfatidové před sušením a po rehydrataci	46
5.1.4	Připravené liposomy z DPPC a polyethyleglykolu před sušením a po rehydrataci	48
5.2	Vysušený prášek.....	49
6	ZÁVĚR.....	54
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	56
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	61
8.1	Seznam zkratek.....	61
8.2	Seznam symbolů.....	62
9	PŘÍLOHY	63
9.1	Distribuce velikosti částic.....	63
9.2	Výstupy z termodynamické analýzy	69

1 ÚVOD

Inhalační podávání léčiv je v dnešní době běžné, využívá se především na plicní onemocnění jako je rakovina plic, astma, bronchitida nebo pneumonie. Nastoupení účinku je rychlé, ale působení krátkodobé. Řešením by mohla být varianta inhalace sušených liposomů, které by zajistily dlouhodobé působení léčiv a byla by to ideální možnost dávkování léků na různá onemocnění, právě kvůli rychlému nástupu účinky, nižší dávce a toxicitě pro organismus oproti perorálně podávaným léčivům. Konkrétně by se mohlo jednat například o inzulín (lék na cukrovku), upustilo by tím od nepříjemného klasického injekčního podávání.

Cílem práce je připravit liposomální systémy vhodné ke sprejovému sušení, vznik prášku, následná rehydratace (pro obnovení struktury liposomů) vodou a pufrem o stejném pH jako je na plicní sliznici.

Současně jsou připravené vzorky charakterizovány množstvím metod. Mezi tyto metody se řadí dynamický rozptyl světla, elektroforetický rozptyl světla, rastrovací transmisní elektronová mikroskopie, skenovací elektronová mikroskopie, termogravimetrická analýza, infračervená spektroskopie a měření aerodynamické velikosti částic. Pomocí využití těchto metod jsou získány informace o liposomech v roztoku i o vysušeném prášku. Dojde k ověření vzniku liposomů v roztoku před sušením i jejich rekonstrukce po rehydrataci, současně se zjistí jejich velikost a náboj. U vysušeného prášku se zjišťuje jeho složení, aerodynamická velikost částic, zbytková vlhkost a zobrazuje se detail jeho povrchu.

Liposomy byly připraveny z fosfolipidu dipalmitoylfosfatidylcholinu (DPPC) rehydratací fosfolipidového filmu roztokem sacharózy pro ochranu struktury při sprejovém sušení. Lepší stabilizace liposomů byla zajištěna cholesterolem, ten ovlivní tekutost membrány, kyselinou fosfatidovou (PA) kvůli inter-vezikulární stabilizaci a polyethylenglykolem (PEG), který liposom obalí, zajistí neutrální náboj a brání agregaci.

2 TEORETICKÁ ČÁST

Teoretické části této diplomové práce je věnována problematice, která je nutná pro správné porozumění části praktické. Začátek teoretické části popisuje především fosfolipidy (viz 2.1), následuje z nich tvorba liposomů (viz 2.2) a vysvětlení všech metod, které byly využity pro charakterizaci připravených částic (viz 2.4 až 2.11).

2.1 Fosfolipidy

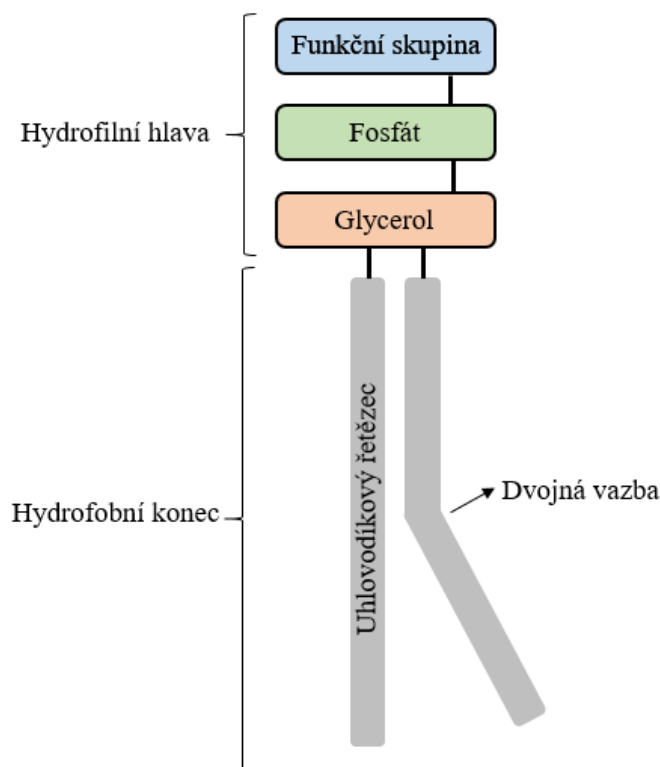
Hlavní složkou liposomové membrány jsou fosfolipidy, které se řadí mezi složené lipidy. Jsou to molekuly obsahující hydrofilní i hydrofobní část, čímž získávají amfifilní charakter. Fosfolipidy mají kladný, záporný nebo neutrální náboj. Ve vodném prostředí mohou samovolně agregovat a vytvářet například micely, membránové dvojvrstvy nebo liposomy [1, 2].

Amfifilní molekuly začínají agregovat ve vodném prostředí vlivem hydrofobních interakcí při dosažení tzv. kritické micelární koncentrace (CMC), ta závisí na teplotě, vlastnostech hydrofilní skupiny nebo délce uhlovodíkového řetězce [3, 4]. Tvar vzniklých agregátů je určen velikostí kritického sbalovacího parametru, jehož velikost závisí na ploše hydrofilní skupiny, délce hydrofobního řetězce a objemu, vypočítá se podle vzorce

$$P_c = \frac{v}{a_l l_c}, \quad (2.1)$$

kde P_c je kritický sbalovací parametr, v a l_c jsou objem a a_l je maximální prodloužená délka hydrofobního chvostu (chvostů). Podle jeho hodnoty vznikají již zmíněné micely, válcovité a diskovité útvary, vezikuly, dvojvrstvy nebo obrácené micely [5].

Fosfolipidy lze rozdělit na dvě skupiny: estery glycerolu (fosfoacylglyceroly, schéma zobrazeno na obr. 1) a estery sfingosinu (sfingomyeliny) [1, 2].



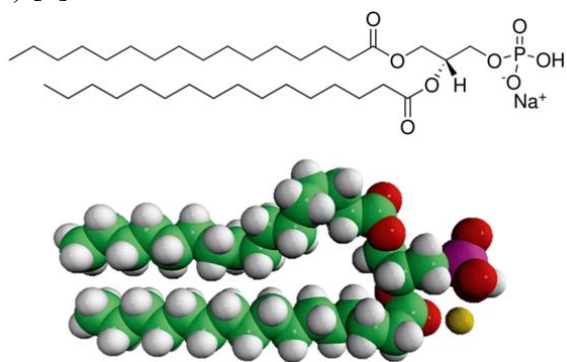
Obr. 1: Schéma fosfoacylglycerolu (upraveno dle [2])

Páteř struktury fosfoacylglycerolu tvoří glycerol, na němž jsou esterovými vazbami vázány dva uhlovodíkové zbytky mastných kyselin a kyselina fosforečná. Uhlovodíkové řetězce jsou tvořeny acyly mastných kyselin, připojenými ke kyslíkům v glycerolu. Na kyselině fosforečné je současně navázána funkční skupina. Podle této funkční skupiny vznikají například fosfatidylcholin, fosfatidylglycerol, fosfatidylinositol, fosfatidylserin apod. Glycerol, kyselina fosforečná a funkční skupina společně tvoří hydrofilní hlavy, druhou částí fosfolipidu jsou zbytky mastných kyselin, které představují hydrofobní část. [1, 2].

2.1.1 Kyselina fosfatidová

Kyselina fosfatidová (PA) je nejmenší a nejjednodušší fosfolipid. Jedná se o prekurzor dalších složitějších fosfolipidů. Stejně jako ostatní fosfolipidy se i PA vyskytuje v membránových dvojvrstvách a přispívá tak k fyzikálním vlastnostem membrány. Při fyziologickém pH má záporný náboj, je to silný aniont, přispívá tak k zápornému náboji celé membrány [6]. PA má vůči uhlovodíkovému řetězci malou vysoce nabitou hlavní skupinu, viz obr. 2. Malá hlavní skupina lépe zapadá do vnitřní vrstvy, kde je konvexní (negativní zakřivení) membrány, z toho důvodu může být její distribuce v liposomu nesymetrická [7].

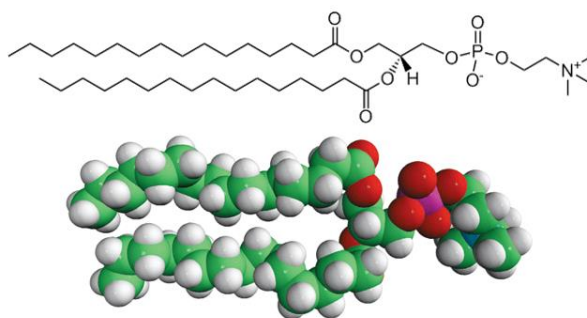
Díky svému zápornému náboji může sloužit jako pilíř pro navázání kladných látek. PA je životně důležitý buněčný lipid, jehož hladina je v buňkách udržována na nízkých hodnotách vlivem působení fosfohydroláz, ty přeměňují PA na diacylglycerol, který složí jako výchozí látka pro tvorbu různých lipidů. Současně je PA součástí několika buněčných funkcí u rostlin, zvířat a mikroorganismů (růst a diferenciacie buněk, regulace buněčného cyklu, apoptóza, tvorba stresových hormonů) [6].



Obr. 2: Struktura PA včetně 3D zobrazení [8]

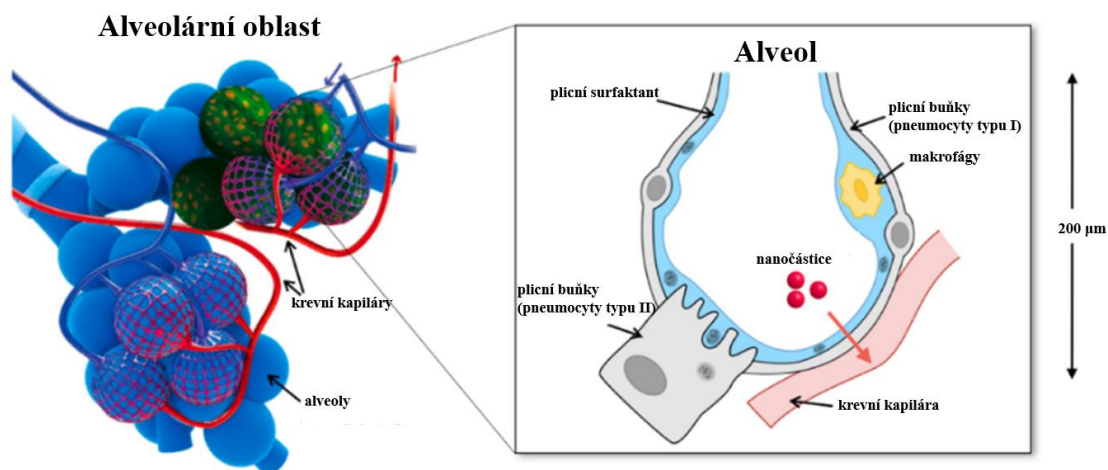
2.1.2 Dipalmitoylfosfatidylcholin

Dipalmitoylfosfatidylcholin (DPPC) neboli lecitin je fosfolipid skládající se z palmitové kyseliny, která je připojena k hlavní skupině fosfatidylcholínu, což je možno vidět na obr. 3. [9]



Obr. 3: Struktura DPPC včetně 3D zobrazení [9]

DPPC je látka tělu vlastní, kromě jiného se jedná o hlavní složku plicního surfaktantu v alveolech, kde působí jako povrchově aktivní látka, pro snížení povrchového napětí vodní vrstvy. Má tak význam při výměně plynů v plicích. DPPC má stejně jako ostatní fosfolipidy hydrofilní i hydrofobní část, díky tomu se hromadí na fázovém rozhraní kapalina plyn. Na následujícím *obr. 4* je možné vidět alveolární oblast a samotný zvětšený alveol s plicním surfaktantem, který je tvořen pneumocyty typu II, což jsou plicní buňky [10, 11].

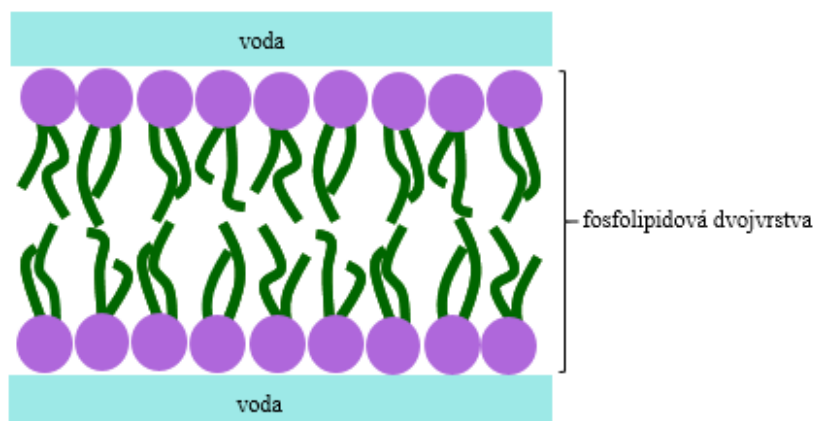


Obr. 4: Detail alveolární oblasti a alveol [12]

Kromě plicních alveol, se DPPC využívá pro výzkumné účely jako je příprava liposomů a dvojvrstev při problematice dodávání léčiv do organismu. Další využití se najde ve farmacii u přípravy léků k léčbě syndromu respirační tísně (např. Curosurf®), kterou trpí nejčastěji předčasně narozené děti, kterým se ještě nevyvinuly dostatečně plice s plicním surfaktantem [10].

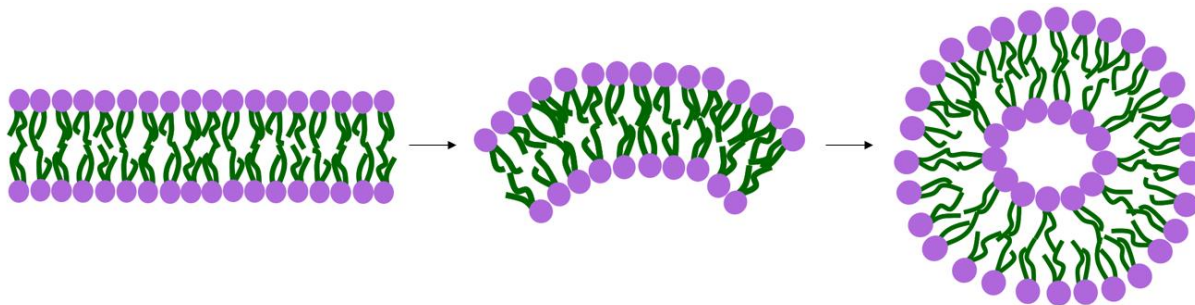
2.1.3 Fosfolipidové membrány

Fosfolipidy jsou amfifilní látky (viz 2.1) a vlivem hydrofobního efektu se organizují do větších struktur jako na *obr. 5*. Hydrofobní molekuly nevytvářejí s polárními molekulami vody vazby, naopak se snaží o větší uspořádání vody ve svém okolí. Názorným příkladem může být vznik olejového oka na hladině vody. Molekuly se uspořádají, tím sníží entropii, ale současně při agregaci je potřeba menší množství molekul vody pro organizaci kolem jednotlivých mastných ok a celková entropie se zvýší [2].



Obr. 5: Fosfolipidová dvojvrstva (upraveno dle [2])

Síly, které řídí uspořádání fosfolipidů do dvojvrstvy, přidávají dvojvrstvě i samozacelovací schopnost. Pokud se v membráně vytvoří trhлина, vznikne volné rozhraní s vodou, které je energeticky nevýhodné, tak se fosfolipidy samovolně přeuspořádají, aby trhlinu opravily. Kdyby došlo k velkému poškození, může dojít k úplnému rozpadu dvojvrstvy. Volnému rozhraní lze zabránit tím, že planární dvojná vrstva, jejíž hrany jsou v kontaktu s vodou, se uzavře a vytvoří uzavřený útvar (viz *obr. 6*), který je energeticky výhodný na rozdíl od planární dvojně vrstvy [2].

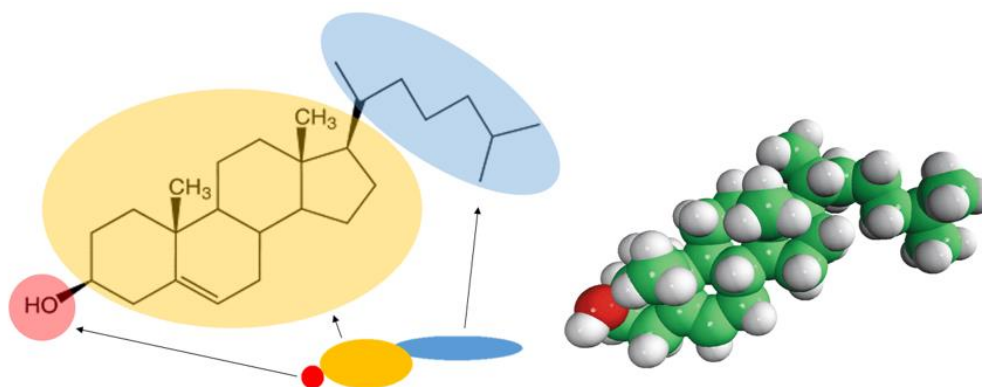


Obr. 6: Tvorba uzavřeného oddílu z planární dvojvrstvy (upraveno dle [2])

Fosfolipidy ve dvojvrstvě se mohou pohybovat, z toho důvodu se membrány považují za dvojrozměrné tekutiny. Málo častý pohyb je překlápění neboli flip-flop, přechod z jedné poloviny dvojně vrstvy do druhé. Takový pohyb je energeticky poměrně náročný a předpokládá se přítomnost enzymu tzv. flipázy. Častější je tepelný pohyb, který způsobuje otáčení jednotlivých fosfolipidů kolem podélné osy nebo výměna míst se sousedními molekulami takzvaná laterální difuze. Při nižších teplotách je membrána tužší a u vyšších teplot se tekutost zvyšuje [2].

Vliv na tekutost dvojných vrstev má délka uhlovodíkové řetězce a nasycení. Nenasycené uhlovodíkové řetězce obsahují jednu nebo více dvojných vazeb, které tvoří nepravidelnost v řetězci (viz *obr. 1*) brání těsnému přiléhání řetězců k sobě, a v důsledku toho je membrána tekutější. Delší uhlovodíkové řetězce k sobě oproti kratším těsněji přiléhají a membrána je viskóznější. Čím je membrána tužší, tím vyšší je teplota fázového přechodu. Jedná se o teplotu, kdy membrána přechází z pevné uspořádané fáze do kapalné neuspořádané [7, 13].

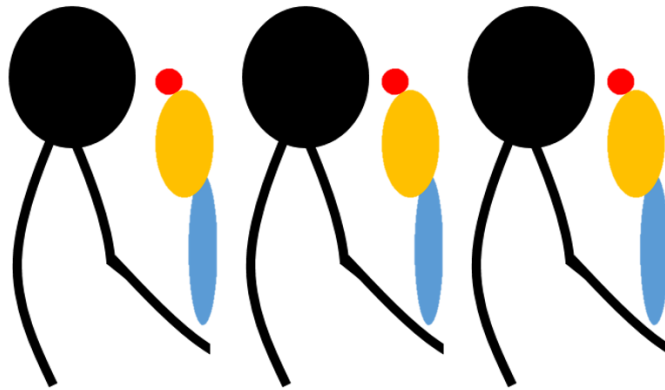
Na viskozitu membrány může mít vliv přidavek cholesterolu. Cholesterol se řadí mezi steroly. Jeho struktura je zobrazena na *obr. 7*, zahrnuje tetracyklický kondenzovaný kruhový skelet s jednou hydroxylovou skupinou na třetím uhlíku, dvojnou vazbu mezi pátým a šestým uhlíkem a isooktylový uhlovodíkový postranní řetězec na sedmnáctém uhlíku.



Obr. 7: Zobrazení cholesterolu včetně 3D struktury [14, 15]

Molekula je kromě flexibilního postranního řetězce planární a rigidní. Cholesterol se díky hydroxylové skupině řadí mezi amfifilní látky, bez ní by byl hydrofobní. Hydroxylová skupina je důležitá nejen kvůli dodávání amfifilního charakteru, ale také zprostředkovává vodíkové vazby cholesterolu s vodou nebo případně s lipidovými složkami buněčné membrány. Orientace cholesterolu ve fosfolipidové dvojvrstvě je podobná jako u samotných fosfolipidů, polární hydroxylová skupina směřuje k vodné fázi a zbytek je paralelní s uhlovodíkovými řetězci fosfolipidů [14].

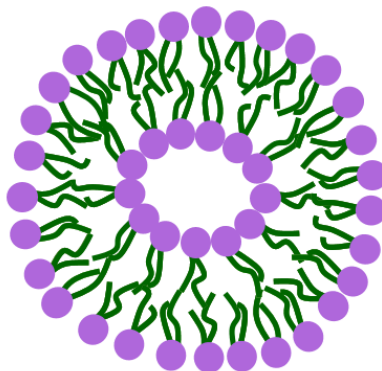
Cholesterol reguluje tuhost a tekutost membrán, díky němu se membrány stávají těsnějšími, zamezuje tak úniku enkapsulovaných látek a zaručí plynulejší fázový přechod při nižších teplotách [7]. Přítomnost cholesterolu v membránách obsahujících nenasycené uhlovodíkové zbytky zajišťuje vyplnění mezer mezi fosfolipidy (viz obr. 8), které byly způsobeny právě dvojnými vazbami. Naopak u nasycených fosfolipidů může přítomnost cholesterolu narušit pravidelnou strukturu fosfolipidové dvojvrstvy [2, 13].



Obr. 8: Začlenění cholesterolu mezi fosfolipidy (upraveno dle [2])

2.2 Liposomy

Struktura liposomů (viz obr. 9) byla poprvé publikována v polovině 60. let britským vědcem Alecem Banghamem a jeho kolegy. Od té doby byly liposomy široce zkoumány jako transportní vezikuly pro léčiva, proteiny, nukleové kyseliny a zobrazovací činidla. Způsoby podávání zahrnují nitrožilní infuze, injekce, lokální infiltrace nebo orální inhalace [16].



Obr. 9: Liposom (upraveno dle [13])

Lipidy tvořící liposomy mohou být přírodní nebo syntetické. Liposomy jsou biokompatibilní a biologicky odbouratelné, což je činí vhodnými pro biomedicínský výzkum. Mohou doručit

látky přímo do místa účinku prostřednictvím pasivního nebo aktivního cílení, čímž se sníží systémové vedlejší účinky a maximalizují se terapeutické přínosy [16, 17].

Liposomy mohou být nosiči jak hydrofilních, tak hydrofobních látek díky jejich vodnému jádru a fosfolipidové dvojvrstvě. Liposomy poskytují vynikající ochranu enkapsulovaných látek před fyziologickou degradací, umožňují prodloužení doby uvolňování léku a zároveň prodlužují poločas rozpadu léku [16]. Terapeutická oblast se nejčastěji zaměřuje na léčbu rakoviny, infekce, anestezie, vakcín nebo onemocnění plic. Nejčastější lékové formy liposomů jsou suspenze a prášky [16].

Vlastnosti liposomů se liší podle lipidů, ze kterých jsou složeny, povrchového náboje, velikosti a způsobů přípravy. Složení dvojvrstvy ovlivňuje také tuhost a tekutost membrány [18].

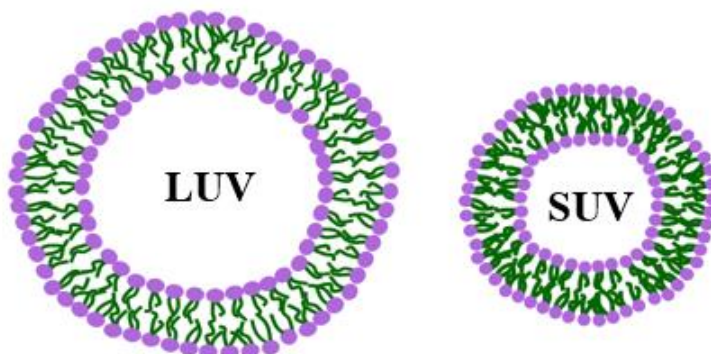
Liposomy mohou mít různou velikost a více vrstev, podle vrstev je lze rozdělit do dvou skupin. Jedna skupina jsou multilamelární vezikuly (MLV) a druhá unilamelární vezikuly.

U multilamelárních liposomů (MLV) mají vezikuly cibulovou strukturu, tedy více vrstev. Jednotlivé fosfolipidové vrstvy jsou od sebe odděleny vodnou fází, viz *obr. 10*. Jejich velikost může dosahovat až 5 μm [13, 18].



Obr. 10: Multilamelární liposom (upraveno dle [13])

Na *obr. 11* jsou zobrazeny dvě skupiny unilamelárních vezikul: velké unilamelární vezikuly (LUV) a malé unilamelární vezikuly (SUV). Takové liposomy mají pouze jednu fosfolipidovou membránu. Velikost malých unilamelárních liposomů (SUV) se pohybuje v rozmezí 20-100 nm, u velkých (LUV) 100-250 nm [13, 18].



Obr. 11: Velký a malý unilamelární liposom (upraveno dle [13])

2.2.1 Příprava liposomů

Vlastnosti vyrobených liposomů přímo souvisejí se způsobem jejich přípravy. Metod přípravy liposomů existuje velké množství, níže je několik popsáno konkrétněji. Při výběru metody je potřeba vzít v úvahu několik parametrů: fyzikálně-chemické vlastnosti enkapsulovaného materiálu, povahu média pro dispergaci liposomů, účinnou koncentraci zapouzdřeného média a jeho koncentraci, systémové dodávání liposomů do organismu, velikosti, polydisperzitu nebo reprodukovatelnost. Klíčovým parametrem při určování cirkulačního poločasu liposomů je právě zmíněná velikost. S velikostí souvisí také množství enkapsulovaného léčiva a počet dvojrstev připraveného liposomu [17].

Proliposomová metoda se řadí mezi jedny z nejjednodušších, spočívá v rozpuštění lipidů ve vodě a ethanolu při vyšší teplotě až vznikne pasta. Do pasty se za stálého míchání přikapává voda nebo pufr a vzniklá suspenze se po dobu jedné hodiny hydratuje. Touto metodou vznikají MLV. Nevýhodou metody je její špatná reprodukovatelnost [19].

Další možností, jak připravit liposomy, je injekční metoda. Lipidy jsou rozpuštěné v ethanolu nebo etheru a za stálého míchání se vstříkuje tato směs do vody, následuje odstranění rozpouštědla rotačním odpařováním nebo centrifugací. Metoda je jednoduchá a vhodná pro přípravu většího množství liposomů, jejich velikost závisí na koncentraci lipidů v rozpouštědle a rychlosti vstřikování [19].

Emulgační metoda je podobná injekčním metodám, rozdíl je v tom, že do organické fáze se přidává malé množství vody a vytvoří se emulze vody v organické fázi. Lipidy vytvoří monovrstvu kolem kapiček vody, organické rozpouštědlo se odpaří a v průběhu vypařování se tvoří liposomy. Hlavní výhodou emulgační metody je, že poskytuje vyšší enkapsulační účinnost ve srovnání s injekčními metodami [19].

Metoda využívaná pro přípravu liposomů v této práci se nazývá odpařování rozpouštědla neboli hydratace lipidového filmu. Metoda je jednoduchá a skládá se ze tří základních kroků. Prvním krokem je rozpouštění lipidů v organickém rozpouštědle např. methanol, chloroform nebo jejich směs pro zajištění rozpouštění všech komponent. Druhým krokem je odstranění rozpouštědla a to odpařováním. Odpařování může probíhat buďto samovolně nebo na rotační odparce za sníženého tlaku. Po odpaření vznikne tenký film lipidů. Posledním krokem je hydratace. Vzniklé liposomy mají velikost kolem 200-1000 nm, řadí se tak k MLV. Následovat mohou sekundární úpravy, ke kterým se řadí sonifikace nebo extruze pro redukci velikosti liposomů [13].

Sonifikace je metoda pro zmenšení MLV a LUV na SUV. Existují dva typy sonifikace a to buď pomocí sondy nebo vodní lázně. V případě využití sondy, je špička sonifikátoru ponořená přímo do disperze liposomů a vstupuje tak do ní velké množství energie, narušují se vnější vrstvy a vznikají menší vezikuly. Nevýhodou je zahřátí na vysokou teplotu a možnost znečištění vzorku ponořenou sondou. Sonifikace ve vodní lázni je šetrnější, protože do vzorku nevstupuje příliš velká energie a nedochází k tak velkému zahřívání, nevýhodou může být delší doba provedení [13, 18].

Druhou metodou pro zmenšení velikosti liposomů je zmíněná extruze. Liposomy se protlačí extruzní sestavou, která obsahuje polykarbonátovou membránu s póry o určité velikosti, tak aby došlo ke zmenšení velikosti liposomů [13, 18].

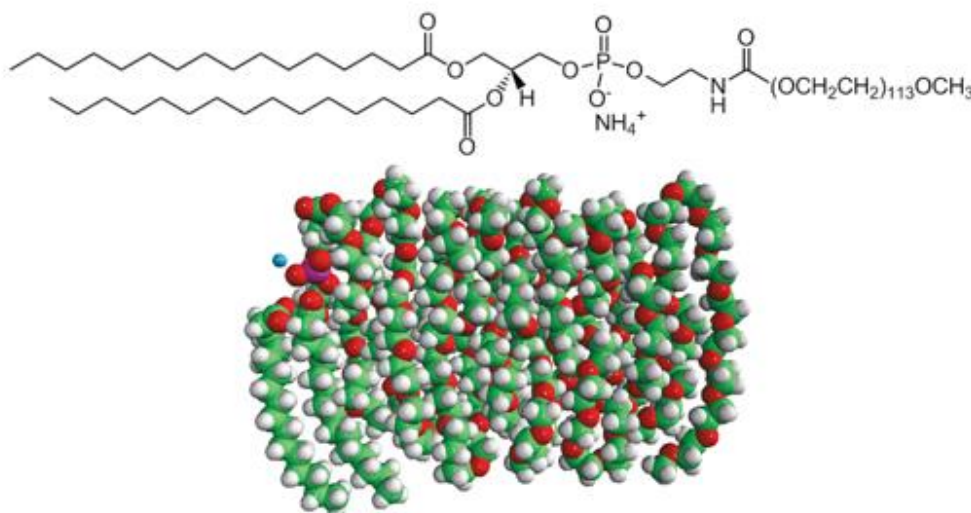
2.2.2 Typy liposomů

2.2.2.1 Konvenční liposomy

První generací liposomů, které byly vyvinuty, jsou konvenční liposomy. Skládají se z lipidové dvojvrstvy, ta může být složená z kationtových, aniontových nebo neutrálních fosfolipidů a cholesterolu. Konvenční liposomy měly velký potenciál z důvodu snížení toxicity léčiv a zlepšení jejich dodávání do nemocných tkání ve srovnání s volným léčivem. Nevýhodou systému je jeho rychlá clearance, což je množství plazmy, které se očistí od určité látky za jednotku času [20, 21]. Clearance je způsobena tzv. opsonizací. Opsonizace znamená označení částic protilátkami neboli opsoniny. Označené částice jsou tak určeny k fagocytóze [21, 22].

2.2.2.2 Liposomy s prodlouženou dobou cirkulace

Liposomy s prodlouženou dobou cirkulace neboli stealth liposomy se řadí k tzv. liposomům druhé generace. Pro celkové zlepšení stability liposomů a prodloužení jejich doby cirkulace v krvi byly zavedeny stéricky stabilizované liposomy nejčastěji pomocí polyethylenglykolu (PEG), který je zobrazen na obr. 12 [21, 23].



Obr. 12: PEG včetně jeho 3D struktury [24]

Polyethylenglykol je hydrofilní, inertní a netoxický polymer složený z dvouuhlíkatých jednotek, mezi kterými jsou etherové vazby. Nejčastěji se využívá ve farmacii, kosmetice a potravinářství. Konkrétně se využívá při hojení ran, při kolonoskopii (čištění střev), jako emulgátor nebo bývá součástí zubních past. Významný údaj je molekulová hmotnost, podle které má pak PEG různé využití a má vliv také na jeho degradaci. [25].

Povrchové modifikace liposomů pomocí PEG lze dosáhnout několika způsoby: fyzikální adsorpcí polymeru na povrch vezikul, začleněním PEG do systému v průběhu přípravy liposomů nebo kovalentním připojením reaktivních skupin na povrch předem připravených liposomů [23].

Navázání PEG na liposomy prokázalo několik biologických a technologických výhod. Mezi nejvýznamnější vlastnosti PEGylovaných liposomů patří již zmíněná delší cirkulace v krevním oběhu a tím zlepšená distribuce enkapsulovaných látek v potřebných tkáních. Dalšími důležitými výhodami jsou zabránění agregace vezikul, čímž se zlepšuje stabilita a snížení rychlosti clearance [23]. Snížení clearance dochází v důsledku toho, že PEG je velmi hydrofilní,

imobilizuje na svém povrchu molekuly vody, tím je omezen přístup a vazba opsoninů na povrch liposomů. Vytváří stérickou vrstvu a elektrostatickou stabilizaci [7, 23]. PEGylované liposomy jsou poté „neviditelné“ pro makrofágy a celkově imunitní systém [23]. Kromě zmíněného zabírání prostoru unikají PEGylované liposomy clearanci, protože mají neutrální náboj, stejně tak mají sníženou clearanci i aniontové liposomy [26].

2.2.2.3 Cílené liposomy

Název vychází z anglického pojmenování (ligand-targeted), jsou to liposomy funkcionalizované pomocí ligandů. Mechanismus těchto liposomů je podobný jako aktivní cílení. Aktivní cílení je definováno jako modifikace nanočástic cílovými skupinami, to jim umožňuje rozpoznat a navázat se na cílové buňky prostřednictvím interakce ligand-receptor [27, 28].

Takové liposomy nabízejí obrovský potenciál pro specifické dodávání léků do určených typů buněk nebo tkání, které produkují určité receptory, tím se zamezuje nechtěné interakci s jinými tkáněmi a tím možné toxicitě. Mezi ligandy, které jsou roubovány na povrch liposomu, se řadí např. protilátky, peptidy, proteiny nebo sacharidy [27, 28].

2.2.2.4 Liposomy reagující na stimuly

Název liposomů je přeložen z anglického stimuli-triggered liposomy. Jak už z názvu plyne, jedná se o liposomy, které jsou navrženy tak, aby zabránily uvolňování léčiva v krevním řečišti i tkáních a uvolňovaly svůj obsah jen tehdy, když jsou vystaveny spouštěcímu stimulu [27].

Podněty, které způsobí uvolnění enkapsulovaných léčiv se dělí na vnější a vnitřní spouštěče. Mezi vnitřní spouštěče se řadí pH, teplota nebo hladina určitých enzymů a mezi vnější patří teplota, magnetické pole, ultrazvuk i světlo [28].

Vnější spouštění je oproti vnitřnímu výhodnější a to především kvůli lepší možnosti kontrolovat, kdy přímo k léčbě dochází a dobu léčení. Nejideálnější systém je takový, kdy na liposomy je navázaný ligand, díky kterému je umožněno liposomu rozpoznat cílovou tkáň a následující vnější nebo vnitřní spouštěcí stimuly pro uvolnění enkapsulovaného léčiva v tomto místě [27].

2.2.2.5 Lipoplexy

Lipoplexy jsou kationtové liposomy, mají kladný náboj a mohou tak tvořit komplexy se zápornými nukleovými kyselinami jako je DNA a RNA. Lipoplexy vstupují do buněk prostřednictvím endocytózy nebo fúzí buněčnou membránou. Jejich úkolem je chránit nukleovou kyselinu před enzymatickou hydrolyzou a imunitním systémem. Uvnitř buňky by mělo dojít k uvolnění nukleové kyseliny v jejím původním stavu a může začít genová exprese [29, 30].

Tvorba lipoplexů má tři fáze. V první fázi je hnací silou tvorby lipoplexů s nukleovými kyselinami uvolňování malých protiiontů (kationty z povrchu nukleové kyseliny/proteinů a aniontů z povrchu kationtových liposomů). K uvolňování protiiontů dochází ve chvíli, kdy se nukleové kyseliny rychle vážou na opačně nabitý povrch lipidové soustavy. Druhá fáze spočívá v agregaci lipoplexů a závisí na množství záporného náboje. V poslední fázi dochází k tzv. nastavení pohyblivosti. Pohyblivost závisí na typu lipidu a při vazbě nukleové kyseliny se snižuje [29, 30].

2.3 Inhalační podávání léčiv

Počátky terapeutických inhalací sahají až do starověku, velkou pozornost si získaly v posledních padesáti letech. Dýchací cesty jsou orgán, který je neustále vystavován nečistotám okolí. Jedná se o komplexní systém s ochrannými mechanismy. Pokud nefungují ochranné mechanismy dostatečně nebo jsou přetíženy, dochází ke vzniku respiračních onemocnění [31].

Plíce dospělého člověka váží zhruba 1 kg. Aby bylo dosaženo dostatečně vysoké koncentrace orálně nebo nitrožilně podaného léčiva, musí být systémová dávka velká a může způsobovat vedlejší účinky. Velké molekuly jako třeba proteiny se např. po perorálním nebo intravenózním podání často nemusí do plic ani dostat, protože neprojdou skrz endoteliální a epiteliální bariéru. Není tedy jiná možnost, jak je do plic dostat, než inhalačně [31].

Inhalační podávání léčiv má své výhody i nevýhody. Plíce jsou velmi dobře prokrvený orgán s velkou plochou – inhalační podání léčiv má tak rychlý nástup účinku. Potřebná dávka léčiva je podstatně menší než při systémovém podání a tím se snižuje možnost nežádoucích účinků. V současné době se inhalačně podávají především léky na astma, bronchitidu, pneumonii, rakovinu plic apod. [31]. V budoucnu by se inhalačně mohly podávat i léčiva na jiné nemoci a to především z důvodu rychlého nástupu účinku, menší dávky a současně by mohly nahradit nepříjemné aplikace (např. intravenózní aplikace inzulínu při cukrovce) [32].

Plíce jsou větvený systém zakončený alveoly (plicními sklípky – viz kapitola 2.1.2). Komplikací může být velikost inhalovaných částic (prášek/kapičky). Pokud jsou částice příliš velké, usadí v orofaryngu (mandle, konec jazyka, patro, stěny hltanu), zatímco pokud jsou moc malé, mohou být vydechnuty z plic zpět ven nebo vychytávány makrofágy. Ideálně by jejich aerodynamická velikost měla být 0,5 až 5 μm [32].

Nevýhodou u inhalačního podání může být krátká doba účinku léčiva, kdy je léčivo odstraňováno z dýchacích cest přirozenými eliminačními mechanismy. Je tak nutné častější dávkování. Další nevýhodou může být komplikovanost plic, jak už bylo řečeno, mají rozvětvený tvar a vypadají různě u různých jedinců, protože mohou být modifikovány v důsledku onemocnění. Podle aktuální situace jedince se mění v plicích viskozita hlenu a imunologická bariéra představovaná makrofágy, což může dávkování také komplikovat [31, 33].

Mezi hlavní inhalační systémy, které se běžně využívají, se řadí (viz *obr. 12*) tlakově dávkované inhalátory (kapalná forma, koordinace stlačení a vdechu), nebulizátory (tvoří z kapaliny aerosol) a inhalátory suchého prášku (bez koordinace vdechnutí a stlačení, větší stabilita léčiva v suchém stavu) [31, 33].



Obr. 13: Zleva tlakově dávkovaný inhalátor, inhalátor suchého prášku, nebulizátor [34]

Tlakově dávkované inhalátory obsahují léčivo rozpuštěné nebo dispergované ve zkapalněných hnacích látkách. Aktivace (stlačení) přístroje se současným vdechnutím uvolní přesnou dávku, pro správné podání je nutná přesná koordinace stlačení a vdechnutí. Po vdechnutí se hnací látky rychle odpaří a v plicích zůstává pouze léčivo. Nebulizátory mohou generovat velké objemy aerosolu k vdechnutí, bez nutnosti sušení částic nebo využívání hnacího plynu. Nevýhodou nebulizátorů je jejich velikost, nejsou to kapesní zařízení, která může mít pacient stále u sebe. Inhalátory suchého prášku jsou ovládány dechem, čímž odpadá problém jako je u tlakově dávkovaných inhalátorů, kde je nutné spojení vdechnutí a dávkování [32].

2.3.1 Liposomy pro inhalační podávání

Liposomy, které byly podrobně popsány v kapitole 2.2, mají jedinečné vlastnosti a ty z nich dělají ideální kandidáty pro nosiče léčiv při různých onemocněních, jako jsou rakovina plic, astma, cystická fibróza nebo třeba cukrovka. Jak už bylo zmíněno, plíce nabízí jedinečnou možnost cílení díky velkému povrchu plic. Již dříve byla studována bezpečnost inhalace liposomů a bylo potvrzeno, že nevyvolávají žádné vedlejší nebo škodlivé reakce [32].

Je všeobecně známo, že látky enkapsulované v liposomech se mohou postupně uvolňovat. Uvolňování je ovlivněno strukturou liposomu a vlastnostmi enkapsulované látky. Inhalace léčiv enkapsulovaných v liposomech tak nabízí možnost delšího působení vlivem postupného uvolňování, což řeší nevýhodu krátké doby účinnosti zmíněnou v kapitole 2.3. Současně je výhodou složení liposomů. Liposomy jsou složeny z fosfolipidů a plicní surfaktant obsahuje právě 80-90 % fosfolipidů. Největší zastoupení má DPPC, je tak ideální pro přípravu liposomů [32, 35].

Pro inhalaci liposomů se jeví jako nejvhodnější inhalátor suchého prášku a to hned z několika důvodů. Inhalátor suchého prášku je malé zařízení, tudíž je snadno přenosný, není potřeba využívat hnací plyn, dávkování je jednoduché, finanční náklady jsou nízké a obecně stabilita formulace je vyšší v suchém stavu [33].

U inhalace liposomů pomocí tlakově dávkovaných liposomů hrozí, že liposomy budou v aerosolu tvořit větší částice, než jsou pro inhalaci vhodné a u nebulizátorů je problém se stabilitou liposomů u samotného procesu nebulizace, kde může dojít k rozpadu liposomů a uvolnění enkapsulované látky [32].

Pro využívání inhalátorů suchého prášku je potřeba liposomy usušit. Nejčastěji využívané metody sušení jsou lyofilizace a sprejové sušení. V případě sušení liposomů se nabízí jako vhodnější varianta sprejové sušení, protože sušení lyofilizací je mnohem dražší, je potřeba větší energie a samotný proces může narušit strukturu liposomů. Ve fázi mrazení mohou vznikat ledové krystaly a vyvolávat tak únik enkapsulovaných látek. Sprejové sušení je rychlejší, levnější a lze dosáhnout přípravy částic s požadovanými aerodynamickými vlastnostmi [32, 35].

2.4 Sprejové sušení

Sprejové sušení je metoda, kdy dochází k přeměně roztoku nebo suspenze na prášek působením horkého vzduchu. Historie sprejového sušení sahá až do roku 1860, ale první oficiální patent pro jednoduché sušící zařízení byl vydán až roku 1872 ve Spojených státech. S postupem času se metoda stávala čím dál tím víc bezpečná a vylepšená. Ve 20. letech

20. století se metoda začala aktivně využívat pro potravinářské účely při výrobě sušeného mléka, což je až dodnes jedna z nejrozšířenějších aplikací. Velký rozmach metody proběhl při 2. světové válce, protože se sušením snižoval objem a hmotnost přepravovaných potravin (především mléčné výrobky). V poválečném období se metoda začala využívat ve farmaceutickém, chemickém, keramickém a polymerním průmyslu [36].

V současné době se metoda sprejového sušení využívá v mnoha oblastech. Nejčastěji při výrobě léčiv, nápojů, příchutí, barviv, mléčných výrobků nebo pracích prostředků. Konkrétně v medicínských aplikacích se sprejové sušení využívá především na výrobu mikročástic určených pro enkapsulaci a systémy dodávání léčiv, které pak mohou být podávány orálně, pulmonálně, oftalmologicky, parenterálně nebo vaginálně [37].

2.4.1 Princip metody sprejového sušení

Samotný mechanismus sušení rozprašováním je založen na eliminaci vlhkosti pomocí vyhřívané atmosféry. Proces má tři hlavní fáze: atomizace, přeměna kapek na pevné částice a sběr částic. U přípravy vzorků pro sušení je nutné myslet na složení, a pokud je potřeba, tak přidat protektant (nejčastěji sacharidy jako sacharóza, laktóza, trehalóza), které dokáží zabránit degradaci vzorku nebo zhroucení struktury vlivem horkého plynu [36, 38].

Vzorek je v první fázi pomocí pumpy nasáván do sušárny, kde dochází k atomizaci. Existují různé atomizéry např. rotační (využívá odstředivou sílu) hydraulický tlakový (roztok je veden pod tlakem potrubím se snižujícím se průměrem), pneumatický tryskový (většinou dvoukapalinový, kde je do trysky přiváděn roztok i plyn).

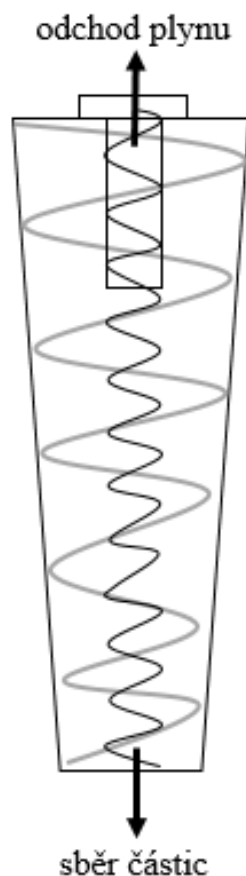
Roztok je rozprašen na malé kapičky atomizérem a teplým nosným plynem (vzduch, inertní plyn) veden do vyhřáté sušící komory. Tvorbou malých kapiček dojde ke vzniku větší povrchové plochy, čímž se optimalizuje přenos tepla a hmoty mezi sušícím plynem a částicemi kapaliny. Vznikají tak ideální podmínky pro proces odpařování [36, 38].

Druhá zmíněná fáze je přeměna kapek na částice, což je klíčová fáze a tvoří ji dvě části. Při první dochází ke kontaktu kapky a vzduchu, tím dojde k rychlému odpaření vlhkosti z povrchu kapky. V druhé části se vypařuje kapalina i z jádra kapky a vznikají tak zcela vysušené částice. V druhé fázi je velmi důležitý zvolený správný tvar a velikost sušící komory vzhledem k atomizéru a předpokládané velikosti částic. Je potřeba, aby došlo k vysušení kapiček dříve, než se dostanou ke stěnám komory, kde by se mohly usazovat [36, 38].

Opět existuje více druhů sušících komor a to souprůdé (sušící plyn a roztok se pohybují stejným směrem), protiprůdé (sušený roztok je vstřikován v opačném směru než sušící plyn) a smíšené průtokové komory (roztok je vstřikován v horní části komory, v protiproudu ke směru sušícího plynu) [36, 38].

Poslední fáze zahrnuje separační postup, při kterém se sušené částice oddělí od sušícího plynu. Nejčastěji jsou využívány cyklóny, kde je separační mechanismus založen na odstředivé síle. Sušící vzduch je společně s částicemi přiváděn do horní části kuželové cyklóny. Vzduch v cyklóně vytvoří vnější vír u stěn cyklóny. Částice jsou vlivem odstředivé síly tlačeny doprostřed, kde vzniká vnitřní vír v opačném směru, a částice se usazují ve sběrné nádobě, zatímco plyn je vypuzován z cyklóny horní stranou. I přes proudění vzduchu a vzniku odstředivé síly se v průběhu sušení částice mohou usazovat na vnitřní stěně cyklóny. Schéma celého procesu je zobrazeno na *obr. 14*. Dále se pro sběr částic mohou využívat např. tkaninové

filtry nebo elektrostatické odlučovače. Vysušené částice mohou mít různou velikost, tvar nebo mohou být i duté, vše záleží na složení vzorku a parametrech sušení [36, 38].



Obr. 14: Cyklóna pro sběr usušených částic (upraveno dle [36])

2.4.2 Parametry sušení

Konečné vlastnosti vysušených částic jsou ovlivněny nastavením zařízení i vlastnostmi sušené látky a podle těchto parametrů mohou být ovlivněny fyzikální vlastnosti výsledného suchého produktu. Optimalizace parametrů pro dosažení ideálního produktu je často běh na dlouhou trať, většinou se jedná o roky práce [36, 38].

Mezi parametry, které se nastavují na zařízení před samotným sušením, se řadí vstupní teplota sušícího plynu, průtok sušícího plynu, rychlost dodávky proudu do atomizéru a atomizační tlak. Vstupní teplota sušícího plynu má vliv na rychlost odpařování, ale musí být zvolena tak, aby nedošlo vlivem vysoké teploty k degradaci samotného vzorku, musí se volit podle složení sušeného materiálu. Průtok sušícího plynu je objem plynu, který je přiváděn do sušící komory za jednotku času. Průtok by měl být dostatečně nízký na to, aby zajistil úplné odpaření vlhkosti z částic, ale zároveň dostatečně vysoký na účinnou separaci cyklónou. Rychlost pumpování vzorku do atomizéru může mít vliv na velikost vzniklých kapiček, větší rychlost dodání způsobuje větší kapičky, menší rychlost naopak menší kapičky. Vliv na velikost kapiček má i atomizační tlak, větší způsobí menší kapičky a naopak [36, 38].

Viskozita vzorku, povrchové napětí, výstupní teplota, doba setrvání v sušící komoře a fyzikální vlastnosti suchého produktu jsou vlastnosti, které mají vliv na proces sušení nebo mohou být ovlivněny sušením, ale nedají se přímo nastavit. Viskozita vzorku je podstatná

především pro nasávání do atomizéru a následně pro samotný atomizér. Pokud by byl vzorek k sušení příliš viskózní, mohlo by docházet k ucpávání hadičky (nasávání vzorku) nebo atomizéru. Povrchové napětí souvisí s atomizací. K atomizaci dochází v důsledku narušení povrchového napětí vzorku, to znamená, že větší povrchové napětí brání atomizaci, v takovém případě je nutné napětí před sušením snížit například emulgací nebo homogenizací. Výstupní teplota je výsledek všech výměn tepla a hmoty uvnitř sušící komory, závisí na vstupní teplotě a průtoku sušícího plynu. Setrvání v sušící komoře je opět závislé na nastavení a to především průtoku sušícího plynu. Prášek, který je produktem sušení, může mít vlivem nastavení různé vlastnosti (velikost, zbytková vlhkost, stabilitu, ...). Dosažení požadovaných vlastností u prášku může být, jak už bylo zmíněno, vzhledem k proměnlivým velmi náročné [36, 38].

2.5 Dynamický rozptyl světla

Metoda měření dynamického rozptylu světla (DLS) se jinak nazývá fotonová korelační spektroskopie a využívá se k měření velikosti částic podle toho, jak rozptylují světlo z laseru. DLS je široce využívaná analytická metoda používaná v různých oblastech přírodních věd, materiálech i v procesech průmyslové kontroly kvality [39].

Při dopadu laserového paprsku na koloidní částice dochází k rozptylu elektromagnetických vln do všech směrů. Laserové světlo, které je rozptýleno částicemi, je zaznamenáváno a kvantifikováno detektorem pro počítání fotonů umístěným pod specifickým úhlem. Počet fotonů dopadající na detektor v čase kolísá, to je způsobeno neustálým neuspořádaným pohybem částic, který se nazývá Brownův pohyb. Částice se podle své velikosti pohybují různými rychlostmi, malé částice rychleji než velké a rozptýlené světlo pak fluktuuje. Současně je výsledné rozptýlené světlo dáno i konstruktivními a destruktivními interferencemi.

Intenzitu rozptýleného světla porovnává po krátkých časových intervalech korelátor, pozoruje rozklad korelace. Korelace s časem klesá, u malých částic klesá rychlejší než u velkých, protože velké částice se pohybují pomalu, tudíž se jejich pozice mění pomaleji a pokles korelace je pomalejší. Pomocí autokorelační funkce jsou získány korelační konstanty. Následuje vyhodnocení podle určitého algoritmu a je zjištěna difúzní konstanta. Na rychlost pohybu částic v roztoku má vliv teplota a viskozita, proto je potřeba tyto dvě veličiny zadat do nastavení měření, aby nedošlo ke zkreslení výsledku. Ze známe difúzní konstanty, viskozity a teploty lze pomocí Stokes-Einsteinově rovnici určit hydrodynamický poloměr částic. Hydrodynamický poloměr částic je poloměr hypotetické koule, která by se pohybovala stejnou rychlostí jako částice v roztoku, využívá se vzorec

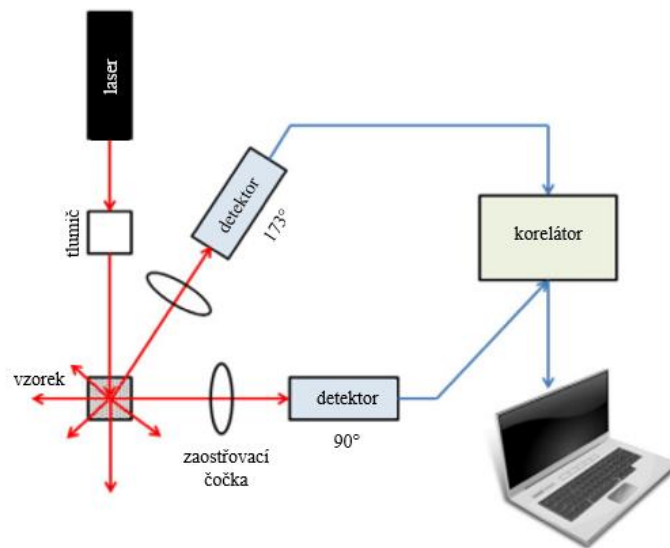
$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_h}, \quad (2.2)$$

kde D je translační difúzní konstanta, k_B je Boltzmanova konstanta, T je teplota, η je viskozita rozpouštědla a r_h je zmíněný hydrodynamický poloměr [39].

Existuje několik přístrojů pro měření rozptylu světla, ale princip je všude stejný. Základem je laser, vzorek v kyvetě a detektor světla. K dalším částem se řadí tlumič před vzorkem, zaostřovací čočka a korelátor [40]. Instrumentace je zobrazena na *obr. 15*.

Jako zdroj světla se využívají lasery o různých vlnových délkách. Nejčastější lasery jsou neonové a diodové o vlnových délkách např. 633, 532 nebo 638 nm. Na vzorky se běžně využívají skleněné kyvety, vzorek by měl být čistý, homogenní a průhledný bez sraženin. U některých přístrojů je detektor umístěn pod úhlem 90°, ale častější je úhel 173°, protože

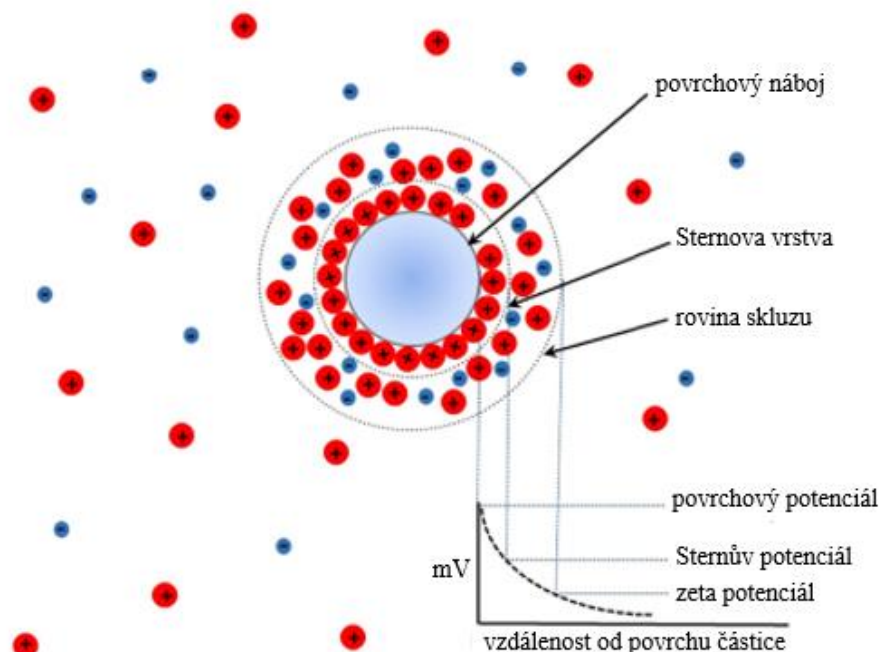
umožňuje detekci zpětného rozptylu a vylučuje nadměrné rozptýlené světlo v přímém směru. Důležitou částí je i operační softwarové rozhraní, které umožní uživateli vkládat data jak pro různá rozpouštědla (např. viskozitu), materiály (např. absorpce) tak i nastavení teploty, opakování měření apod. [40].



Obr. 15: Instrumentace měření dynamického rozptylu světla [40]

2.6 Elektroforetický rozptyl světla

Elektroforetický rozptyl světla (ELS) je metoda, kterou se zjišťuje zeta potenciál (ZP) neboli elektrokinetický potenciál. Nejčastěji se využívá k zjištění stability částic v koloidním roztoku. Zeta potenciál vzniká na rovině skluzu koloidní částice v rozpouštědle za přítomnosti elektrického pole. Kromě potenciálu na rovině skluzu vznikají na definovaných místech kolem částice další potenciály (povrchový potenciál neboli Nerstův potenciál a Sternův potenciál). Na obr. 16 je zobrazena nabitá částice s elektrickou dvojrůstkou [41].

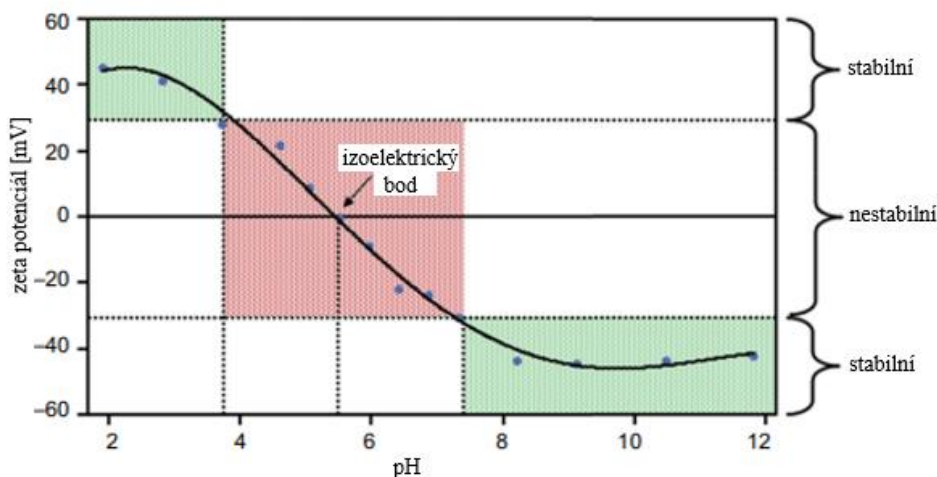


Obr. 16: Elektrická dvojrůstka kolem nabitě částice v elektrickém poli [41]

Nabitá částice na svůj povrch přitahuje ionty/molekuly s opačným nábojem, než má ona sama, tato první vrstva se nazývá Sternova. Se vzdáleností od povrchu částice klesá přitažlivá síla částice (elektrostatická síla) a v okolí Sternovy vrstvy se vyskytují ionty se stejným nábojem i opačným vzhledem k náboji částice. Této vrstvě se říká difúzní a společně se Sternovou vrstvou vytváří zmíněnou elektrickou dvojvrstvu. Složení difúzní vrstvy je dynamické a mění se podle pH, iontové síly, teploty nebo koncentrace. Uvnitř difúzní vrstvy se vyskytuje hypotetická rovina nazývaná rovina skluzu, která funguje jako rozhraní pro určení, které ionty se budou pohybovat s částicí nebo budou volně v rozpouštědle [40, 41].

Výsledná hodnota zeta potenciálu vypovídá o stabilitě částic. Pokud je náboj dostatečně nízký (pod -30 mV) nebo vysoký (nad 30 mV), částice se odpuzují a nedochází k aglomeraci. V případě, že je hodnota zeta potenciálu mezi -30 mV a 30 mV, tak jsou nestabilní. Na ZP má vliv několik faktorů [41].

Největší vliv na hodnotu zeta potenciálu má pH roztoku viz *obr. 17*. Při nulové hodnotě zeta potenciálu se částice chová elektricky neutrálně (nemá žádný náboj), říká se tomu izoelektrický bod. Částice ztrácejí svou stabilitu, když jsou pH hodnoty blízké izoelektrickému bodu. Mimo tuto oblast jsou hodnoty zeta potenciálu považovány typicky za stabilní (tzn. při vyšším a nižším pH) [41].

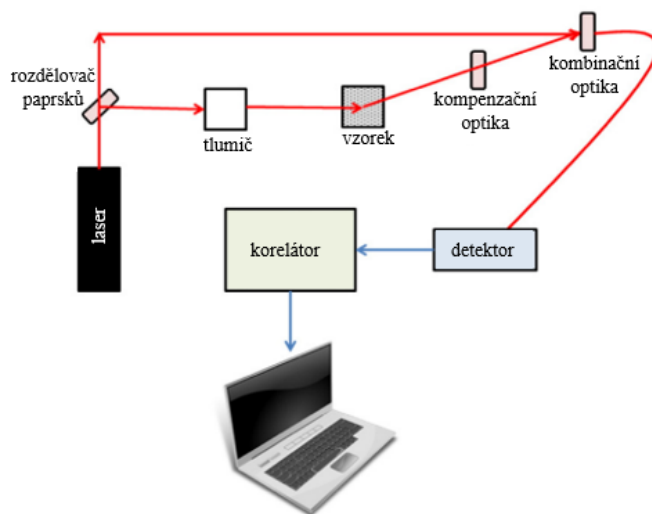


Obr. 17: Znárodnění vlivu hodnoty pH na stabilitu částic [41]

Iontová síla a koncentrace mají také vliv na ZP, s rostoucí iontovou silou ZP klesá a naopak. U koncentrace je průběh opačný a složitější, ale obecně se dá říct, že s vyšší koncentrací se ZP také zvyšuje [40].

Měření zeta potenciálu metodou elektroforetického rozptylu světla probíhá podobně jako měření DLS, využívají se stejné přístroje, ale je nutné vytvořit elektrické pole, k tomu se využívají ponorné články s elektrodami. Instrumentace je zobrazena na *obr. 18*. Nabitě částice se pak pohybují k elektrodě s opačným nábojem (elektroforéza). Tedy například záporně nabitá částice se tak bude i s okolními ionty pohybovat ke kladné elektrodě. Princip měření je potom takový, že laserový paprsek je rozdělen na dva, jeden prochází vzorkem, druhý je referenční. Pohyblivé částice během elektroforézy rozptylují dopadající laserový paprsek a rozptýlené světlo má jinou frekvenci než původní laser, software následně vyhodnotí

frekvenční posun (tzv. Dopplerův posun) a pomocí matematických výpočtů je získána hodnota zeta potenciálu [40].



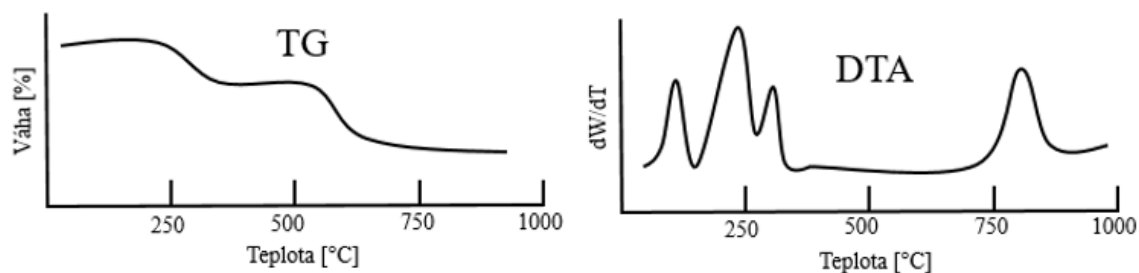
Obr. 18: Instrumentace měření elektroforetického rozptylu světla [40]

2.7 Termogravimetrická analýza

Termogravimetrická analýza (TGA) je technika využívaná v termické analýze, kde se zaznamenává změna hmotnosti látky jako funkce teploty nebo času. Nejčastěji se pomocí této analýzy měří např. tepelná stabilita materiálů, obsah plniva v polymerech nebo obsah vlhkosti [42].

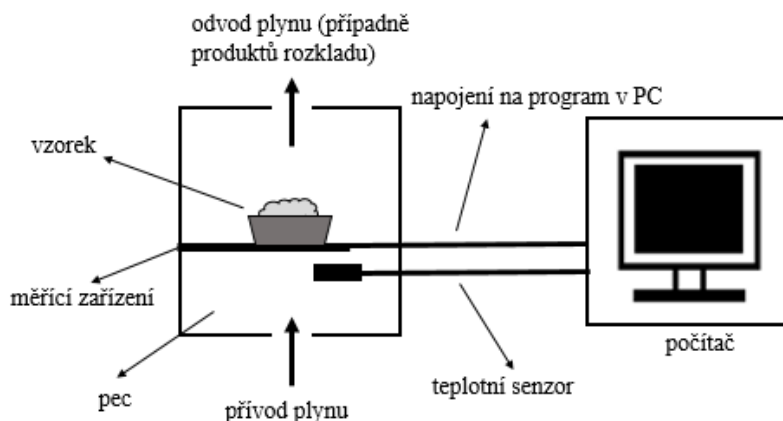
Termogravimetrické metody se dělí na tři typy. První je statická (izotermická) termogravimetrie, kde se zaznamenává hmotnost vzorku jako funkce času při konstantní teplotě. Druhým typem je kvazistatická termogravimetrie, vzorek se zahřívá, dokud nedojde do chvíle, kdy bude jeho hmotnost i přes zvyšující se teplotu konstantní. Posledním typem je dynamická termogravimetrie, zde dochází k zahřívání vzorku předem definovanou rychlostí, většinou lineárně [42].

Princip metody začíná zahříváním vzorku se známou počáteční hmotností a v různých časových intervalech se zaznamenává změna hmotnosti s rostoucí teplotou. Výsledkem je graf (viz obr. 19) závislosti hmotnosti na teplotě metodou termogravimetrie (TG) nebo metodou diferenční termické analýzy (DTA). TG je záznam změny rychlosti jako funkce teploty nebo času, druhá možnost je křivku derivovat (DTA) a je získána závislost derivace termogravimetrické křivky na čase nebo teplotě. Metoda TG se častěji využívá na měření změn hmotnosti materiálů a metoda DTA na stanovení např. teploty tání [42].



Obr. 19: Ukázka výstupu z termogravimetrického měření (upraveno dle [42])

Na obr. 20 je zobrazeno schéma měřicího přístroje. Mezi základní části patří pec s prostorem pro vzorek, v peci je zvolená potřebná atmosféra (např. vzduch nebo inertní plyn) a další nedílnou součástí je měřící zařízení napojené na počítač se softwarem pro vyhodnocení potřebných dat [42, 43].

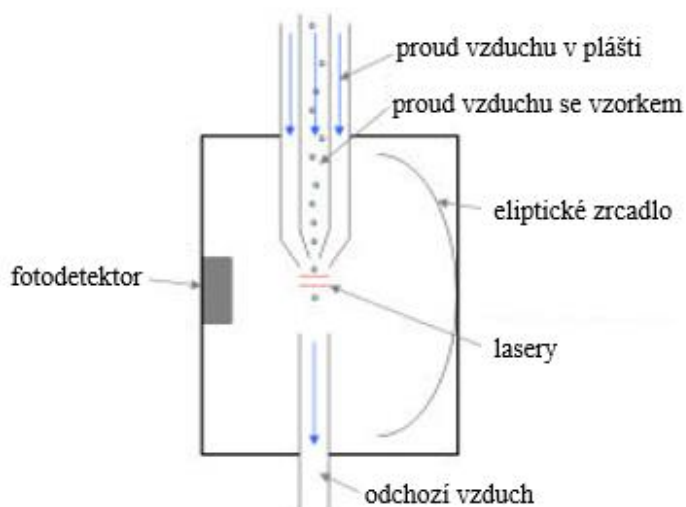


Obr. 20: Instrumentace TGA měření (upraveno dle [42, 43])

2.8 Aerodynamická velikost částic

Aerodynamická velikost částic neboli střední hmotnostní aerodynamický průměr (MMAD) se liší od geometrické velikosti částic tím, že zahrnuje vliv proudění vzduchu na chování částice. Jde tak o velikost, která je velmi důležitá u částic pro plicní inhalaci. Aerodynamická velikost je taková velikost, kterou by měla hypotetická koule s hustotou 1 g/cm^3 a stejným aerodynamickým chováním jako zkoumaná částice. Z toho plyne, že částice se stejnou velikostí, ale různou hustotou, budou mít odlišné hodnoty aerodynamické velikosti. Částice s nižší hustotou budou mít větší aerodynamickou velikost oproti částicím s hustotou větší [44].

Prášek je nasáván do trubice, kde vzniká podtlak, který umožní nasávání dalšího prášku a současně zde působí smykové síly, které zapříčiní rozdělení prášku na jednotlivé částice (deaglomerace). Částice jsou unášeny proudem vzduchu tryskou, na konci jsou dva laserové paprsky, což je možno vidět na obr. 21.

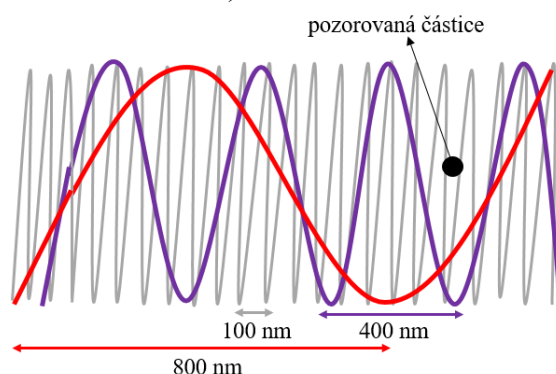


Obr. 21: Znárodnění měření aerodynamické velikosti částic [44]

Částice při průchodu lasery vytvářejí dva pulsy rozptýleného světla – časové zpoždění vzniklé průchodem skrz dva paprsky souvisí s rychlostí částic a v tom případě i s jejich aerodynamickým průměrem. Rozptýlené světlo je pomocí eliptického zrcadla shromažďováno na fotodetektor a následně vyhodnoceno v počítači [44].

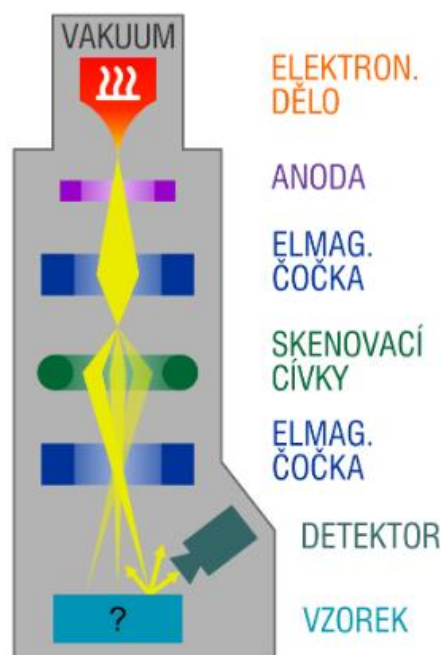
2.9 Skenovací elektronová mikroskopie

Skenovací neboli rastrovací elektronová mikroskopie (SEM) se od běžné mikroskopie liší tím, že místo fotonů ze světelného paprsku se využívá paprsek elektronů a skleněné čočky jsou nahrazeny elektromagnetickými. Na obr. 22 je zobrazeno elektromagnetické vlnění elektronů, které má kratší vlnovou délku než světlo, z toho důvodu poskytuje elektronový mikroskop větší rozlišení (může být až v řádech nanometrů) [45–47].



Obr. 22: Různé vlnové délky elektromagnetického vlnění

V komoře, kde dochází k interakci elektronů se vzorkem, je nutné, aby bylo vakuum, které zabrání srážkám elektronů s molekulami vzduchu. Elektrony vycházejí vlivem velkého napětí z kovového hrotu (elektronové dělo), procházejí anodou, elektromagnetickou čočkou, skenovací cívkou, další elektromagnetickou čočkou a dopadají na vzorek, kde probíhá skenování jeho povrchu (viz obr. 23) [45–47].



Obr. 23: Cesta paprsku ze zdroje ke vzorku u SEM [45]

Při kontaktu vysokoenergetických elektronů a vzorku se vytváří několik možných signálů, které mohou být detekovány – sekundární elektrony, zpětně odražené elektrony, rentgenové záření, katodoluminiscence nebo Augerovy elektrony. Všechny tyto signály se řadí k nepružnému rozptylu, kdy dopadající elektrony přenesou svou energii na vzorek a tím dojde ke vzniku zmíněných signálů [45–47].

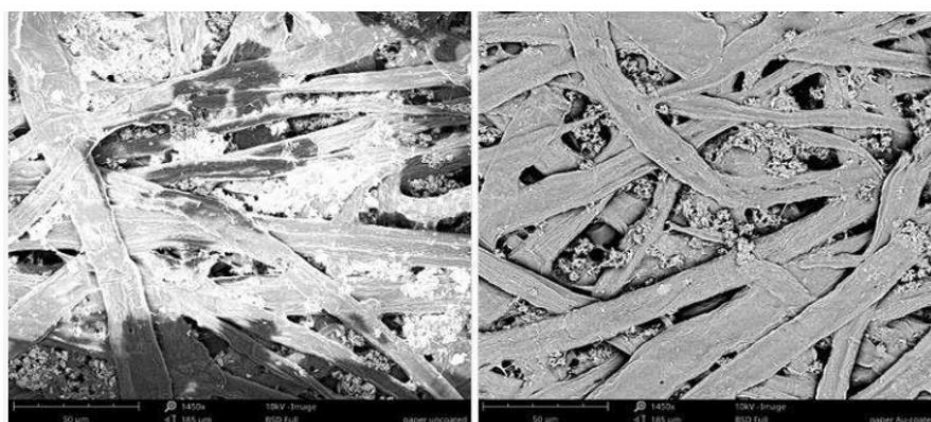
Sekundární elektrony pocházejí z místa dopadu svazku elektronů, jedná se o hloubku maximálně kolem desítek nanometrů. Detekcí sekundárních elektronů můžeme zjistit, jak vypadá struktura povrchu vzorku, a poskytují topografické informace. Detekce sekundárních elektronů probíhá pod určitým úhlem od vzorku, což umožňuje, aby zobrazená místa byla buď tmavší nebo světlejší, vzniká tak trojrozměrný efekt [45, 47].

Zpětně odražené elektrony pocházejí z větší hloubky (až stovky nanometrů) než sekundární elektrony a poskytují informace topografické, materiálové i krystalografické. Při zobrazování vzorku pomocí zpětně odražených elektronů závisí i na jejich prvkovém složení, prvky s větším atomovým číslem jsou znázorněny světleji než s nižším [45, 47].

Rentgenové záření vzniká při dopadu elektronů na povrch vzorku. Detekcí rentgenových paprsků lze zjistit informace o elementárním složení vzorku. Podle použitého detektoru se analyzují jednotlivé prvky, jimž odpovídá rentgenové záření o určité vlnové délce, nebo celé vyzářené spektrum [45, 47].

Katodoluminiscence je emise viditelného světla po interakci se vzorkem, umožňuje tak tvorbu barevného obrazu vzorku. Augerovy elektrony se využívají k prvkové analýze, vznikají tak, že elektron ve vnější slupce získá energii a opustí atom, čímž dojde k emisi, která je detekována. Energií, kterou získal, vznikla přechodem jiného elektronu do nižší energetické hladiny [45, 47].

Aby bylo možné detekovat některý z výše zmíněných signálů, je nutné, aby vzorky byly vodivé. V případě nevodivého vzorku by vzorek působil jako elektronová past, akumulací elektronů by se nabíjel a vytvářel by bílé plochy, které by rušily vzhled výsledného obrazu vzorku. Nevodivé vzorky se z toho důvodu potahují nejčastěji tenkou vrstvou zlata (kolem 10 nm) a to následně zabrání akumulaci elektronů. Rozdíl při zobrazení nevodivého a vodivého vzorku je zobrazen na *obr. 24* [48].



nevodivý vzorek

vodivý vzorek

Obr. 24: Rozdíl zobrazení nevodivého a vodivého vzorku [48]

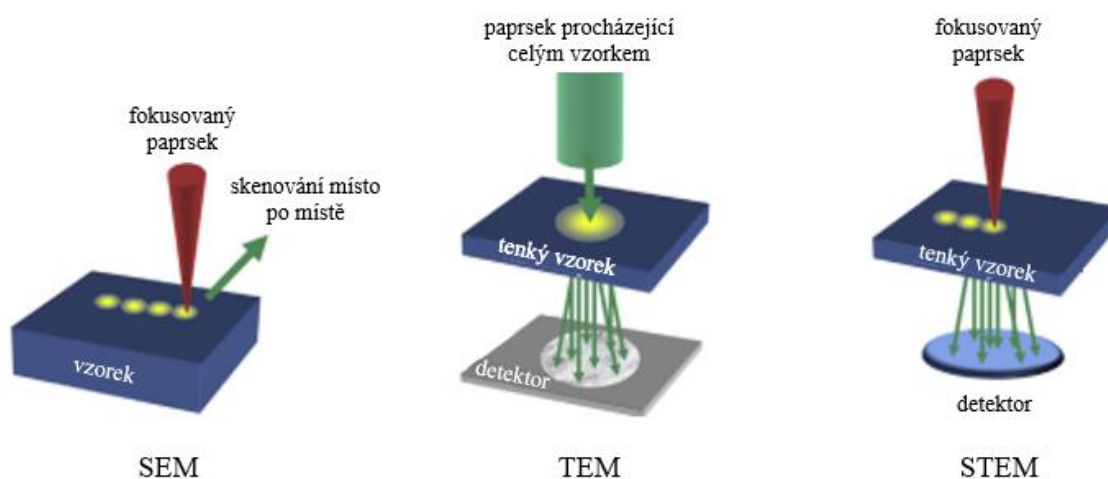
2.10 Rastrovací transmisní elektronová mikroskopie

Rastrovací transmisní elektronová mikroskopie (STEM) kombinuje princip transmisní elektronové mikroskopie (TEM) a rastrovací (skenovací) elektronové mikroskopie (SEM) [49].

Princip SEM je popsán v kapitole 2.9. TEM se od SEM liší především tím, že zde dochází k pružnému rozptylu. Elektrony neztrácí svou energii, nedochází k interakci se vzorkem, pouze jím projdou a jsou detekovány. Zjišťuje se tak informace o vnitřní struktuře vzorku. Dalším rozdílem je, že u SEM svazek elektronů prochází postupně místo po místě celý vzorek, zatímco u TEM prochází celým vzorkem najednou. Díky TEM můžeme dokonce vidět jednotlivé atomy vzorku [49].

U STEM je stejně jako i TEM pod vzorkem umístěn detektor elektronů, avšak nedochází tady k průchodu elektronů celým vzorkem najednou, ale obraz je získáván skenováním svazku elektronů místo po místě, jako u SEM. Zároveň mohou být využívány i detektory např. pro sekundární elektrony, odražené elektrony nebo rentgenové záření. Grafické zobrazení všech tří metod pro porovnání je na *obr. 25* [46].

Elektrony využívané pro zobrazování vzorku jsou pomalejší než u SEM a TEM (nižší urychlovací napětí). STEM je tedy k vzorku šetrnější a ideální pro biologické vzorky. Vzorky musí být velmi tenké (desítky až stovky nanometrů) a musí mít nízkou hustotu, v případě tlustého nebo hodně hustého vzorku by došlo k velkému rozptylu elektronů a narušení obrazu. Pro uchycení vzorků se nejčastěji využívají uhlíkové mřížky a to z několika důvodů. Mřížka se používá na kalibraci velikosti a rozlišení, vrstva uhlíku na mřížce brání propadnutí vzorku skrz, současně díky mřížce vzniká dostatečně velký kontrast pro zobrazení vzorků. Elektrony s mřížkou nikterak neinteragují a mohou projít, tudíž nedochází k rozptylu, zachová se tak kvalita obrazu (vysoké rozlišení i kontrast). V případě biologických vzorků je někdy potřeba barvení těžkými kovy, protože vzorky jsou složeny z lehkých prvků (kyslík, dusík, vodík), které neinteragují s elektrony, elektrony projdou bez rozptylu a nevznikne tak žádný obraz [46].



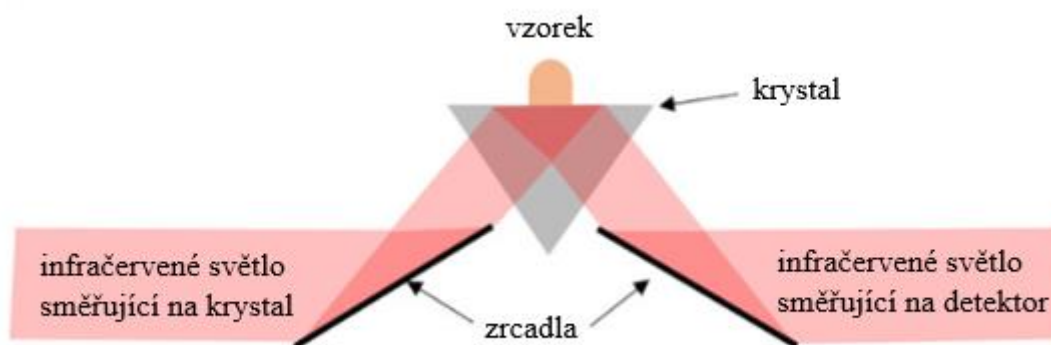
Obr. 25: Porovnání SEM, TEM a STEM [46]

2.11 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie (IČ) je analytická metoda, která se využívá k určení vazeb a funkčních skupin ve strukturách chemických sloučenin. Metoda je založena na zkoumání

interakce infračerveného záření s hmotou. Při kontaktu infračerveného záření se vzorkem dojde k absorpci elektromagnetického záření a změně dipólového momentu molekuly během změn rotačních a vibračních stavů molekuly. IČ lze využít pro vzorky všech skupenství a výstupem je infračervené spektrum, což je závislost optických vlastností (absorbance/transmitance) na vlnočtu. V infračerveném spektru jsou vyobrazeny absorpční pásy podle absorpčních frekvencí molekuly, tzv. otisky palce (fingerprint), které jsou charakteristické pro určité funkční skupiny [50].

V infračervené spektroskopii existuje několik metod měření, v rámci této diplomové práce je zásadní ATR-FTIR. FTIR spektroskopie je infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací, což je algoritmus pro transformaci dat získaných ze spektrální analýzy a vynesení závislosti absorbance (množství pohlceného světla vzorkem) na vlnočtu. ATR je doplňková metoda zeslabené úplné reflektance využívající krystal s vysokým indexem lomu (často křemíkový krystal). Jak je možno vidět na *obr. 26*, infračervené světlo je směřováno na zrcadlo, díky němu narazí na krystal, kde dochází k vnitřnímu odrazu. Následně světlo pokračuje na vzorek a s ním interaguje. Ze vzorku se paprsek vrátí zpět do krystalu, tím projde na druhou stranu, kde je zrcadlo, které jej nasměruje na detektor. Naměřené informace zpracovává software, využije zmíněnou Fourierovu transformaci k získání výsledného spektra [50, 51].



Obr. 26: Cesta paprsku u ATR-FTIR [51]

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

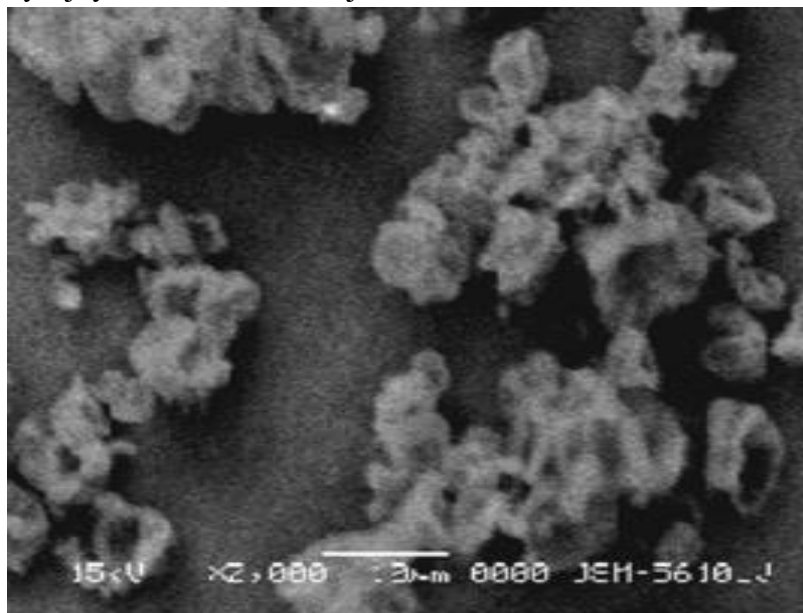
Yu-li Lo a spol. se zaměřili na zkoumání sprejově sušených liposomálních částic složených z fosfolipidů, disacharidů jako protektantů a enkapsulovanou superoxid dismutázou (SOD). Liposomy byly připravovány z různých fosfolipidů, konkrétně dipalmitoylfosfatidylcholinu (DPPC), dimyristoylfosfatidylcholinu (DMPC), distearoylfosfatidylcholinu (DSPC) a dipalmitoylfosfatidylglycerolu (DPPG). Jako protektanty byly využity sacharóza, trehalóza a laktóza. Do liposomů byla enkapsulována superoxidmutáza, známá jako antioxidační enzym, který chrání tělo před škodlivými účinky volných superoxidových radikálů. U směsi SOD\fosfolipid\sacharid byla měřena velikost částic pomocí DLS a zeta potenciál. Následovalo sušení. Po sušení byla zjišťována aktivita SOD, morfologie prášku pomocí rastrovací elektronové mikroskopie, chemická analýza pomocí elektronové spektroskopie, určení obsahu zbytkové vlhkosti pomocí Karla Fischera, využití diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) pro zjištění teploty denaturace SOD ve formě prášku SOD\DPPC\sacharóza, analýza infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací (FT-IR) a měření aerodynamické velikosti částic využitím Andersenova kaskádového impaktoru. Jako nejvhodnější systém byla vyhodnocena formulace SOD\DPPC\sacharóza, kde se zachovala největší aktivita SOD. SEM ukázalo vrásčité a rozinkový vzhled (viz obr. 27) vysušeného prášku. Velikost liposomů byla kolem 150 nm a zeta potenciál 0,5 mV. Aerodynamická velikost částic byla 2,4 μm a zbytková vlhkost 2,4 %. Analýza elektronovou spektroskopií naznačila nepřítomnost SOD v povrchové oblasti prášku, což ukazuje, že SOD bylo dobře obklopeno DPPC a sacharózou, FT-IR dokazuje přítomnost SOD i po usušení a teplota denaturace SOD ve formě prášku byla stanovena na 106 °C [33].



Obr. 27: SEM zobrazení usušených liposomů SOD\DPPC\sacharóza [33]

Chougule a spol. připravovali sprejově sušené liposomy pro inhalační podávání léčiva Dapson (DS) na pneumonii. Samotné liposomy byly složeny z dipalmitoylfosfatidylcholinu (DPPC) a cholesterolu. Jako protektanty byly využity laktóza, sacharóza nebo hydrolyzovaná želatina. Do směsi připravené k sušení (liposomy a protektant) byl přidán antiadherent (leucin) pro zabránění spojování částic, čímž mohly vzniknout aerodynamicky vhodné částice. Změřená

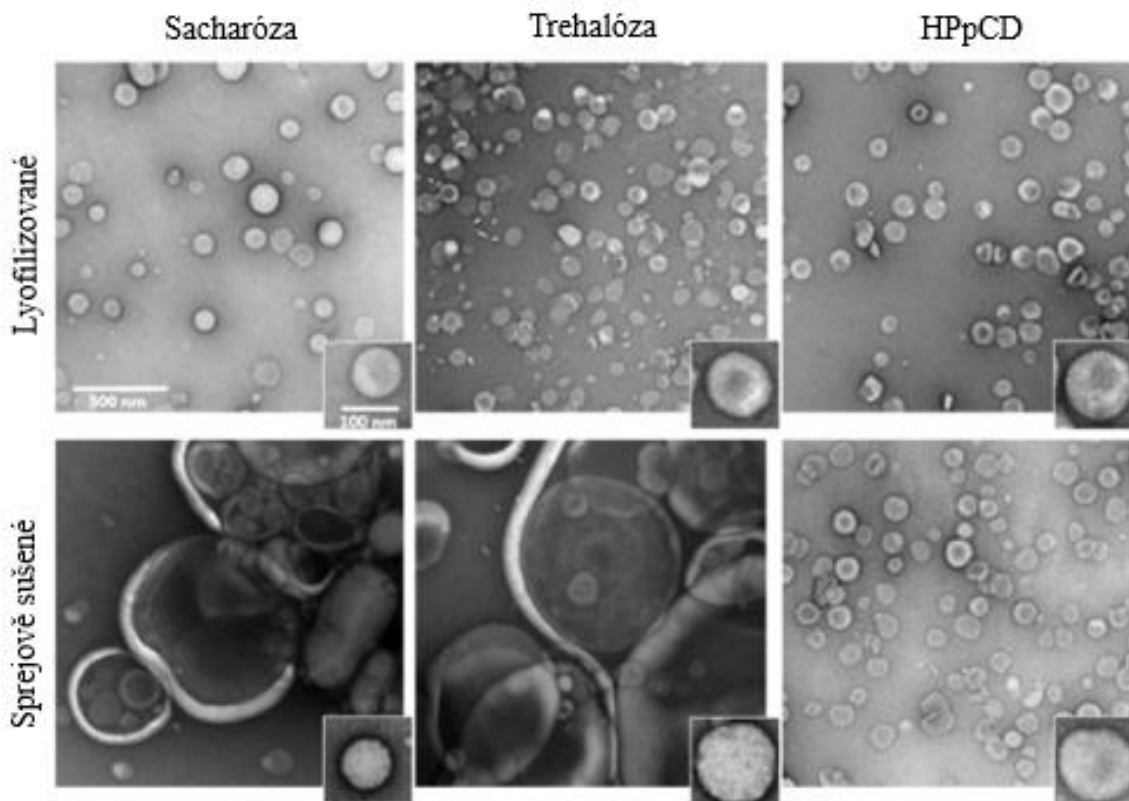
velikost liposomů se pohybovala kolem 140 nm se zeta potenciálem 0,8 mV. Enkapsulační účinnost byla 95 %. Zjišťované hodnoty u samotného prášku se mírně lišily podle složení systému. Velikost částic byla okolo 9 μm , pomocí Andersenova kaskádového impaktoru byla určena aerodynamická velikost prášku na 2,5 μm . Metodou Karla Fischera se zjistila zbytková vlhkost, která nebyla totožná pro všechny systémy. Nejnižší byla u prášku, kde byla laktóza jako protektant (2,3 %), u ostatních systémů se hodnota pohybovala okolo 5 %. V rámci této studie bylo pozorováno více vlastností připravených systémů. Na *obr. 28* je možné vidět vzhled prášku pomocí SEM. Pozitivní výsledek byl zjištěn u frakce jemných částic, které byly dopraveny se 75 % účinností do hlubokých plic a uvolňování léčiva probíhalo po dobu až 16 hodin oproti obyčejným léčivům, kde se jedná o dobu 3 hodin [52].



Obr. 28: Ukázka prášku zobrazena metodou SEM [52]

Van den Hoven a spol. zpracovali studii věnující se přípravě liposomů z DPPC, cholesterolu a potažené PEG. Do liposomů byl enkapsulován jako modelové léčivo fosforečnan disodný prednisolop (PLP). Metody sušení byly sprejové sušení a lyofilizace. K liposomům byly přidány různé protektanty a to buď hydroxypropyl-p-cyklodextrin (HPpCD), trehalóza nebo sacharóza. U vysušených prášků byl testován obsah zbytkové vlhkosti (Karl Fischer), teplota skelného přechodu (diferenciální skenovací kalorimetrie) a amorfní charakter (rentgenová difrakce). Liposomy před sušením i po rehydrataci a rekonstrukci byly charakterizovány pomocí dynamického rozptylu světla pro zjištění velikosti, HPLC pro určení koncentrace PLP a lipidů. Po rekonstrukci byly liposomy pozorovány metodou TEM. Liposomy byly připraveny jak naplněné, tak prázdné, ovšem jejich vlastnosti před usušením byly téměř stejné – velikost se pohybovala okolo 100 nm, koncentrace PLP u naplněných liposomů mezi 0,8-1,8 mg/ml a koncentrace lipidů 12,1-15,7 mg/ml. Po vysušení liposomů lyofilizací a sprejovým sušením byly pozorovatelné změny. Obsah zbytkové vlhkosti u lyofilizovaných částic se pohybovala okolo 1 %, u sprejově sušených okolo 4 %. Ve vzorcích obsahujících HPpCD byl velký rozdíl v teplotě skelného přechodu. Po lyofilizaci i sprejovém sušení byla teplota skelného přechodu u vzorků se sacharózou mírně vyšší u lyofilizovaných systémů. U trehalózy byly výsledky stejné, vliv na tuto teplotu může mít obsah zbytkové vlhkosti. Rozdíly ovšem nebyly příliš velké, zatímco u vzorků s HPpCD to bylo více než 100 °C. Difrakční rentgenová analýza

ukázala, že všechny sušené liposomální formulace jsou amorfni. Koncentrace PLP po sušení a rekonstrukci byla u vzorků s HPpCD stejná, ale u liposomů obsahující sacharózu a trehalózu došlo k poklesu, jak u sprejového sušení i u lyofilizace. Po rehydrataci a rekonstrukci liposomů byla také zjištěna přítomnost liposomů, u sprejově sušených liposomů se sacharózou a trehalózou došlo po rekonstrukci ke zvětšení liposomů a agregaci, ale u systému s HPpCD a sušených mrazem vznikly liposomy téměř shodné s těmi před sušením (viz *obr. 29*) [53].

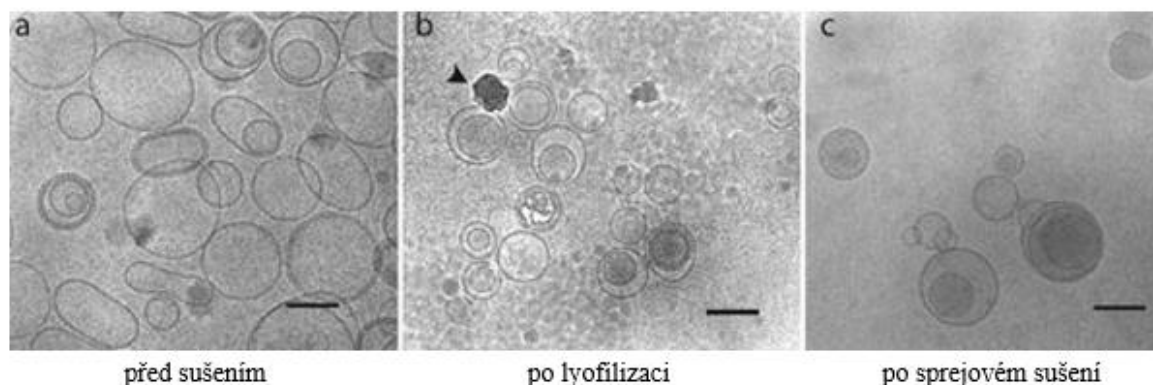


Obr. 29: Porovnání liposomů sušených lyofilizací nebo sprejovým sušením s různými protektanty [53]

Wessmana a spol. zkoumali metodami Cryo-TEM a dynamickým rozptylem světla morfologické změny u sprejově sušených nebo lyofilizovaných liposomů a dvouvrstvých disků. Důraz byl kladen především na identifikaci strukturních změn, které představují riziko připravených systémů jako nosičů léčiv. Liposomy byly složeny z 1,2-distearoyl- sn-glycero-3-fosfocholinu (DSPC), cholesterolu a některé jsou pokryté 1,2-distearoyl- sn-glycero-3-fosfoethanolamin-N-[methoxy(polyethylenglykol)-5000] (DSPE-PEG). Dvouvrstvé disky obsahovaly DSPC, cholesterol a DSPE-PEG. Protektantem byla laktóza, která byla buď přímo součástí přípravy liposomů nebo byla následně přidána až do vodného roztoku liposomů. Velikost všech liposomů před sušením se pohybovala mezi 79 a 95 nm. Původní liposomy před sušením bez PEG připravené jak ve vodě i laktóze obsahovaly velké množství unilamelárních liposomů, ale vyskytovali se zde i multilamelární liposomy. Liposomy s PEG byly z velké části pouze unilamelární.

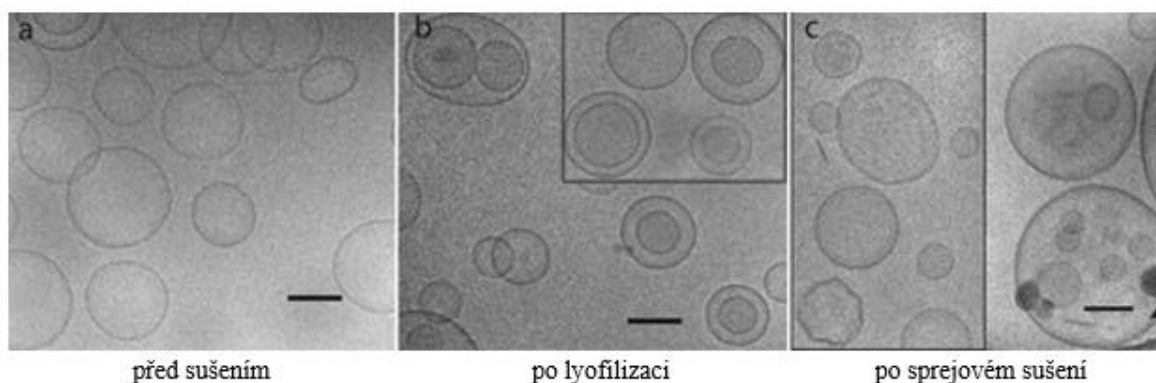
U liposomů bez PEG připravených v laktóze došlo po procesu lyofilizace a následné rehydrataci ke snížení velikosti liposomů, ale současně ve vzorku vzniklo malé množství větších útvarů okolo 800 nm (vícelamelární liposomy). Vícelamelární liposomy vznikaly

nejspíš v důsledku osmotické nerovnováhy. Liposomy bez PEG sprejově sušené a připravené v laktóze se po rehydrataci zmenšily, vykazovaly zvýšený podíl vícelamelárních liposomů. Porovnání liposomů zobrazených pomocí Cryo-SEM je na *obr. 30*.



Obr. 30: Liposomy bez PEG zobrazené metodou Cryo-TEM [54]

Vzorky s PEG připravené v laktóze se po lyofilizaci a rehydrataci, mírně zvětšily, opět vznikly i větší částice ale tentokrát hlavně zapouzdřené liposomy. PEGylované liposomy připravené v laktóze se po sprejovém sušení také zvětšily a vznikl i podíl větších částic, které tvořily zapouzdřené liposomy, vše je zobrazeno na *obr. 31* z metody Cryo-SEM.

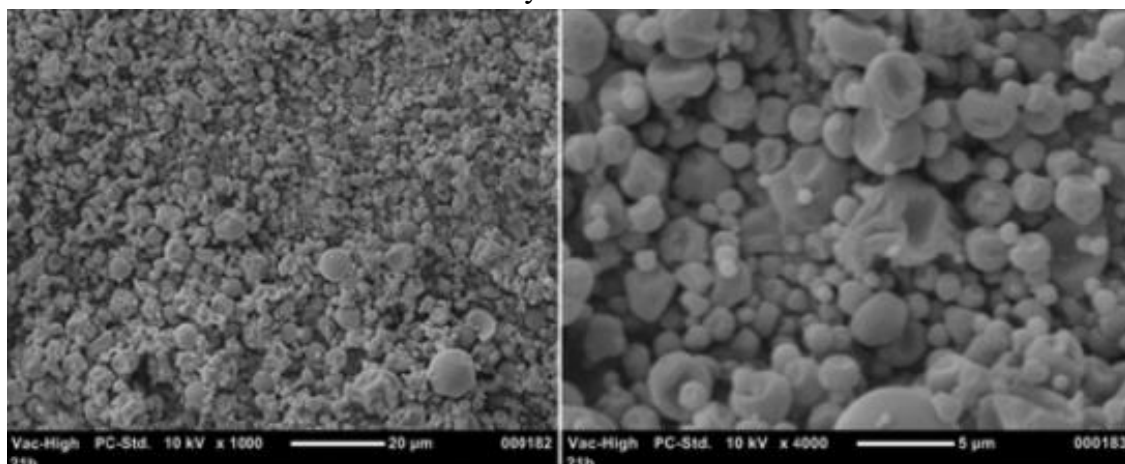


Obr. 31: Liposomy s PEG zobrazené metodou Cryo-TEM [54]

Co se týká vzorků původně připravených ve vodě s pozdějším přidavkem laktózy, tak u lyofilizace liposomů bez PEG došlo ke zvětšení i vzniku vícelamelárních liposomů. S PEG zůstaly liposomy po lyofilizaci především unilamelární, ale zvětšily se. Sprejové sušení liposomů s PEG i bez něj způsobilo zvětšení liposomů až k 1000 nm, zůstaly však unilamelární. U disků vlivem obou druhů sušení došlo ke zvětšení, ale nebyly zde významné rozdíly. Vzhledem k tomu, že v liposomech nebylo nic enkapsulováno, nebylo možné udělat z tohoto pohledu závěr na možnost uvolňování léčiv z těchto liposomů [54].

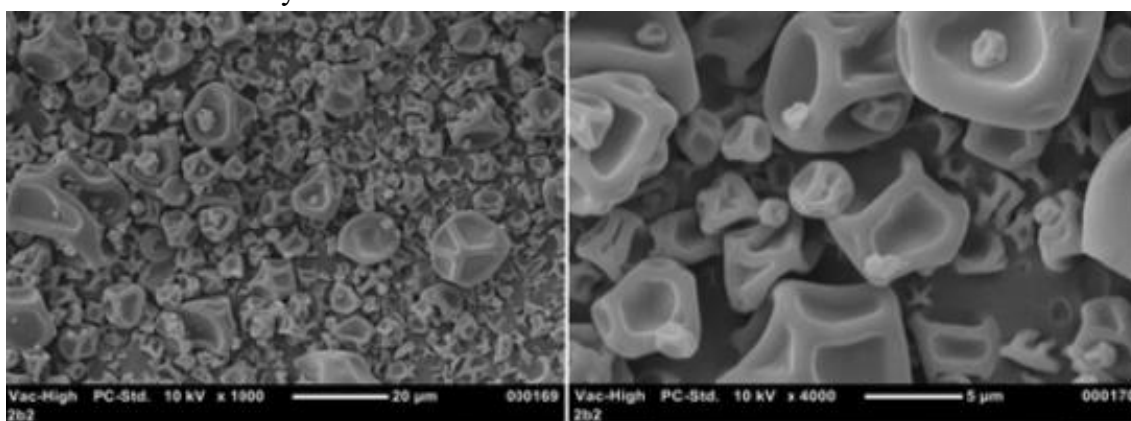
Karadag a spol. se ve svém výzkumu zaměřili na sprejové sušení liposomů s nabitým polymerem, které by mělo zamezit rozpadu liposomů vlivem sušení. Aniontové liposomy byly připraveny z lecitinu a jako protektant byl použit maltodextrin. Takové liposomy byly následně potaženy kladným chitosanem s vysokou nebo nízkou molekulovou hmotností. Zeta potenciál liposomů se tak stal kladný a liposomy by se měly elektrostaticky odpuzovat. Velikost nepotažených liposomů byla 400 nm, přidáním chitosanu se zvětšila na 500 nm. Maltodextrin byl také použit ve dvou různých molekulových hmotnostech. Ukázalo se, že přidavek maltodextrinu k nepotaženým liposomům způsobil jejich flokulaci a rozpad, sušeny byly tedy jen

liposomy potažené chitosanem. Vliv na vzhled prášku (zobrazeno pomocí SEM) měla především molekulová hmotnost maltodextrinu. Na obr. 32 je vidět prášek s nízkou molekulovou hmotností maltodextrinu, jeho velikost částic byla pod 5 µm. Stejně tak vypadal jak s nízkomolekulárním chitosanem tak i vysokomolekulárním chitosanem.



Obr. 32: Prášek liposomů s nízkomolekulárním maltodextrinem zobrazený metodou SEM [55]

Částice mají relativně hladký a nepromáčklý povrch. To je způsobeno nejspíš teplotou skelného přechodu a větším množstvím sacharidů s nízkou molekulovou hmotností (působí jako změkčovadlo, je mobilní), které zabraňují smršťování během sušení. Naopak u částic s vysokomolekulárním maltodextrinem došlo k zvrásnění povrchu nejspíš v důsledku vzniku bublin, protržení povrchu a scvrknutí (viz obr. 33). Velikost částic prášku s maltodextrinem o vyšší molekulové hmotnosti byla větší a mezi vzorky s chitosanem o nízké nebo vysoké molekulové hmotnosti byl rozdíl minimální.

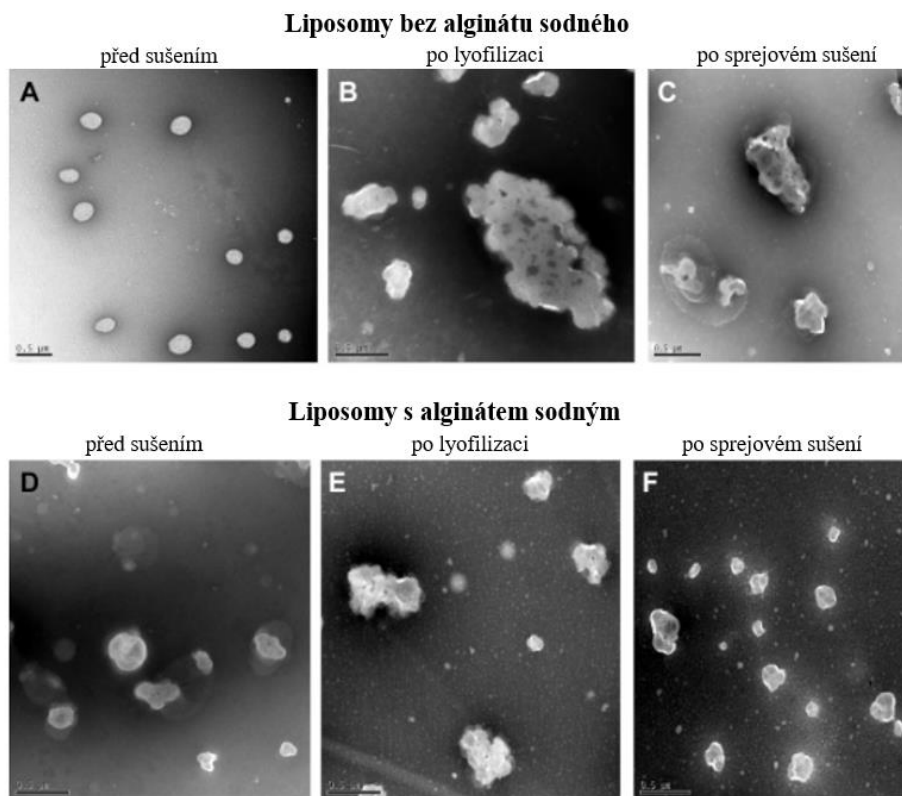


Obr. 33: Prášek liposomů s vysokomolekulárním maltodextrinem zobrazený metodou SEM [55]

Zbytková vlhkost prášku byla určena metodou Karla Fischera a u všech vzorků se pohybovala kolem 4%. Technikou laserové difrakce byla měřena velikost liposomů po jejich opětovné rehydrataci, která byla provedena puřem. U rekonstituovaných prášků s vysokomolekulární hmotností došlo ke zvětšení u nízkomolekulárního i vysokomolekulárního chitosanu. Nárůst byl přibližně 250 nm pro liposomy potažené chitosanem s vysokou molekulovou hmotností, zatímco pro liposomy potažené chitosanem s nízkou molekulovou hmotností narostly liposomy na více než 15násobek jejich původní velikosti. Průměrná velikost částic prášku s nízkomolekulárním maltodextrinem

s vysokomolekulárním i nízkomolekulárním chitosanem po rehydrataci byla 350 nm, tudíž se oproti původní velikosti mírně zmenšily [55].

Wang a spol. vytvořili studii, jejíž cílem bylo zkoumat vliv vnějšího povlaku alginátem vápenatým na lyofilizované a sprejově sušené liposomy. Liposomy byly připraveny ze sojového fosfatidylcholinu, cholesterolu a jako modelové léčivo byl enkapsulován paclitaxel (PTX), následovalo potažení alginátem sodným. Jako protektant u sušení byl využit mannitol. U připravených liposomů byla měřena účinnost zachycení PTX pomocí molekulární vylučovací chromatografie a velikost částic metodou dynamického rozptylu světla. Optimální liposomy bez potažení alginátem vápenatým měly velikost okolo 121 nm a účinnost zachycení 88 %. Potažené liposomy byly značně větší, velikost se pohybovala okolo 355 nm a účinnost zachycení 81 %. U liposomů byla testována stabilita v simulované žaludeční a střevní tekutině, aby bylo zjištěno, zda má alginát sodný ochranný účinek na systémy. Účinnost zachycení a velikost se měnila podle pH. Liposomy bez povlaku ukázaly relativně stabilní velikost po celou dobu, ale účinnost zachycení klesla při pH 2 na 55 % a při ještě nižším pH (1,2) to bylo 54 %, naopak u pH 6,8 nedocházelo téměř k žádným změnám oproti původní účinnosti zachycení. Velikost potažených liposomů se měnila, protože alginát sodný je citlivý na pH, v kyselém prostředí se smršťuje a v alkalickém bobtná. Účinnost zachycení se při nižším pH (1,2 a 2) nijak výrazně neměnila, ale v roztocích s vyšším pH (6,8) došlo k poklesu účinnosti zachycení na 61 %. Po vysušení byly prášky opět rehydratovány, aby došlo k opětovné rekonstrukci liposomů, měřila se znova jejich velikost a účinnost zachycení modelového léčiva. Metodou TEM byly zobrazeny liposomy před sušením a následně po rekonstrukci. Na *obr. 34* jsou zmíněné liposomy ukázány s tím, že nepotažené liposomy měly větší tendenci k aglomeraci.



Obr. 34: Zobrazené liposomy metodou TEM [56]

Lyofilizované potažené liposomy se po rehydrataci zmenšily, ale po čase se jejich velikost zvětšila na 375 nm. Nepotažených liposomy po lyofilizaci byly po rehydrataci větší než původní, ale následoval klesající trend velikosti. Zmenšení poukazuje na možnost, že liposomy nebyly v průběhu sušení ochráněné alginátem sodným a jejich struktura byla nejspíš velmi poškozena. Po sušení rozprašováním a rehydrataci byl průběh změny velikostí liposomů podobný jako u lyofilizace, pouze se změnou prvotní velikosti po rehydrataci. U potažených liposomů byla velikost nižší než u lyofilizace, ale opět postupně rostla, u nepotažených byla naopak větší než u lyofilizace a postupně klesala. Po sušení byly ukázány lepší hodnoty v účinnosti zachycení u liposomů potažených alginátem sodným. Po lyofilizaci byla účinnost 67 % u potažených, u nepotažených klesla na 36 %. Po sprejovém sušení potažených liposomů 58 %, u nepotažených hodnota opět klesala na 47% [56].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část diplomové obsahuje výčet chemikálií (viz 4.1), které byly využity při přípravě vzorků. V této části jsou popsány veškeré postupy přípravy vzorků (viz 4.2), jejich následné měření, sušení, měření suchého prášku, rehydratace a zpracování naměřených dat (viz 4.3).

4.1 Chemikálie

Protektant	Sacharóza Vzorec: $C_{12}H_{22}O_{11}$ Mr: 342,30 Penta s.r.o. CAS: 57-50-7 Číslo šarže: 1703270212F
Lipidy	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (16:0 PC – DPPC) Mr: 734,039 Avanti Polar Lipids, Inc. CAS: 63-89-8 Číslo šarže: 850355P-1g
	1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-fosfát (sodná sůl – PA 12:0) Mr: 558,661 Avanti Polar Lipids, Inc. CAS: 108321-06-8 Číslo šarže: 840635P-200mg
	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolamin-N-[methoxy(polyethylenglykol)-5000] (amonná sůl – PEG5000-PE) Mr: 5744,965 Avanti Polar Lipids, Inc. CAS: 474922-84-4 Číslo šarže: 880200P-200MG-A-059
	Cholesterol Vzorec: $C_{27}H_{46}O$ Mr: 386,65 Sigma Aldrich CAS: 57-88-5 Číslo šarže: 26732-25G-F
Rozpouštědla	Chloroform Vzorec: $CHCl_3$ Mr: 119,38 Penta s.r.o. CAS: 67-66-3 Číslo šarže: 2107210716
	Methanol Vzorec: CH_4O Mr: 32,04 Sigma Aldrich (Fluka) CAS: 67-56-1 Číslo šarže: 34966-2.5L

Pufr	PBS tablety pH 7.4 (pro 200 ml) PanReac AppliChem Číslo šarže: 271504-01
Kyselina	Kyselina chlorovodíková 35% P.A. Vzorec: HCl Mr: 36,46 Lach-Ner, s.r.o. CAS: 017-002-01-X Číslo šarže: PP/2014/05946
	Deionizovaná voda Vzorec: H ₂ O Systém: ELGA

4.2 Příprava vzorků

Kapitoly v této sekci se zaměřují na přípravu jednotlivých vzorků podle přidávaných komponentů. Všechny liposomy byly připraveny z DPPC, k němuž byla přidána další komponenta, konkrétně se jednalo buď o cholesterol, kyselinu fosfatidovou nebo polyethylenglykol. Po sušení, byl získán prášek, který byl rehydratován, aby došlo k rekonstrukci liposomů. Pro lepší orientaci v práci, jsou zde zmíněny i metody zkoumání, které byly u připravených vzorků využity, konkrétní postup je v následujících kapitolách.

4.2.1 Liposomy k sušení

Liposomy byly připravovány metodou rehydratace fosfolipidového filmu. Postup přípravy byl u všech vzorků téměř stejný, lišil se jen přidavkem určitých komponentů.

Nejdříve bylo potřeba připravit roztok sacharózy, který byl následně použit na rehydrataci fosfolipidového filmu. Do reagenční láhve se šroubovacím uzávěrem (pyrexky) bylo naváženo takové množství sacharózy, aby po zalití potřebným množstvím deionizované vody byla koncentrace 98 mg/ml. Koncentrace byla zvolena tak, aby výsledný roztok před sušením obsahoval alespoň 10 % pevné složky [53]. Takto připravený roztok sacharózy byl ponechán na magnetické míchačce po dobu 24 h pro úplné rozpuštění sacharidu.

DPPC bylo naváženo do pyrexky, navážka byla zvolena tak, aby výsledná koncentrace po rehydrataci 40 ml roztoku sacharózy byla 2 mg/ml. Vzorky byly připravovány vždy v množství 40 ml, kvůli dostatečnému objemu pro sušení. Navážený DPPC byl rozpuštěn v chloroformu, promíchán pomocí vortexu a nechán v digestoři na odpaření. Následovalo rehydratování vzniklého fosfolipidového filmu roztokem sacharózy. Takto připravený roztok obsahoval zmíněných 10 % pevné složky – důležité pro získání dostatečného množství prášku sušením. Po rehydrataci následoval poslední krok, čímž byla sofinikace tyčovým sonifikátorem (HD 3 200, Bandelin Electronic GmbH & Co. KG). Amplituda při sonifikaci byla 30 % a energie 15 kJ. Následovalo měření zeta potenciálu a velikosti vzniklých liposomů (viz kapitola 4.3.1.)

Při přípravě liposomů s přidavkem cholesterolu byl postup naprosto stejný, jen nebylo naváženo pouze DPPC, ale i cholesterol. Navážka cholesterolu byla volena tak, aby výsledná koncentrace v roztoku byla 10 mol. % [7]. Při sonifikaci byla přidána energie 25 kJ (došlo k odkalení vzorku) [7, 57].

U liposomů s přísávkem PA, bylo naváženo DPPC a následně PA tak, aby koncentrace byla opět 10 mol. %. Příprava se lišila od předešlých vzorků tím, že k chloroformu byl přidán methanol v poměru 4:1, aby došlo k úplnému rozpuštění PA. Další kroky probíhaly stejně jako u předešlých vzorků, jen u sonifikace byla energie zvýšena na 30 kJ.

Poslední typ vzorků obsahoval DPPC a PEG. Obojí bylo nejprve naváženo. Obsah PEG ve výsledném roztoku byl 6 mol. % [57]. Postup přípravy se lišil od liposomů s cholesterolem nebo PA tím, že ke zmenšení liposomů nebyl použit tyčový sonifikátor, ale sonifikace ve vodní lázni (DT 31 H, Bandelin Electronic GmbH & Co. KG). Vodní lázeň byla využita na 25 minut při teplotě 45 °C z toho důvodu, aby do vzorku bylo přidáno méně energie v delším časovém úseku a PEG neměl tendenci tvořit micely.

Posledním krokem bylo u všech vzorků zmíněné měření velikosti částic a zeta potenciálu (viz 4.3.1). Před sušením byly odebrány a uschovány 2 ml vzorku, u kterých byla sledována velikost částic po dobu následujících 15 dnů (konkrétně 1., 3., 5., 8., 11. a 15. den).

4.2.2 Sprejové sušení

Sušení všech vzorků probíhalo stejným způsobem na přístroji LabPlant model PD-06 na Farmaceutické fakultě Masarykovy univerzity. Do vzorku byla zavedena silikonová hadička, která pomocí pumpy nasávala vzorek rychlostí 30 RPM (1305 ml/h) k atomizaci. Atomizace proběhla pomocí dvoukapalinové trysky o průměru 0,5 mm pro získání co nejmenších částic při tlaku 3 bary a teplotě 168 °C (inspirováno [33]). Sběr částic byl uskutečněn pomocí cyklóny. Vysušený prášek byl zvážen pro zjištění výtěžku. Následně byl uchováván v exsikátoru, aby případně nepohlcoval vlhkost z okolí. Vysušený prášek byl podroben několika měření. Byla zjišťována zbytková vlhkost metodou termogravimetrické analýzy (kapitola 4.3.3), aerodynamická velikost částic (kapitola 4.3.4) a nakonec získání snímků struktury prášku skenovací elektronovou mikroskopií (kapitola 4.3.5). U prvního připraveného prášku, který obsahoval liposomy pouze z DPPC, bylo nutné ověření přítomnosti DPPC v prášku i po sušení metodou infračervené spektroskopie (kapitola 4.3.6).

4.2.3 Rehydratace

Usušený prášek byl rehydratován, aby mohlo být ověřeno zpětné zrekonstruování liposomů a jejich porovnání s původními liposomy přes usušením. Do vialky byl naváženo takové množství prášku, aby koncentrace po zalití 2 ml byla 2 mg/ml. Vzorky byly rehydratovány deionizovanou vodou a fosfátovým pufrém (PBS pufr), který měl pH 6,6 (odpovídá pH sliznice dýchacích cest, kde by docházelo po inhalaci k rehydrataci [58]). PBS byl připraven z tablety, která byla zalita 200 ml deionizované vody a nechán na magnetické míchačce rozpustit do dalšího dne. Takto připravený PBS měl pH 7,4, což bylo nutné upravit využitím 0,04 % roztoku kyseliny chlorovodíkové na pH 6,6, pomocí pH metru (SevenEasy S20, Mettler Toledo). Navážený prášek byl tedy zalitý potřebným množstvím deionizované vody nebo připraveným PBS a promíchán pomocí vortexu do úplného rozpuštění. U takto připravených roztoků byla změřena velikost částic a jejich zeta potenciál. Stejně jako u vzorků liposomů před sušením byla sledována jejich velikost po dobu 15 dnů. U prvních rehydratovaných liposomů z DPPC byly také pořízeny snímky metodou STEM, aby byla ověřena jejich přítomnost (viz kapitola 4.3.2).

4.3 Měření a zpracování výsledků

V předchozí kapitole byl popsán veškerý postup při přípravě vzorků, tato kapitola je věnována popisu měření vzorků metodami, které byly již zmíněny.

4.3.1 Velikost liposomů a zeta potenciál

Měření pro zjištění distribuce velikosti částic a zeta potenciálu probíhalo na přístroji ZetaSizer ZS (Malvern Instrument). Měřicí metody byly DLS a ELS.

Pro měření velikosti částic ve vzorku byl vzorek napipetován do skleněné kyvety a vložen do přístroje. Následovalo spuštění měření. Měření probíhalo při teplotě 25 °C s kalibrací na 60 s. Měření bylo nastaveno tak, aby každý vzorek byl proměřen třikrát. Naměřená data byla zprůměrována, byl sestaven graf závislosti intenzity na velikosti částic (distribuce velikosti), byla zjištěná průměrná velikost částí (Z-average) a také hodnota polydisperzního indexu (PDI). Polydisperzní index poskytuje informaci o homogenitě částic v roztoku, čím je blíže k nule, tím jsou si částice více velikostně podobné.

Měření metodou elektroforetického rozptylu světla probíhalo na stejném přístroji, bylo ovšem nutné do kyvety se vzorkem přidat DIP cell elektrodu, pro vytvoření elektrického pole. Měření probíhalo při 25 °C a opakovalo se pětkrát. Výsledky se zprůměrovaly a byla získána hodnota zeta potenciálu částic. U všech vzorků byl zeta potenciál měřen pouze první den měření.

4.3.2 Zobrazení liposomů metodou STEM

Zobrazení liposomů z DPPC ve vzorku před sušením i po rehydrataci proběhlo pomocí rastrovacího transmisního elektronového mikroskopu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) na Ústavu přístrojové techniky Akademie věd České republiky. Vzorek byl nejprve zředěn destilovanou vodou, aby byl dostatečně tenký, neobsahoval moc částic a došlo k jasnému zobrazení. Po kápnutí vzorku na mřížku s 5 nm vrstvou uhlíku byla odsána přebytečná voda. Následovalo promytí destilovanou vodou, kvůli nečistotám a opět odsání vody. Vzorek se nechal na mřížce zaschnout. Zasychání trvalo pár minut a po zaschnutí byl vzorek připraven na měření, po vložení do mikroskopu proběhla první kalibrace elektronového paprsku podle uhlíkové mřížky a následovalo zkoumání vzorku svazkem elektronů s 18 kV urychlovacím napětím.

4.3.3 Zbytková vlhkost prášku

Zbytková vlhkost prášku byla měřena metodou termogravimetrické analýzy na přístroji TGA 5500. Po vložení vzorků do přístroje bylo nastavené měření, které probíhalo v inertní atmosféře dusíku. Nárůst teploty byl nastaven na 10 °C za minutu a pokračovalo až do 500 °C. Výsledkem byl graf závislosti hmotnosti na teplotě s termogravimetrickou křivkou, na které byla u všech vzorků při teplotě 150 °C odečtena zbytková vlhkost.

4.3.4 Aerodynamická velikost prášku

Aerodynamická velikost prášku byla zjišťována na Fakultě strojního inženýrství na Vysokém učení technickém v Brně. Přístroj (Aerodynamický spektrometr částic TSI 3321) se skládá z dispergátoru pevných částic (rozptýlení prášku do plynu), dilutoru (ředí vzorek v poměru 20:1) a aerodynamického spektrometru. Prášek byl nanesen na otočný talíř a z něj je nasáván do přístroje. Lasery, mezi kterými částice proletěly, byly vzdáleny 200 μm. Měření proběhlo desetkrát a naměřená data byla zpracována softwarem Aerosol Instrument Manager.

Z deseti měření byl vypočítán průměr středního hmotnostního aerodynamického průměru (MMAD).

4.3.5 Zobrazení prášku metodou SEM

Povrch prášku byl zobrazen pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (ZEISS EVO LS 10, Německo). Před samotným zobrazením bylo nutné vzorky pozlatit, aby byly vodivé a poté byly vloženy do mikroskopu. Zobrazení povrchu prášku proběhlo na základě detekce sekundárních elektronů. Urychlovací napětí paprsku elektronů mělo 5 kV.

4.3.6 Složení prášku metodou IČ

Infračervená spektroskopie byla použita pro potvrzení přítomnosti DPPC v usušeném prášku, který byl připraven z roztoku liposomů z DPPC. Měření probíhalo na přístroji Nicolet iS50 FT-IR (Thermo Scientific). Konkrétně se jednalo o metodu ATR-FTIR. Vzorek ve formě prášku byl nanesen na ATR krystal a detekoval se vnitřní odraz paprsku. Měření probíhalo v rozmezí $4000-400\text{ cm}^{-1}$. Software zpracoval data a vytvořil spektrum, díky němuž bylo možné určit přítomnost určitých specifických funkčních skupin.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato část diplomové práce je věnována shrnutí výsledků, jejich vysvětlení a odůvodnění. Pro lepší orientaci a pochopení je rozdělena na dvě částic podle metod zkoumání. První se týká liposomů v roztoku (viz 5.1) a druhá vysušeného prášku (viz 5.2). Liposomy, které jsou zde komentovány, byly všechny připraveny rehydratací fosfolipidového filmu roztokem sacharózy, z toho důvodu už nebude sacharóza jako komponent dále připomínána. Vzorky se lišily jejich složením, obsahovaly buď jen DPPC nebo i cholesterol (DPPC + CHOL.), kyselinu fosfatidovou (DPPC + PA) a polyethylenglykol (DPPC + PEG).

5.1 Liposomy v roztoku

U liposomů před sušením a po rehydrataci vysušeného prášku byla ověřována přítomnost liposomů v roztoku, jejich velikost a zeta potenciál, což bylo následně v jednotlivých kapitolách u vzorků zhodnoceno. Dále je důležité zmínit, že distribuce velikostí (průběh 15 dnů měření jednotlivých vzorků), které nejsou zobrazeny v této části, jsou v přílohách (viz 9.1).

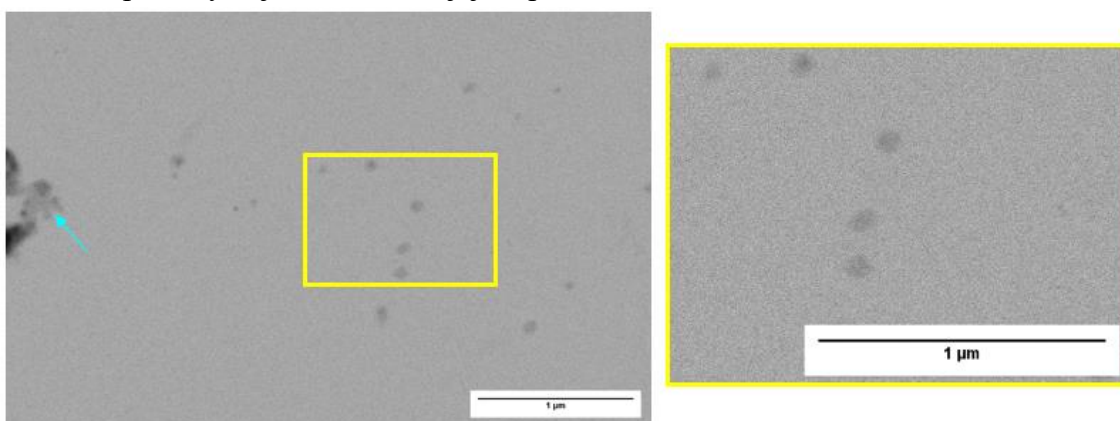
5.1.1 Připravené liposomy z DPPC před sušením a po rehydrataci

První připravené liposomy byly složeny pouze z DPPC bez jakékoli stabilizace, roztok takových liposomů byl lehce opalescentní.

I přes to, že liposomy nebyly stabilizované, vykazovaly v rámci velikostní distribuce stabilitu po dobu 15 dnů. Velikost se v průběhu tohoto časové intervalu mírně zvýšila, ale ke vzniku větších agregátů a rozšíření distribuce velikosti došlo až 11. den. Zeta potenciál liposomů před sušením byl měřen první den a měl hodnotu $(3,2 \pm 0,9)$ mV, což je nestabilní oblast, která byla očekávána u liposomů z nenabitého DPPC a bez další přidané stabilizace.

Vzhledem k tomu, že se jednalo o první vzorek, bylo u něj provedeno navíc zobrazení liposomů pomocí STEM pro potvrzení vzniku liposomů v roztoku před vysušením a především po rehydrataci vysušeného prášku.

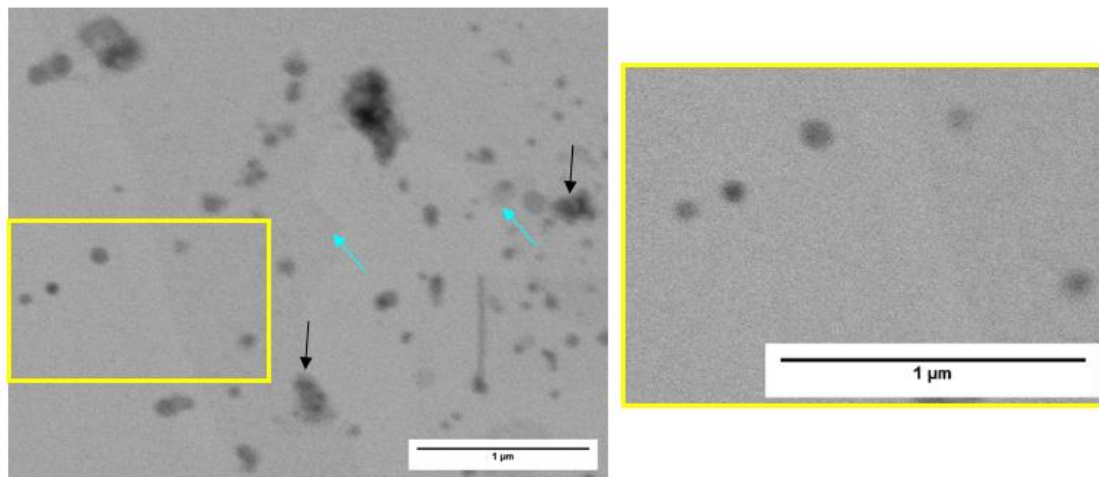
Liposomy před sušením jsou zobrazeny na *obr. 35*. Roztok před sušením obsahoval nečistoty (modrá šipka na *obr. 35*), které nejspíš pocházely ze sacharózy, ale i přes to se podařilo v roztoku liposomy najít a ověřit tak jejich přítomnost.



Obr. 35: Liposomy vzorku DPPC v roztoku před sušením zobrazené metodou STEM (žlutě ohraničené liposomy, modrá šipka značí nečistoty)

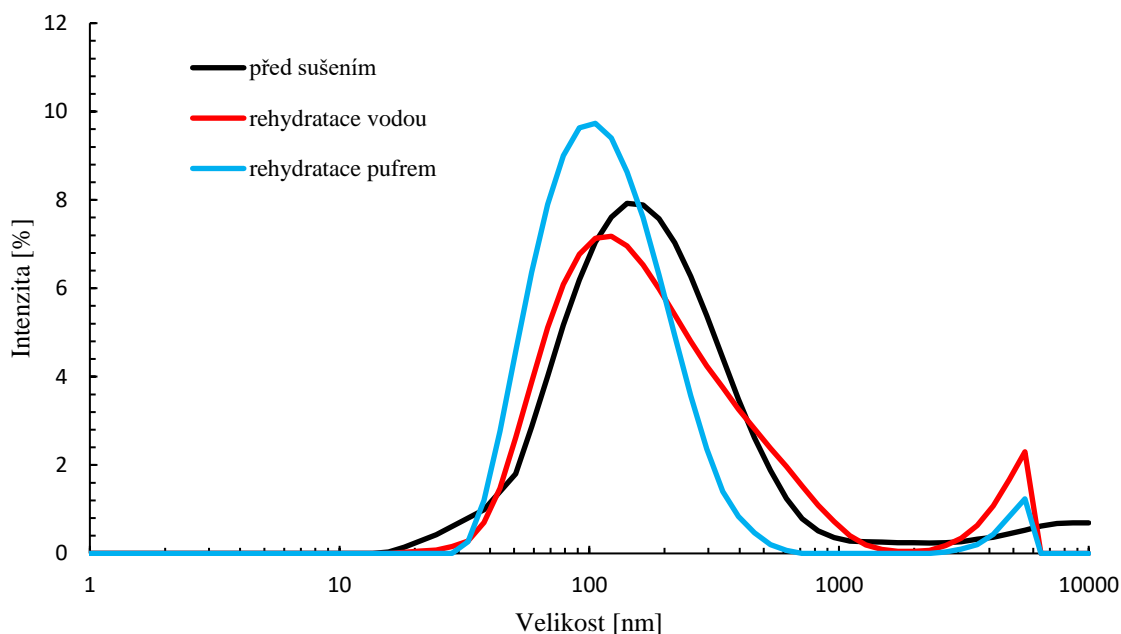
Po rehydrataci vodou bylo opět nutné ověřit přítomnost liposomů pomocí metody STEM. Tento krok byl velmi důležitý, aby potvrdil správný postup přípravy vzorků i sušení.

Při zobrazení roztoku liposomů z DPPC po rehydrataci vodou (viz obr. 36) bylo možné pozorovat shluky zhroucených liposomů (černé šipky na obr. 36) a větší množství nečistot (modré šipky na obr. 36), než u roztoku před sušením [57]. Nečistoty mohly pocházet již ze zmíněné sacharózy nebo z procesu sušení a průchodu vzorku sušárnou, ale i přes to byla přítomnost liposomů opět ověřena, což značí úspěšné zrekonstruování.



Obr. 36: Liposomy vzorku DPPC v roztoku po rehydrataci vodou zobrazené metodou STEM (žlutě ohraničené liposomy, modrá šipka značí nečistoty, černá šipka značí shluk zhroucených liposomů)

Na obr. 37 je distribuce velikosti pro vzorek z DPPC před sušením a po rehydrataci, z kterého je viditelné, že rozdíly ve velikosti nejsou velké, ale distribuce se od sebe odlišují. Porovnání je zobrazeno pro vzorky v 1. den měření, z toho důvodu zde nejsou vidět větší částice, které se začaly objevovat až později a liposomy rehydratované pufrem se zde zdají být nejstabilnější, protože jejich distribuce je nejužší a současně posunutá k nižší velikosti částic. Po pár dnech se částice v roztoku začaly zvětšovat.

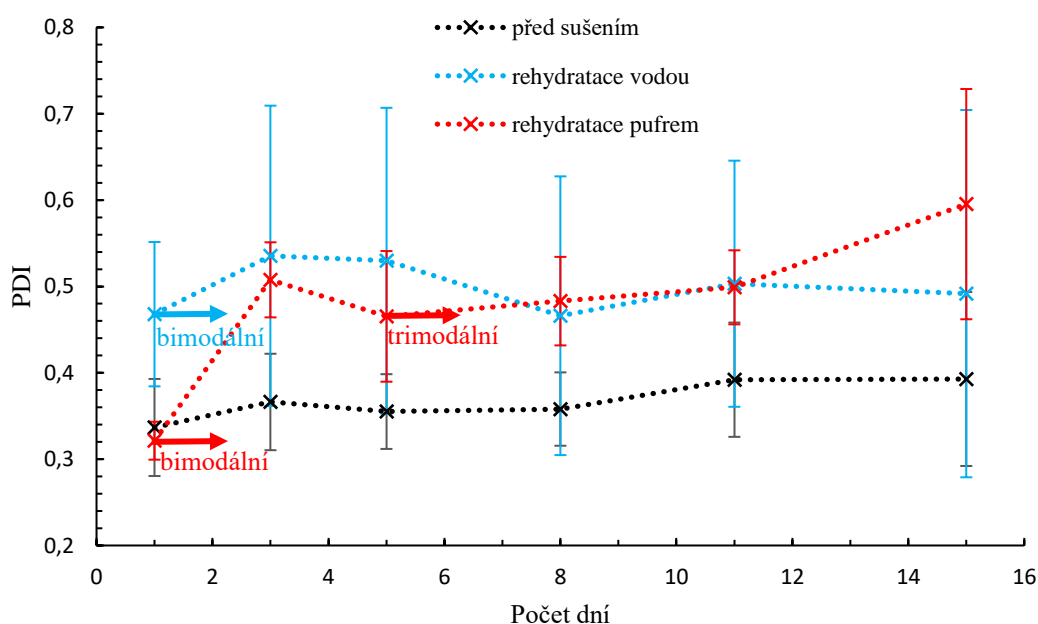


Obr. 37: Distribuce velikosti před sušením a po rehydrataci pro vzorek DPPC v 1. den

Liposomy rehydratované vodou se oproti původnímu vzorku zvětšily, ale jejich velikost a polydisperzita se výrazně neměnila s časem (viz *obr. 38*). U vzorků byla přítomna i populace větších částic (pík okolo 5500 nm), což byly nejspíš nečistoty, protože byly přítomny po celou dobu 15 dnů a jejich velikost se neměnila. Vzorek se tak jevil jako bimodální. Zvětšení liposomů rehydratovaných vodou mohlo nastat změnou rozdílu osmotického tlaku uvnitř a vně liposomu. Po vysušení by měla sacharóza zůstat pouze v liposomální membráně popřípadě uvnitř struktury liposomů. Rehydratací pak nastane chvíle, kdy bude větší koncentrace sacharózy v liposomu oproti vodnému okolí. Voda tak začne vlivem rozdílného koncentračního gradientu difundovat do liposomu. Ve stejnou chvíli může mít vliv na velikost liposomů sacharóza uvolňovaná z liposomů do okolního roztoku, aby došlo k vyrovnání koncentrací. Současně se na velikosti a náboji mohl projevit vliv sušení, který změnil strukturu liposomů [53, 54].

Hodnota zeta potenciálu naměřená u rehydratovaných liposomů vodou se rovnala hodnotě $(-27,6 \pm 3,8)$ mV, což je velký posun do záporných hodnot než u liposomů před rehydratací. Na změnu ZP mohlo mít vliv více faktorů např. změna struktury liposomů sušením, následná rehydratace a zmíněná osmóza. Je možné, že DPPC, který obsahuje kladný i záporný náboj (vzájemně se nulují) se naklonil zápornou částí více na povrch a liposom se tak jevil záporně. ZP se nachází na hranici stability (včetně odchylek) a kvůli tomu mohlo docházet později k agregaci.

Zvětšení částic v následujících dnech bylo patrné především u rehydratace puřem s upraveným pH na 6,6, jak je možno vidět také na *obr. 38*, kde je porovnání hodnot PDI. Liposomy byly oproti původním opět lehce zvětšené, ale současně menší než po rehydrataci vodou. Od počátku bylo opět možné pozorovat zastoupení částic okolo 5000 nm a od 5. dne vznikly větší agregáty v podobě píku u hodnoty kolem 1000 nm. V tomto případě by se mohlo jednat o agregované systémy, protože se ve vzorku objevily až po několika dnech. Vzorek byl tedy trimodální. Zeta potenciál zjištěný u tohoto typu vzorku byl $(-12,4 \pm 1,9)$ mV, tedy vůči vzorku před sušením je zápornější, ale oproti vzorku rehydratovaného vodou kladnější. Podle nestabilní hodnoty ZP následně nastal vznik velkých agregátů.



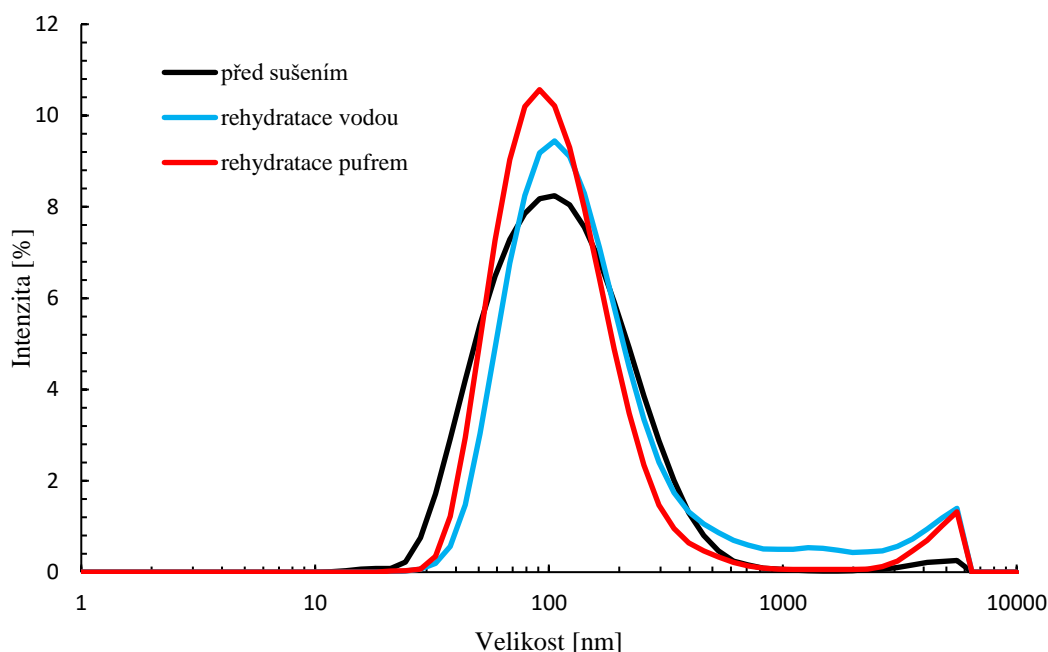
Obr. 38: Závislost hodnoty PDI na dnech měření pro vzorek DPPC

5.1.2 Přípravené liposomy z DPPC a cholesterolu před sušením a po rehydrataci

Druhý typ vzorků obsahoval 10 mol. % cholesterolu, aby byly liposomy stabilnější. Cholesterol vyplní volný prostor mezi fosfolipidy a má tak vliv na tekutost membrány. Roztok liposomů byl opět lehce opalescentní, jako předchozí.

Liposomy u předchozího vzorku před sušením z DPPC se postupně v průběhu dní zvětšovaly až na hodnotu (120 ± 30) nm, zatímco liposomy stabilizované cholesterolem se celou dobu 15 dní držely na velikosti okolo (97 ± 10) nm. Snížením velikosti bylo potvrzeno správné začlenění cholesterolu do membrány, vyplnění volného prostoru, úprava tekutosti membrány tak, aby byla tužší a stabilnější. Hodnota ZP liposomů před sušením se pohybovala okolo $(8,3 \pm 1,3)$ mV. Tato hodnota ZP odpovídá také nestabilní oblasti.

Lepší stabilita byla patrná u liposomů před sušením i po rehydrataci, viz *obr. 39*. Distribuce velikostí je užší a téměř stejná jak u původního roztoku, tak po rehydrataci.



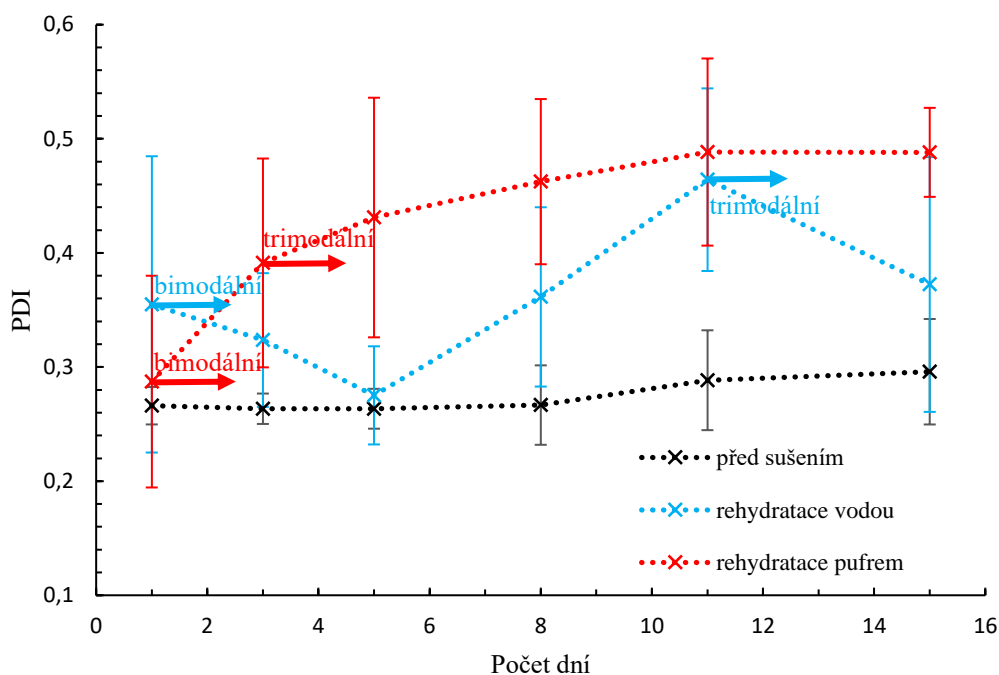
Obr. 39: Distribuce velikostí před sušením a po rehydrataci pro vzorek DPPC + CHOL. v 1. den

Rehydratované liposomy z DPPC + CHOL. se také zvětšily oproti vzorku před sušením a vzorky měly větší polydisperzitu. Průběh po rehydrataci byl tedy podobný jako u předchozího vzorku z DPPC, jen celkově byly hodnoty velikostí nižší.

U vzorků rehydratovaných vodou došlo opět k mírnému zvětšení částic a PDI viz *obr. 40* oproti roztoku před sušením, příčinou mohl být opět osmotický tlak nebo jiné změny způsobené sušením, ale i v tomto případě zůstaly liposomy relativně stabilní celých 15 dní (jako liposomy před sušením) a obecně menší než ty bez stabilizace cholesterolem. U předchozího vzorku z DPPC byla velikost až (198 ± 45) nm, ale u DPPC + CHOL. maximálně (136 ± 12) nm. Dlouhodobě stejná velikost nejspíš potvrzuje zůstatek cholesterolu ve dvojvrstvě i po sušení, zajištění tím větší tuhosti, zpomalení vlivu osmotického tlaku a tím pomalejší růst velikosti. Vzorky byly od počátku bimodální a po celou dobu obsahovaly i částice okolo 5000 nm, od 11. dne vznikl další malý pík v okolí 1000 nm, staly se tak trimodální. Stejně jako u předchozího vzorku DPPC zastoupení částic okolo 5000 nm bez změny velikosti po celou

dobu 15 dnů poukazuje na možnosti, že jsou to nečistoty (následně se vyskytovaly u všech rehydratovaných vzorků). Vznik menšího píku po několika dnech u velikosti 1000 nm by odpovídal možnému agregování liposomů. Zeta potenciál byl $(-13,2 \pm 3,2)$ mV.

Po rehydrataci puřrem byly liposomy menší než ty rehydratované vodou a postupem času se mírně zvětšovaly (zvyšuje se i PDI, viz *obr. 40*), nedošlo však k tomu, že by začaly během 15 dnů měření tvořit výrazně velké shluky, jako tomu bylo u předchozího vzorku. Pík v oblasti 1000 nm byl pozorován po třech dnech i zde, ale nebyl zdaleka tak výrazný jako u minulého vzorku. Částice o velikosti kolem 5000 nm zde byly taktéž od začátku měření. Zeta potenciál se pohyboval v méně záporných hodnotách než u rehydratace vodou $(-9,3 \pm 1,8)$ mV.



Obr. 40: Závislost hodnoty PDI na dnech měření pro vzorek DPPC + CHOL.

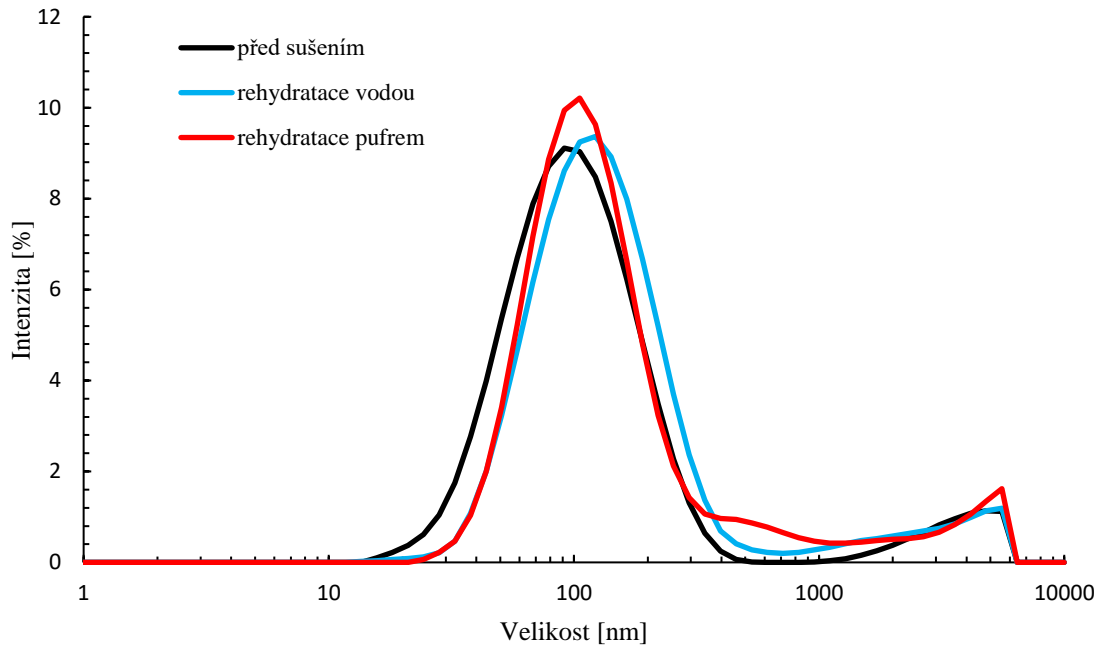
5.1.3 Přípravené liposomy z DPPC a kyseliny fosfatidové před sušením a po rehydrataci

Kyselina fosfatidová je fosfolipid, který se začlení do membrány, podporuje její zakřivení a nese záporný náboj. Roztok liposomů s PA, byl jako předchozí vzorky po přípravě opalescentní. V důsledku přidání záporné PA se zvýšilo elektrostatické odpuzování mezi liposomy a došlo k zúžení distribuce velikosti (viz přílohy 9.1) [7].

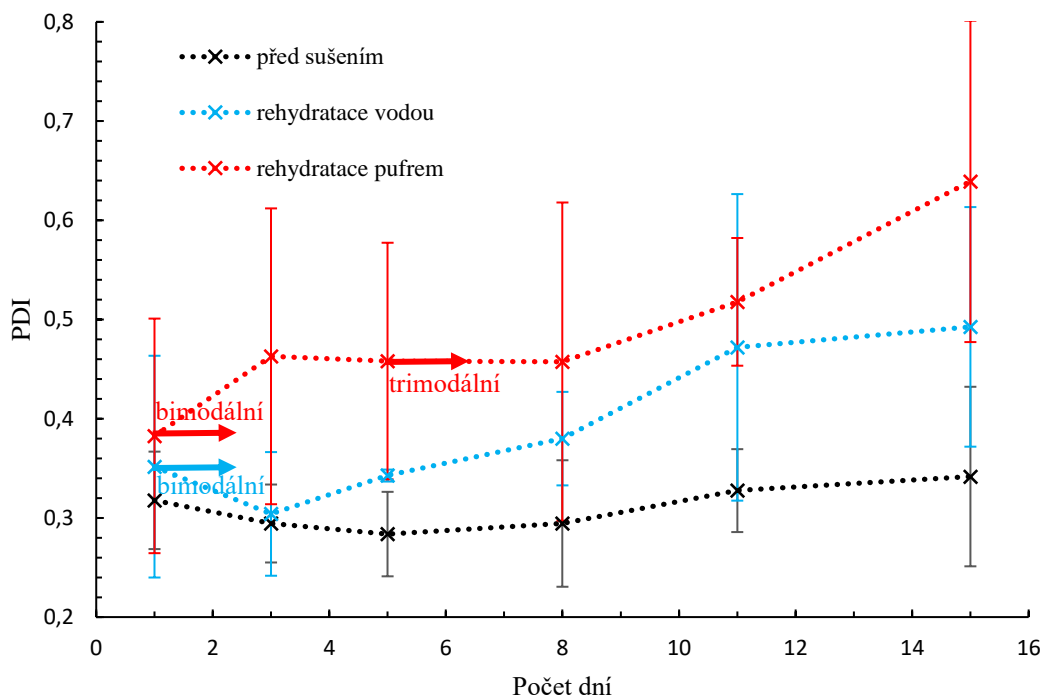
Vzniklé liposomy před sušením byly také menší než prvotní pouze z DPPC a vydržely mít téměř stejnou velikost po celou dobu 15 dnů stejně jako liposomy z DPPC + CHOL. Zeta potenciál takových liposomů byl očekávan záporný, ale naměřená byla hodnota $(10,9 \pm 2,6)$ mV, což je u takových liposomů velmi neobvyklé. Vliv tady mohla mít sacharóza, která svou přítomností v okolí liposomu mohla zakrýt záporný náboj PA. Další možností je, že by PA byla ve větší koncentraci ve vnitřní fosfolipidové vrstvě s negativní zakřivením, kam díky své malé nabitě hlavě vůči uhlovodíkovému řetězci lépe zapadá [7].

Co se týče liposomů vzniklých po rehydrataci, tak první den byly liposomy velikostně velmi podobné těm před sušením (viz *obr. 41*), jejich velikost se s časem postupně zvětšovala a vzorky byly více polydisperzní (viz *obr. 42*). V porovnání se vzorkem DPPC + CHOL.

se liposomy u vzorku DPPC + PA zvětšily do vyšších hodnot, to opět ukazuje lepší stabilizaci u vzorku s cholesterolem. Výskyt částic o velikosti kolem 5000 nm byl pozorovatelný opět od začátku měření a u vzorků rehydratovaných puřem bylo navíc zobrazeno větší množství agregátů, které narůstalo od 5. dne (velikost kolem 800 nm) až do 15. dne, kde byl jejich pík nejvýraznější, a agregáty měly velikost přes 1000 nm.



Obr. 41: Distribuce velikostí před sušením a po rehydrataci pro vzorek DPPC + PA v 1. den



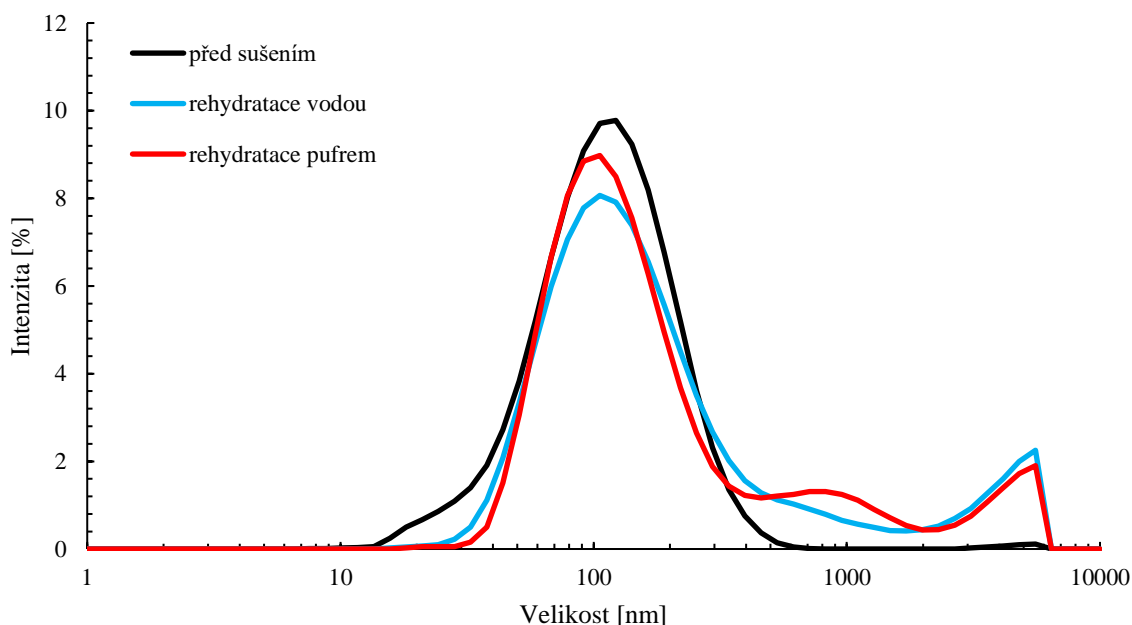
Obr. 42: Závislost hodnoty PDI na dnech měření pro vzorek DPPC + PA

U liposomů rehydratovaných vodou byl ZP $(-19,5 \pm 3,9)$ mV a u rehydratace puforem byla hodnota opět kladnější $(-12,2 \pm 2,0)$ mV. U těchto vzorků se mohlo stát, že vlivem sušení zůstala sacharóza pouze v liposomech. Po rehydrataci už nebyla sacharóza v tak velkém množství v okolí liposomů (dokud nezačne difundovat ven) a nezakryla záporný náboj PA, jako tomu mohlo být před sušením.

5.1.4 Přípravené liposomy z DPPC a polyethylenglykolu před sušením a po rehydrataci

Posledním typem vzorku byly liposomy obalené polyethylenglykolem. Navázání PEG na liposom před sušením bylo potvrzeno hodnotou zeta potenciálu. Polyethylenglykol by měl liposom pokrýt, snížit náchylnost ke srážení a vytvořit nulový ZP. Svou přítomností způsobuje stérickou a elektrostatickou stabilizaci, což zahrnuje i uspořádání molekul vody okolo hydrofilní hlavy PEG [7]. Naměřená hodnota ZP u vzorků před sušením byla $(0,5 \pm 2,6)$ mV, to potvrzuje pokrytí povrchu PEG. Velikost u DPPC + PEG před sušením byla podobná a stabilní po dobu 15 dní jako u vzorků DPPC + CHOL. a DPPC + PA.

Na *obr. 43* jsou zobrazeny distribuce velikostí pro vzorky DPPC + PEG před sušením a ihned po rehydrataci.

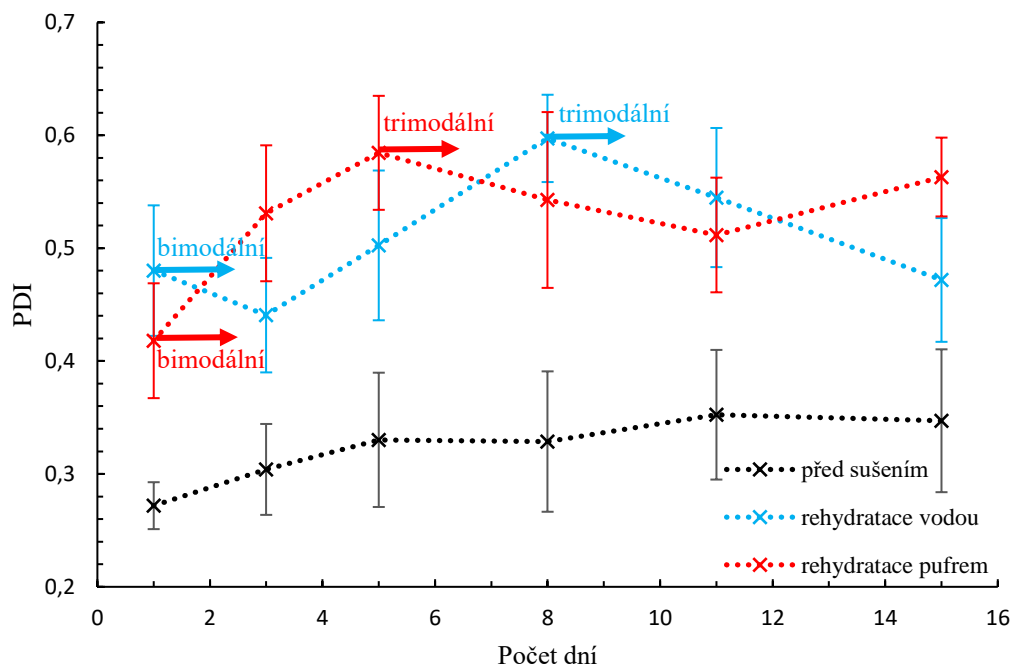


Obr. 43: Distribuce velikostí před sušením a po rehydrataci pro vzorek DPPC + PEG v 1. den

Podle hlavních píků v distribuci vypadá, že se liposomy lehce zmenšily, ovšem polydisperzní index na *obr. 44* se zvýšil a liposomy se v dalších dnech také zvětšovaly. Zvětšení mohlo být způsobeno např. osmotickým tlakem nebo zvětšením objemu PEG po absorbování vody.

Po rehydrataci byly vzorky bimodální, stejně jako u všech předchozích vzorků (zmiňované nečistoty). Po několika dnech u rehydratace vodou i puforem došlo ke tvorbě agregátů a vzorky vykazovaly trimodální charakter. Naměřený zeta potenciál rehydratovaných vzorků byl u použití vody $(-10,6 \pm 1,0)$ mV a u pufru $(-3,6 \pm 1,0)$ mV. Záporný ZP mohl být naměřen kvůli rozprostření náboje PEG, který zajišťuje elektrostatickou stabilizaci, na větší plochu a tím

snížení stabilizačního efektu [59, 60]. V důsledku tohoto mohlo více docházet k agregaci liposomů se ZP v nestabilní oblasti.



Obr. 44: Závislost hodnoty PDI na dnech měření pro vzorek DPPC + PEG

5.2 Vysušený prášek

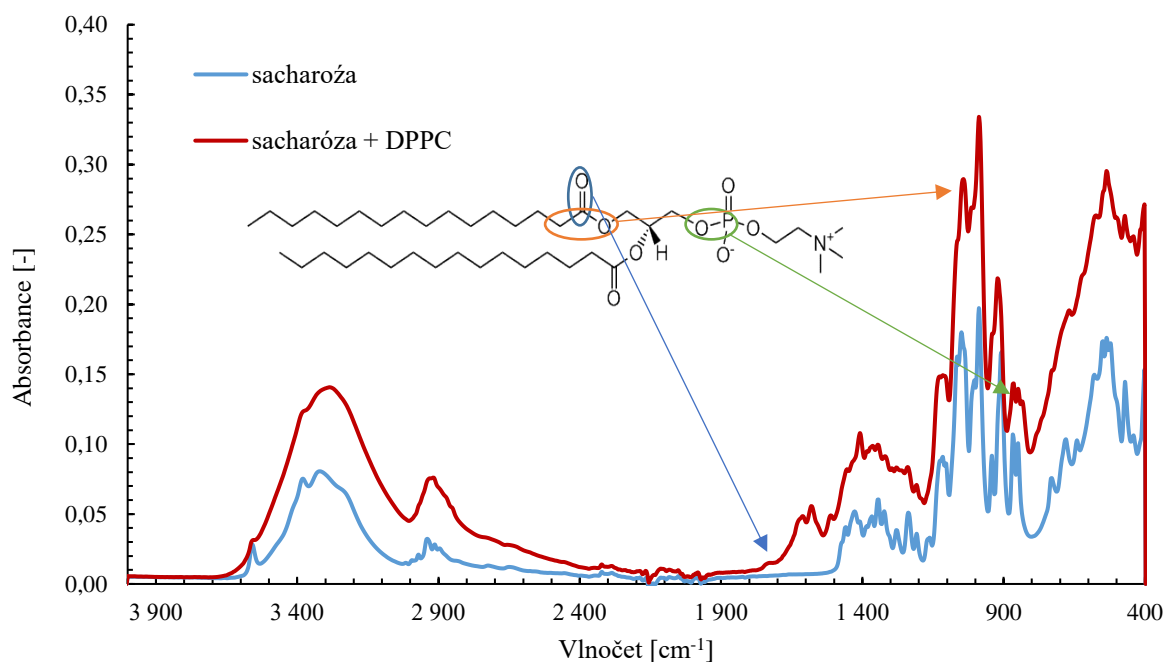
Každý z připravených roztoků byl sprejově sušen k získání prášku pro opětovnou rehydrataci, jejíž výsledky byly popsány v kapitole 5.1. Kapitola věnovaná prášku se zaměřuje na jeho složení, zbytkovou vlhkost, výtěžnost, aerodynamickou velikost a strukturu. Prášek po vysušení byl bílý a bez zápachu. Složení roztoku před sušením nemělo vliv na vzhled prášku a všechny vypadaly stejně jako na obr. 45.



Obr. 45: Vzhled vysušeného prášku všech vzorků

U prvního vysušeného vzorku (liposomy z DPPC) bylo potřebné ověřit, jestli po vysušení zůstal v prášku DPPC a nejen sacharóza, které byla oproti DPPC obsažena ve velkém množství. To se zjišťovalo infračervenou spektrometrií konkrétně ATR-FTIR. Výsledkem bylo spektrum zobrazené na obr. 46. Ze spektra je viditelné, že prášek obsahoval i přes velké množství

sacharózy potřebné DPPC, které bylo potvrzeno zvýrazněnými skupinami ze struktury DPPC. Po rehydrataci bylo ověřeno i zrekonstruování liposomů pomocí STEM (v předchozí kapitole 5.1.1). Po těchto dvou ověřeních bylo předpokládáno, že výsledek by byl stejně pozitivní i u následujících vzorků.



Obr. 46: Výstup infračervené spektroskopie

Po zjištění, že liposomy se ve vysušeném prášku a po rehydrataci stále vyskytují, byly u prášku provedeny další měření. V následující tab. 1 jsou hodnoty aerodynamické velikosti prášku, zbytkové vlhkosti a výtěžky.

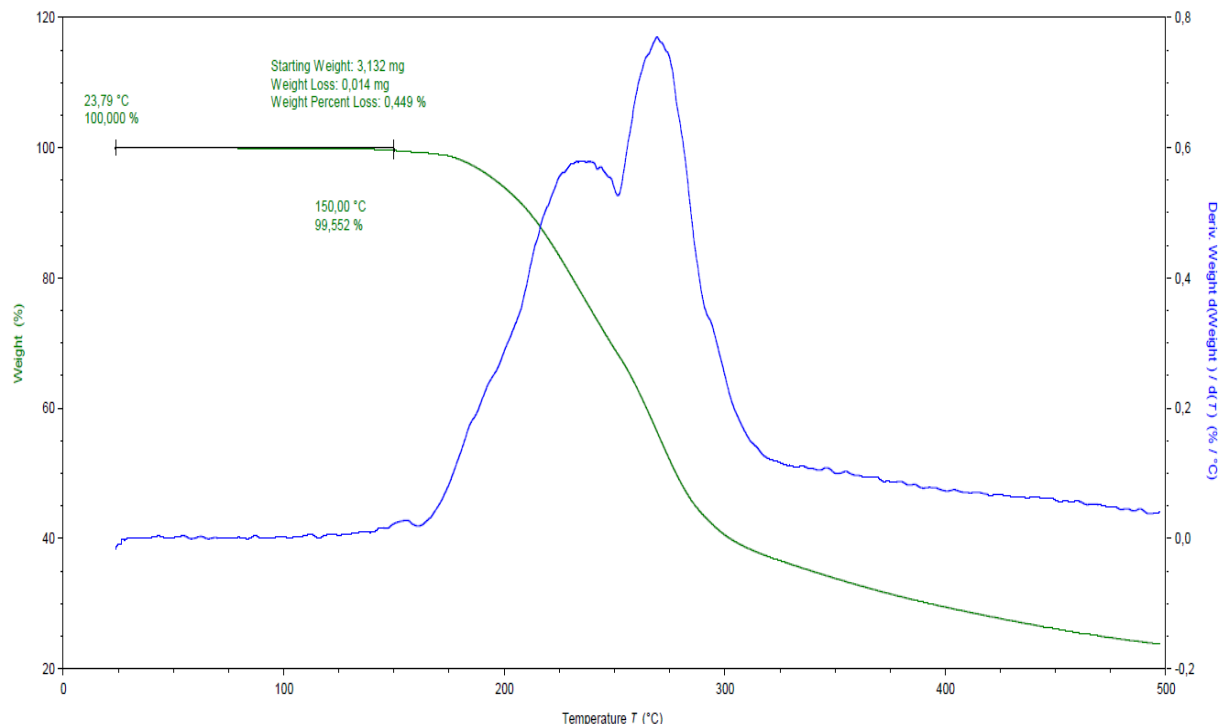
Jak si lze všimnout aerodynamická velikosti byla u prvních tří vzorků (DPPC, DPPC + CHOL., DPPC + PA) podobná, ale u prášku z liposomů potažených polyethylenglykolem byla velikost menší. To mohlo být způsobeno právě přítomností PEG na povrchu liposomu a tím snížení tendence agregovat.

Tab. 1: Hodnoty aerodynamické velikosti, zbytkové vlhkosti a výtěžku pro vzorky prášku

	Aerodynamická velikost [μm]	Zbytková vlhkost [%]	Výtěžek [%]
DPPC	$8,9 \pm 0,9$	$0,40 \pm 0,44$	$4,6 \pm 0,1$
DPPC+CHOL.	$8,9 \pm 1,6$	$3,37 \pm 0,10$	$8,0 \pm 1,5$
DPPC+PA	$7,1 \pm 1,5$	$0,47 \pm 0,04$	$8,0 \pm 1,7$
DPPC+PEG	$5,4 \pm 1,4$	$0,08 \pm 0,07$	$6,7 \pm 2,0$

Měření zbytkové vlhkosti probíhalo termodynamickou analýzou a výstupem byly termogravimetrické křivky, viz obr. 47 (ostatní jsou zobrazeny v přílohách 9.2), ze kterých byla odečítána hodnota zbytkové vlhkosti při 150 °C. Tato teplota byla zvolena kvůli tomu, že při dalším zvyšování docházelo k rozkladu nebo spálení materiálu, to značí prudký pokles zelené křivky.

Zbytková vlhkost byla u vzorků DPPC, DPPC + PA a DPPC + PEG minimální. Jediný vzorek DPPC + CHOL. vykazoval vyšší zbytkovou vlhkost, ale i přes to je hodnota ($3,37 \pm 0,108$) % stále výrazně nízká. Zvýšení mohlo být způsobeno přítomností cholesterolu, membrána je tužší a nemusela se z vnitřku liposomu vypařit všechna voda, to by mohlo být řešeno delším pobytem sušených kapiček v sušárně změnou nastavení sušení.



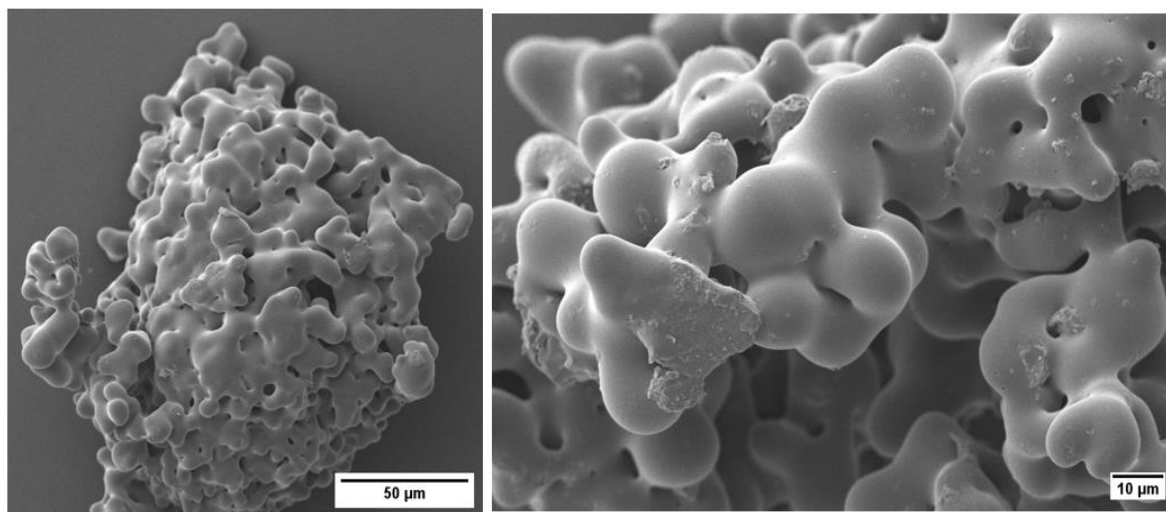
Obr. 47: Ukázka výstupu z termogravimetrické analýzy (vzorek DPPC + PA č. 1)

Třetí hodnotou v tabulce je výtěžek prášku. Uvedené hodnoty výtěžku jsou velmi malé a pouze orientační, protože tím, že roztoku na sušení bylo minimální potřebné množství (40 ml), ve sběrné nádobě na částice bylo opravdu málo prášku. Velká většina zůstala na stěnách cyklóny. Tudíž výtěžek by mohl být rozhodně vyšší, pokud by se podařilo dostat všechny prášek usazený v cyklóně, což nebylo možné.

Úplně poslední metoda využita pro zkoumání prášku byla skenovací elektronová mikroskopie pro detailní zobrazení jeho povrchové struktury. Struktura byla u všech typů vzorku velmi podobná.

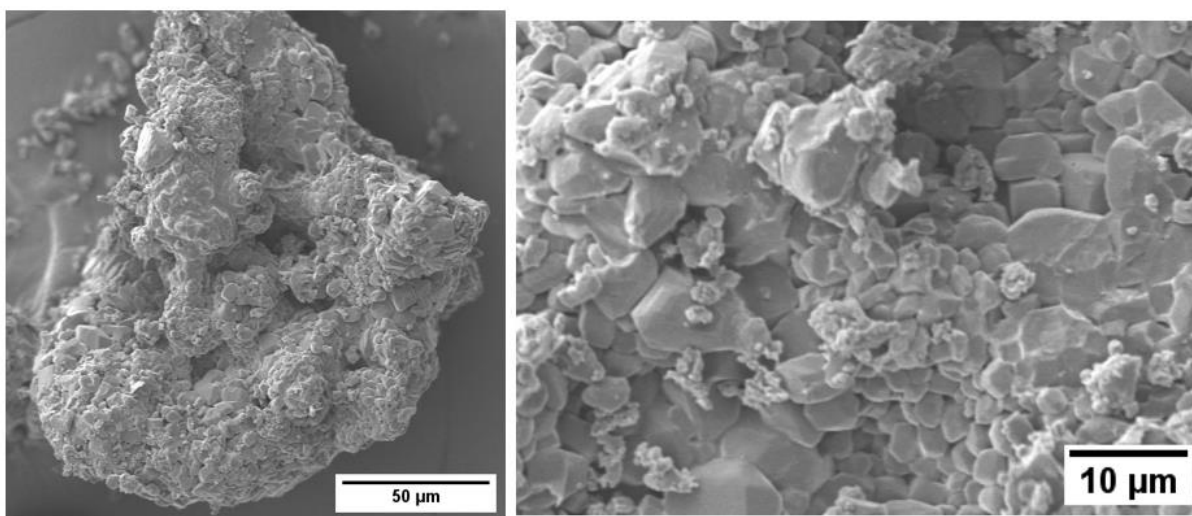
Na obr. 48 je zobrazen vzorek DPPC, v levé části obrázku je vždy zobrazeno zrnko prášku a vpravo je detail povrchu. Podle vzdálenějšího zobrazení je možné určit, že zrnko má průměr okolo 100-150 μm , přitom aerodynamická velikost tohoto prášku byla pouhých ($8,93 \pm 0,89$) μm . Tato skutečnost jasně ukazuje, že hodnoty velikosti prášku a aerodynamická velikost nejsou stejná informace a navíc při měření aerodynamické velikosti částic dochází předem k deaglomeraci, zatímco na obr. 48 jsou částice agregované [52]. Povrch prášku se jeví jako slepený a pokrytý něčím, co tvoří hladký povrch. Slepění více malých částic do jedné velké mohlo nastat vlivem sacharózy v roztoku. Sacharóza je hygroskopická a po pohlcení vody může menší částice slepovat dohromady, tak mohou vznikat větší struktury jako na obr. 48 vlevo. Spojování částic mohlo být podpořeno i nestabilním ZP.

Sacharóza má působit jako protektant a chránit strukturu liposomů. Zůstala nejspíš v liposomech uvnitř i na jejich povrchu (vytvořila povlak), aby nedošlo k poškození a naprostému zřícení struktury [16]. Vzorek tak byl ochráněn a mohlo dojít k opětovné rekonstrukci liposomů po rehydrataci.



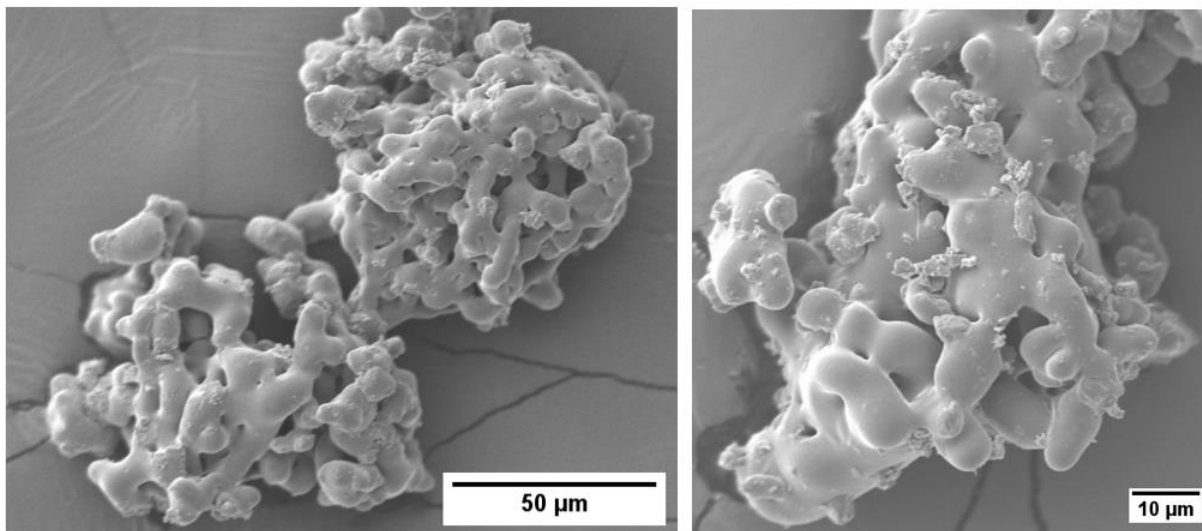
Obr. 48: Povrch prášku vzorku DPPC

Na obr. 49 je prášek vzorku DPPC + CHOL., jeho vzhled se od minulého vzorku mírně liší. Vzhled je více hranatý. Vlivem sušení mohlo dojít k velkému množství změn, jednou z nich mohla být ta, že teplotou při sušení vytvořila sacharóza na povrchu více krystalickou formu oproti předchozímu vzorku. Další možností je, že ke krystalizaci sacharózy na povrchu došlo postupem času v době, než byl vzorek měřen, protože krystalizace závisí na více faktorech, jako je teplota nebo vlhkost [61]. Je možné, že po delší době by taková změna nastala u všech vzorků. Velikost jednotlivých zrněk byla opět okolo 100-150 μm. Menší části, které byly do zrnka spojeny, měly velikost různou, to mohl být následek zkrystalizované sacharózy. Ovšem i přes mírně jiný vzhled prášku došlo k rekonstrukci liposomů, které nevykazovaly žádné výrazné změny.



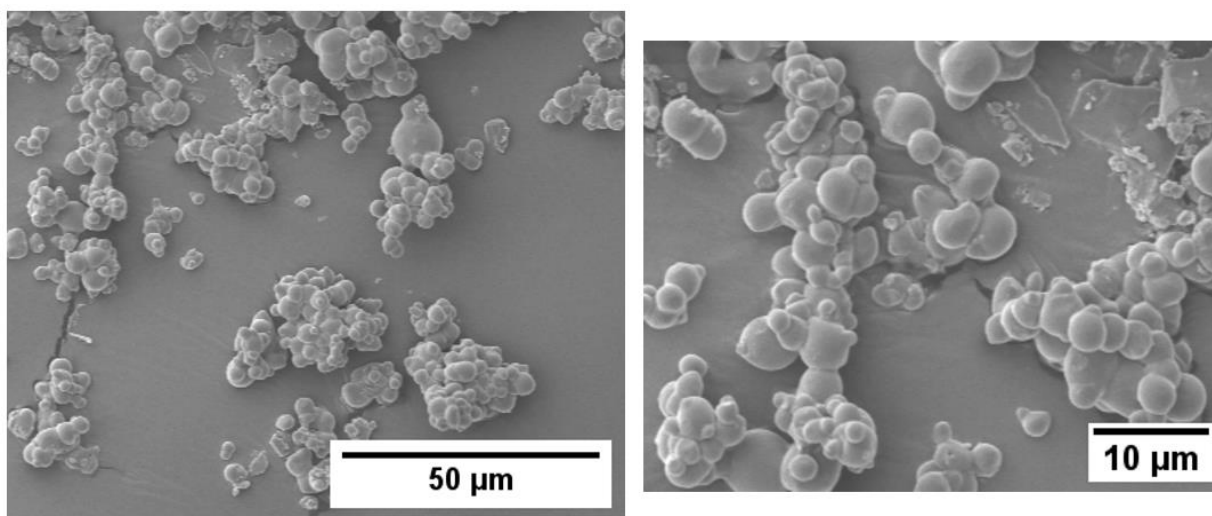
Obr. 49: Povrch prášku vzorku DPPC + CHOL.

Vzorek DPPC + PA na *obr. 50* vypadal stejně jako první vzorek pouze z DPPC. Hladký povrch prášku značí obalení sacharózou a protekci vzorku, což by opět odpovídalo i tomu, že po rehydrataci bez problému vznikly liposomy. Na levé části obrázku jsou dvě zrnka, jejichž velikost byla okolo 50 μm , tedy menší než částice v předchozích vzorcích. Menší částice mohly být způsobeny přítomností PA a odpuzováním vlivem jejího záporného náboje.



Obr. 50: Povrch prášku vzorku DPPC + PA

Poslední vzorek DPPC + PEG se od všech ostatních odlišoval, především tím že jednotlivé částice prášku byly výrazně menší než u všech ostatních vzorků, kde byla velikost v rozmezí 50-150 μm , tady je okolo 25 μm i ještě menší. Tento vzorek vykazoval nejmenší velikost i při měření aerodynamické velikosti částic (viz výše *tab. 1*). Menší částice by mohly potvrzovat zůstatek PEG na povrchu liposomů, protože obecně PEG snižuje agregaci částic, tím že zajišťuje elektrostatickou stabilizaci i tvoří stérickou bariéru a částice se k sobě nepřiblíží dostatečně blízko. Taková bariéra byla v tomto případě vytvořena i pomocí sacharózy, takže by se dalo říct, že liposomy byly chráněny pomocí dvou vrstev (PEG a sacharóza). Dostatečné pokrytí naznačuje i hladký vzhled povrchu prášku zobrazen na *obr. 51*.



Obr. 51: Povrch prášku vzorku DPPC + PEG

6 ZÁVĚR

Jedním z cílů diplomové práce bylo zpracovat rešerši na téma přípravy a stanovení vlastností pevné formy liposomálních systémů vhodných k inhalačnímu podávání. K dalším cílům patřilo dle informací získaných zpracováním teoretické části práce a rešerše připravit a usušit liposomální systémy metodou sprejového sušení. Metodou sušení mohla být i lyofilizace, sprejové sušení se jevílo jako vhodnější varianta především kvůli nižší ceně a rychlejšímu průběhu. Roztok liposomů byl vysušen sprejovým sušením a zpětně rehydratován vodou nebo pufrem o pH 6,6 jako je na plicní sliznici. U připravených liposomů v roztoku před sušením i po rehydrataci bylo provedeno ověření vzniku liposomů metodou rastrovací transmisní elektronové mikroskopie, následovalo měření velikosti částic a měření zeta potenciálu. Vysušený prášek byl zkoumán metodou infračervené spektroskopie, aby byla potvrzena přítomnost DPPC i po vysušení. Dále byla u prášku zjišťována aerodynamická velikost a zbytková vlhkost. Na závěr byly prášky zobrazeny metodou skenovací elektronové mikroskopie.

Základní stavební kámen všech liposomů byl dipalmitoylfosfatidylcholin a jejich protekci při sušení zajistila sacharóza. U prvního připraveného roztoku liposomů byla potvrzena jejich přítomnost metodou STEM. Liposomy z DPPC nebyly příliš stabilní a v průběhu 15 dní se zvětšovaly z původních (84 ± 9) nm až na (120 ± 30) nm, takže k DPPC byly přidány další komponenty pro zlepšení stability. Všechny stabilizované liposomy měly menší velikost než původní pouze z DPPC. Intra-vezikulární stabilizace byla zlepšena přidávkem cholesterolu (10 mol. %), takové liposomy vydržely po celou dobu měření stejné a jejich velikost se pohybovala okolo (97 ± 10) nm. Třetí systémy byly liposomy složeny z DPPC a kyseliny fosfatidové (10 mol. %). Tyto liposomy také vydržely stabilní a neměnily svou velikost. Kyselina fosfatidová měla zajistit svým záporným nábojem inter-vezikulární stabilizaci, ale zeta potenciál byl ($10,9 \pm 2,6$) mV. Kladný zeta potenciál mohl být zapříčiněn zakrytím záporného náboje přítomnou sacharózou. Další možností je větší množství PA ve vnitřní části membrány (způsobeno tvarem PA) oproti venkovní, kde se měří ZP. Poslední připravený typ liposomů obsahoval DPPC a polyethynglykol (6 mol. %), který pokryl povrch liposomů, zamezil jejich agregaci a zajistil zeta potenciál v okolí nulové hodnoty. Pro jistotu vzniku liposomů i po rehydrataci byla jejich přítomnost ověřena a potvrzena metodou STEM (opět pouze u prvního vzorku rehydratovaného vodou).

Rehydratace vysušeného prášku měla u systémů DPPC a DPPC + CHOL. podobný průběh. Liposomy rehydratované vodou měly větší velikost než ty před sušením a postupně se zvětšovaly, nejspíš vlivem osmotického tlaku nebo změnami ve struktuře sušením. Po rehydrataci pufrem vznikly liposomy větší než před sušením ale menší než u rehydratace vodou, které se dál také zvětšovaly. Rozdíl mezi vzorky DPPC a DPPC + CHOL. byl v tom, že u systémů s cholesterolem došlo k již zmíněné stabilizaci, dokázané tím, že naměřená velikost byla maximálně (136 ± 12) nm, ale u liposomů bez cholesterolu až (280 ± 69) nm. Dále u liposomů DPPC + CHOL. rehydratovaných vodou nebyl pozorovaný nárůst velikosti v průběhu 15 dnů, protože cholesterol vyztužil membránu.

Rehydratací liposomů s PA vznikly velikostně stejné liposomy, které se postupně opět zvětšovaly. Zeta potenciál měl po rehydrataci zápornou hodnotu v nestabilní oblasti. Po sušení už nebyla v okolí liposomu sacharóza, která mohla záporný náboj PA před sušením zakrývat.

Posledním rehydratovaným systémem byly liposomy potažené polyethylenglykolem. Přímo po rehydrataci se liposomy oproti liposomům před sušením zvětšily, ale porovnání velikosti liposomů rehydratovaných vodou a pufrem bylo stejné, pak se jejich velikost také zvětšila. Zvětšení v tomto případě mohlo být způsobeno osmotickým tlakem nebo zvětšováním objemu právě PEG. Zeta potenciál měl zápornou hodnotu v nestabilní oblasti, což mohlo nastat rozprostřením náboje PEG na větší plochu a tím snížení elektrostatické stabilizace.

U vysušeného prášku byla infračervenou spektroskopií potvrzena přítomnost DPPC po vysušení značící správný postup přípravy i úspěšnou možnost rehydratace. Aerodynamická velikost částic byla u vzorků DPPC, DPPC + CHOL. a DPPC + PA podobná, vzorek DPPC + PEG vykazoval nejmenší aerodynamickou velikost ($5,40 \pm 1,43$) μm , což potvrzuje potažení liposomů PEG i po sušení a zajištění tím menší agregace částic. Nejvyšší zbytkovou vlhkost měl prášek DPPC + CHOL. ($3,367 \pm 0,108$) %. Hodnota vlhkosti je stále dost nízká a ovlivnit ji mohlo složení liposomální membrány nebo proces sušení. Zbytkové vlhkosti byly odečítány z termogravimetrické křivky při teplotě 150 °C, protože při vyšších teplotách docházelo k rozkladu nebo spálení vzorku. Poslední zvolenou metodou pro charakterizaci byla skenovací elektronová mikroskopie, aby byly zjištěny informace o povrchu prášku. U všech vzorků bylo viditelné potažení prášku vrstvou sacharózy, která tak splnila svou ochrannou funkci. U vzorku DPPC + CHOL. byl povrch prášku lehce odlišný od ostatních. Na jeho povrchu byly malé hranaté útvary, ty mohly být způsobeny krystalizací sacharózy vlivem okolních podmínek. Nejmenší částice v prášku na snímcích byly u systému DPPC + PEG, což stejně jako nejmenší aerodynamická velikost částic, značí dobrou stérickou a elektrostatickou stabilizaci pomocí PEG.

V průběhu zpracování diplomové práce se úspěšně podařilo sprejově vysušit a rehydratovat všechny typy připravených liposomálních systémů o různém složení. Charakterizace systémů jak v kapalně, tak pevně formě ukázala různé vlastnosti právě podle komponentů vzorku. Dle zjištěných informací v této práci se dá zvolit jako nejvhodnější systém DPPC + PEG, protože velikost i aerodynamická velikost byly nejmenší. Aerodynamická velikost byla ($5,40 \pm 1,43$) μm a prášek by měl šanci se dostat až do hlubokých plic. Současně byl zeta potenciál po rehydrataci pufrem o stejném pH jako na plicní sliznici velmi blízko nule, takže by nedošlo k vyvolání reakce imunitního systému.

Příprava suchých částic z roztoku liposomů byla provedena především kvůli myšlence vytvoření prášku, který by obsahoval liposomy s enkapsulovaným léčivem. Po vdechnutí by se prášek rehydratoval na povrchu plicní sliznice a dlouhodobě by se z něj uvolňovalo léčivo. Připravené liposomy by mohly představovat vhodné kandidáty, ale vzhledem k tomu, že do liposomů nebylo nic enkapsulováno, tak by bylo vhodné prozkoumat možnosti enkapsulace, zadržení léčiva po sušení i aktivitu léčiva po vysušení. Téma je tedy rozhodně určené k dalším krokům zkoumání a hledání ideálního postupu k dosažení požadovaného výsledku.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Fosfolipidy. *Institut Galenus* [online]. [cit. 2023-04-16]. Dostupné z: <https://www.galenus.cz/clanky/lipidy/biochemie-lipidy-fosfolipidy>
- [2] ALBERTS BRUCE, BRAY DENIS, Johnson Alexander. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. B.m.: 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero [cit. 2023-04-16], 2006. ISBN 80-902906-0-4.
- [3] NOVÁK, Josef. *Fyzikální chemie II*. B.m.: Praha: Vysoká škola chemicko-technologická [cit. 2023-04-16], 2001. ISBN 80-708-0436-X.
- [4] HOLMBERG, Krister. *Surfactants and polymers in aqueous solution*. B.m.: 2nd ed. Chichester: Wiley [cit. 2023-04-16], 2003. ISBN 04-714-9883-1.
- [5] YEH, Shao-Jen, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Cosolvent Effects on the Stability of Catanionic Vesicles Formed from Ion-Pair Amphiphiles. *Langmuir* [online]. 2005, 21(14), 6179-6184 [cit. 2023-04-16]. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la047207g
- [6] STILLWELL, William. Membrane Polar Lipids. In: *An Introduction to Biological Membranes* [online]. B.m.: Elsevier [cit. 2023-04-16], 2016, s. 63–87. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-63772-7.00005-1
- [7] 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* [online]. 2021, 204, 111793 [cit. 2023-04-30]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2021.111793
- [8] 16:0 PA Avanti Polar Lipids [online]. [cit. 2023-04-16]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/avanti/830855p>
- [9] 16:0 PC (DPPC) Avanti Polar Lipids [online]. [cit. 2023-04-16]. Dostupné z: <https://avantilipids.com/product/850355>
- [10] Dipalmitoylphosphatidylcholine [online]. [cit. 2023-04-16]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Dipalmitoylphosphatidylcholine>
- [11] MUDR. ONDŘEJ VESELÝ. *Téma: Plicní surfaktant jeho složení, syntéza, funkce a terapeutické uplatnění* [online]. B.m.: Ústav patologické fyziologie LF UP Olomouc, Dětská endokrinologická ambulance Svitavské nemocnice a.s.[cit. 2023-04-16], 2012. Dostupné z: <http://pfyziolklin.upol.cz/?p=834>
- [12] JEAN-FRANÇOIS BERRET, FANNY MOUSSEAU a RÉMI LE BORGNE ET EVDOKIA K. OIKONOMOUSEAU. Sol-gel transition induced by alumina nanoparticles in a model pulmonary surfactant [online]. 2022, 1-15 [cit. 2023-04-16]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/359890312_Sol-gel_transition_induced_by_alumina_nanoparticles_in_a_model_pulmonary_surfactant
- [13] PANDEY, Himanshu, Radha RANI a Vishnu AGARWAL. Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. *Brazilian Archives of Biology and Technology* [online]. 2016, 59, [cit. 2023-04-17]. ISSN 1516-8913. Dostupné z: doi:10.1590/1678-4324-2016150477
- [14] OHVO-REKILÄ, H. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research* [online]. 2002, 41(1), 66-97 [cit. 2023-04-17]. ISSN 01637827. Dostupné z: doi:10.1016/S0163-7827(01)00020-0
- [15] cholesterol (plant) Avanti Polar Lipids [online]. [cit. 2023-04-17]. Dostupné z: <https://avantilipids.com/product/700100>
- [16] LIU, Peng, Guiliang CHEN a Jingchen ZHANG. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. *Molecules* [online]. 2022, 27(4), [cit. 2023-04-17].

- ISSN 14203049. Dostupné z: doi:10.3390/MOLECULES27041372
- [17] ÇAĞDAŞ, Melis, Ali Demir SEZER a Seyda BUCAK. Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery. In: *Application of Nanotechnology in Drug Delivery* [online]. B.m.: InTech [cit. 2023-04-17], 2014. Dostupné z: doi:10.5772/58459
- [18] AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN, Sang Woo JOO, Nosratollah ZARGHAMI, Younes HANIFEHPOUR, Mohammad SAMIEI, Mohammad KOUHI a Kazem NEJATI-KOSHKI. Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2013, 8(1), 1-9 [cit. 2023-04-17]. ISSN 1556276X. Dostupné z: doi:10.1186/1556-276X-8-102/TABLES/2
- [19] ŠTURM, Luka a Nataša Poklar ULRIH. Basic Methods for Preparation of Liposomes and Studying Their Interactions with Different Compounds, with the Emphasis on Polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, 22(12), 22 [cit. 2023-04-17]. ISSN 14220067. Dostupné z: doi:10.3390/IJMS22126547
- [20] Clearance [online]. [cit. 2023-04-17]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Clearance>
- [21] SERCOMBE, Lisa, Tejaswi VEERATI, Fatemeh MOHEIMANI, Sherry Y. WU, Anil K. SOOD a Susan HUA. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2015, 6(DEC), 286 [cit. 2023-04-17]. ISSN 16639812. Dostupné z: doi:10.3389/FPHAR.2015.00286/BIBTEX
- [22] Oponizace [online]. [cit. 2023-04-17]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Oponizace>
- [23] 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* [online]. 2006, 1(3), 297 [cit. 2023-04-17] [vid. 2023-04-17]. ISSN 11769114. Dostupné z: [/pmc/articles/PMC2426795/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16639812/)
- [24] 16:0 PEG5000 PE Avanti Polar Lipids [online]. [cit. 2023-04-17]. Dostupné z: <https://avantilipids.com/product/880200>
- [25] polyethylenglykol (zkr. PEG) | Velký lékařský slovník On-Line [online]. [cit. 2023-04-17]. Dostupné z: <https://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/polyethylenglykol-zkr-peg-1>
- [26] DESHPANDE, Pranali P, Swati BISWAS a Vladimir P TORCHILIN. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomedicine* [online]. 2013, 8(9), 1509-1528 [cit. 2023-04-17]. ISSN 1743-5889. Dostupné z: doi:10.2217/nnm.13.118
- [27] FRANCO, Marina Santiago, Eliza Rocha GOMES, Marjorie Coimbra ROQUE a Mônica Cristina OLIVEIRA. Triggered Drug Release From Liposomes: Exploiting the Outer and Inner Tumor Environment. *Frontiers in Oncology* [online]. 2021, 11, [cit. 2023-04-17]. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2021.623760
- [28] ALSAWAFAH, Nour, William G. PITT a Ghaleb A. HUSSEINI. Dual-Targeting and Stimuli-Triggered Liposomal Drug Delivery in Cancer Treatment. *ACS Pharmacology & Translational Science* [online]. 2021, 4(3), 1028-1049 [cit. 2023-04-17]. ISSN 2575-9108. Dostupné z: doi:10.1021/acsptsci.1c00066
- [29] DAN, Nily. Structure and kinetics of synthetic, lipid-based nucleic acid carriers. In: *Lipid Nanocarriers for Drug Targeting* [online]. B.m.: Elsevier [cit. 2023-04-17], 2018, s. 529–562. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-813687-4.00014-1
- [30] OSTRÓŽKA-CIEŚLIK, Aneta a Beata SARECKA-HUJAR. The Use of Nanotechnology in Modern Pharmacotherapy. In: *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics* [online]. B.m.: Elsevier [cit. 2023-04-17], 2017, s. 139–158. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-52725-5.00007-1
- [31] ANDERSON, Sandra, Paul ATKINS, Per BÄCKMAN, David CIPOLLA, Andrew

- CLARK, Evangelia DAVISKAS, Bernd DISSE, Plamena ENTCHEVA-DIMITROV, Rick FULLER, Igor GONDA, Hans LUNDBÄCK, Bo OLSSON a Jeffrey WEERS. Inhaled Medicines: Past, Present, and Future. *Pharmacological Reviews* [online]. 2022, 74(1), 48-118 [cit. 2023-04-17]. ISSN 0031-6997. Dostupné z: doi:10.1124/pharmrev.120.000108
- [32] RUDOKAS, Mindaugas, Mohammad NAJLAH, Mohamed Albed ALHNAN a Abdelbary ELHISSI. Liposome Delivery Systems for Inhalation: A Critical Review Highlighting Formulation Issues and Anticancer Applications. *Medical Principles and Practice* [online]. 2016, 25(Suppl. 2), 60-72 [cit. 2023-04-17]. ISSN 1011-7571. Dostupné z: doi:10.1159/000445116
- [33] LO, Yu-li, Jui-chen TSAI a Jung-hua KUO. Liposomes and disaccharides as carriers in spray-dried powder formulations of superoxide dismutase. *Journal of Controlled Release* [online]. 2004, 94(2–3), 259-272 [cit. 2023-04-17]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2003.09.019
- [34] MUDR. VIKTOR KAŠÁK. Nové inhalační systémy užívané v léčbě chronických nemocí dýchacího ústrojí s obstrukcí dýchacích cest | Remedia [online]. 2009, [cit. 2023-04-17]. Dostupné z: <https://www.remédia.cz/rubriky/klinicka-farmakologie-a-farmacie/nove-inhalacni-systemy-uzivane-v-lecbe-chronicky-nemoci-dychacih-ustroji-s-obstrukci-dychacich-cest-1069/>
- [35] HOŘAVOVÁ, Hana, Jan GAJDZIOK a David VETCHÝ. Typy a příprava lipozomálních přípravků pro plicní podání [online]. 2020, [cit. 2023-04-17]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3599/3545>
- [36] SANTOS, Daniel, Ana Colette MAURÍCIO, Vitor SENCADAS, José Domingos SANTOS, Maria H. FERNANDES a Pedro S. GOMES. Spray Drying: An Overview. In: *Biomaterials - Physics and Chemistry - New Edition* [online]. B.m.: InTech [cit. 2023-04-17], 2018. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.72247
- [37] The Spray Drying Process | Eurotherm [online]., [cit. 2023-04-17]. Dostupné z: <https://www.eurotherm.com/life-sciences-cpg-processes-applications/the-spray-drying-process/>
- [38] CAL, Krzysztof a Krzysztof SOLLOHUB. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2010, 99(2), 575-586 [cit. 2023-04-17]. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.21886
- [39] FALKE, Sven a Christian BETZEL. Dynamic Light Scattering (DLS). In: [online]. B.m.: [cit. 2023-04-17], 2019, s. 173–193. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-28247-9_6
- [40] BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* [online]. 2016, 235, 337-351 [cit. 2023-04-17]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017
- [41] PATE, K. a P. SAFIER. Chemical metrology methods for CMP quality. In: *Advances in Chemical Mechanical Planarization (CMP)* [online]. B.m.: Elsevier [cit. 2023-04-17], 2016, s. 299–325. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100165-3.00012-7
- [42] BIMAL RAUT. Thermogravimetric Analysis: Principle, Instrumentation, and Reliable Application - Chemistry Notes [online]. 2022, [cit. 2023-04-17]. Dostupné z: https://chemistnotes.com/analytical_chemistry/thermogravimetric-analysis-principle-instrumentation-and-reliable-application/
- [43] Thermogravimetric Analysis (TGA) – PhotoMetrics [online]. [cit. 2023-04-17]. Dostupné z: <https://photometrics.net/thermogravimetric-analysis-tga/>
- [44] Aerodynamic Particle Sizer (Centre for Atmospheric Science - The University of Manchester) [online]. [cit. 2023-04-17]. Dostupné z: <http://www.cas.manchester.ac.uk/restools/instruments/aerosol/aps/>

- [45] Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) - MATCA [online]. [cit. 2023-04-17]. Dostupné z: <https://matca.cz/technologie/analyticke-metody/sem/>
- [46] INKSON, B.J. Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. In: *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods* [online]. B.m.: Elsevier [cit. 2023-04-17], 2016, s. 17–43. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100040-3.00002-X
- [47] Scanning Electron Microscopy | Principles of Scanning Electron Microscopy | Thermo Fisher Scientific [online]. [cit. 2023-04-17]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/materials-science/learning-center/applications/scanning-electron-microscope-sem-electron-column.html>
- [48] LUYK, Erik. Sputter Coating for SEM: How This Sample Preparation Technique Assists Your Imaging. *Thermo Fisher Scientific* [online]. [cit. 2023-04-17]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/blog/materials/sputter-coating-for-sem-how-this-sample-preparation-technique-assists-your-imaging/>
- [49] Transmission Electron Microscopy (TEM) | Thermo Fisher Scientific [online]. [cit. 2023-04-17]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/electron-microscopy/products/transmission-electron-microscopes.html>
- [50] B. ABBAS. Infrared Spectroscopy: Principle, Instrumentation & Applications [online]. 2023, [cit. 2023-04-17]. Dostupné z: https://psiberg.com/infrared-spectroscopy/#Infrared_IR_spectrophotometer
- [51] TIERNAN, Hannah, Bernadette BYRNE a Sergei G. KAZARIAN. ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging for the analysis of biopharmaceuticals. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 2020, 241, [cit. 2023-04-17]. ISSN 13861425. Dostupné z: doi:10.1016/J.SAA.2020.118636
- [52] CHOUGULE, Mahavir, Bijay PADHI a Ambikanandan MISRA. Development of Spray Dried Liposomal Dry Powder Inhaler of Dapsone. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2008, 9(1), 47-53 [cit. 2023-04-17]. ISSN 1530-9932. Dostupné z: doi:10.1208/s12249-007-9024-6
- [53] VAN DEN HOVEN, Jolanda M., Josbert M. METSELAAR, Gert STORM, Jos H. BEIJNEN a Bastiaan NUIJEN. Cyclodextrin as membrane protectant in spray-drying and freeze-drying of PEGylated liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2012, 438(1–2), 209-216 [cit. 2023-04-17] [vid. 2023-04-17]. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/J.IJPHARM.2012.08.046
- [54] WESSMAN, Per, Katarina EDWARDS a Denny MAHLIN. Structural effects caused by spray- and freeze-drying of liposomes and bilayer disks. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2010, 99(4), 2032-2048 [cit. 2023-04-17]. ISSN 1520-6017. Dostupné z: doi:10.1002/JPS.21972
- [55] KARADAG, Ayse, Beraat ÖZÇELİK, Martin SRAMEK, Monika GIBIS, Reinhard KOHLUS a Jochen WEISS. Presence of Electrostatically Adsorbed Polysaccharides Improves Spray Drying of Liposomes. *Journal of Food Science* [online]. 2013, 78(2), E206-E221 [cit. 2023-04-17]. ISSN 1750-3841. Dostupné z: doi:10.1111/1750-3841.12023
- [56] WANG, Lijuan, Xiongwei HU, Baode SHEN, Yunchang XIE, Chengying SHEN, Yi LU, Jianping QI, Hailong YUAN a Wei WU. Enhanced stability of liposomes against solidification stress during freeze-drying and spray-drying by coating with calcium alginate. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2015, 30, 163-170 [cit. 2023-04-17] [vid. 2023-04-17]. ISSN 1773-2247. Dostupné z: doi:10.1016/J.JDDST.2015.10.012
- [57] SZABOVÁ, Jana, Ondrej MIŠÍK, Jan FUČÍK, Kateřina MRÁZOVÁ, Ludmila

- MRAVCOVÁ, Jakub ELCNER, František LÍZAL, Vladislav KRZYŽÁNEK a Filip MRAVEC. Liposomal form of erlotinib for local inhalation administration and efficiency of its transport to the lungs. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2023, 634, 122695 [cit. 2023-04-30]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2023.122695
- [58] FISCHER, Horst a Jonathan H. WIDDICOMBE. Mechanisms of Acid and Base Secretion by the Airway Epithelium. *The Journal of membrane biology* [online]. 2006, 211(3), 139 [cit. 2023-04-19]. ISSN 00222631. Dostupné z: doi:10.1007/S00232-006-0861-0
- [59] IGLIČ, Aleš, Milan BRUMEN a Saša SVETINA. Determination of the inner surface potential of the erythrocyte membrane. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* [online]. 1997, 43(1), 97-103 [cit. 2023-05-1]. ISSN 03024598. Dostupné z: doi:10.1016/S0302-4598(96)05181-1
- [60] DONATH, E. a D. LERCHE. 309 - Electrostatic and structural properties of the surface of human erythrocytes. I-cell-electrophoretic studies following neuraminidase treatment. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* [online]. 1980, 7(1), 41-53 [cit. 2023-05-1]. ISSN 03024598. Dostupné z: doi:10.1016/0302-4598(80)87030-9
- [61] LEINEN, K. M. a T. P. LABUZA. Crystallization inhibition of an amorphous sucrose system using raffinose. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* [online]. 2006, 7(2), 85-89 [cit. 2023-05-1]. ISSN 1673-1581. Dostupné z: doi:10.1631/jzus.2006.B0085

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam zkratek

Zkratka	Význam
DPPC	dipalmitoylfosfatidylcholin
PA	kyselina fosfatidová
PEG	polyethylenglykol
PA	kyselina fosfatidová
DLS	dynamický rozptyl světla
ESL	elektroforetický rozptyl světla
ZP	zeta potenciál
STEM	rastrovací transmisní elektronová mikroskopie
APS	aerodynamická velikost částic
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TGA	termogravimetrická analýza
IČ	infračervená spektroskopie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyseliny
SUV	malé unilamelární vezikuly
LUV	velké unilamelární vezikuly
MLV	velké multilamelární vezikuly
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů v roztoku
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
ATR	totální ztlumený obraz
obr.	obrázek
nm	nanometr
tab.	tabulka
mV	milivolt
h	hodina
ml	mililitr
mg/ml	miligram na mililitr
kJ	kilojoule
mol. %	molární procenta
s	sekunda
PDI	polydisperzní index
CMC	kritická micelární koncentrace
s	sekunda
ns	nanosekunda
tzv.	takzvaně
CMC	kritická micelární koncentrace
např.	například
SOD	superoxidmutáza
DMPC	dimyristoylfosfatidylcholin

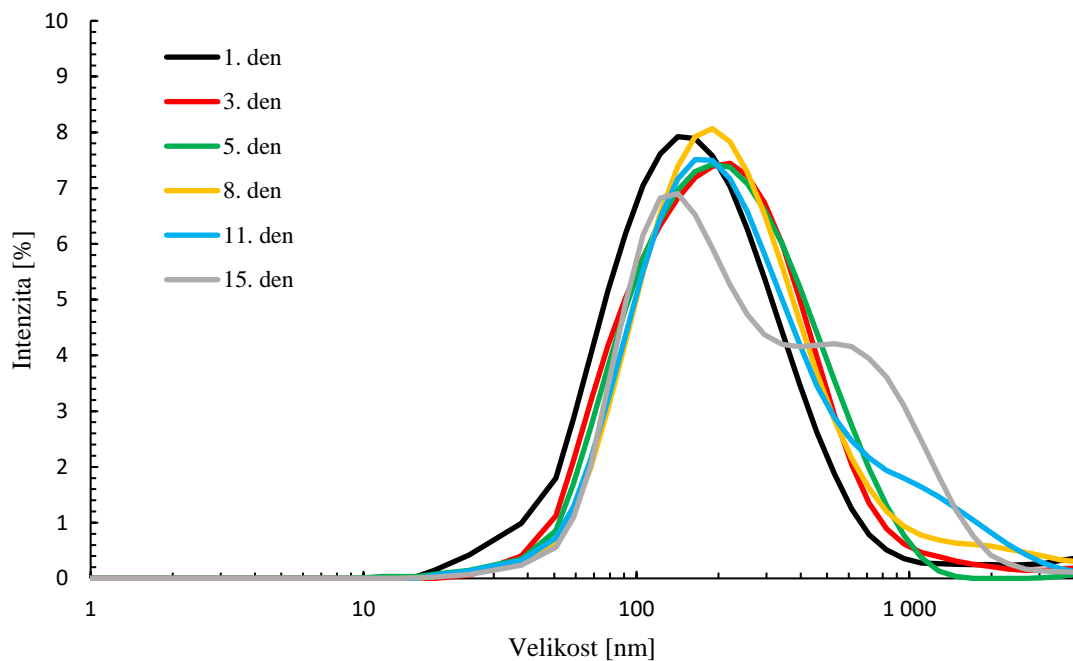
DSPC	distearoylfosfatidylcholin
DPPG	dipalmitoylfosfatidylglycerol
DS	Dapson
PLP	fosforečnan disodný prednisolop
HP β CD	hydroxypropyl-p-cyklodextrin
HPLC	vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií
Cryo-TEM	kryotransmisní elektronová mikroskopie
DSPE-PEG	1,2-distearoyl- sn-glycero-3-fosfoethanolamin-N-[methoxy(polyethylenglykol)-5000]
PTX	paclitaxel
μm	mikrometr
apod.	a podobně
SOP	standardní operační systém
TG	termogravimetrie
TDA	diferenční termická analýza
PC	počítač
MMAD	hmotnostní aerodynamický průměr
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
kV	kilovolt
PBS	fosfátový pufr
cm	centimetr

8.2 Seznam symbolů

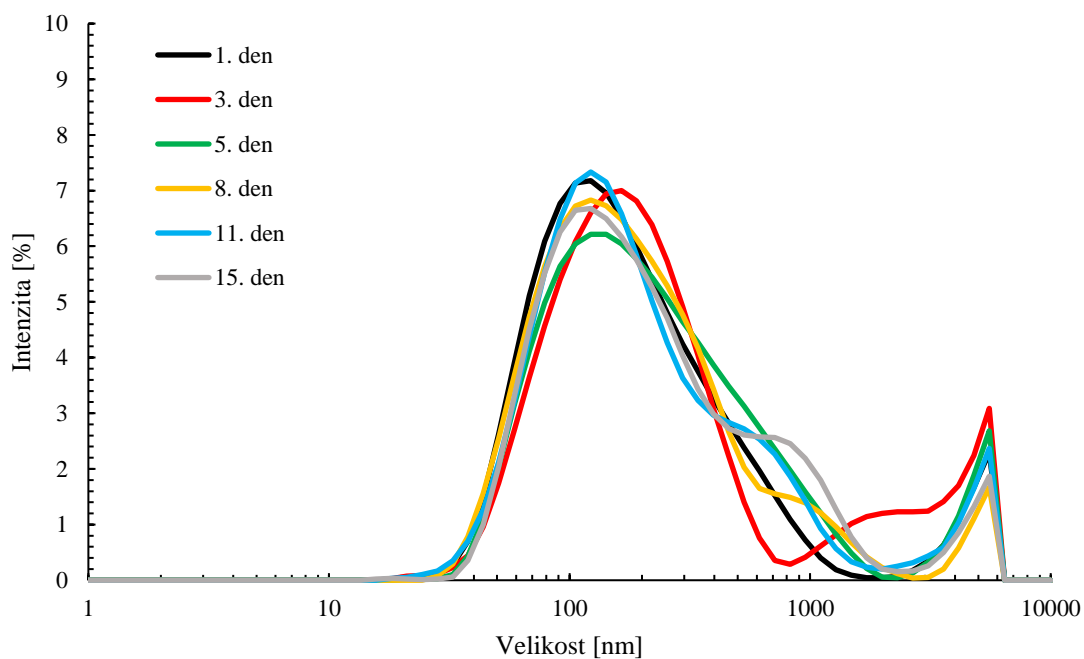
Symbol	Název veličiny
η	viskozita rozpouštědla
r_h	hydrodynamický poloměr
T	teplota
D	translační difuzní konstanta
k_B	Boltzmanova konstanta
π	matematická konstanta
$^{\circ}\text{C}$	stupeň Celsia
$^{\circ}$	stupeň
%	procento
P_c	kritický sbalovací parametr
v, l_c	objem
a_l	maximální prodloužená délka hydrofobního chvostu

9 PŘÍLOHY

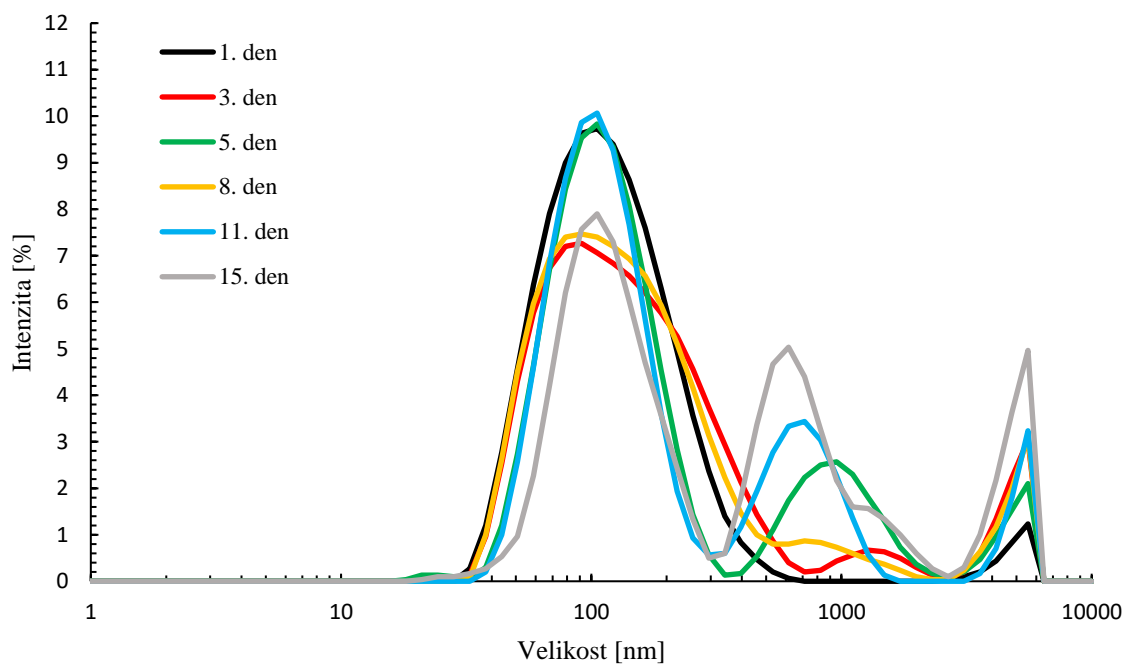
9.1 Distribuce velikosti částic



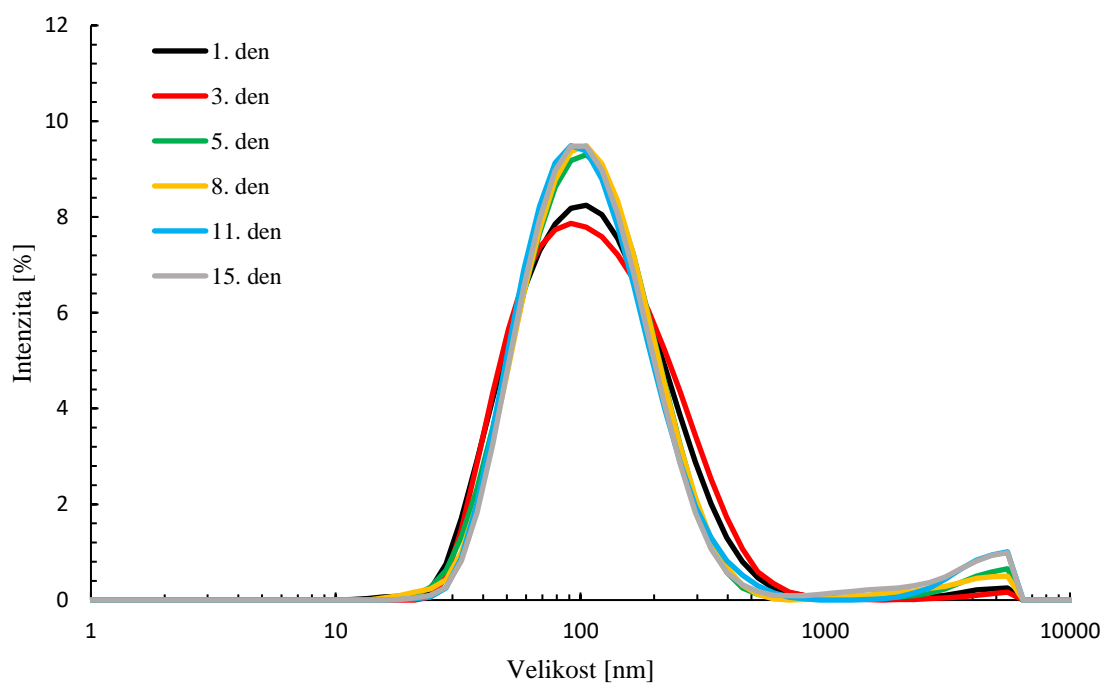
Obr. 52: Závislost intenzity na velikosti pro vzorek DPPC před sušením během 15 dnů



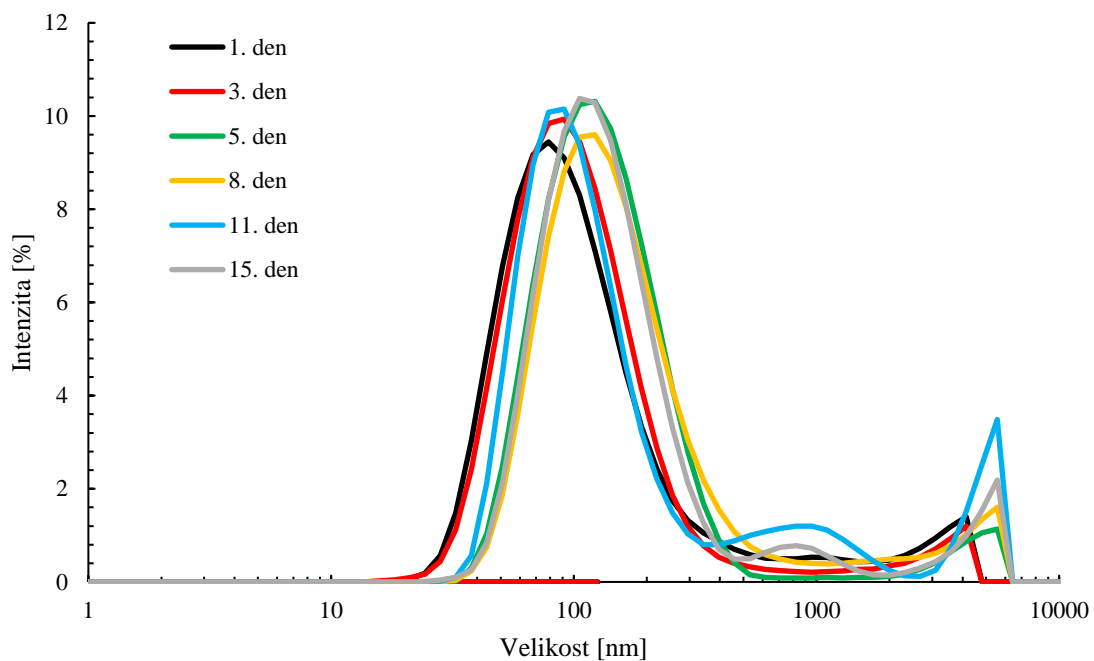
Obr. 53: Závislost intenzity na velikosti pro vzorek DPPC po rehydrataci vodou během 15 dnů



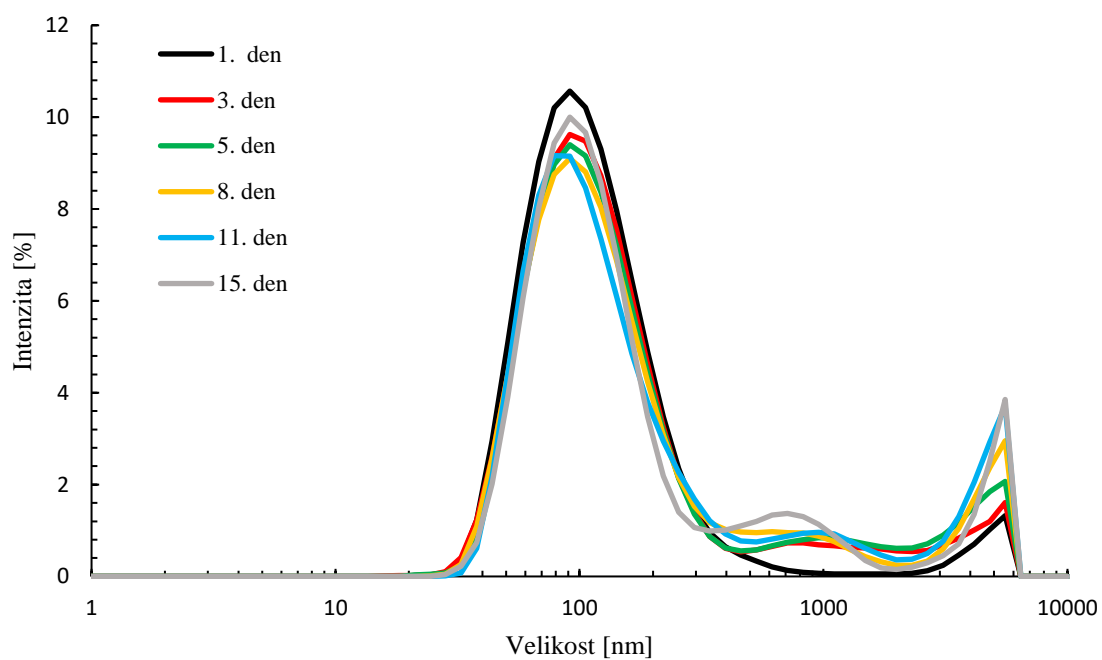
Obr. 54: Závislost intenzity na velikosti pro vzorek DPPC po rehydrataci puforem během 15 dnů



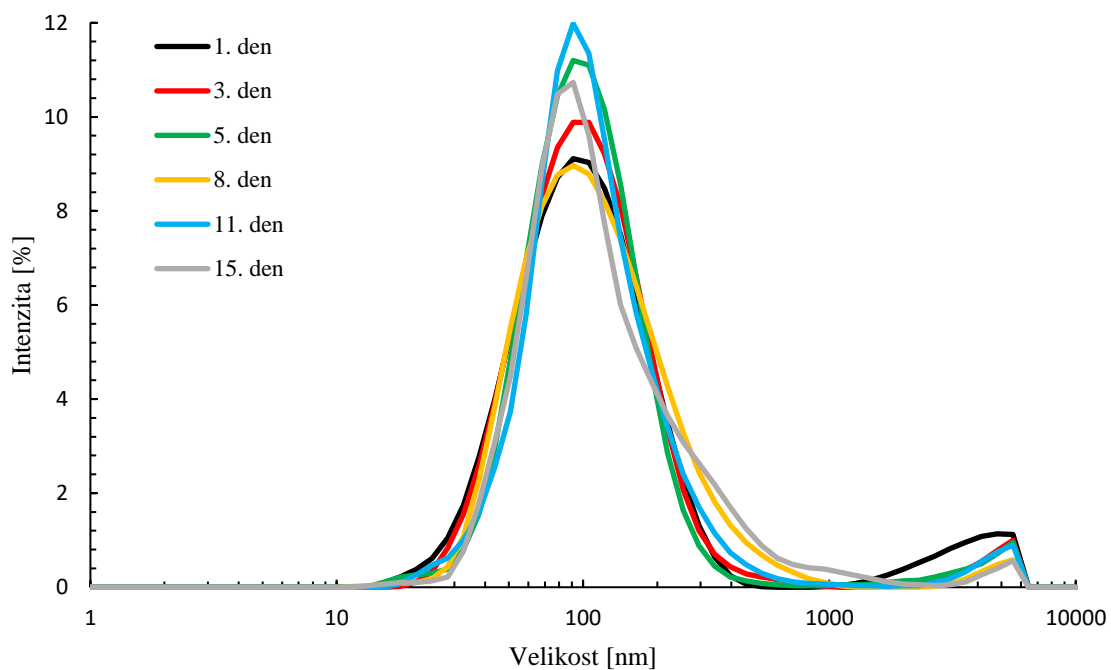
Obr. 55: Závislost intenzity na velikosti pro vzorek DPPC + CHOL před sušením během 15 dnů



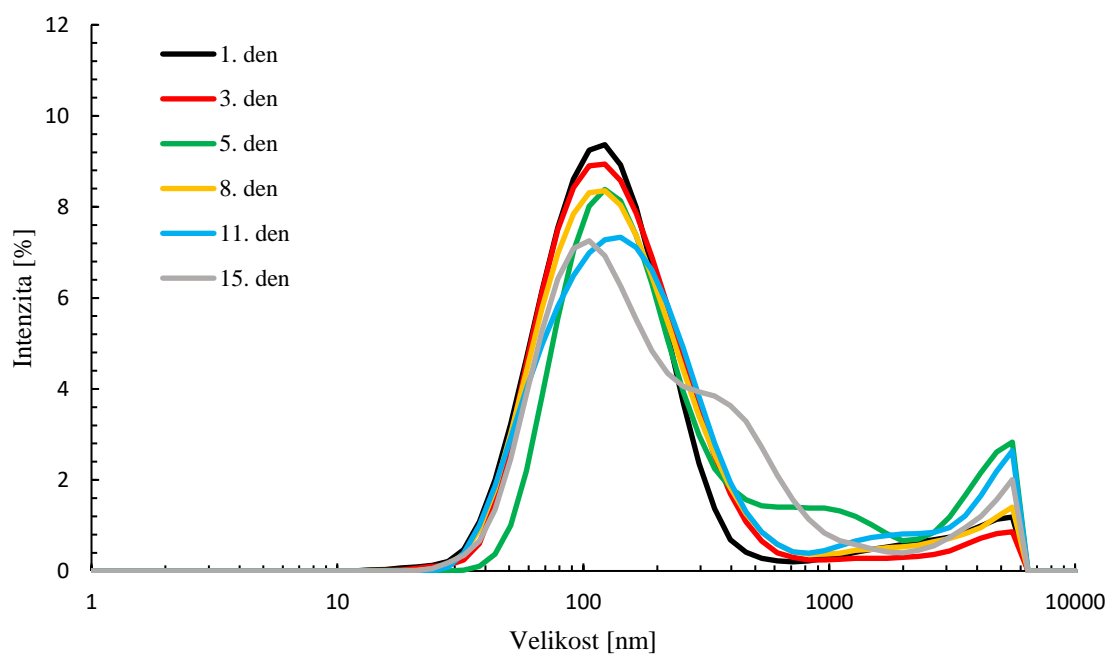
Obr. 56: Závislost intenzity na velikosti pro vzorek DPPC + CHOL. po rehydrataci vodou během 15 dnů



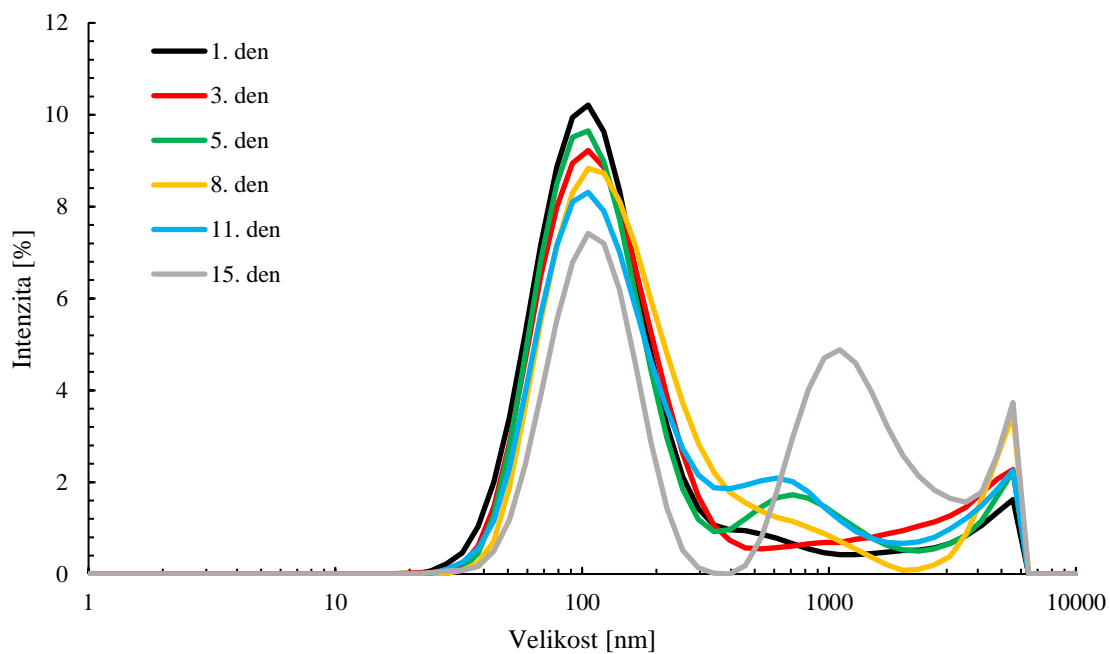
Obr. 57: Závislost intenzity na velikosti pro vzorek DPPC + CHOL. po rehydrataci pufrem během 15 dnů



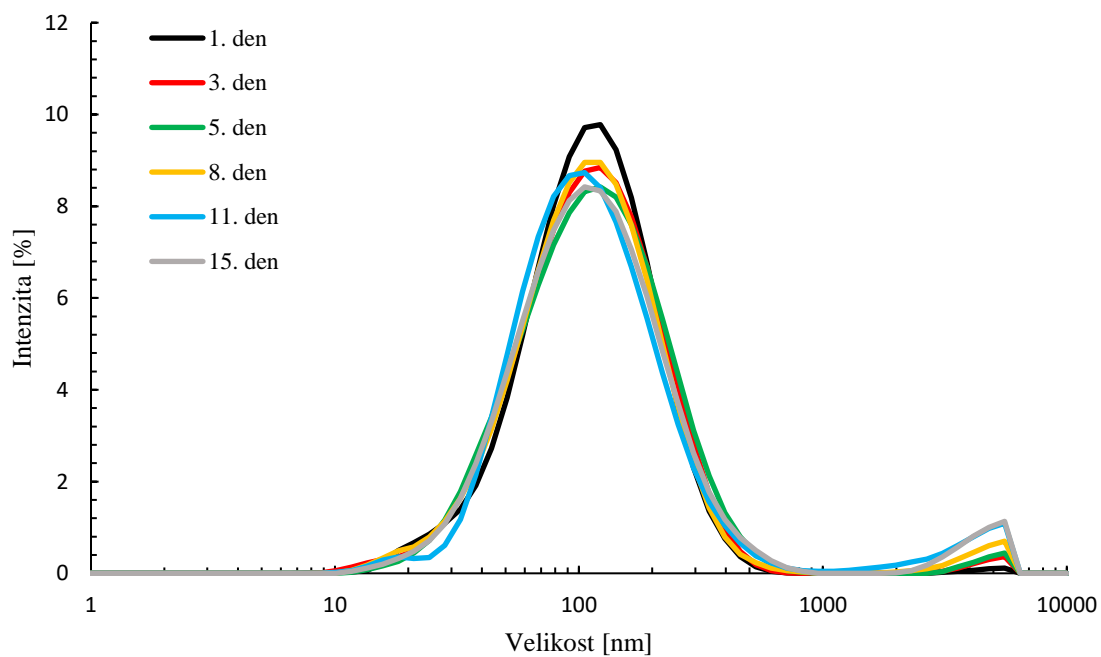
Obr. 58: Závislost intenzity na velikosti pro vzorek DPPC + PA před sušením během 15 dnů



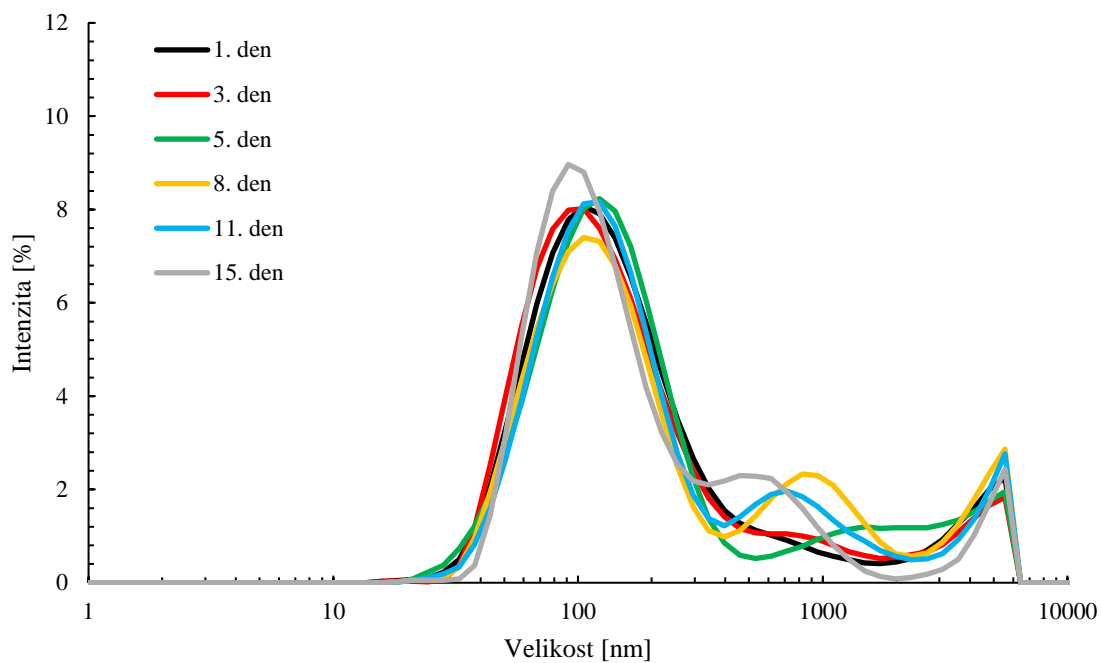
Obr. 59: Závislost intenzity na velikosti pro vzorek DPPC + PA po rehydrataci vodou během 15 dnů



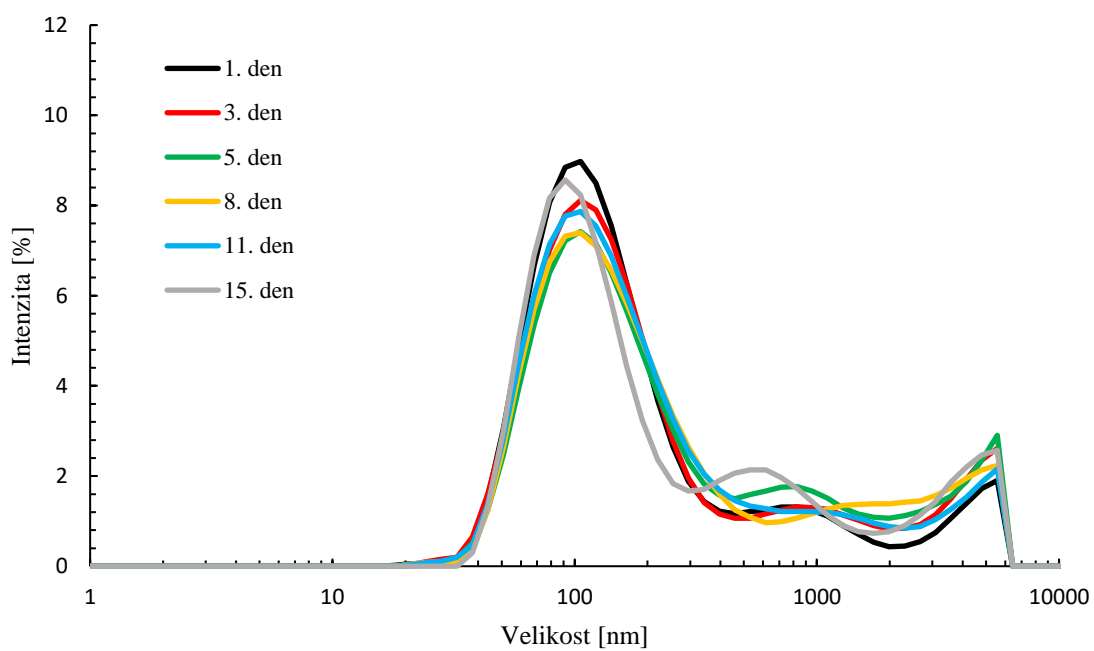
Obr. 60: Závislost intenzity na velikosti pro vzorek DPPC + PA po rehydrataci pufrém během 15 dnů



Obr. 61: Závislost intenzity na velikosti pro vzorek DPPC + PEG před sušením během 15 dnů

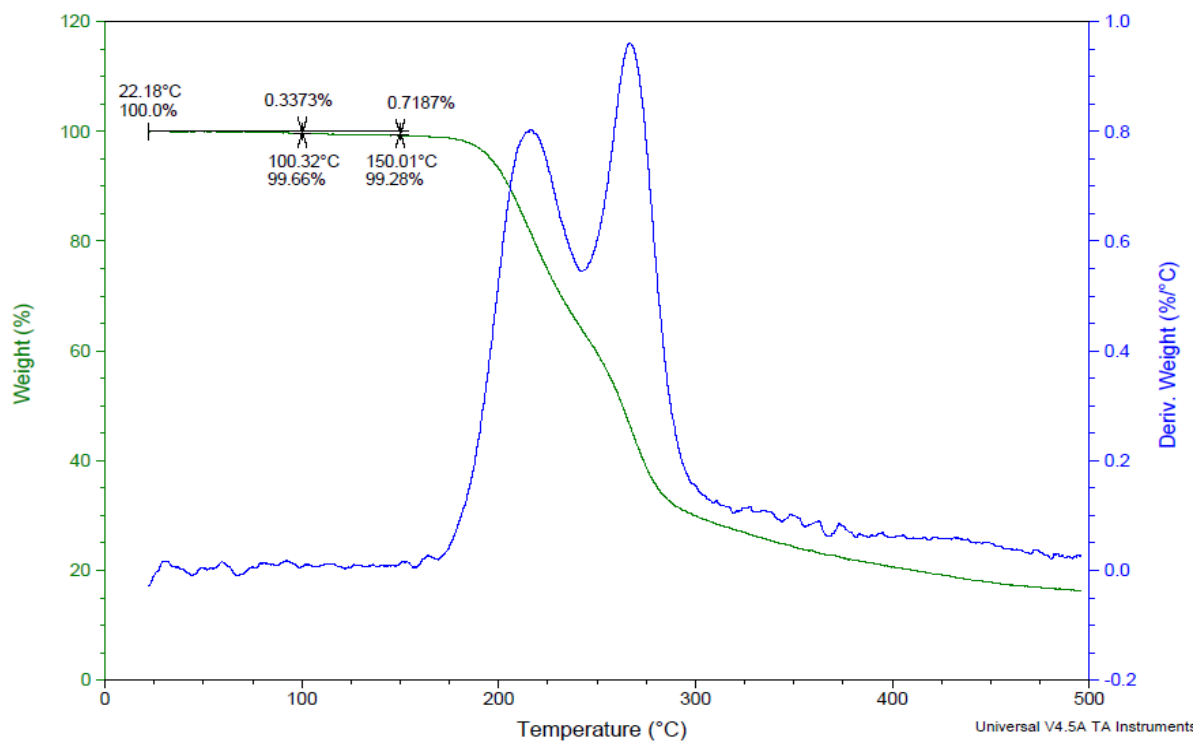


Obr. 62: Závislost intenzity na velikosti pro vzorek DPPC + PEG po rehydrataci vodou během 15 dnů

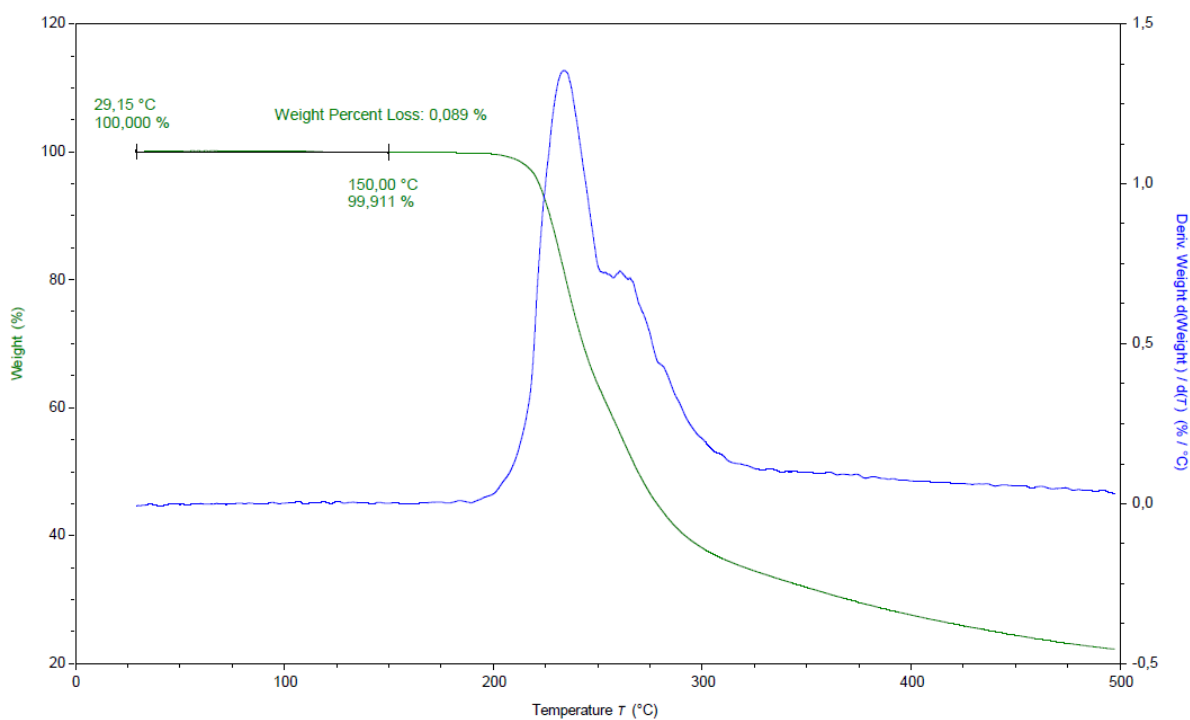


Obr. 63: Závislost intenzity na velikosti pro vzorek DPPC + PEG o rehydrataci pufrem během 15 dnů

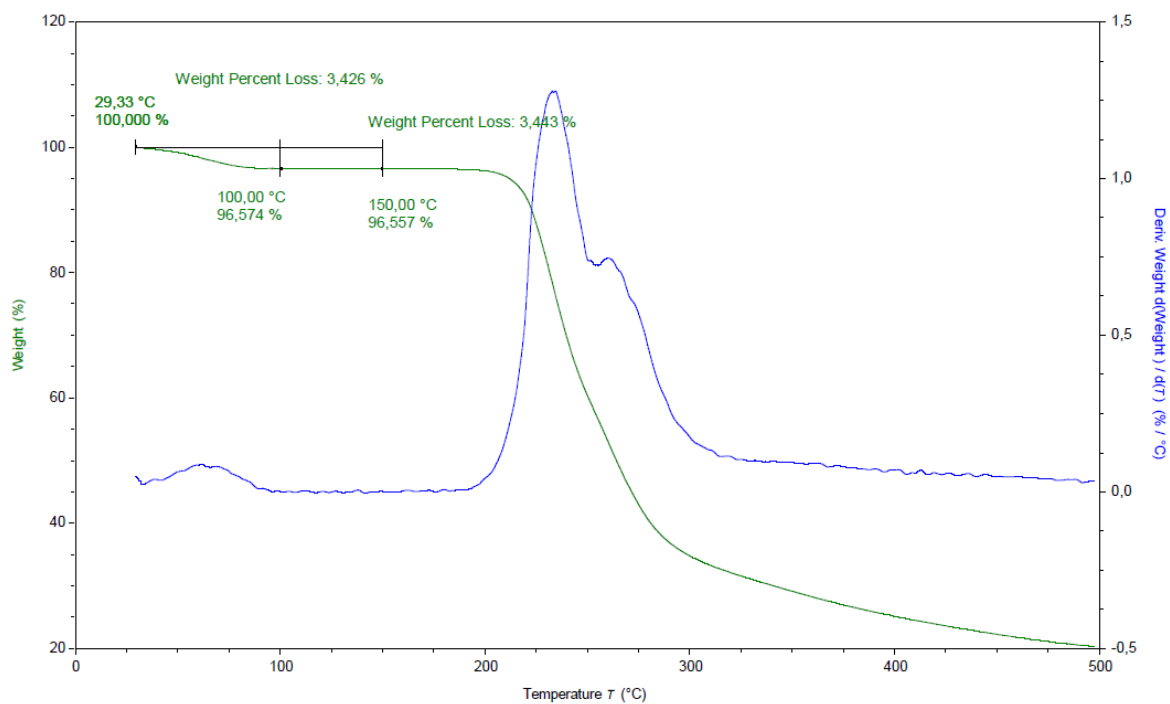
9.2 Výstupy z termodynamické analýzy



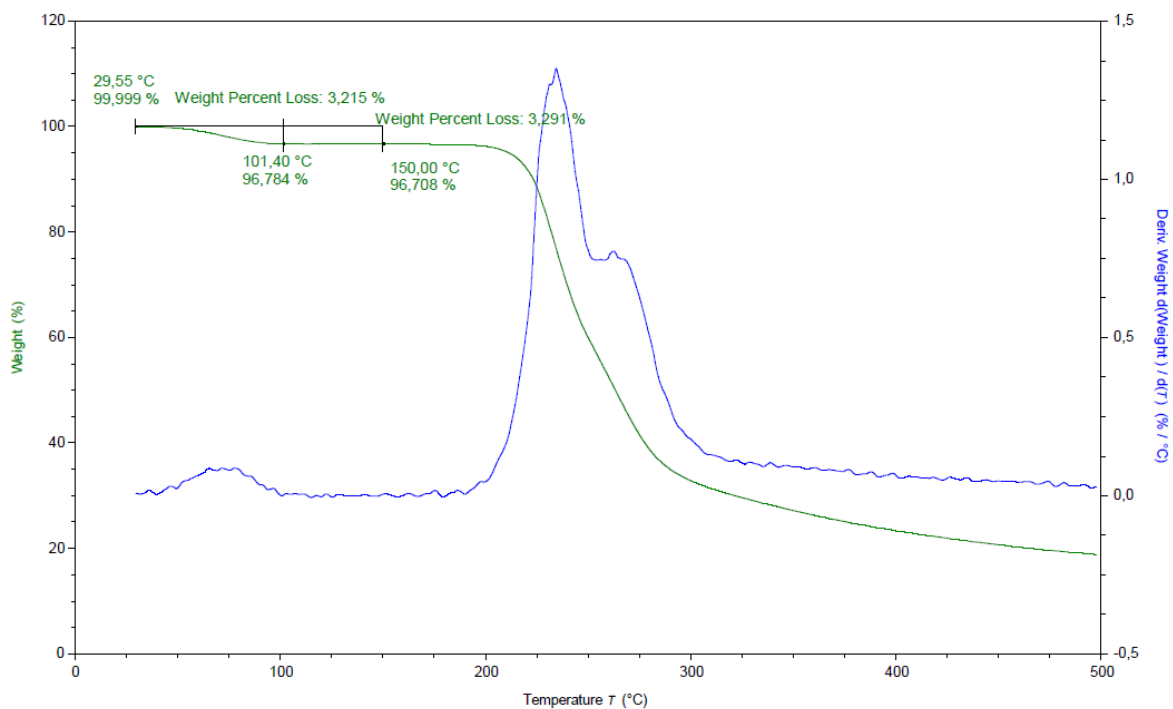
Obr. 64: Výstup z termogravimetrické analýzy (vzorek DPPC č. 1)



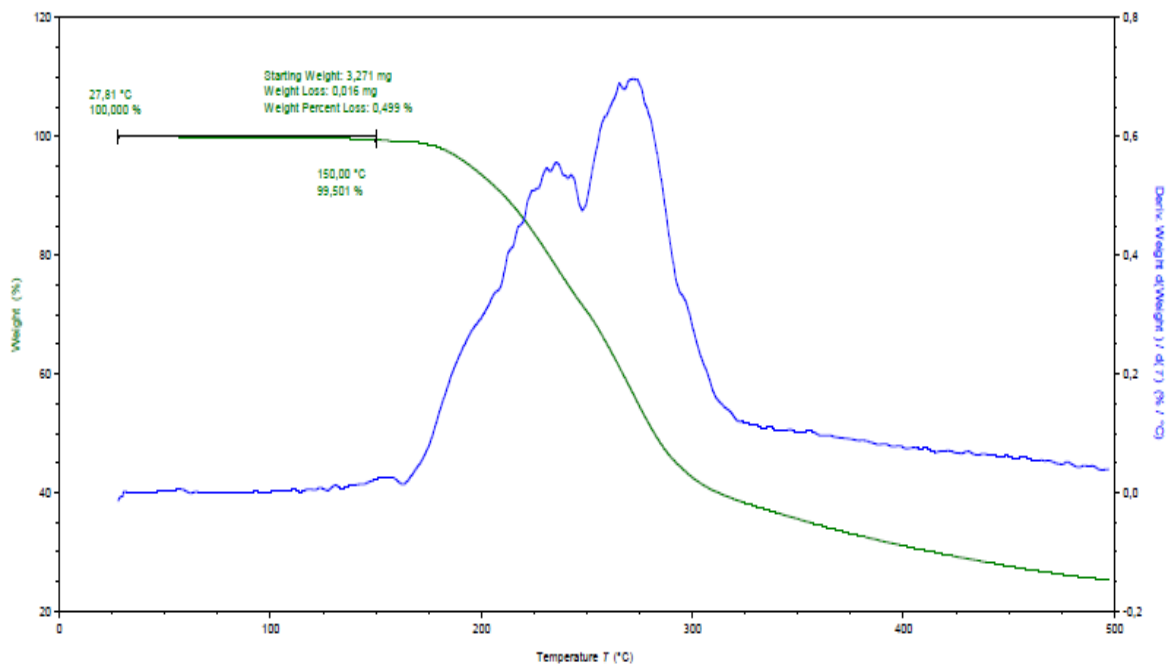
Obr. 65: Výstup z termogravimetrické analýzy (vzorek DPPC č. 2)



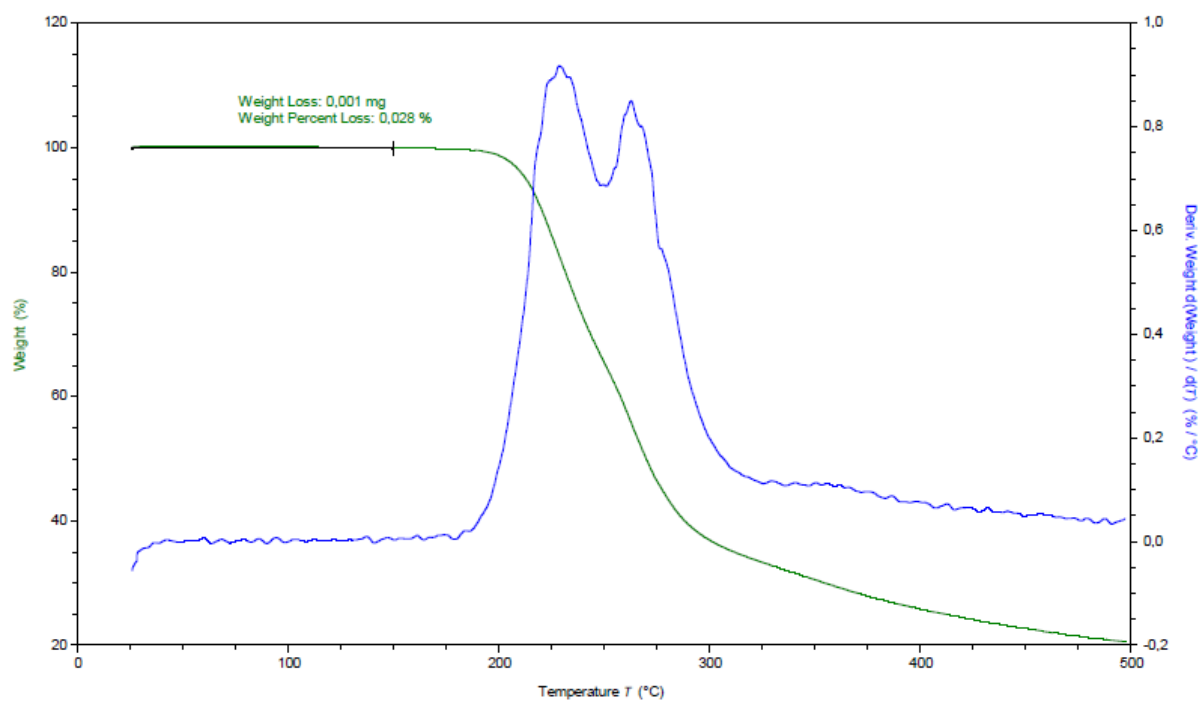
Obr. 66: Výstup z termogravimetrické analýzy (vzorek DPPC + CHOL č. 1)



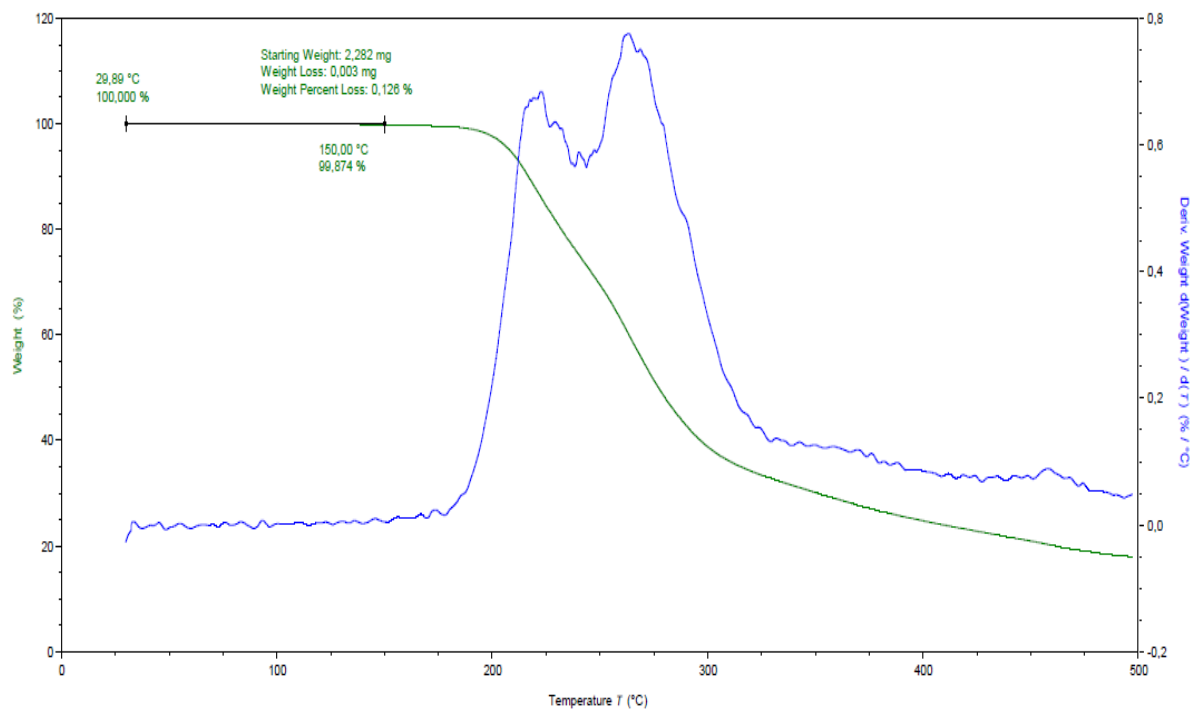
Obr. 67: Výstup z termogravimetrické analýzy (vzorek DPPC + CHOL č. 2)



Obr. 68: Výstup z termogravimetrické analýzy (vzorek DPPC + PA č. 2)



Obr. 69: Výstup z termogravimetrické analýzy (vzorek DPPC + PEG č. 1)



Obr. 70: Výstup z termogravimetrické analýzy (vzorek DPPC + PEG č. 2)