



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# INKORPORACE MALÝCH ORGANICKÝCH HYDROFILNÍCH LÁTEK DO VEZIKULÁRNÍCH SYSTÉMŮ

INCORPORATION OF SMALL ORGANIC HYDROPHILIC SUBSTANCES INTO VESICULAR SYSTEMS

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Vendula Janoušková

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2021

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1641/2020 Akademický rok: 2020/21  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Vendula Janoušková**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Inkorporace malých organických hydrofilních látek do vezikulárních systémů

### Zadání bakalářské práce:

- 1) Rešerše na způsoby inkorporace hydrofilních látek do malých unilamelárních vesikulárních systémů a způsobů ověření.
- 2) Na základě rešerše zvolit vhodné látky a prověřit možnosti jejich inkorporace do modelových liposomálních systémů.
- 3) Zhodnotit získané výsledky z hlediska náročnosti přípravy případně vytvořit standardní operační postup.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

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

-----  
Vendula Janoušková  
student(ka)

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

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce se zabývá studiem enkapsulační účinnosti hydrofilní látky a jejím uvolňováním z vodného středu v závislosti na odlišném složení komponent jednotlivých lipozomálních systémů. Jako modelové léčivo byla vybrána hydrofilní fluorescenční sonda zvaná pyranin. Cílem bylo připravit lipozomy, které by byly z hlediska jejich vlastností vhodné pro inhalační podávání a které by zajistily pasivní cílení s prodlouženou dobou uvolňování bez vyvolání vedlejších účinků na organismus. Podařilo se nám vytvořit standardní operační postup pro inkorporaci hydrofilních látek. Byly připraveny lipozomální systémy skládající se z přísad různých komponent, jako je cholesterol, kyselina fosfatidová, polyethylenglykol navázaný na fosfatidylethanolamin a trimethylchitosan. Dále se nám podařilo charakterizovat jednotlivé lipozomální systémy z hlediska velikosti, stability a enkapsulační účinnosti, což jsou důležité fyzikálně-chemické vlastnosti pro další aplikační potenciál.

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis deals with the study of the encapsulation efficiency of hydrophilic drugs and their releasing from the aqueous core depending on the different composition of the components of individual liposomal systems. The hydrophilic fluorescent probe called pyranine was chosen as a model drug. The aim was to prepare liposomes which would be suitable for inhalation administration in terms of their properties. These liposomes would provide passive targeting with prolonged release time without causing negative side effects on the organism. We have succeeded in developing a standard operating procedure for the incorporation of hydrophilic drugs. Liposomal systems have been prepared consisting of the addition of various components as cholesterol, phosphatidic acid, pegylated phosphatidylethanolamine and trimethylchitosan. Furthermore, we were able to characterize the individual liposomal systems in terms of size, stability and encapsulation efficiency which are important physicochemical properties for further application potential.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

1,2-dipalmitoylfosfatidylcholin, enkapsulační účinnost, pyranin, uvolňování z lipozomů, zeta potenciál, velikost, cholesterol, kyselina fosfatidová, polyethylenglykol, trimethylchitosan

## **KEY WORDS**

1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine, encapsulation efficiency, pyranine, releasing from liposomes, zeta potential, size, cholesterol, phosphatidic acid, polyethylenglycol, trimethylchitosan

JANOŠKOVÁ, Vendula. *Inkorporace malých organických hydrofilních látek do vezikulárních systémů* [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-07-17]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131421>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

## PROHLÁŠENÍ

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

.....  
podpis studenta

### *Poděkování:*

*Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce doc. Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. za jeho trpělivost a drahocenné rady. Dále bych chtěla poděkovat konzultantce Ing. Janě Szabové za její čas, radu, ochotu, pomoc a přátelství. V neposlední řadě patří mé poděkování mým přátelům za jejich optimismus a důvěru. Nejvíce bych však chtěla poděkovat svojí rodině za jejich lásku, pochopení a podporu při celém mém studiu.*

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>8</b>
2.1	Lipozomy .....	8
2.1.1	Složení lipozomů .....	8
2.1.2	Fyzikálně-chemické vlastnosti lipozomů .....	12
2.1.3	Rozdělení lipozomů .....	14
2.1.4	Metody přípravy lipozomů .....	15
2.1.5	Sekundární úpravy lipozomů .....	17
2.2	Enkapsulace léčiv .....	17
2.2.1	Hydrofilní léčiva .....	19
2.2.2	Způsob transportu a uvolnění léčiva .....	20
2.3	Fluorescence .....	21
2.3.1	Fluorescenční sondy .....	22
2.4	Rozptyl světla .....	23
2.4.1	Dynamický rozptyl světla .....	23
2.4.2	Elektroforetický rozptyl světla .....	24
<b>3</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>31</b>
4.1	Chemikálie .....	31
4.2	Příprava koncentrační řady HPTS ve vodě .....	32
4.3	Příprava lipozomů .....	32
4.4	Centrifugace .....	33
4.5	Dialýza .....	33
4.6	Měření a zpracování výsledků .....	33
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>35</b>
5.1	Kalibrační řada HPTS ve vodě .....	35
5.2	Fyzikálně-chemická charakterizace lipozomů .....	35
5.2.1	Lipozomy z DPPC .....	35
5.2.2	Lipozomy z DPPC s přídavkem 30 mol. % cholesterolu .....	36
5.2.3	Lipozomy z DPPC s přídavkem 30 mol. % PA .....	37
5.2.4	Lipozomy z DPPC s přídavkem 30 mol. % cholesterolu a 30 mol. % PA .....	38
5.2.5	Lipozomy z DPPC s přídavkem 6 mol. % PEG <sub>5000</sub> -PE .....	39
5.2.6	Lipozomy z DPPC s přídavkem 30 mol. % cholesterolu a 6 mol. % PEG <sub>5000</sub> -PEG .....	40

5.2.7	Lipozomy z DPPC s přídavkem 30 mol. % cholesterolu, 30 mol. % PA a 6 mol. % PEG <sub>5000</sub> -PE .....	41
5.2.8	Lipozomy z DPPC s přídavkem 30 mol. % cholesterolu, 30 mol. % PA, 6 mol. % PEG a 0,1 % TMC .....	42
5.3	Enkapsulační účinnost lipozomů .....	43
5.4	Uvolňování HPTS z lipozomů .....	45
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>48</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....</b>	<b>56</b>
8.1	Seznam zkratk.....	56
8.2	Seznam symbolů.....	56
<b>9</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>57</b>

# 1 ÚVOD

V současné době se v medicíně stále více upřednostňuje použití lipozomální formy léčiv z důvodu ochrany lidského organismu před toxicitou léčiva (snížení míry vedlejších účinků), prodloužené doby cirkulace v krvi a cíleného nebo řízeného uvolňování léčiva. Do popředí se dostává i inhalační podávání léčiv, jehož hlavním pozitivem je vyhnutí se first-pass efektu po průchodu játry, ve kterých dochází ke snížení účinku léčiva jeho částečnou metabolizací před vstupem do krve. Velkou výhodou je to, že mají plíce velkou absorpční plochu, tenkou membránu a zvýšený průtok krve, díky kterému se léčivo rychle rozšíří po celém těle.

Tato bakalářská práce navazuje na diplomovou práci Ing. Jany Szabové [1], která se zabývala přípravou a charakterizací stealth lipozomů a jejich kombinací s trimethylchitosanem pro inhalační podávání. Základní komponentu lipozomálního systému bude tvořit fosfatidylcholin, přesněji DPPC, který byl zvolen díky tomu, že je nejhojněji zastoupeným fosfolipidem vyskytujícím se v surfaktantu plicních alveol. K této základní komponentě bude přidán cholesterol pro zajištění stability lipozomálního systému a také kvůli snížení možného úniku enkapsulovaného léčiva. Dále bude přidána kyselina fosfatidová, která bude sloužit jako pilíř pro vazbu trimethylchitosanu. Za účelem snížení opsonizace lipozomů cirkulujících v lidském organismu a zabránění jejich následnému vychytávání pomocí makrofágů, bude kostra lipozomálního systému potažena polyethylenglykolem. V posledním kroku bude přidán trimethylchitosan, který je schopen rozvolňovat těsné spoje ve tkáních a zvyšovat účinnost plicní administrace vzniklých stealth lipozomů. Tímto by mohl být při inhalačním podání usnadněn vstup nebulizovaných lipozomů s enkapsulovaným léčivem do krve.

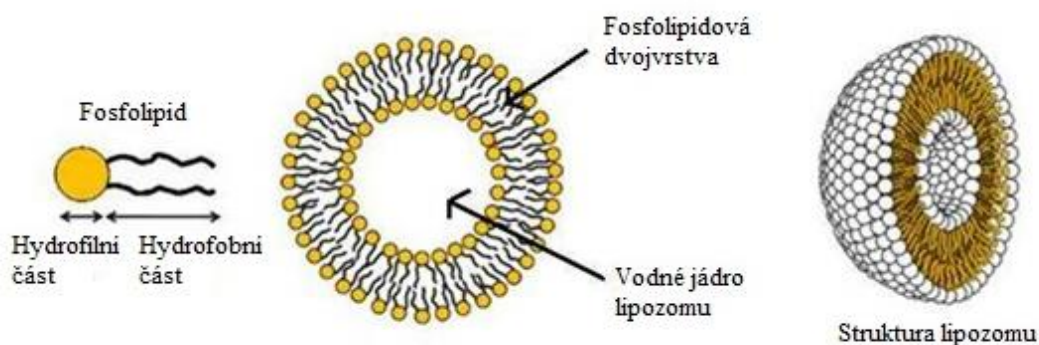
Cílem této bakalářské práce je určení enkapsulační účinnosti hydrofilní fluorescenční sondy zvané pyranin v závislosti na rozdílném složení komponent fosfolipidové dvojvrstvy a studium uvolňování enkapsulovaného pyraninu z vodného středu lipozomů.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Lipozomy

Lipozomy byly poprvé popsány v roce 1961 britským hematologem Alecem Banghamem, kterému se je podařilo objevit při testování nových elektronových mikroskopů. V následujících letech byly pojmenovány podle objevitele na bangozomy a poté na lipozomy (z řečtiny tukové částice) [2].

Lipozomy jsou **malé sférické vezikuly** skládající se z vodného jádra, které obklopuje a odděluje od vnějšího prostředí jedna nebo více fosfolipidových dvojvrstev (viz *obr. 1*). Lipozomy jsou slibnými a hojně využívanými **přenašeči bioaktivních látek** a léčiv díky schopnosti biodegradace, nízké toxicitě spojené s nízkým výskytem vedlejších účinků, prodloužené době cirkulace v krvi a cílení do místa účinku [3]. Největší výhodou je, že slouží jako **nosiče hydrofobních i hydrofilních léčiv**, přestože jsou v lipozomech umístěny odlišně a vykazují různé způsoby inkorporace i uvolňování. Hydrofobní léčiva se zabudovávají do membrány, zatímco hydrofilní léčiva jsou uzavřeny v jejich vodném jádře [4].



Obr. 1: Struktura lipozomu [5]

Hlavní nevýhodou lipozomů je jejich rychlá degradace a clearance (= množství plazmy, která se očistí od této látky za jednotku času), která je způsobena makrofágy. To lze do jisté míry eliminovat použitím stealth lipozomů, které je možno připravit potažením materiálu, jako je polyethylenglykol, který zabraňuje opsonizaci (označení cizorodé částice protilátkami tzv. opsoniny) lipozomů a jejich vychytávání makrofágy [6].

#### 2.1.1 Složení lipozomů

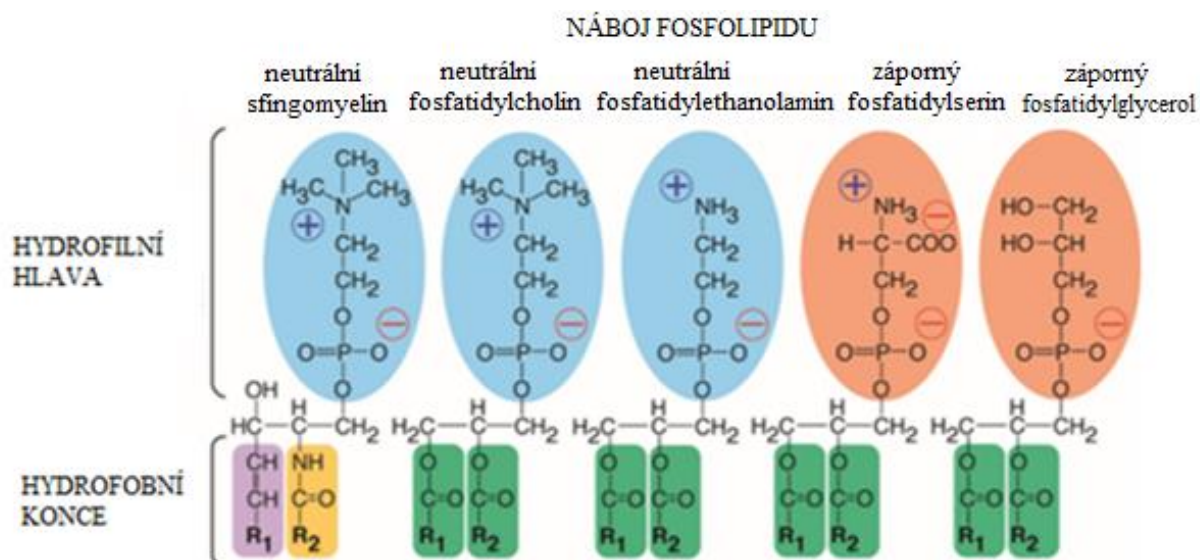
##### 2.1.1.1 Fosfolipidy

Fosfolipidy jsou základní stavební složkou biomembrán nacházejících se v živých organismech. Představují sloučeniny obsahující esterově vázanou kyselinu fosforečnou. Z pohledu kyseliny fosforečné se jedná o její **diestery**, kde jednu z esterových částí tvoří glycerol. Na druhou esterovou část kyseliny fosforečné mohou být navázány různé funkční skupiny. Fosfolipidy mají dva konce, polární hydrofilní a nepolární hydrofobní. Hydrofobní část tvoří řetězce mastných kyselin, zatímco polární část fosfátová skupina [2]. Díky tomuto



**amfifilnímu charakteru** mají tendenci ve vodném prostředí samovolně agregovat do různých tvarů (dvojlipidové membrány, lipozomů či micel) [7].

Podle složení a typu polární hlavy fosfolipidu můžeme fosfolipidy dělit podle náboje na neutrálně, negativně a pozitivně nabitě, jak uvádí *obr. 2*.



*Obr. 2: Příklady nabitých fosfolipidů [8]*

Přestože savčí buněčná membrána obsahuje 500-1000 různých druhů fosfolipidů pro syntézu lipozomů sloužících k terapeutickým účelům, je vhodné současně použít nanejvýš dva fosfolipidy, čímž se zjednoduší jejich příprava i následná charakterizace. Klíčovým hlediskem pro výběr těchto fosfolipidů se stávají jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, o kterých pojednává kapitola 2.1.2 [8].

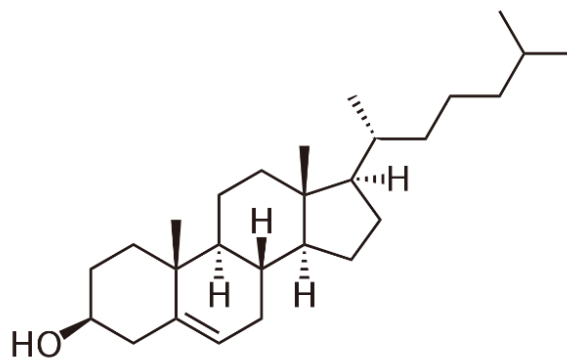
**Fosfatidylcholin** a **sfingomyelin** patří mezi nejčastěji se vyskytující fosfolipidy. Základní kostru fosfatidylcholinu tvoří glycerol, k němuž jsou esterově vázány dvě molekuly mastných kyselin a jedna molekula kyseliny fosforečné. Kostru sfingomyelinu tvoří naopak sfingosin (*D*-erythro-2-amino-trans-4-octadecen-4,3-diol), ke kterému je vznikem peptické vazby vázána mastná kyselina a jedna molekula kyseliny fosforečné [8]. Přirozeně vyskytující se fosfatidylcholin většinou obsahuje dva uhlovodíkové řetězce podobné délky, z nichž jeden je nasycený a druhý nenasycený. Nenasycená mastná kyselina má zabudovanou jednu až šest dvojných vazeb v konfiguraci *cis*. Sfingomyelin vyskytující se v membránách je mnohem více nasycený. Obsahuje velmi dlouhý acylový řetězec (20-24 uhlíků), což vede k nesouladu mezi řetězcem a k zakřivení membrány [9].

**Fosfatidylserin** a **fosfatidylethanolamin** patří mezi aminofosfolipidy nacházející se převážně na vnitřní straně fosfolipidové membrány, což způsobuje její asymetrii. Ta je způsobena tím, že tyto aminofosfolipidy mají tvar kužele. Hydrofilní skupina zabírá méně místa, než je tomu v případě acylových řetězců, tudíž mají tendenci tvořit spíše obrácené útvary. Aminofosfolipidy se účastní důležitých procesů jako srážení krve, adheze buněk a endocytóza [9]. Mezi fosfolipidy dále patří například **fosfatidylglycerol**

či **fosfatidylinositol** [8]. Mezi aminofosfolipidy patří také fosfatidylcholin, který je převážně syntetizován z diacylglycerolu v endoplazmatickém retikulu. Značné množství fosfatidylcholinu (70 %) je syntetizováno pomocí CDP-cholinové dráhy probíhající v jaterních buňkách. Fosfatidylcholin může být v buňkách degradován několika druhy fosfolipáz zvaných A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C a D, které se vyskytují v různých buněčných kompartmentech, některé z nich jsou dokonce součástí signalizačních drah. Fosfatidylcholin slouží jako zdroj diacylglycerolu, fosfatidové kyseliny, lysofosfatidové kyseliny a faktorů aktivujících krevní destičky a kyselinu arachidonovou [9]. Do této skupiny patří **dipalmitoylfosfatidylcholin**, který je hlavní složkou plicních povrchově aktivních látek, které snižují povrchové napětí na rozhraní vzduch-kapalina a zabráňují alveolárnímu kolapsu během dýchání. Mezi další významné zástupce patří distearoylfosfatidylcholin a dimyristoylfosfatidylcholin [10].

### 2.1.1.2 Cholesterol

Cholesterol se skládá z tetracyklického planárního skeletu, který má ve své struktuře zabudovanou hydroxylovou skupinu, jednu dvojnou vazbu, dvě methylové skupiny a nakonec iso-octylový řetězec (viz obr. 3). Důležitou vlastností 3D struktury cholesterolu je, že všechny postranní řetězce jsou orientovány na stejnou stranu kolmo k rovině planárního skeletu. Hydroxylová skupina je zásadní pro to, aby jinak hydrofobní sloučenina měla **amfifilní charakter**. Orientuje molekulu v membránách a zprostředkovává vznik vodíkových můstků ve vodném prostředí, případně s lipidovými složkami jiných buněčných membrán [9].



Obr. 3: Strukturální vzorec cholesterolu [11]

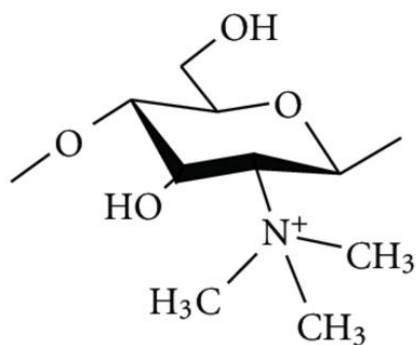
Cholesterol je hlavní složkou přidávanou při tvorbě lipozomů ke **stabilizaci** jejich dvojrvtvy (v závislosti na fluiditě se obsah cholesterolu pohybuje kolem 30–45 % z celkového počtu komponent), jelikož poskytuje membráně tekutost, pružnost a propustnost. Vyplňuje prostory mezi nedokonale sbalenými fosfolipidy, brání pohybu fosfolipidů v membráně (laterální pohyb) i pohybu flip-flop (překlápění molekul z jedné vrstvy do druhé) a zajišťuje tuhost, jelikož brání fázovému přechodu lipidových dvojrvtv a tím snižuje únik inkorporovaných léčiv [12].

### 2.1.1.3 Polyethylenglykol

Polyethylenglykol (PEG) je bio-inertní, **netoxický**, termoplastický a lineární hydrofilní polymer nejčastěji konjugovaný přes terciální aminovou skupinu polyethylenaminu tvořícího lipozom nebo s molekulami cholesterolu přímo ve fosfolipidové dvojvrstvě [8]. Lipozomy nesoucí na svém povrchu náboj jsou rozpoznávány imunitním systémem jako cizorodé látky díky jejich specifické vazbě s cirkulujícími sérovými proteiny. To má za následek jejich rychlou clearance vlivem mononukleárního fagocytického systému složeného z dendritických buněk, monocytů a makrofágů, které jsou součástí vrozené imunity hrající klíčovou roli při fagocytóze patogenů a cizorodých látek. Proces potažení lipozomů polyethylenglykolem se nazývá **PEGylace** mající za následek vznik tzv. **stealth lipozomů**. Tímto způsobem polyethylenglykol zvyšuje hydrataci na povrchu lipozomu a díky tomu slouží jako ochranná bariéra před interakcí s opsoniny, vyčytáváním lipozomů makrofágy a následnou clearance a eliminací. Z tohoto důvodu je polyethylenglykol v současné době hojně používán k prodloužení doby cirkulace a zvýšení stability lipozomů s inkorporovanými léčivy v krevním oběhu. Za optimální podmínky PEGylace se považuje potažení polyethylenglykolem s molekulovou hmotností 1000-2000 g/mol tvořící pouze 5-10 mol. % z celkového množství fosfolipidů, čím dochází ke vzniku vrstvy o tloušťce cca 5 nm [13].

### 2.1.1.4 Biopolymery

Biopolymery mohou pozitivním způsobem modifikovat vlastnosti lipozomů. Jedním z příkladů může být **N,N,N-trimethylchitosan**, který díky svému pozitivnímu náboji zvyšuje mukoadhezivní vlastnosti a umožňuje paracelulární transport přes těsné spoje nacházející se mezi buňkami (např. plicní alveoly). Navíc díky svému pozitivnímu náboji zabraňuje agregaci částic [14]. Neméně významným biopolymerem je sodná sůl **kyseliny hyaluronové**, která se vyskytuje v širokém spektru molekulových hmotností, díky čemuž je schopna zasahovat do škály reakcí probíhajících v organismu, a to jak v buňce, tak i mimo ni [15].



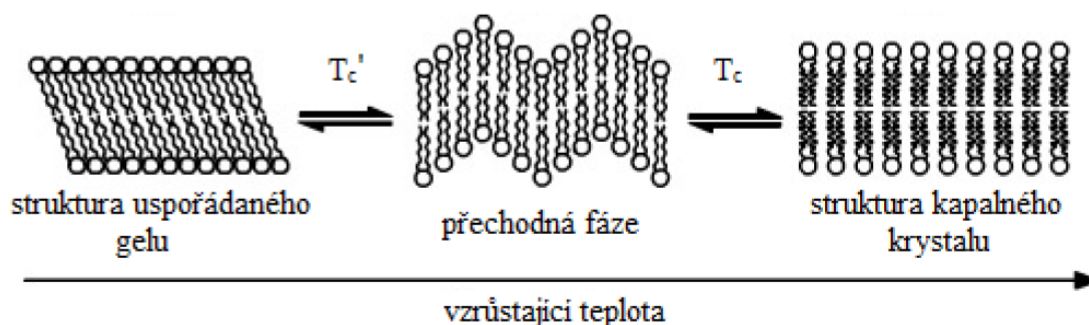
Obr. 4: Strukturální vzorec trimethylchitosanu [16]

Chitosan je **netoxický**, biokompatibilní a biodegradabilní polysacharid vznikající nejčastěji alkalickou N-deacetylací chitinu (viz obr. 4). Jeho značnou nevýhodou je jeho nerozpustnost ve vodě při fyziologickém pH, avšak při snížení pH pod hodnotu 6 dochází k protonaci volných aminoskupin a jeho prostorovému rozvinutí, což má za následek zvýšení rozpustnosti a získání **mukoadhezivních vlastností**. Z tohoto důvodu se upřednostňuje syntéza

trimethylchitosanu, který má permanentní kladný náboj díky methylaci aminoskupiny a z toho vyplývající mukoadhezivní i absorpční vlastnosti v celé šíři pH stupnice. To usnadňuje paracelulární transport hydrofilních léčiv na základě vratného rozrušení těsných spojů v membráně. Velmi důležitou vlastností při tomto ději je přítomnost kladného náboje trimethylchitosanu, který interaguje se záporně nabitými složkami nacházejícími se v dutinách mezi jednotlivými buňkami [14].

### 2.1.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti lipozomů

Složení lipozomální membrány určuje náboj, sterické uspořádání a fluiditu membrány, která je charakteristická teplotou mezifázového přechodu. **Teplota mezifázového přechodu** ( $T_C$ ) je definována jako teplota, při které lipidy samovolně konvertují z uspořádané gelové fáze, kde jsou uhlovodíkové řetězce rozprostřeny v těsné blízkosti, do fáze neuspořádaného tekutého krystalu, kde jsou naopak uhlovodíkové řetězce pohyblivé a náhodně orientované (viz obr. 5). Při dosažení  $T_C$  jsou obě fáze v rovnováze. Každý typ molekul lipidů má svou charakteristickou  $T_C$  danou délkou uhlovodíkových řetězců, jejich nasycením, nábojem a typem hydrofilní hlavičky. S prodlužující se délkou řetězce se Van der Waalsovy interakce stávají silnějšími, což vyžaduje k narušení více energie, a proto se  $T_C$  úměrně zvyšuje. Naopak zavedení dvojných vazeb převážně v konfiguraci *cis* způsobuje vznik zlomu v řetězci, což vyžaduje nižší  $T_C$ . **Fluidita** membrány lze ovlivnit inkorporací lipofilních molekul, jako je cholesterol, který zvýší fluiditu na základě rozšíření rozmezí teplot, při kterých dochází k mezifázovému přechodu. Tím se také zvýší stabilita lipozomu. Cholesterol v uspořádané gelové fázi způsobuje horší uspořádávání fosfolipidů, díky čemuž mají nižší teplotu  $T_C$ . Naopak u neuspořádané fáze tekutého krystalu cholesterol drží fosfolipidy lépe pohromadě [17, 18, 19].



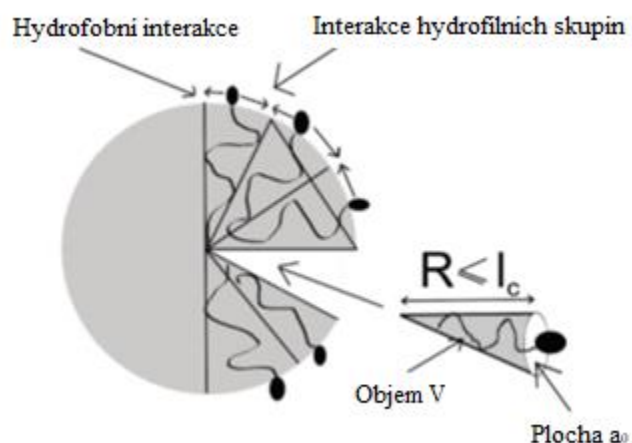
Obr. 5: Uspořádání fosfolipidové dvojvrstvy [20]

Teplota mezifázového přechodu je důležitým kritériem pro výběr fosfolipidů pro přípravu lipozomů. Použitím fosfolipidů s vyšším  $T_C$  dojde k vytvoření stabilnějších lipozomů, ale také ke snížení možnosti úniku léčiva při dosažení cílového místa působení. Pokud se v tomto případě zvýší teplota vyvolávající mezifázový přechod, je možné, že léčiva denaturují během procesu enkapsulace. Je tedy nezbytné zvážit vhodný výběr fosfolipidu, aby se předešlo předčasnému či pozdnímu úniku a denuraci složek při příliš vysokých teplotách [18].

### 2.1.2.1 Agregace amfifilních molekul

Fosfolipidy patří mezi amfifilní molekuly, které jsou složeny z polární a nepolární části a každá tato část upřednostňuje jiný druh rozpouštědla, což je důvodem, proč amfifilní molekuly, jako jsou fosfolipidy, spontánně agregují a tvoří různé mikrostruktury [21].

**Kritická micelární koncentrace (CMC)** je koncentrace, při jejímž překročení se začnou monomery amfifilů ve vodě samovolně shlukovat a tvořit micely nebo dvojvrstvy, aby minimalizovaly nevýhodné hydrofobní interakce jejich částí s vodou. Kritická micelární koncentrace závisí na délce a struktuře uhlovodíkového řetězce, kdy hodnota CMC s rostoucí délkou uhlovodíkového řetězce klesá. Rozvětvení uhlovodíkového řetězce, přítomnost dvojných vazeb a polární substituent na alkylovém řetězci vedou ke zvýšení CMC, ale připojení benzenového jádra k alkylovému řetězci vede naopak ke snížení. Dále závisí na vlastnostech hydrofilní skupiny dané zejména nábojem, vlastnostech protiiontů závislé na jejich mocenství, teplotě, tlaku a v neposlední řadě na přítomnosti dalších látek v roztoku. Jednoduché anorganické elektrolyty snižují hodnotu CMC, a to tím více, čím vyšší je koncentrace elektrolytu a čím vyšší je mocenství opačně nabitého iontu. Přítomnost neelektrolytů se projevuje různě. Nepolární látky mají na CMC malý vliv a silně polární látky mají komplexní účinky [22].



Obr. 6: Parametry amfifilní molekuly [23]

Hnací silou spontánní agregace amfipatických molekul jsou především hydrofobní interakce, kdy poměr mezi velikostí a tvarem hydrofilní a hydrofobní části určuje typ vzniklého agregátu. Tvar vzniklé struktury vyjadřuje **kritický sbalovací parametr (CPP)** popsáný vztahem:

$$CPP = \frac{V}{l \cdot a_0}, \quad (2.1)$$

kde  $V$  označuje volný objem, který v agregátu zaujímá hydrofobní řetězec molekuly,  $l$  je efektivní délka alkylového řetězce a  $a_0$  označuje efektivní plochu, kterou zaujímá hydrofilní část amfifilní molekuly – příčná plocha polární hlavy (viz obr. 6) [23].

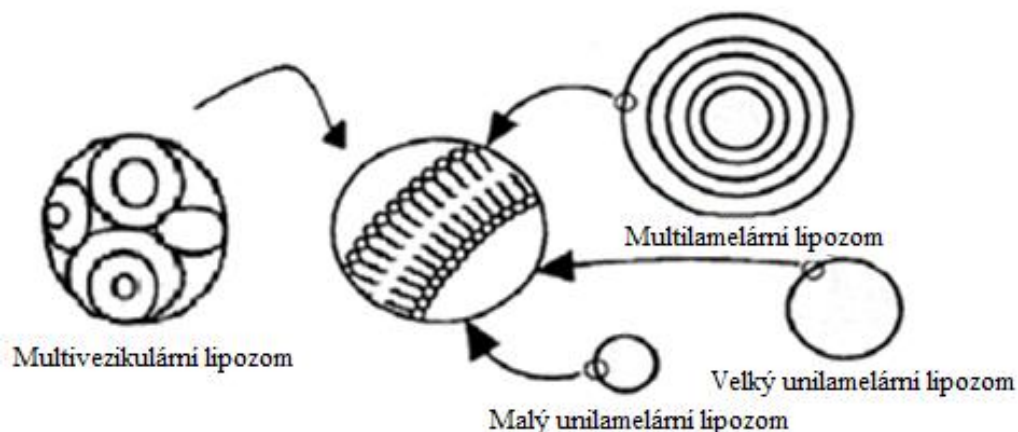


Sbalovací parametr je bezrozměrná veličina předpovídající pouze tvaru struktury. Molekula s menším CPP než jedna třetina ve tvaru kužele vede ke vzniku sférické micely. Molekula s CPP větším než jedna třetina a zároveň menším než jedna polovina ve tvaru kolomého kužele vede ke vzniku cylindrické micely. V rozmezí hodnot 0,5–1 se tvoří vezikuly, naopak při hodnotě CPP rovné jedné se již formuje planární dvojvrstva. Překročením hodnoty rovné jedné dochází ke vzniku obrácených micel [24].

### 2.1.3 Rozdělení lipozomů

Kategorizovat lipozomy lze podle mnoha hledisek. Nejčastější je však klasifikace podle velikosti, lamelarity a náboje.

Co se týče rozdělení podle velikosti, **malé unilamelární vezikuly** (SUV) jsou tvořeny jednou lipidovou dvojvrstvou o průměru přibližně 50 nm a odlišují se od ostatních vysokým povrchovým napětím způsobeným značným zakřivením membrány. Jejich velikost jim umožňuje unikat z krve do okolních tkání přes endotel kapilár, na druhé straně je inkorporace hydrofilních léčiv omezena malým objemem jejich vnitřního vodného prostoru. Vykazují značnou nestabilitu jednak pro vysoký stupeň deformace a permeability membrány pro hydrofilní molekuly, jednak pro zvýšenou náchylnost k interakci a fúzi s velkými molekulami.



Obr. 7: Přehled lipozomálních částic s různým uspořádáním lamel [26]

**Velké unilamelární vezikuly** (LUV) mají průměr větší než 50 nm a vykazují nízké membránové napětí i stabilitu. Jsou vhodné jako nosiče hydrofilních léčiv vlivem poměrně vysokého podílu obsahu vody. **Velké oligolamelární vezikuly** (OLV) vznikají obvykle jako vedlejší produkt při přípravě LUV. Jsou tvořeny několikavrstevnými membránami, u kterých je uvolňování léčiva zpomaleno díky silnější vrstvě lipidů, což umožňuje podávání vyšších dávek a prodloužení účinku. **Velké multilamelární vezikuly** (MLV) jsou tvořeny velkým počtem lipidových dvojvrstev a jejich velikost odpovídá 100-1000 nm. Velký počet dvojvrstev zapříčiňuje pomalé uvolňování hydrofilního léčiva, proto jsou vhodnější jako nosiče hydrofobních léčiv. A nakonec **multivezikulární vezikuly** (MVV), které také vznikají obvykle jako vedlejší produkt při přípravě MLV, kdy je v jedné větší vezikule enkapsulováno několik menších vezikul [25]. Rozdělení lipozomů znázorňuje obr. 7.

Dále lze lipozomy dělit podle funkce a modifikace povrchové membrány na konvenční lipozomy, stealth lipozomy, aktivní lipozomy a lipoplexy. U **konvenčních lipozomů** převažují především neutrální fosfolipidy, tudíž má membrána poměrně nízkou transportní kapacitu a vysokou propustnost, což vykazuje nestabilitu systému. Jsou základem pro výrobu většiny dalších typů povrchově modifikovaných lipozomů. Membrána **stealth lipozomů** (dlouhodobě cirkulující) obsahuje dlouhé řetězce hydrofilního polymeru (nejčastěji polyethyleglykol), která vytvoří na povrchu obal zabraňující nežádoucím imunitním reakcím, jako je opsonizace a následné vychytávání makrofágy. Membrána **aktivních lipozomů** obsahuje modifikované látky, které jsou schopny selektivního a kontrolovaného uvolňování léčiva a k jejichž aktivaci je potřeba stimulace. Dělí se na dvě skupiny. První skupinou jsou cílené lipozomy, které mají ve své struktuře zabudované antigeny, protilátky, enzymy nebo receptory pro afinitní reakci, která nastane při kontaktu s cílovou buňkou, kdy se po akumulaci postupně uvolní transportovaná aktivní látka. Do druhé skupiny patří spouštěné lipozomy, v jejichž membráně je zabudována chemická látka způsobující změny její struktury při spouštěcím mechanismu, jejímž stimulem je fyzikální (teplo, světlo), fyzikálně-chemický (bobtnání, solvatace), iontový (změna koncentrace, změna pH), enzymatický či kombinovaný podnět. **Lipoplexy** obsahují ve své struktuře nabitě fosfolipidy. Dochází ke kovalentní interakci s opačně nabitými makromolekulami (DNA, RNA a proteiny) [27].

Dalším klasifikační kategorií je náboj, který je určen charakterem polárních částí lipidových molekul a který ovlivňuje jejich stabilitu – brání agregaci a změně velikosti vlivem repulzních sil.

**Anionické lipozomy** jsou díky svému zápornému náboji rychle vychytávány cílovými buňkami z oběhu a relativně snadno v krevním oběhu svůj obsah uvolňují. Mezi fosfolipidy s negativním nábojem patří fosfatidylserin, fosfatidylinositol, fosfatidylglycerol a kyselina fosfatidová. **Kationické lipozomy** patří mezi nejpoužívanější transportní systémy v oblasti genové transfekce. V molekulách lipidů obsahují kvartérní amoniovou bázi, která je za fyziologického pH protonovaná. Zástupcem je 1,2-dioley-3-trimethylammonium-propan (DOTAP). **Neutrální lipozomy** jsou kvůli absenci náboje náchylné k agregaci a sedimentaci. Patří mezi ně fosfatidylcholin, sfingomyelin a fosfatidylethanolamin [23].

#### 2.1.4 Metody přípravy lipozomů

Lipozomy mohou být připravovány pomocí široké škály metod. Typ zvolené metody významně ovlivňuje druh, velikost, lamelarity a účinnost enkapsulace. Metody lze rozdělit do dvou hlavních odvětví, kdy jedním jsou objemové metody, kde se lipozomy získávají přenosem fosfolipidů z organické fáze do vodné, a druhou jsou filmové metody, kdy se hydratují lipidové filmy vzniklé vysoušením organického rozpouštědla [28].

Všechny metody používané pro přípravu lipozomů lze shrnout do čtyř základních kroků. Prvním krokem je vysoušení lipidů z organického rozpouštědla, následuje hydratace lipidů vodnou fází, přečištění výsledných lipozomů, a nakonec jejich úprava pro dosažení požadované velikosti, lamelarity a stability lipozomu [29].

Mezi jednu z nejeftivnějších metod přípravy lipozomů patří **metoda prolipozom – lipozom**. Prolipozomy jsou pevné volně se pohybující útvary, které jsou schopny hydratovat

se při styku s vhodnou biologickou tekutinou a vytvořit tak lipozomy. Tato metoda je jednoduchá, poskytuje extrémně vysokou enkapsulační účinnost v porovnání s jinými metodami za vzniku multilamelárních lipozomů [30, 32].

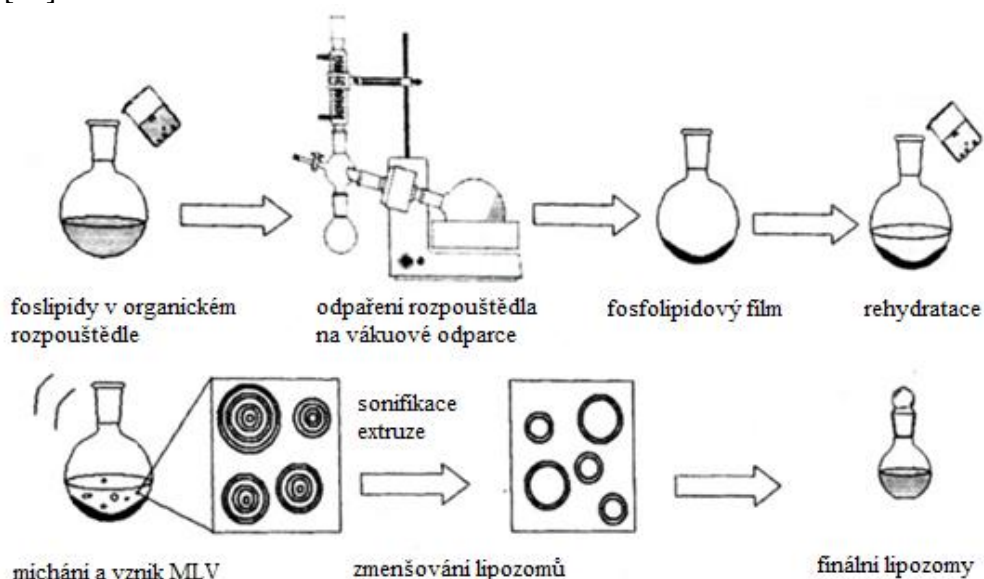
Další metodou je **reverzně fázová evaporizace**, ve které se lipozomy tvarují sekundárním zhroucením gelové fáze vzniklé odpařením organického rozpouštědla, kdy přebytek fosfolipidů vytvoří celistvou dvojvrstvu kolem obrácených micel vzniklých v první fázi. Velkou výhodou je, že vzniklé lipozomy mají větší vodný objem než lipozomy vytvořené jinými metodami, tudíž mají i vysokou enkapsulační účinnost pro hydrofilní látky [29, 32].

**Metoda opakovaného zmrazování a rozmrazování** je založena na opakovaném rychlém zmrazování tekutým dusíkem na teplotu  $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$  a následným rozmrazením nad teplotu fázového přechodu lipidů [33]. Enkapsulační účinnost vzniklých MLV nebo LUV s velkým objemem vodné fáze se pohybuje mezi 20 až 60 % [29].

Mezi další metody patří **etherové a ethanolové injekce** nebo **detergentová metoda** [28].

#### 2.1.4.1 Metoda hydratace fosfolipidového filmu

Banghamova metoda neboli metoda hydratace tenkého fosfolipidového filmu byla první popsanou metodou přípravy fosfolipidů – jedná se o jednu z nejstarších metod (viz obr. 8) [23]. Metoda hydratace fosfolipidového filmu je též jednou z nejjednodušších a nejpoužívanějších metod, přestože je její značnou nevýhodou **nízká enkapsulační účinnost**, obtížné odstranění organického rozpouštědla, náročná homogenizace a malý objem vzorku [34].



Obr. 8: Model vzniku lipozomů pomocí metody rehydratace fosfolipidového filmu a jejich sekundární úpravy [35]

Přesně navážené množství lipidů je nejdříve rozpuštěno v organickém rozpouštědle tak, aby vznikla homogenní směs. Jako rozpouštědlo se volí chloroform nebo směs chloroformu a methanolu, dále se používá dichlormethan nebo čistý ethanol. Takto připravený roztok v baňce s kulatým dnem je po důkladném promíchání nutno zbavit daného organického



rozpouštědla. Pro malé objemy organického rozpouštědla může být použit proud suchého dusíku nebo argonu v digestoři, naopak pro větší objemy rozpouštědla vakuová odparka při teplotě vakuu 45–60 °C [36]. Na stěnách nádoby se utvoří **tenký fosfolipidový film**, který se za stálého míchání a třepání rehydratuje vodnou fází. Jako vhodné hydratační médium se volí destilovaná voda, deionizovaná voda nebo pufr. Teplota hydratačního média by měla být nad teplotou fázového přechodu daného lipidu. Vzniklý lipidový film je tvořen z více lipidových vrstev naskládaných na sobě, které v důsledku hydratace začnou bobtnat a v průběhu míchání vytvářet lipozomy, čímž se roztok zbarví do mléčně bílé. Při prudkém míchání vzniká heterogenní směs velkých multilamelárních lipozomů, jejichž velikost může být redukována mnohými sekundárními úpravami za vzniku homogenní směsi (sonifikace, extruze, dialýza aj.). Při jemném míchání naopak vznikají velké unilamelární lipozomy [37]. Doba procesu hydratace fosfolipidového filmu trvá přibližně 2 hodiny a pro její plný a hladký průběh je dobré lipozomální suspenzi ponechat přes noc uležet při nižších teplotách pohybujících se kolem 0 °C [38].

### 2.1.5 Sekundární úpravy lipozomů

*Sonifikace* je široce se uplatňující metodou pro přípravu unilamelárních lipozomů, při níž dochází k rozrušení multilamelárních lipozomů za použití zvukové energie [39]. Pro přípravu lze využít dvou technik. Při sonifikaci pomocí sondy, jejíž špička je ponořena přímo do lipozomálního roztoku, je uvolněná energie velmi vysoká, proto často dochází k přehřívání vzorku a případné oxidaci nenasycených lipidů. Z tohoto důvodu je nutné roztok chladit v ledové lázni. Další značnou nevýhodou je, že se ze sondy mohou uvolňovat titanové částice, které znečistí roztok. Druhou technikou je umístění zkumavky s lipozomálním roztokem do vodní lázně sonifikátoru na 5-10 minut, kde je mnohem jednodušší vlivem nižší energie kontrolovat teplotu [40]. Vzhledem k tomu, že je střední velikost a distribuce částic ovlivněna složením, koncentrací lipozomů, objemem vzorku, teplotou, výkonem a dobou působení ultrazvuku, je nemožné reprodukovat podmínky pro použití ultrazvuku [36]. Velmi závažnou nevýhodou sonifikace je malá enkapsulační účinnost, možnost degradace a oxidace, kontaminace kovem ze sondy a také přítomnosti MLV mezi výslednými SUV [40].

*Extruze* je v současné době jednou z nejpoužívanějších metod produkce unilamelárních lipozomů. Pro extruzi se používá extrudér složený z těla a dvou stříkaček, který pod tlakem protlačí lipozomální suspenzi přes polykarbonátový filtr s definovanou velikostí pórů, čímž vznikají homogenní lipozomy s průměrem blízkým právě velikosti těchto pórů [39, 41]. Extruze by měla probíhat při vyšší teplotě, než je teplota fázového přechodu lipidů  $T_C$ , jelikož má filtr tendenci zanášet se tuhými membránami lipozomů, které nemohou úspěšně projít [26]. Metoda je šetrná k zacházení s nestabilními materiály a má na rozdíl od sonifikace několik výhod. Hlavní výhodou je menší časová náročnost a reprodukovatelný průměr a distribuce velikosti [41]. Nevýhodou je špatné udržení vysoké teploty a práce s malým objemem vzorku (max 50 ml) [43].

## 2.2 Enkapsulace léčiv

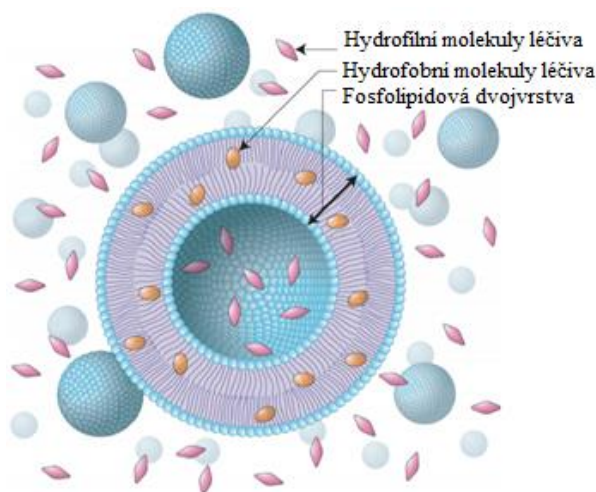
Enkapsulace je proces zachycení a uzavření vhodného léčiva podle jeho polární či nepolární povahy a jeho následné začlenění do vodného jádra lipozomu nebo přímo

do lipozomální dvojvrstvy. Účelem enkapsulace léčiv je izolace a ochrana enkapsulovaného léčiva (před oxidací, deaktivací v důsledku reakcí, ke kterým ve volném prostředí může dojít), maskování určitých vlastností (barva, chuť, zápach a náboj), dosažení řízeného nebo cíleného uvolnění, ochrany organismu před toxicitou enkapsulované látky a v neposlední řadě k dosažení imobilizace určitého biologického materiálu [44].

Enkapsulace léčiv může být charakterizována pomocí několika variant. První variantou je **enkapsulační účinnost**, která vyjadřuje podíl enkapsulované látky k jejímu původnímu množství. Dále pak pomocí **enkapsulované kapacity** definované jako maximální množství látky, které může být enkapsulováno do lipozomu vztažené na 1 mol fosfolipidů. A také pomocí **enkapsulovaného objemu** definovaného jako skutečný objem látky uzavřený membránou vztažený na 1 mol fosfolipidů [45].

MLV jsou vhodné pro enkapsulaci hydrofobních látek a LUV pro hydrofilní látky díky objemnému vodnému jádru, zatímco SUV podléhají nízké enkapsulační účinnosti hydrofilní látky vlivem malého objemu vodného jádra. Ke vzrůstu enkapsulační účinnosti pro hydrofilní látky dojde jak přidáním iontu, tak inkorporací glykolipidů nebo cholesterolu a úpravou pH vodné fáze. Inkorporace cholesterolu do lipozomální dvojvrstvy pro enkapsulaci hydrofobních látek způsobuje snížení enkapsulační účinnosti vlivem nedostatečného prostoru pro jeho inkorporaci. To také výrazně záleží na koncentraci lipidů a délce a nasycení jejich řetězců. Vnesením náboje na lipozomální dvojvrstvu se může zvýšit enkapsulační účinnost, avšak záleží převážně na povaze enkapsulované látky, zda bude nejvyšší enkapsulační účinnost u neutrálních, kladných nebo záporných lipozomů – **neexistuje univerzální pravidlo**. Další možností je chemická modifikace léčiv – hydrofobicitu málo hydrofobních látek lze zvýšit derivatizací na mastné kyseliny [45].

K enkapsulaci hydrofilních léčiv dochází v průběhu hydratace lipidů, kdy je část léčiva zachycena uvnitř lipozomu a uzavřena v jeho vodném jádře. Přebytečné léčivo v rozpouštědle je odstraněno dialýzou nebo gelovou chromatografií. Naopak při enkapsulaci hydrofobních léčiv se léčivo nejprve rozpustí spolu s fosfolipidy v organickém rozpouštědle, které je odstraněno evaporací, čímž dojde ke vzniku fosfolipidového filmu, který je následně rehydratován [37]. Enkapsulaci léčiv podle jejich polaritě znázorňuje *obr. 9*.

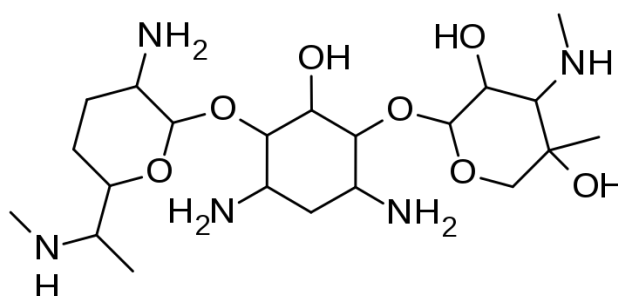


*Obr. 9: Enkapsulace léčiv hydrofilní a hydrofobní povahy [46]*

### 2.2.1 Hydrofilní léčiva

Malé hydrofilní molekuly léčiv jsou široce užívány v klinické praxi, přestože podléhají v organismu rychlé clearance, nízké intracelulární absorpci a toxicitě pro okolní tkáň. Tyto nevýhody lze překonat enkapsulací léčiva do lipozomů, čímž dojde ke zvýšení účinnosti léčiva bez vedlejších účinků uvolněním v cílovém místě účinku. Lipozomy jsou schopny uvolňovat obsah reakcí na specifické podněty, jako je změna pH, teplo, ultrazvuk, světlo nebo změna magnetického pole [47]. Vlivem dobré rozpustnosti hydrofilních léčiv ve vodě a vysokému podílu vody v externím prostředí lipozomů je enkapsulační účinnost nízká. Enkapsulační účinnost je možné zvýšit vhodným výběrem metody přípravy, jako je opakované zmrazování a rozmrazování nebo evaporizace [48].

Jako antibiotika se původně označovaly látky produkované mikroorganismy, které potlačují růst jiných mikroorganismů nebo je usmrcují. V současnosti se pod tento pojem zahrnují i látky syntetické nebo polosyntetické [49]. Mezi hydrofilní antibiotika patří piperacilin, meropenem, aztreonam, ceftriaxon, amikacin, gentamicin (viz obr. 10) a linezolid [50]. **Meropenem** se používá hlavně k léčbě meningitidy, pneumonie, sepse, antraxu a cystické fibrózy [51]. **Aztreonam** slouží k léčbě infekce kostí a měkkých tkání, pneumonie, endometritidy a infekce močových cest [52]. **Ceftriaxon** léčí převážně infekce krve a středního ucha, endokarditidu, meningitidu, infekce močových cest, kapavku a zánětlivé onemocnění pánve [53]. **Amikacin** se používá k léčbě tuberkulózy odolné vůči jiným léčivům a **linezolid** v případě rezistence bakteriální infekce na jiné antibiotika [54, 55].



Obr. 10: Strukturální vzorec gentamicinu [56]

**Doxorubicin** je antracyklinové cytostatikum izolovaná z bakterie *Streptomyces paucetius* [57]. Doxorubicin patří mezi neúčinnější léčiva v terapii karcinomu prsu, ale jeho klinické použití je limitováno především výskytem srdeční myopatie závislé na kumulativní použité dávce, která může vést k fatálnímu srdečnímu selhání jak během terapie, tak o několik let později. Lipozomální forma doxorubicinu zvyšuje terapeutický index snížením kardiotoxicity a vykazuje obdobnou protinádorovou účinnost jako konvenční léková forma [58]. **Cytarabin** též známý jako cytosin arabinosid je jedním z nejvíce používaných látek k léčbě akutní myeloidní leukémie [59]. **Topotekan** se používá k léčbě pokročilých karcinomů vaječníků, rakoviny děložního čípku, v druhé řadě k léčbě karcinomů plic a v kombinaci s cytarabinem k léčbě akutní myeloidní leukémie [60]. **Irinotekan** se stal spolu velmi důležitým cytostatikem pro léčbu pokročilých karcinomů tlustého střeva a konečníku [61]. **Nivolumab** a **pembrelizomab** byly schváleny pro léčbu metastázujících melanomů včetně

nemalobuněčného karcinomu plic, karcinomu ledvin, hlavy, krku, močového měchýře a klasického Hodgkinova lymfomu [62, 63].

**Chlorpromazin** je typické antipsychotikum používající se k léčbě schizofrenie, příznaků mánie u lidí s bipolární poruchou, dětské hyperaktivity a chronické škytavky. Spolu s jinými léčivy se používá k léčbě tetanu a akutní porfyrie [64]. **Pimavanserin** je též hydrofilní antipsychotikum schválené k léčbě Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby [65, 66]. Naopak mezi hydrofilní antidepressiva spadá **venlafaxin** sloužící k léčbě depresí, úzkostí a panických záchvatů [67]. Dalším důležitým léčivem je **pregabalin** pro léčbu neuropatických bolestí (při diabetu nebo jako následek pásového oparu) a epilepsie [68]. Do této kategorie lze též zařadit **methyfenidát** k léčbě ADHD a narkolepsie [69].

**Amidaron** je nejúčinnější antiarytmikem v prevenci fibrilace síní, přestože má velké množství vedlejších účinků a nijak výrazně neovlivňuje mortalitu pacientů. **Ibutilid** se jeví jako nejefektivnější lék na konverzi flutteru síní – síniová tachykardie [70]. Mezi hydrofilní léčiva k léčbě fibrilace síní patří **vernakalant**, který má v porovnání s amidaronem vyšší účinnost v krátkém intervalu po podání [71]. **Verapamil** a **diltiazem** se používají k léčbě vysokého krevního tlaku a při bolestech na hrudi při angině pectoris [72, 73].

Nelze zapomenout na další hydrofilní léčiva jako je theofylin, pentaxifylin, diklofenak, tramadol a suramin. **Theofylin** se používá k léčbě astmatu. **Pentaxifylin** je využíván při poruchách cerebrovaskulární cirkulace a při onemocnění chronických periferních cév. Sodná sůl **diklofenaku** je antirevmatikem a antiflogistikem. **Tramadol** slouží jako analgetikum s protizánětlivým účinkem [74]. **Suramin** je multifunkční léčivo se širokou škálou využití od antiparazitických a antivirových účinků až po léčbu rakoviny, hadího uštknutí a autismu. Je velmi účinným při léčbě spící nemoci a říční slepoty [75].

### 2.2.2 Způsob transportu a uvolnění léčiva

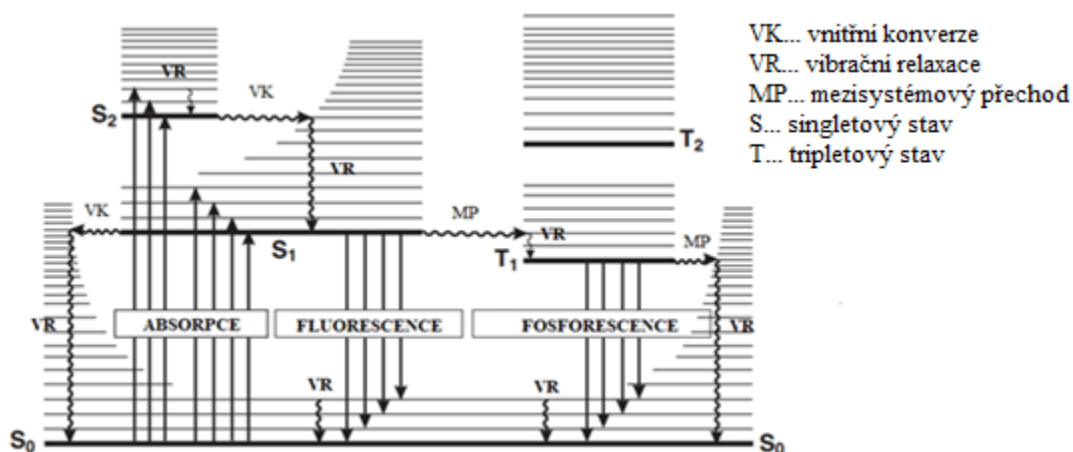
Lipozomy mohou interagovat s buňkami čtyřmi různými způsoby, přičemž se při transportu léčiva uplatňuje více způsobů najednou. **Endocytózou** se rozumí adsorpce lipozomu na povrch buněčné membrány a díky fagocytóze vznikne lipozom uzavřený v buněčné membráně. Druhým způsobem je **adsorpce lipozomu na povrch buněčné membrány** vlivem nescifických hydrofobních a elektrostatických interakcí nebo specifických interakcí s buněčnými receptory. Uplatňuje se i **fúze**, ve které dochází k mísení lipidů z lipozomální membrány s lipidy z buněčné membrány, čímž se uvolňuje léčivo do cytoplazmy buňky. Dalším způsobem je **transportem lipidů z lipozomální membrány do buněčné membrány** a naopak [76].

Pro uvolnění léčiva mohou být použity i metody lokální (enzymy či změna pH) nebo dálkové (světlo, teplo nebo ultrazvuk). Prvním spouštěčem byla **hypertermie** – zahřátí nádoru, u kterého se ukázalo, že poskytuje až 4x účinnější transport a uvolnění například lipozomálního cytostatika methotrexátu. Pro uvolnění léčiva v kyselém prostředí na místě zánětu nebo u některých primárních nádorů se začaly využívat lipozomy citlivé na změnu pH. Použitím ultrazvuku na PEGylovaný doxorubicin bylo dosaženo zvýšení koncentrace léčiva v nádoru, a tedy i zvýšení léčebného účinku. U enzymů na uvolnění obsahu lipozomů došlo k selhání vlivem imunitní odpovědi. Hypertermie dodnes zůstává nejspolehlivější metodou [77].

## 2.3 Fluorescence

**Fluorescence** je jev, při kterém dochází k emisi absorbovaného záření z elektronově excitovaného stavu zpět do stavu základního za současného uvolnění elektromagnetického záření. Vyznačuje se tím, že emise světelného záření probíhá ze singletového elektronového stavu ( $S_1$ ), při kterém mají excitovaný elektron i párový elektron v základním stavu opačný spin. Následná deexcitace elektronu zpět na základní hladinu je spinově dovolená a probíhá vysokou rychlostí. Látky vykazující schopnost fluorescence se nazývají **fluorofory** – nejčastěji se jedná o organické sloučeniny s konjugovaným systémem dvojných vazeb [78]. Emitované záření se posouvá k vyšším vlnovým délkám vlivem ztráty energie při nezářivých přechodech, ke kterým patří vibrační relaxace, vnitřní konverze a mezisystémové přechody. Tato skutečnost je označována jako **Stokesův posun** [79].

Pro schématický popis všech procesů probíhajících mezi absorpcí a emisí záření molekulou fluoroforu se používá **Perrin-Jablonskiho diagram** (viz obr. 11). Po absorpci záření je fluorofor nejčastěji excitován ze základního stavu  $S_0$  na vyšší vibrační hladinu excitovaného stavu  $S_1$  nebo  $S_2$  ( $10^{-15}$  s). Poté v převážné většině případů dojde k uvolnění tepelné energie do okolí procesem zvaným vibrační relaxace a k následné relaxaci elektronu na nejnižší vibrační hladinu  $S_1$ , čímž se systém stabilizuje ( $10^{-12}$  s). Konečným procesem je deexcitace elektronů ze základní vibrační hladiny excitovaného stavu  $S_1$  na některou z nižších vibračních hladin základního stavu  $S_0$ , následně je opět pomocí vibrační relaxace dosaženo základní vibrační hladiny  $S_0$ . Dalším možným procesem je mezisystémový přechod změny spinu vedoucí k jevu zvanému fosforecence způsobeného přeměnou singletového excitovaného stavu na stav tripletový  $T_1$ . Vnitřní konverze je proces, při kterém molekula přechází ze základní vibrační hladiny daného excitovaného stavu na vyšší vibrační hladinu nižšího stavu [78, 79].



Obr. 11: Perrin-Jablonskiho diagram [79]

Mezi nejdůležitější charakteristiky fluorescence patří **kvantový výtěžek** definovaný jako poměr množství fotonů vyzářených ku množství fotonů absorbovaných. Fluorofory s velkým kvantovým výtěžkem blízcímu se jedné většinu absorbované světelné energie emitují. Hodnota kvantového výtěžku je však vždy menší než jedna, a to vlivem ztrát energie

při nezářivých přechodech. Další důležitou charakteristikou je **intenzita fluorescence** definovaná jako počet fotonů emitovaných za jednotku času vztažených na jednotku objemu. Závislost intenzity fluorescence na vlnové délce záření udává absorpční a emisní spektrum fluoroforu [79].

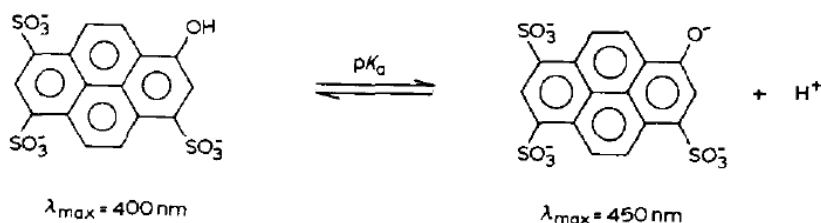
### 2.3.1 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy jsou **nevlastní fluorofory**, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentně a mění při tom své fluorescenční vlastnosti v závislosti na vlastnostech prostředí, čehož může být využito při studiu vlastností, jako je například polarita, pH nebo viskozita [80]. Fluorescenční sondy jsou oblíbenými a univerzálními nástroji pro analytické snímání a optické zobrazení díky jejich vysoké citlivosti, jednoduchému použití, specifitě a rychlosti odezvy [81]. Fluorescenční sondy se hojně využívají ve fluorescenční spektroskopii a fluorescenční mikroskopii při zobrazování tkání, buněk a organel [78].

#### 2.3.1.1 Pyranin

Pyranin (trisodná sůl kyseliny 8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonové) neboli **HPTS** je silně fluoreskující, vlivem přítomnosti tří sulfonových kyselin ve vodě dobře rozpustná fluorescenční sonda. Díky přítomnosti fenolické hydroxylové skupiny ve své struktuře je sonda extrémně citlivá na pH prostředí [82]. Vzhledem k tomu, že jsou sulfonové skupiny pyraninu ionizovány v celém rozmezí pH, je pyranin jako fluorescenční sonda účinně odpuzován od povrchu záporně nabitých lipozomů. Z tohoto důvodu při enkapsulaci reaguje pyranin na vodíkové ionty uvnitř vodného jádra [83].

Emisní maximum fluorescence pyraninu má pouze jednu vlnovou délku, a to **510 nm**. Excitační spektrum intenzity fluorescence pyraninu je při této vlnové délce emise silně závislá na stupni ionizace hydroxylové skupiny při rozdílných hodnotách pH a propustnosti hydroxidových iontů přes lipozomální membránu při změnách vnějšího pH [84, 85]. Hodnota pH prostředí silně ovlivňuje absorpční charakteristiky pyraninu, kdy lze v absorpčním spektru rozlišit dva píky, jejich absorpční maxima odpovídají vlnové délce **400 nm a 450 nm** (viz obr. 12). První pík odpovídá neionizované formě pyraninu v případě kyselého vnějšího prostředí, kdežto druhý pík odpovídá ionizované formě při alkalickém prostředí. Emisní spektrum intenzity fluorescence při 510 nm vyjadřuje poměr mezi neionizovanou a ionizovanou formou pyraninu, tudíž intenzita fluorescence roste s přírůstkem ionizované formy, naopak klesá s přírůstkem neionizované formy. Pouze při absorpci záření o 413 nm je intenzita fluorescence nezávislá na změně pH – tato vlnová délka je označována jako **izobestická** [86].



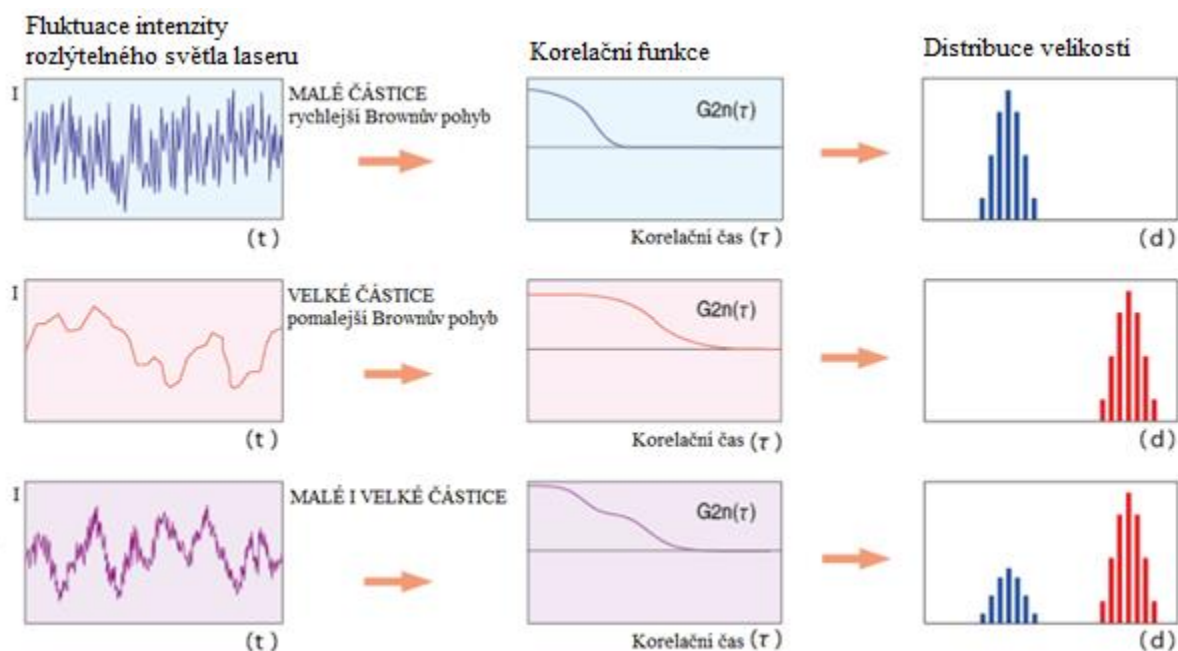
Obr. 12: Neionizovaná a ionizovaná forma HPTS [86]

## 2.4 Rozptyl světla

Obecně je rozptyl světla brán jako jev, při kterém v určité soustavě dochází k interakci světla s částicemi, které jsou menší než vlnová délka dopadajícího záření. Světelné paprsky se při interakci odchýlí od přímého směru do více různých směrů. V případě, že se jedná o částice v rozmezí velikosti 1–1000 nm, pozorujeme tzv. **Tyndalův jev**, při němž se paprsky procházející disperzním prostředím stávají viditelnými v podobě kužele [87].

### 2.4.1 Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla neboli kvazielastický rozptyl světla je metoda vhodná pro měření velikosti částic v submikronové oblasti. Lze ji využít při charakterizaci emulzí, micel, lipozomů, latexů a pigmentů. Základem této neinvazivní a nedestruktivní techniky je měření **fluktuace intenzity rozptýleného světla** z laserového zdroje okolo její průměrné hodnoty [88].



Obr. 13: Fluktuační intenzity rozptýleného světla a korelační křivka malých a velkých částic [90]

Při použití laseru je světlo koherentní a po jeho interakci s částicemi dochází k interferenci. Jelikož koloidní částice podléhají neustálému náhodnému **Brownovu pohybu**, mění se vzdálenost, kterou musí urazit rozptýlené světlo k detektoru. Rychlost Brownova pohybu je ovlivněna velikostí částic, menší částice se pohybují rychleji než ty velké. Z měření rychlosti tohoto pohybu jsme schopni určit velikost částic a pro změření této rychlosti je nutné na částice posvítit laserem. Rozptýlené vlnění může interferovat v závislosti na vzdálenosti mezi částicí a detektorem. Výsledkem je tedy již zmíněná intenzivní fluktuační rozptýleného záření okolo průměrné hodnoty intenzity, z níž se získá **korelační funkce** [89]. Tyto fluktuační souvisí s interferenčním zeslabováním a zesilováním světla rozptýleného na nestacionárních částicích disperzní fáze. Čím rychleji se částice pohybují, tím rychleji se intenzita rozptýleného světla mění. Korelační funkce udává, jak jednotlivé částice v průběhu měření



vzájemně korelují. Vzhledem k tomu, že se malé částice pohybují rychleji, trvá kratší dobu, než změní svou pozici. Z tohoto důvodu klesá korelační křivka dříve. U větších částic je tomu přesně naopak [88]. Celý postup měření dynamického rozptylu světla znázorňuje *obr. 13*.

Velikost částic lze vypočítat z korelační funkce výpočtem pomocí translačního difuzního koeficientu prostřednictvím **Stokesovy – Einsteinovy rovnice**:

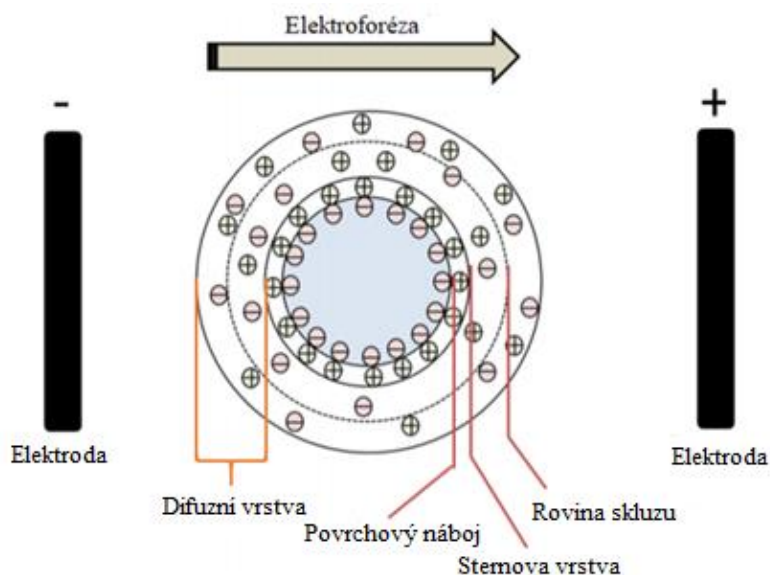
$$d(H) = \frac{k_b \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \mu \cdot D}, \quad (2.2)$$

kde  $d(H)$  je hydrodynamický průměr částic,  $D$  je translační difuzní koeficient,  $k_b$  je Boltzmannova konstanta,  $T$  je teplota a  $\mu$  je viskozita disperzního prostředí [88].

Nespornými výhodami této metody je rychlý a jednoduchý průběh měření bez potřeby kalibrace, analýza vyžaduje jen velmi malé množství vzorku a měřicí zařízení je komerčně dostupné s automatizací včetně analýzy dat. Jednou z hlavních výhod je její využití při analýze velikosti částic s rozměry do 10  $\mu\text{m}$ . Kritickým krokem je čištění a plnění kyvety. Pokud se v kyvetě objeví prach nebo mikrobublinky, může dojít k narušení nebo překrytí signálu analytu a měření pak může být zatíženo chybou [88].

#### 2.4.2 Elektroforetický rozptyl světla

Elektroforetický rozptyl světla je metoda stanovení zeta potenciálu na rovině skluzu povrchu elektrické dvojvrstvy (viz *obr. 14*) [91]. Zeta potenciál se všeobecně používá k charakterizaci stability koloidních systémů souvisejících s povrchovým nábojem částic a interakcí mezi jednotlivými molekulami [92].



*Obr. 14: Zobrazení elektrické dvojvrstvy [94]*

Nabitou koloidní částici dispergovanou ve vodném prostředí obklopují opačně nabitě částice, čímž vzniká **Sternova vrstva** pevně vázaná k dispergované částici. Kolem této vrstvy se dále hromadí ionty obsahující tentokrát i stejně nabitě ionty, čímž dochází ke vzniku



**difuzní vrstvy.** Poté co je na roztok koloidních částic aplikováno vnější elektrické pole, částice se pohybují k opačně nabitě elektrodě, čímž se v difuzní vrstvě vytvoří **rovina skluzu** působící jako rozhraní mezi pohybem částice a rozpouštědla. Potenciálový rozdíl mezi rovinou skluzu a objemem kapaliny se nazývá elektrokinetický neboli **zeta potenciál** [93].

Pohybující se částice během elektroforézy rozptyluje paprsek laseru. Výsledkem je rozptýlený paprsek s jinou frekvencí, kdy tento frekvenční posun je vzhledem k frekvenci původního paprsku laseru úměrný rychlosti částic. V průběhu měření elektroforetického rozptylu světla laserového paprsku se vytváří záznam frekvenčních spekter umožňujících výpočet elektrokinetického a následně i zeta potenciálu dle rovnice:

$$\xi = \frac{3 \cdot \mu \cdot \eta}{2 \cdot \varepsilon \cdot F}, \quad (2.3)$$

kde  $\xi$  je zeta potenciál,  $\mu$  je elektrokinetický potenciál,  $\eta$  je viskozita disperzního prostředí,  $\varepsilon$  je permitivita disperzního prostředí a  $F$  je funkce související s tvarem částice [92, 94].

O tom, zda se lipozomální částice budou shlukovat nebo dispergovat, rozhoduje to, jestli v roztoku převažují síly přitažlivé (van der Waalsovy) nebo síly odpuzivé (elektrostatické). V případě, že zeta potenciál bude mít vysokou kladnou nebo zápornou hodnotu, budou se částice v roztoku dispergovat. Takový systém je považován za stabilní. V opačném případě, kdy hodnota zeta potenciálu bude mít nízkou hodnotu blízkou nule, jednotlivé částice se budou agregovat do větších útvarů. Částice s takovým zeta potenciálem jsou tedy nestabilní. Za hranici stability se považuje hodnota zeta potenciálu rovná  $\pm 30$  mV [95].

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

**CORDEIRO C. a spol.** se zabývali inkorporací antibiotika gentamicinu do pH-senzitivního lipozomu, jehož forma by byla schopna dosáhnout lepší účinnosti při podávání antibiotik, a tedy celkového zlepšení antibakteriální terapie. Fosfolipidy byly smíchány s chloroformem a následně bylo rozpouštědlo za stálého míchání odpařeno pod proudem dusíku. Zbytek rozpouštědla byl odstraněn použitím vysokotlakého vakua. Dokonale vysušený fosfolipidový film byl rehydratován přidáním 0,5 ml roztoku složeného z 50 mg gentamicinu rozpuštěného v pufru při pH 7,4. Hydratace byla usnadněna intenzivním mícháním a pěti cykly opakovaného zmrazení a rozmrazení při  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Poté byly vzorky zředěny. Takto vzniklá multilamelární disperze byla převedena na směs unilamelárních lipozomů pomocí extrudéru s velikostí pórů 0,1 mikrometru při teplotě  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Odstranění gentamicinu z vnějšího povrchu těchto aniontových lipozomů bylo dosaženo úpravou pH suspenze na 10 přidáním pufovaného fyziologického roztoku s glycinem. Všechny neinkorporovaný podíl gentamicinu byl ze suspenze odstraněn převedením na kolonu a jímáním frakcí, které byly opět ekvilibrovány puftrem na pH 7,4. Volný a lipozomální gentamicin byl vpraven do myši infikovaných bakterií *Salmonella enterica*. Studie zaznamenala prodlouženou cirkulaci lipozomálního gentamicinu v krvi i zvýšenou účinnost při léčbě infekce způsobené touto bakterií [96].

**EL-RIDY M. S. a spol.** se zabývali vytvořením lipozomální formy amikacinu důležitého k terapeutickému zvýšení účinnosti a bezpečnosti léčiva. Lipozomy byly připraveny metodou rehydratace fosfolipidového filmu. Nejdříve bylo přesně navážené množství 10 mg amikacinu solubilizováno v 10 ml boraxového pufru. 100 mg DPPC s cholesterolem bylo rozpuštěno v 10 ml chloroformu při současném míchání při  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 10 minut. Chloroform byl odpařen na vakuové odparce při sníženém tlaku, čímž se na stěnách baňky s kulatým dnem vytvořil fosfolipidový film. Ten byl rehydratován roztokem amikacinu připraveného v prvním kroku. Neenkapsulovaný podíl amikacinu byl z roztoku odstraněn centrifugací po dobu 30 minut při teplotě  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Lipozomální sediment byl resuspendován 10 ml boraxového pufru. Ze supernatantu bylo spektrofotometricky zjištěno množství neenkapsulovaného amikacinu, díky tomu bylo možné vypočítat enkapsulační účinnost amikacinu. Antibakteriální aktivita volného a lipozomálního amikacinu byla pozorována na myších infikovaných bakterií *Escherichia coli*. Enkapsulační účinnost se pohybovala kolem 44-62 % v závislosti na náboji lipozomu a přítomnosti cholesterolu. Výsledky studia uvádějí zvýšenou účinnost lipozomálního amikacinu vlivem zvýšené cirkulace v krvi a nižší koncentrace amikacinu hromadícího se v játrech, slezině a ledvinách, což výrazně snižuje toxicitu lipozomální formy oproti volně podávanému amikacinu [97].

**LIU J. J. a spol.** se zabývali zvýšením enkapsulační účinnosti topotekanu do lipozomů použitím gradientu síranu amonného a následně srovnáním stability a cytotoxicity lipozomální a konvenční formy topotekanu. Malé unilamelární lipozomy byly připraveny metodou rehydratace fosfolipidového filmu. DSPC s cholesterolem byly rozpuštěny v chloroformu v baňce s kulatým dnem. Rozpouštědlo bylo odpařeno pomocí rotační vakuové odparky za sníženého tlaku, čímž vznikl na stěnách baňky suchý fosfolipidový film. Ten byl při  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  hydratován roztokem síranu amonného. Vzniklá suspenze byla pětkrát opakovaně

zmrazena a rozmrazena, poté třikrát extrudována přes polykarbonátový filtr s velikostí pórů 0,1 mm a sedmkrát pomocí vysokotlakého vytlačovacího zařízení přes filtr s velikostí pórů 0,05 mm. Síran amonný byl z externího prostředí ekvilibrován na pH 5,5 přidáním pufru a odstraněn pomocí chromatografické kolony. Topotekan okamžitě přidaný do roztoku ve formě prášku byl do lipozomů zapouzdřen vlivem gradientu síranu amonného. Směs lipozomů a topotekanu byla inkubována ve vodní lázni o teplotě 60 °C po dobu 30 minut. Neenkapsulovaný topotekan byl z roztoku odstraněn gelovou filtrací. Množství enkapsulovaného topotekanu bylo měřeno spektrofotometricky. Volný a lipozomální topotekan byl vpraven do myši, do nichž byly injektovány nádorové buňky způsobující akutní myeloidní leukémii. Výsledky studie uvádějí, že 90 % přidaného topotekanu bylo úspěšně enkapsulováno do lipozomů. Také byla potvrzena zvýšená doba cirkulace lipozomálního topotekanu v krvi a lepší protinádorová aktivita v porovnání s konvenční formou [98].

**MESSERER C. L. a spol.** zkoumali vliv lipozomální formy irinotekanu na léčbu kolorektálního karcinomu v porovnání s jeho konvenční formou. Unilamelární lipozomy byly připraveny metodou rehydratace fosfolipidového filmu, kdy bylo přesně navážené množství fosfolipidů rozpuštěno v chloroformu. Rozpouštědlo bylo odpařeno pod proudem dusíku a přes noc ponecháno ve vakuu za účelem odpaření zbytkového rozpouštědla. Vzniklý suchý fosfolipidový film byl rehydratován síranem měďnatým. Hydratace byla urychlena několika cykly zmrazování a rozmrazování. Suspenze byla dvakrát protlačena přes polykarbonátové membránové filtry s velikostí pórů 100 nm, čímž došlo ke vzniku homogenního roztoku lipozomů. Zbytek neinkorporovaného síranu měďnatého bylo odstraněno pomocí chromatografické kolony. Irinotekan byl do lipozomů zapouzdřen vlivem protonového gradientu vzniklého začleněním dvojmocného kationtu mědi do lipozomální dvojvrstvy. Volný irinotekan byl odstraněn gelovou chromatografií a množství enkapsulovaného irinotekanu bylo určeno pomocí spektrofotometru. Studie potvrzuje enkapsulaci více než 90 % přidaného irinotekanu. Z výsledků vyplývá, že enkapsulovaná forma výrazně snižuje rychlost růstu karcinomu u myši, z čehož lze usuzovat zvýšení terapeutické aktivity při léčbě metastázující rakoviny ledvin [99].

**KIM C. K. a spol.** se zabývali studiem enkapsulační účinnosti, rychlostí a mechanismem uvolnění cytarabinu z lipozomů. Byly připraveny SUV a LUV lipozomy. Přesně navážené množství lecitinu a cholesterolu bylo rozpuštěno v chloroformu a po zamíchání byl chloroform odpařen pomocí rotační vakuové odparky, čímž na stěnách nádoby ulpěl suchý fosfolipidový film. Ten byl suspendován roztokem cytarabinu ve fosfátovém pufru a ponechán vortexovat 5 minut. SUV lipozomy byly připraveny ultrasonifikací. K přípravě LUV lipozomů se použila reverzně fázová evaporizace. Připravený fosfolipidový film byl rozpuštěn ve 3 ml etheru, k čemuž byl přidán 1 ml roztoku cytarabinu ve fosfátovém pufru. Tento binární roztok byl sonifikován pouze krátce, aby došlo ke vzniku obrácených micel, kdy byl cytarabin s vodnou fází uzavřen v obrácených micelách a ether byl vytlačen do vnějšího prostředí. Poté byl ether odpařen použitím rotační vakuové odparky, čímž došlo ke vzniku homogenního roztoku LUV lipozomů. V obou případech byl neenkapsulovaný cytarabin odstraněn průtokem přes gelovou chromatografickou kolonu. Z výsledků studie vyplývá, že při enkapsulaci cytarabinu byla metoda reverzně – fázové evaporizace desetkrát účinnější. Totéž bylo pozorováno při sníženém množství fosfátového pufru v roztoku

cytarabinu. Na uvolňování cytarabinu se výrazně podílelo množství cholesterolu. Nakonec bylo také zjištěno, že k uvolňování cytarabinu z lipozomů dochází prostou difuzí, která nikterak nepoškozuje fosfolipidovou dvojvrstvu [100].

**MARTÍ A. a spol.** se zabývali tím, jaká je vhodná metoda pro přípravu lipozomální formy doxorubicinu. Dále se snažili objasnit jeho strukturu, účinnost enkapsulace a stabilitu. Lipozomy byly připraveny dvěma mírně odlišnými metodami. V prvním případě bylo DPPC a cholesterol rozpuštěny v chloroformu, který byl odpařen pod proudem suchého dusíku a poté lyofilizován. Vzniklý fosfolipidový film byl rehydratován roztokem chloridu sodného a pufrem obsahujícím rozpuštěný doxorubicin. V případě druhém byl doxorubicin zrovna smíchán s DPPC a cholesterolem v chloroformu, který byl odpařen stejným způsobem. Avšak tentokrát byl vzniklý fosfolipidový film rehydratován roztokem chloridu sodného a pufrem neobsahujícím doxorubicin. Obě suspenze byly sedmkrát extrudovány přes polykarbonátový membránový filtr s přesně definovanou velikostí pórů. Neenkapsulovaný podíl byl z roztoku odstraněn gelovou filtrační chromatografií a množství enkapsulovaného doxorubicinu bylo zjištěno fluorimetricky. Výsledky studie naznačují, že vyšší enkapsulační účinnost nastala při zabudování doxorubicinu do fosfolipidové membrány, a to právě díky částečným hydrofobním interakcím uhlíkových skeletů doxorubicinu s fosfolipidy. Stejně tak stabilita lipozomů byla vyšší v případě druhé přípravné metody i v případě výskytu vyššího množství cholesterolu [101].

**MIRZAE M. a spol.** se zabývali porovnáním antibakteriální aktivity volné a lipozomální formy amikacinu a také prázdného lipozomu. Multilamelární lipozomy byly připraveny rehydratací fosfolipidového filmu, kdy byly DPPC a cholesterol v poměru 2:1 rozpuštěny v chloroformu. Poté bylo rozpouštědlo odstraněno pomocí vakuové odpary za sníženého tlaku při 30 °C. Suchý fosfolipidový film, který ulpěl na stěnách baňky, byl rehydratován vodným roztokem amikacinu o koncentraci 10 mg/ml. Lipidová suspenze ponořená v ledové lázni byla sonifikována po dobu 40 sekund pomocí ultrazvuku na malé unilamelární lipozomy. Neenkapsulovaný amikacin byl odstraněn centrifugací. Supernatant byl opatrně shromážděn pomocí Pasteurovy pipety a precipitát byl resuspendován ve fyziologickém roztoku. Promývání bylo opakováno dvakrát. Lipozomální forma amikacinu byla měřena pomocí HPLC chromatografie okamžitě po rozrušení fosfolipidové membrány Tritonem X-100. Míra účinnosti volného a lipozomálního amikacinu byly stanoveny a zhodnoceny na mikrobiální kultuře *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis* a *Staphylococcus aureus*. Enkapsulační účinnost amikacinu odpovídala 24 %. Výsledky studie jasně ukazují, že lipozomální forma amikacinu vykazuje stejné antibakteriální účinky jako ostatní formy již při použití výrazně nižší koncentrace. Kombinace lipozomální formy amikacinu s prázdnými lipozomy měla naprosto totožnou účinnost jako použití volné formy amikacinu – potřeba vyšší koncentrace [102].

**ZAHRA M. J. a spol.** zkoumali mikrobiální účinnost lipozomální a volné formy meropenemu proti klinickým a laboratorním izolátům bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, která je schopna tvořit biofilm poskytující rezistenci proti široké škále antibiotik. Lipozomy obsahující meropenem byly připraveny ethanolovou injekcí. Fosfatidylcholin, cholesterol a meropenem byly rozpuštěny v ethanolu, který byl následně velmi pomalu injektován

pomocí tenké jehly do vodného roztoku podléhajícímu neustálému míchání pomocí homogemizéru. Neenkapsulovaný podíl meropenemu byl odstraněn pomocí centrifugace a vzniklý čirý roztok byl podroben spektrofotometrii při 300 nm, čímž byla pomocí matematických operací stanovena enkapsulační účinnost meropenemu připravená touto metodou na 61,3 %. Výsledky studie potvrdily, že minimální inhibiční koncentrace lipozomálního meropenemu je výrazně nižší než v případě jeho volné formy. Dále bylo potvrzeno také to, že lipozomální forma meropenemu dokáže odstranit biofilm a inhibovat jakoukoliv motilitu všech izolátů této bakterie již ve velmi nízké koncentraci. Naopak volná forma má tyto schopnosti pouze u některých izolátů, a to při mnohem vyšších koncentracích [103].

**MASTRANGELO E. a spol.** zkoumali inhibiční antivirovou aktivitu volného i lipozomálního suraminu vůči enzymu RNA-dependentní RNA-polymeráze způsobující množení norovirových částic v hostitelském organismu myši. Lipozomy byly připraveny metodou ethanolové injekce, kdy byl nejprve suramin rozpuštěn ve vodném roztoku *L*-lysinu a tato směs byla smíchána se směsí ethanolu, fosfatidylcholinu o koncentracích 30 nebo 90 mM a pufrem. Takto vzniklý roztok byl opatrně a pomalu vsťikován ručně nebo pomocí injekční pumpy do dvakrát predestilované vody. Gelová filtrace byla využita pro odstranění neenkapsulovaného podílu suraminu a jednotlivé jímané frakce byly podrobeny UV spektrofotometrii. Enkapsulační účinnost lipozomů připravených ručně odpovídala 72,8 % a pomocí injekční pumpy 88,5 %. Výsledky této studie jasně uvádějí, že lipozomální suramin úspěšně inhiboval replikaci myšího noroviru již při nižších koncentracích, než by tomu bylo potřeba při použití volné formy suraminu, a to z důvodu špatné propustnosti do buňky vlivem jeho negativního náboje [104].

**EBRAHIMI S. a spol.** zkoumali antibakteriální účinnost volné a lipozomální formy cefriaxonu na vysoce rezistentní bakterii *Escherichia coli*. V prvním kroku přípravy lipozomů se pevný a kapalný lipid přidá k ethanolu a sójovému lecitinu. Takto vzniklý roztok byl umístěn do vodní lázně vyhřáté na 60 °C, do které byl následně přidán roztok deionizované vody s rozpuštěným cefriaxonem – vznik vnitřní vodné fáze. K vytvoření vnější vodné fáze byla použita destilovaná voda s emulgátorem Tween 80, která byla přidána do vnitřní vodné fáze, a celý tento roztok byl ochlazen na teplotu 0–4 °C. V posledním kroku byl roztok míchán při pokojové teplotě za účelem odpaření organického rozpouštědla a tvorby lipozomální formy cefriaxonu. Neenkapsulovaný podíl cefriaxonu byl odcentrifugován, supernatant byl zředěn destilovanou vodou a převeden na HPLC chromatografickou kolonu, kde byla mobilní fáze složena z 95 % methanolu a 5 % destilované vody. Eluované podíly byly měřeny UV-VIS spektrofotometricky. V závislosti na použitém pevném a kapalném lipidu se enkapsulační účinnost pohybovala mezi 60-83 %. Studie zaznamenala postupné a trvalé uvolňování léčiva ze struktury lipozomů způsobující snížení resistance bakterie vůči antibiotikům a tím také zvýšení bakteriální úmrtnosti s časem. Dále bylo potvrzeno to, že již poloviční koncentrace cefriaxonu enkapsulovaná v lipozomech dosáhla stejných výsledků jako v případě použití jeho volné formy [105].

**JITHAN A. V. a spol.** se zabývali vytvořením lipozomální gelu diklofenaku pro zlepšení protizánětlivého účinku při topickém podání. Nejdříve byly rehydratací fosfolipidového filmu

vytvoreny multilamelární lipozomy. Různé množství sodné soli diklofenaku, lecitin a cholesterol byly rozpuštěny v směsi chloroformu a vody v poměru 9:1. Odpařením organického rozpouštědla po dobu 15 minut při 60 °C na vakuové odparce vznikla tenká fosfolipidová vrstva na stěnách baňky, která byla dále přes noc sušena ve vakuové sušárně pro zajištění úplného odpaření organického rozpouštědla. Fosfolipidový film byl rehydratován pufrem za neustálého míchání po dobu jedné hodiny. Následně byla suspenze centrifugována a usazené lipozomy byly resuspenzovány v pufru. Poté byla tato suspenze podrobena sonifikaci za vzniku malých unilamelárních lipozomů. Neenkapsulovaný podíl diklofenaku byl odstraněn centrifugací. Enkapsulovaný podíl byl pomocí elektrického mísiče vmíchán do již připraveného 1 % hydrogelu. Enkapsulační účinnosti byla pomocí spektrofotometrie určena na 58-62 % v závislosti na původním množství diklofenaku. Připravený gel byl aplikován na nahou kůži potkana postiženou otokem, která byla chirurgicky odstraněna z jeho břicha. Výsledky studie potvrdily prodloužený a trvalejší protizánětlivý účinek lipozomálního gelu diklofenaku bez projevu jakýchkoliv nežádoucích účinků [106].

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Chemikálie

#### Lipidy

##### **1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfocholin (PC 16:0) - DPPC**

Anti Polar Lipids, Inc.

CAS: 63-89-8

Číslo šarže: 160PC-319

Mr: 734,05

##### **1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-fosfát (sodná sůl PC 12:0)**

Anti Polar Lipids, Inc.

CAS: 108321-06-8

Číslo šarže: 840635P-200MG-A-024

Mr: 558,661

##### **1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolamin-N-[methoxy(polyethylenglykol)-5000] (amonná sůl – PEG<sub>5000</sub>-PE)**

Anti Polar Lipids, Inc.

CAS: 474922-84-4

Číslo šarže: 880200P-200MG-A-059

Mr: 5744,965

##### **Cholesterol**

Sigma Aldrich

CAS: 57-88-5

Číslo šarže: 26732-25G-F

Mr: 386,65

#### Rozpouštědla

##### **Chloroform**

Penta s.r.o.

CAS: 67-66-3

Číslo šarže: 2107210716

Mr: 119,38

##### **Methanol**

Sigma Aldrich

CAS: 67-56-1

Číslo šarže: 154903-2L

Mr: 32,04

##### **Deionizovaná voda (ELGA)**

##### **Destilovaná voda**

<b>Polyelektrolyty</b>	<b>Trimethylchitosan</b> Sigma Aldrich CAS: 52349-26-5 Číslo šarže: 912123-1G
<b>Ostatní</b>	<b>8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonová kyselina (sodná sůl)</b> Sigma Aldrich CAS: 6358-69-6 Číslo šarže: BCBG0703V Mr: 524,38

## 4.2 Příprava koncentrační řady HPTS ve vodě

Pro určení enkapsulační účinnosti HPTS v jednotlivých lipozomálních systémech byla sestrojena koncentrační řada v rozmezí  $2 \cdot 10^{-6}$  M a  $1 \cdot 10^{-7}$  M HPTS v deionizované vodě. Toto rozmezí bylo zvoleno díky skutečnosti, že enkapsulační účinnost hydrofilních látek inkorporovaných do lipozomů odpovídá velmi nízkým hodnotám. Z tohoto důvodu je zásadní detekce takto malého množství enkapsulovaného HPTS.

Nejdříve byl připraven zásobní roztok HPTS o koncentraci  $5 \cdot 10^{-5}$  M. Přesným ředěním tohoto zásobního roztoku deionizovanou vodou vznikly v čistých a suchých vialkách jednotlivé roztoky koncentrační řady.

## 4.3 Příprava lipozomů

Prvně byl připraven zásobní roztok DPPC v chloroformu o koncentraci 20 mM. Do suché a čisté vialky bylo naváženo přesné množství DPPC, které bylo rozpuštěno v chloroformu. Tento zásobní roztok DPPC byl používán při přípravě všech variant lipozomálních systémů, které se skládaly ze samotného DPPC, ale také z přídavku 30 mol. % cholesterolu, 30 mol. % kyseliny fosfatidové nebo kombinací cholesterolu a kyseliny fosfatidové. Toto zastoupení přídavků bylo zvoleno na základě diplomové práce Ing. Jany Szabové [1].

Do čistých a suchých vialek byly pro přípravu jednotlivých lipozomálních roztoků o různém složení naváženy konkrétní přídavky komponent tak, aby jejich výsledná koncentrace ve vzorku odpovídala zmíněným molárním procentům z celkového množství fosfolipidů. Tyto navážky byly rozpuštěny v zásobním roztoku DPPC v chloroformu. V případě výskytu kyseliny fosfatidové ve vzorku byl navíc přidán methanol pro její úplné rozpuštění. Po odpaření těchto rozpouštědel v digestoři vznikly na stěnách vialek tenké fosfolipidové filmy. Odpařování organických rozpouštědel probíhalo v digestoři po dobu 1,5–2 hodiny. Tyto fosfolipidové filmy byly rehydratovány deionizovanou vodou nebo 0,5 mM roztokem HPTS. Roztok HPTS o koncentraci 0,5 mM pro rehydrataci fosfolipidového filmu byl připraven rozpuštěním příslušného množství HPTS v deionizované vodě. Výsledná koncentrace DPPC ve vzorku činila  $1 \cdot 10^{-3}$  M. Takto vzniklý vzorek byl promíchán na vortexu a následně byl podroben sonifikaci. Energie sonifikace činila 5 kJ, avšak v případě výskytu cholesterolu ve vzorku byla energie zvýšena na 8,3 kJ.

Dalším krokem byla příprava stealth lipozomů. Ke všem těmto variantám lipozomálních systémů byl navíc ještě přidán polyethyleglykol navázaný na fosfatidylethanolamin. K již



naváženým přídávům byl do stejných vialek odvážen PEG<sub>5000</sub>-PE v takovém množství, že jeho výsledná koncentrace činila 6 mol. % z celkového množství fosfolipidů. Jedinou odlišností při přípravě vzorků byla sonifikace ve vodní lázni po dobu 25 minut při teplotě 40–45 °C, a to z toho důvodu tendence PEG<sub>5000</sub>-PE samovolně tvořit ve vodném prostředí micely. Tomu zabráníme přidávkem nižšího množství energie po delší dobu.

Do míchaného roztoku stealth lipozomů (s přidávkem 30 mol. % cholesterolu, 30 mol. % kyseliny fosfatidové a 6 mol. % PEG<sub>5000</sub>-PE) ve vodní lázni při teplotě 10 °C byl po kapkách přidáván roztok trimethylchitosanu v poměru 1:2. Roztok trimethylchitosanu byl připraven rozpuštěním navážky o takovém množství, že jeho výsledná koncentrace činila 0,1 % z celkového množství fosfolipidů. Směs byla nadále míchána po dobu 60 minut při stálém udržování teploty na 10 °C.

#### 4.4 Centrifugace

V případě podezření na vznik velkých agregátů byly připravené roztoky lipozomálních systémů nality do skleněných centrifugačních zkumavek a uzavřeny zátkou. Lipozomální roztoky byly podrobeny centrifugací při 4 000 ot/min po dobu 15 min. Vznik sedimentu byl zhodnocen na základě vizuálního pozorování.

#### 4.5 Dialýza

Pro oddělení neenkapsulovaného podílu HPTS z roztoků lipozomálních systémů byla zvolena dialýza. Dialyzační střívka (cut off: 50 000 Da) byla naplněna roztoky a ponechána dva dny dialyzovat. Dialyzační roztoky byly pravidelně vyměňovány. Po dvou dnech bylo provedeno měření, po kterém byly roztoky vráceny zpět do patřičných dialyzačních střívek a ponechány dialyzovat dalších sedm dní. Tentokrát z důvodu studia uvolňování enkapsulovaného HPTS z lipozomů.

#### 4.6 Měření a zpracování výsledků

Pro charakterizaci a potvrzení vzniku chtěných lipozomálních systémů s enkapsulovaným HPTS bylo využito měření distribuce velikosti částic a zeta potenciálu na přístroji Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Pro určení množství enkapsulovaného HPTS uvnitř lipozomů byl použit fluorescenční spektrometr FS5 (Edinburg Instruments).

Měření velikosti distribuce částic probíhalo ve skleněných kyvetách při teplotě 25 °C s dobou kalibrace vzorku rovné 30 sekundám. Každý vzorek byl proměřen třikrát a z těchto hodnot byl vytvořen průměr. Výsledkem měření byla závislost intenzity rozptýleného světla na velikosti částic. U vzorků, jejichž index polydisperzity byl nižší než 0,5, byla relevantním výsledkem střední velikost částic. V případě, že index polydisperzity byl vyšší než hodnota 0,5, vycházelo se pouze ze srovnávání distribucí částic zastoupených v lipozomálním vzorku.

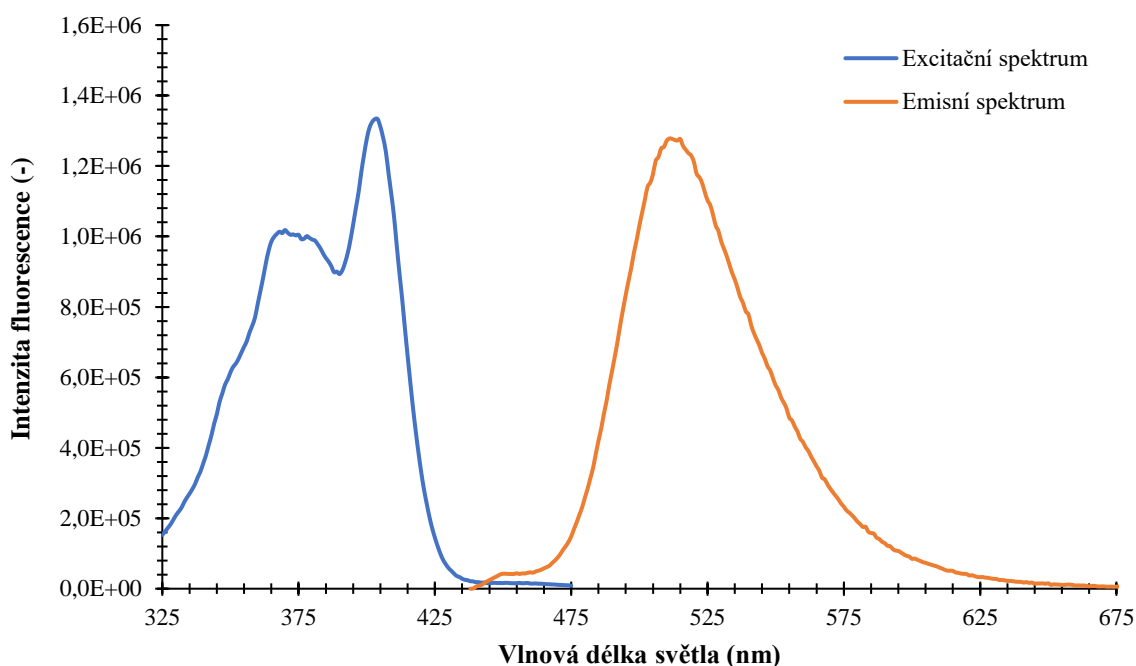
Zeta potenciál byl měřen ve skleněných kyvetách při teplotě 25 °C za pomoci dip cell elektrody. Kalibrace vzorku probíhala 30 sekund. Každý vzorek byl proměřen pětkrát. Výsledná hodnota zeta potenciálu odpovídala průměru těchto pěti měření.

Měření na fluorescenčním spektrometru probíhalo v křemenných kyvetách při laboratorní teplotě. Byla měřena excitační spektra všech roztoků v rozmezí vlnových délek 325–475 nm s emisní vlnovou délkou nastavenou na hodnotu 510 nm (viz obr. 15). Velikost štěrbin činila

0,75 nm. Nejdříve byla proměřena excitační spektra jednotlivých roztoků koncentrační řady HPTS připravených v deionizované vodě. Intenzita fluorescence byla z excitačních spekter odečítána při izobestické vlnové délce o hodnotě 413 nm. Z těchto hodnot byla následně sestrojena kalibrační křivka závislosti intenzity fluorescence na koncentraci roztoků HPTS. Výsledkem měření byla lineární regresní přímka a příslušná regresní rovnice vzniklá proložením naměřených dat. Po prvním i druhém dialyzačním procesu byla měřena excitační spektra připravených lipozomálních systémů s enkapsulovanou fluorescenční sondou HPTS. Ze znalosti regresní rovnice stanovené při kalibraci HPTS byla stanovena koncentrace HPTS uvnitř lipozomů z hodnoty intenzity fluorescence odečtené při izobestické vlnové délce rovné 413 nm. Hodnota enkapsulační účinnosti byla vypočítána jako poměr HPTS enkapsulovaného v lipozomech ku celkovému množství HPTS použitého při rehydrataci fosfolipidové dvojvrstvy. Rovnice pro výpočet enkapsulační účinnosti má tvar:

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

kde  $EE$  značí enkapsulační účinnost,  $C_E$  je vyjadřuje molární koncentraci enkapsulovaného HPTS a  $C_R$  je molární koncentrace HPTS, kterým byl rehydratován fosfolipidový film.

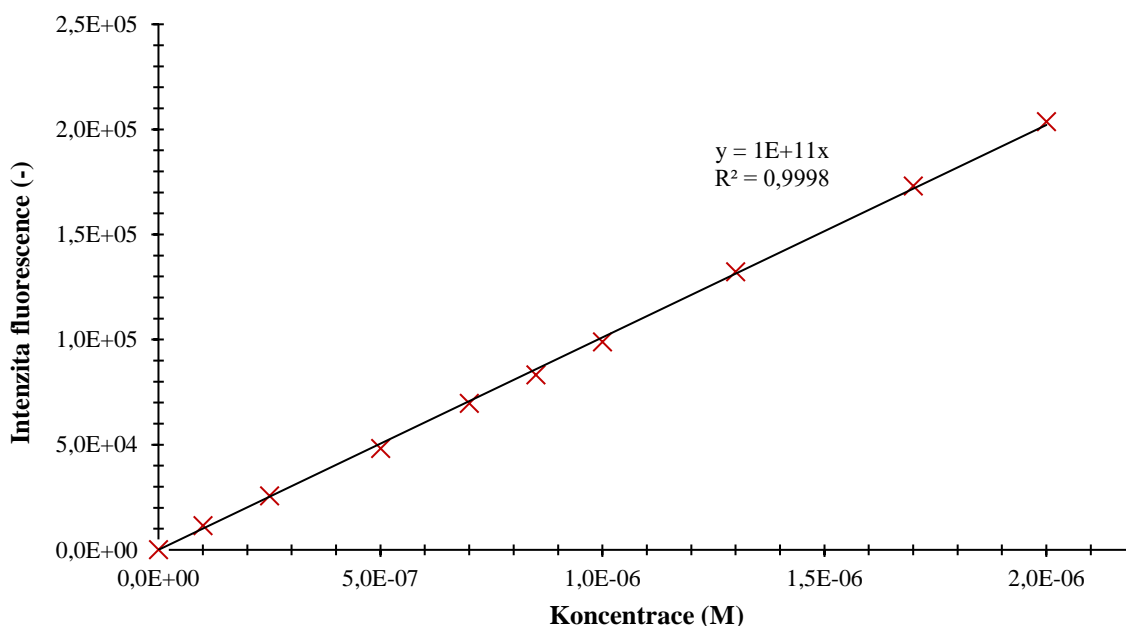


Obr. 15: Excitační a emisní spektrum HPTS

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Kalibrační řada HPTS ve vodě

Pro stanovení enkapsulační účinnosti různých variant lipozomálních systému byla sestrojena kalibrační křivka závislosti intenzity fluorescence při 413 nm na koncentraci jednotlivých roztoků HPTS. Každý roztok o koncentracích v rozmezí  $2 \cdot 10^{-6}$  M a  $1 \cdot 10^{-7}$  M HPTS byl proměřen třikrát, z čehož byl následně sestaven průměr měření a ten byl vyneseno do závislosti.



Obr. 16: Kalibrační křivka závislosti intenzity fluorescence na koncentraci roztoku HPTS včetně chybových úseček

Z obr. 16 je patrné, že kalibrační křivka v oblasti měřených koncentrací vykazuje lineární charakter, tudíž byla sestrojena regresní přímka vycházející z lineární regrese, jejíž přesná hodnota se rovnala:

$$y = 1,01725 \cdot 10^{11} x \quad (2.5)$$

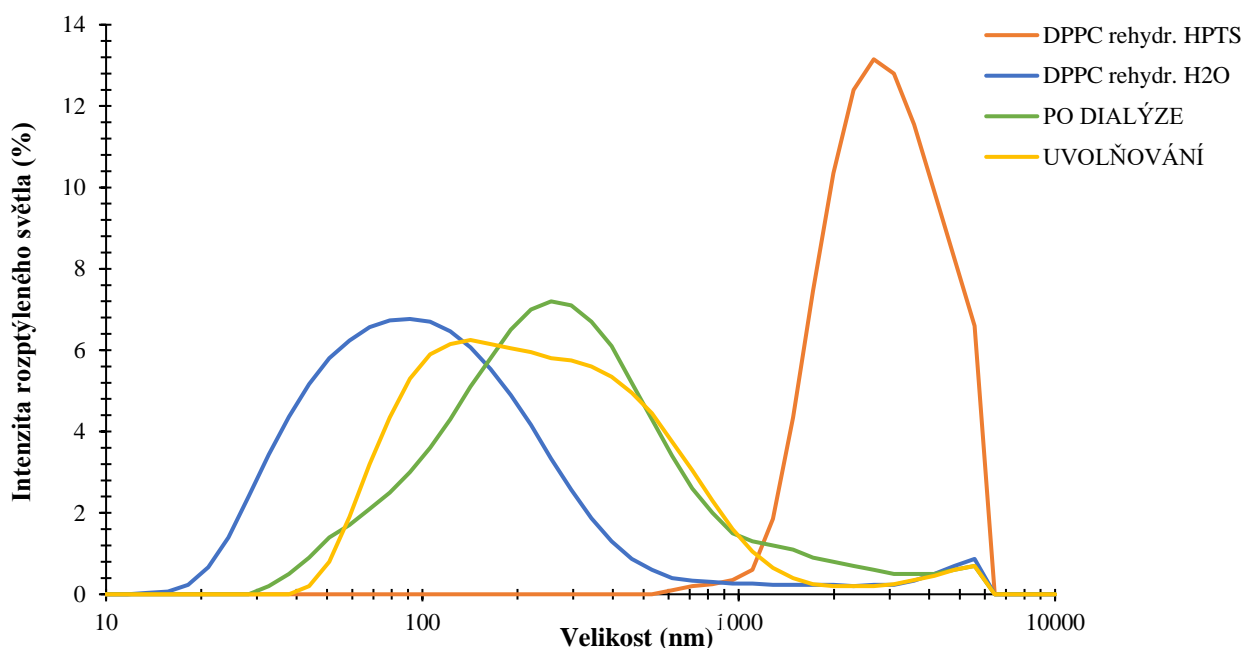
### 5.2 Fyzikálně-chemická charakterizace lipozomů

Jednotlivé varianty lipozomálních systémů byly nejdříve rehydratovány deionizovanou vodou. Toto měření sloužilo jako „blank“ pro charakterizaci chování a vlivu HPTS na velikost a zeta potenciál lipozomů o odlišném složení komponent po jejich rehydrataci 0,5 mM roztokem HPTS.

#### 5.2.1 Lipozomy z DPPC

Rehydratací fosfolipidového filmu deionizovanou vodou se nám podařilo připravit stabilní lipozomy se střední velikostí rovné  $(93 \pm 6)$  nm a zeta potenciálem o hodnotě

( $28,2 \pm 2,8$ ) mV. Naopak střední velikost lipozomů vytvořených rehydratací 0,5 mM roztokem HPTS činila ( $2\,795 \pm 399$ ) nm a zeta potenciál odpovídal hodnotě ( $0,3 \pm 0,4$ ) mV. Zvýšení velikosti lipozomů po rehydrataci roztokem HPTS může být vysvětleno tím, že došlo k interakci mezi kladně nabitou částí hlavičky DPPC (cholinová skupina) a záporným nábojem vyskytujícím se ve struktuře HPTS. To mělo za následek vznik vrstvy HPTS na vnější straně fosfolipidové membrány a vyrovnání nábojů (což je potvrzeno hodnotou zeta potenciálu pohybujícího se kolem nulové hodnoty). Z důvodu značně nestabilní hodnoty zeta potenciálu lze tedy usuzovat, že HPTS podporuje vznik velkých agregátů. Dalším možným vysvětlením markantního zvýšení střední velikosti lipozomů z DPPC s HPTS je ten, že struktura HPTS ovlivnila samotný proces tvorby lipozomů [107].



Obr. 17: Distribuce velikosti lipozomů z DPPC

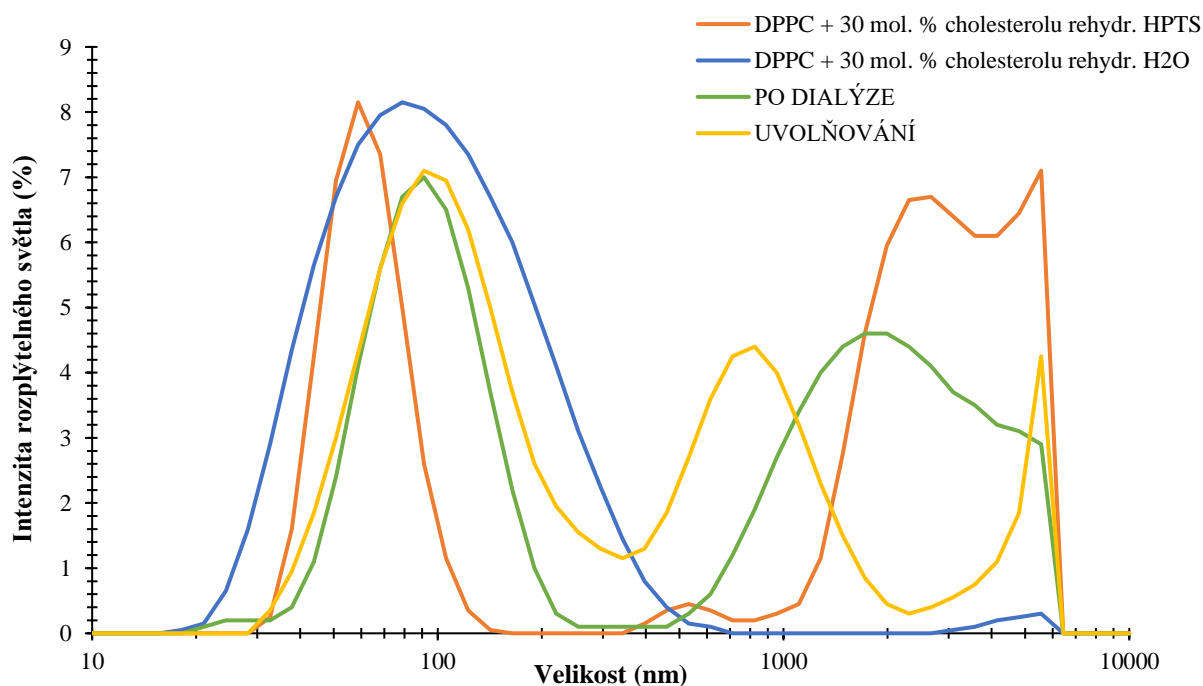
Jak je patrné z obr. 17, po první dialýze HPTS se velikost lipozomů snížila na střední velikost rovnou ( $210 \pm 7$ ) nm a zeta potenciál byl ( $-4,9 \pm 3,7$ ) mV. Vysvětlení nám poskytuje skutečnost, že velké agregáty sedimentovaly na dně dialyzačního střeva. Tato skutečnost byla experimentálně potvrzena při centrifugaci roztoku. Vznik sedimentu potvrzuje obr. 25 v příloze. Při měření se vycházelo pouze z měření supernatantu, což by také vysvětlovalo růst zeta potenciálu po první i po druhé dialýze do záporných hodnot. Proto i po druhé dialýze, která trvala sedm dní, se střední velikost lipozomů opět snížila na hodnotu ( $185 \pm 2$ ) nm a zeta potenciál na ( $-15,5 \pm 4,8$ ) mV.

### 5.2.2 Lipozomy z DPPC s přídavkem 30 mol. % cholesterolu

Při rehydrataci fosfolipidového filmu obsahujícího DPPC a cholesterol deionizovanou vodou vznikly lipozomy se střední velikostí ( $82 \pm 7$ ) nm a zeta potenciálu ( $12,5 \pm 2,4$ ) mV. Cholesterol má tendenci obnažovat záporně nabitě části (fosfátové skupiny) fosfolipidových hlaviček DPPC, proto při rehydrataci fosfolipidového filmu vodou vznikají částice o nižším

zeta potenciálu, než tomu bylo v případě samotného DPPC. Snížení střední velikosti lipozomálních částic může být vysvětleno stabilizací, kdy cholesterol zvyšuje tuhost membrány. Pokles může být také objasněn jiným agregačním chováním DPPC v přítomnosti cholesterolu, který nebývá na fosfolipidové dvojvrstvě distribuován rovnoměrně [107]. Po navázání HPTS byl zeta potenciál ještě nižší pravděpodobně díky vazbě HPTS na kladné části DPPC, které nebyly ovlivněny přítomností cholesterolu. Z hlediska polydisperzity systému není možné velikost klasifikovat na základě střední velikosti částic, proto přihlížíme pouze k distribuci velikostí vzniklých lipozomů.

Jak lze pozorovat z *obr. 18*, HPTS ve styku s cholesterolem podmiňuje vznik dvou frakcí. Avšak odstraněním části neenkapsulovaného podílu HPTS se vyšší frakce posune k menším velikostem. To platí i v případě uvolňování HPTS ze středu lipozomů při druhé dialýze. Vysvětlením může být opět to, že frakce s vyšší velikostí sedimentovala (potvrzeno centrifugací), a proto se při dalších měřeních vycházelo pouze z měření supernatantu. To mělo opět za následek růst zeta potenciálu do nižších hodnot rovných  $(-10,4 \pm 1,4)$  mV a  $(-20,3 \pm 2,8)$  mV, z čehož vyplývá, že se stabilita systému v supernatantu zvyšovala.



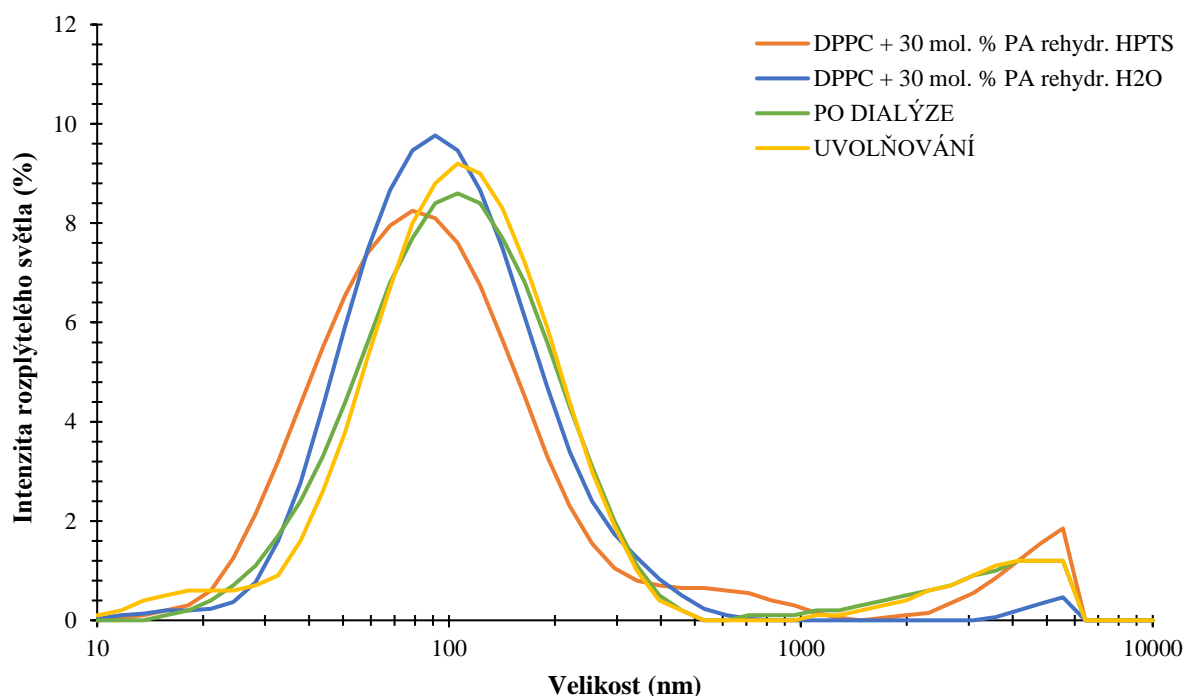
*Obr. 18: Distribuce velikostí lipozomů z DPPC a cholesterolu*

### 5.2.3 Lipozomy z DPPC s přídavkem 30 mol. % PA

Po rehydrataci fosfolipidového filmu deionizovanou vodou vznikly lipozomy o střední velikosti odpovídající  $(87 \pm 7)$  nm a zeta potenciálu o hodnotě  $(-38,3 \pm 2,5)$  mV. Při rehydrataci roztokem HPTS se vytvořily lipozomy se střední velikostí odpovídající  $(84 \pm 7)$  nm a zeta potenciálu o hodnotě  $(-46,1 \pm 5,4)$  mV. V obou případech vznikly stabilní systémy, které se v rámci odchylek velikostně nelišily. Ačkoliv by se měla kyselina fosfatidová vyskytovat na vnitřním povrchu lipozomů [108, 109], enkapsulace souhlasně nabitého HPTS a menší prostor uvnitř lipozomů může nutit větší část kyseliny fosfatidové

navázat se spíše na vnější povrch. Tomu odpovídá značné snížení zeta potenciálu. Záporný náboj kyseliny fosfatidové vlivem odpudivých sil zabránil vazbě většího množství HPTS na vnější stranu lipozomů – neovlivnění agregačního procesu. Odpudivé síly mezi souhlasnými náboji jsou zodpovědné za vznik menších částic než v případě lipozomů skládajících se pouze z DPPC.

Po první dialýze a odstranění neenkapsulovaného podílu HPTS se střední velikost lipozomů zvýšila na  $(96 \pm 1)$  nm a zeta potenciál se také zvýšil na  $(-32,1 \pm 2,1)$  mV. Důvodem zvětšení lipozomů může být úbytek odpudivých sil působících mezi HPTS a kyselinou fosfatidovou ve struktuře lipozomu. V rámci odchylek zeta potenciálů docházelo pouze k jeho malé změně, a to díky možnosti odstranění určitého množství HPTS, které mohlo být vázáno na cholinové skupině DPPC. Po druhé dialýze byla velikost lipozomů nepatrně větší – činila  $(99 \pm 1)$  nm. Zeta potenciál se však nepatrně zvýšil na  $(-26,9 \pm 0,5)$  mV. Tento pokles mohl být způsoben buď úplným odstraněním HPTS vázaného na kladný náboj DPPC, nebo uvolněním části HPTS enkapsulovaného uvnitř vodného středu lipozomu. Distribuce velikostí zůstala zachována, což je zjevné z obr. 19.



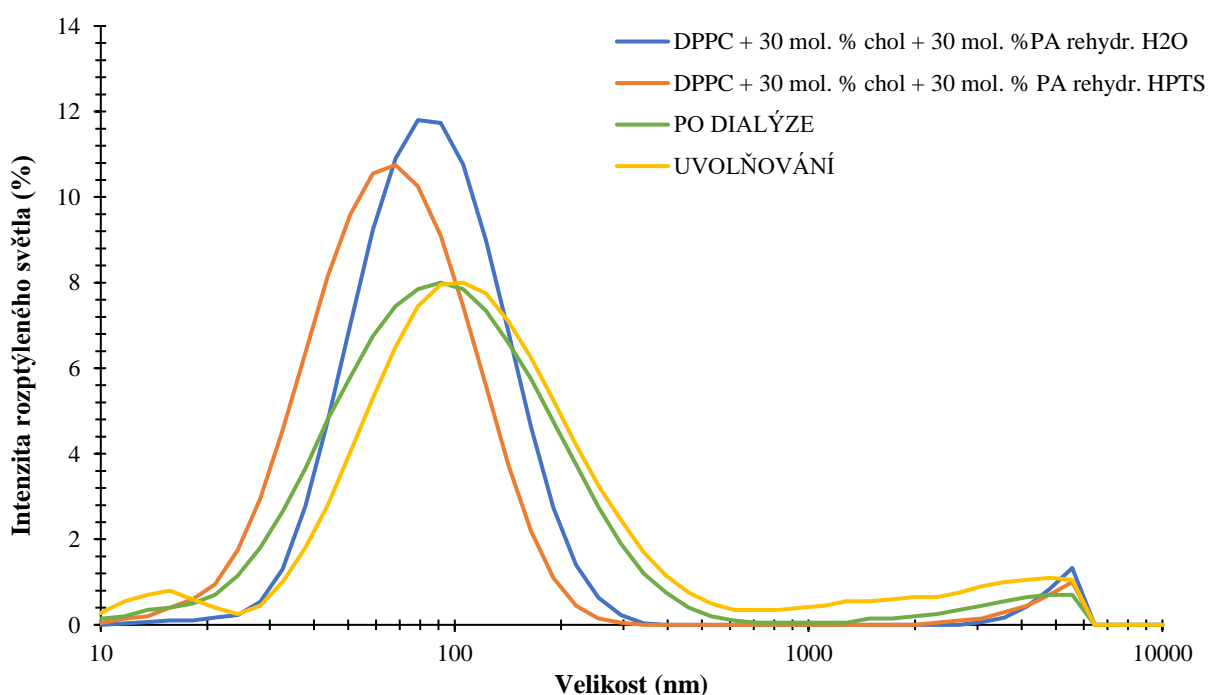
Obr. 19: Distribuce velikosti lipozomů z DPPC a PA

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

Po přidavku 30 mol. % cholesterolu a 30 mol. % kyseliny fosfatidové se nám rehydratací v deionizované vodě podařilo připravit lipozomy se střední velikostí částic o hodnotě  $(87 \pm 2)$  nm a hodnotou zeta potenciálu rovnou  $(-60,5 \pm 7,1)$  mV. Střední velikost částic vzniklých rehydratací fosfolipidového filmu roztokem HPTS činila  $(61 \pm 5)$  nm a zeta potenciál byl roven  $(-57,1 \pm 4,9)$  mV. Hodnoty zeta potenciálů se pohybují ve stabilních záporných hodnotách, které jsou způsobeny přítomností cholesterolu obnažujícího fosfátovou skupinu na fosfolipidu DPPC a přítomností kyseliny fosfatidové, která má sama o sobě

záporný náboj. Z toho vychází také skutečnost, že velikost lipozomů s enkapsulovaným HPTS má menší velikost oproti lipozomům rehydratovanými vodou. Je to způsobené velmi silnými odpudivými silami mezi obnaženým záporným nábojem povrchu lipozomů a záporným nábojem HPTS. V porovnání s lipozomy, v jejichž struktuře se nachází pouze kyselina fosfatidová, jsou tyto odpudivé síly značně silnější, proto je i velikost těchto lipozomů v porovnání s nimi o něco menší. To samozřejmě platí i pro srovnání s lipozomy, které mají ve své struktuře inkorporovaný cholesterol.

Po odstranění neenkapsulovaného podílu HPTS se odpudivé síly snížily, proto došlo ke zvětšení lipozomů na hodnotu  $(78 \pm 2)$  nm. Vlivem toho se zvýšil i zeta potenciál na hodnotu  $(-28,3 \pm 1,4)$  mV. Při studiu uvolňování HPTS z lipozomů byla jejich střední velikost stanovena na  $(98 \pm 6)$  nm a zeta potenciál na  $(-23,6 \pm 1,9)$  mV. Nárůst velikosti po druhé dialýze je důsledkem dalšího snížení odpudivých sil vlivem odstranění části enkapsulovaného HPTS z vodného středu lipozomů. V obou případech došlo k výraznému nárůstu zeta potenciálu pod hodnotu stability, což má za následek rozšíření distribuce velikosti částic (viz obr. 20). Každopádně se nám podařilo z hlediska vlastností připravit částice vhodné pro přidavek PEG<sub>5000</sub>-PE a trimethylchitosanu.



Obr. 20: Distribuce velikosti lipozomů z DPPC, cholesterolu a PA

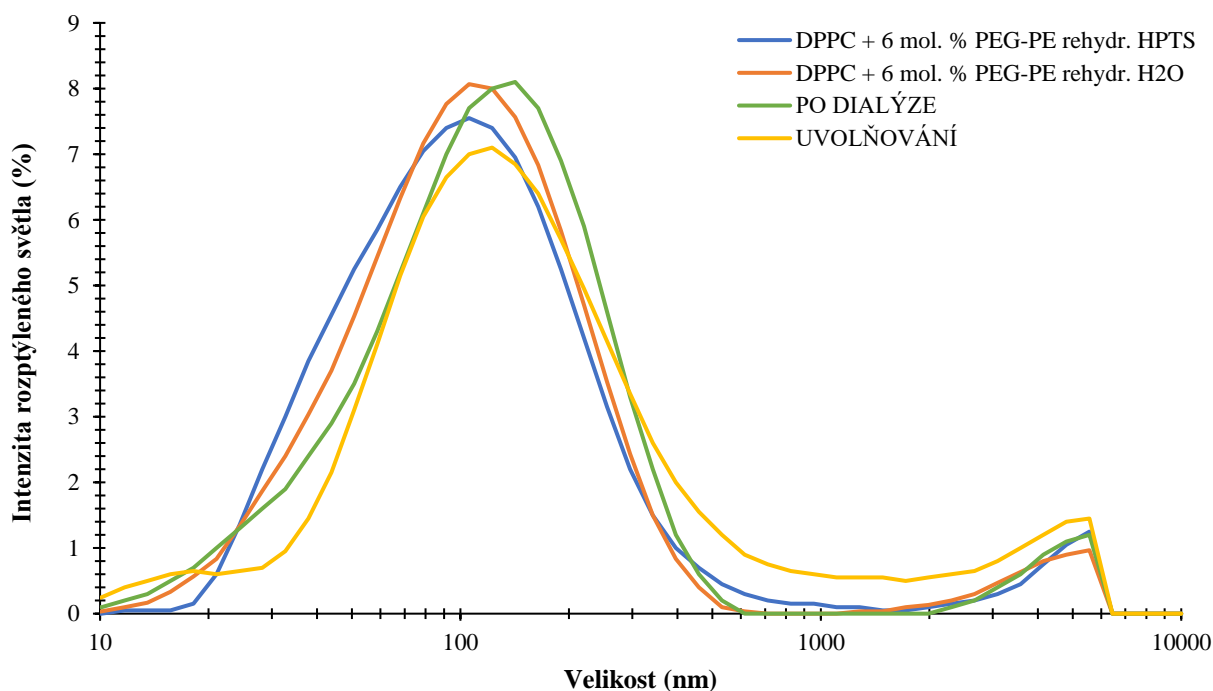
### 5.2.5 Lipozomy z DPPC s přidavkem 6 mol. % PEG<sub>5000</sub>-PE

Přidavkem 6 mol. % polyethylenglykolu navázaného na fosfatidylethanolamin a rehydratací v deionizované vodě se nám podařilo připravit lipozomy se střední velikostí odpovídající  $(87 \pm 2)$  nm a zeta potenciálu  $(-0,2 \pm 0,7)$  mV. V porovnání s lipozomy složenými pouze z DPPC se zeta potenciál pohybuje kolem nulové hodnoty z důvodu schopnosti PEG<sub>5000</sub>-PE překrýt povrchový náboj lipozomů. Lipozomy jsou tak chráněny proti opsonizaci a vychytávání makrofágy v krevním oběhu organismu [6]. Navíc došlo i k poklesu



střední velikosti v porovnání s lipozomy bez přídavku polyethylenglykolu, což je zapříčiněno sterickou a elektrostatickou stabilizací, která zahrnuje orientaci molekul vody kolem hydrofilní hlavičky fosfolipidu PEG<sub>5000</sub>-PE [108]. Po rehydrataci fosfolipidové membrány roztokem HPTS se velikost ani zeta potenciál lipozomů v rámci odchylek nezměnila. Hodnota střední velikosti činila  $(87 \pm 6)$  nm a zeta potenciál  $(-3,3 \pm 2,5)$  mV.

Po první dialýze vznikly lipozomy se střední velikostí rovnou  $(95 \pm 3)$  nm a zeta potenciálu  $(-15,4 \pm 0,7)$  mV. Po postupném uvolňování HPTS z vodného středu lipozomů byla jejich střední velikost stanovena na  $(111 \pm 7)$  nm a zeta potenciál na  $(-23,3 \pm 5,2)$  mV. Zvětšení velikosti lipozomů pravděpodobně nastalo díky nedostatečné stabilitě systému a možná také díky tomu, že odstraněním záporného náboje z okolí lipozomů došlo ke snížení odpudivých sil. Dialyzací kromě snížení stabilizace mohlo dojít i k poklesu „stealth“ vlastností lipozomů, proto se mohl projevit záporný náboj fosfátové skupiny DPPC, což by vysvětlovalo postupný pokles zeta potenciálu po první i po druhé dialýze. Odchylka v měření mohla být způsobena tím, že se zeta potenciál odečítá na rovině skluzu, která se mohla nacházet ve vrstvě PEG<sub>5000</sub>-PE, nebo tím, že postup přípravy těchto lipozomů byl částečně odlišný v porovnání s lipozomy bez přídavku PEG<sub>5000</sub>-PE. K přípravě se využívala vodní lázeň s nižší energií, aby se v roztoku nevytvořily micely. Jak si můžeme všimnout na *obr. 21*, po druhé dialýze se distribuce velikostí lipozomů zvýšila vznikem malého podílu větších částic (0,5–5 μm).



*Obr. 21: Distribuce velikosti lipozomů z DPPC a PEG<sub>5000</sub>-PE*

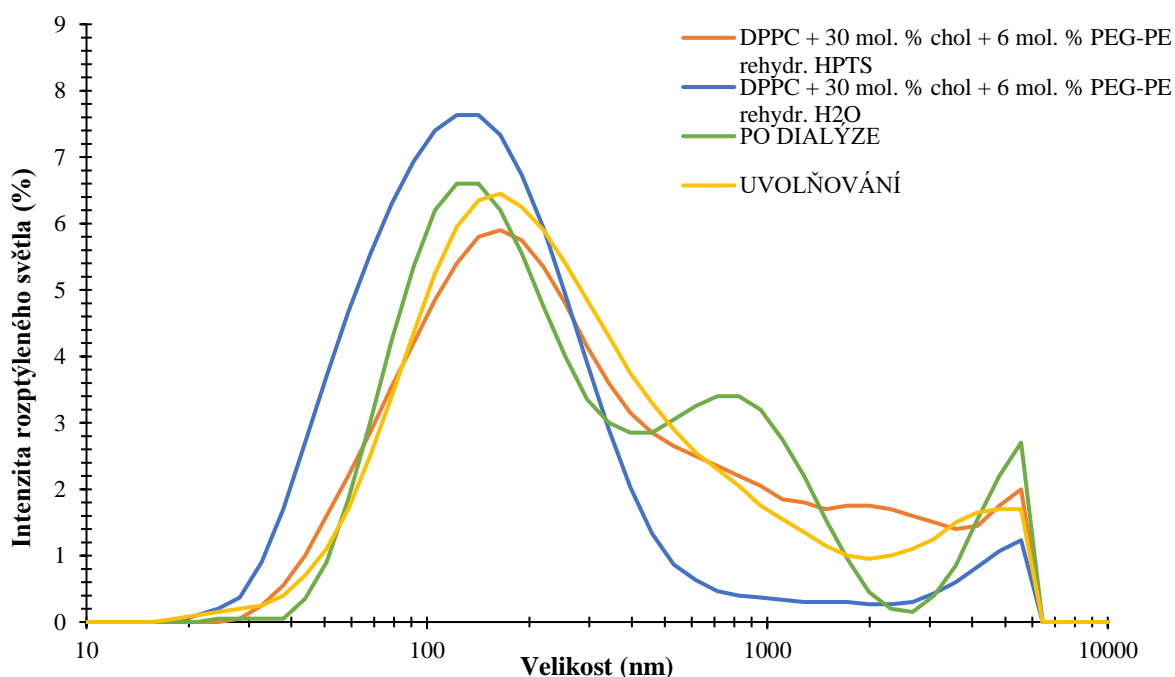
### 5.2.6 Lipozomy z DPPC s přídavkem 30 mol. % cholesterolu a 6 mol. % PEG<sub>5000</sub>-PEG

Přídavkem 6 mol. % polyethylenglykolu navázaného na fosfatidylethanolamin k cholesterolu a DPPC se při rehydrataci fosfolipidového filmu deionizovanou vodou vytvořily lipozomy se střední velikostí o hodnotě  $(120 \pm 10)$  nm a zeta potenciálem



odpovídajícímu hodnotě  $(-0,8 \pm 2,6)$  mV. Porovnáním s lipozomy, které ve své struktuře měly inkorporovaný pouze cholesterol, lze konstatovat, že snížení zeta potenciálu k nulové hodnotě má za následek překrytí náboje lipozomů polyethylenglykolem. Velikost je o něco vyšší kvůli vzniku vrstvy polyethylenglykolu na povrchu lipozomů nebo díky jinému způsobu agregace vlivem více složek lipozomů [107]. Z hlediska polydisperzity není možné posuzovat velikost lipozomů připravených po rehydrataci fosfolipidového filmu roztokem HPTS na základě střední velikosti, nýbrž podle distribuce velikostí zastoupených částic.

Jak je patrné na *obr. 22*, rehydratací fosfolipidového filmu roztokem HPTS vznikly lipozomy se širší distribucí velikostí. Avšak zeta potenciál těchto lipozomů odpovídal hodnotě  $(-9,2 \pm 0,8)$  mV, a to pravděpodobně díky tomu, že cholesterol má tendenci obnažovat fosfátové skupiny fosfolipidů do vnějšího prostředí [108]. Vlivem nestability systému lipozomy upřednostnily vznik větších částic. Po první dialýze vznikly stabilnější lipozomy se zeta potenciálem, jehož hodnota byla rovna  $(-20,8 \pm 2,9)$  mV, a po druhé dialýze zeta potenciál dále klesl na hodnotu  $(-34,4 \pm 0,9)$  mV. Klesající hodnoty zeta potenciálu mohou být opět vysvětleny vznikem agregátů. Lze tedy s jistotou konstatovat, že pro to, aby lipozomy neagregovaly a vykazovaly vyšší stabilitu, by bylo nutné použít vyšší koncentraci PEG<sub>5000</sub>-PE. Nepřesnost měření může být způsobena tím, že se zeta potenciál odečítal na rovině skluzu, která se mohla nacházet ve vrstvě PEG<sub>5000</sub>-PE, nebo tím, že postup přípravy těchto lipozomů byl částečně odlišný v porovnání s lipozomy bez přídavku PEG<sub>5000</sub>-PE.



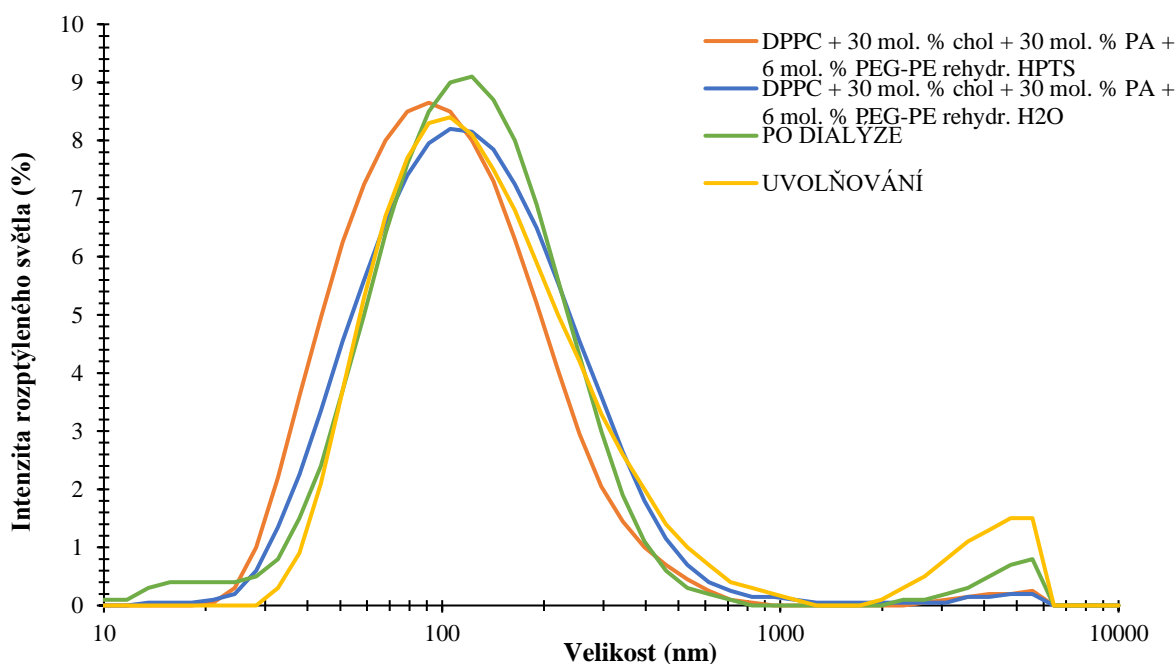
*Obr. 22: Distribuce velikosti lipozomů z DPPC, cholesterolu a PEG<sub>5000</sub>-PE*

### 5.2.7 Lipozomy z DPPC s přídavkem 30 mol. % cholesterolu, 30 mol. % PA a 6 mol. % PEG<sub>5000</sub>-PE

Po rehydrataci fosfolipidové dvojvrstvy stealth lipozomů s přídavkem cholesterolu a kyseliny fosfatidové deionizovanou vodou byly připraveny lipozomy se střední velikostí odpovídající  $(102 \pm 9)$  nm a zeta potenciálem o hodnotě  $(-5,5 \pm 3,4)$  mV. Oproti lipozomům

připraveným bez přídavku polyethylenglykolu je nárůst velikosti značný pravděpodobně kvůli tvorbě vrstvy PEG na povrchu lipozomů či jiného agregačního chování vlivem více složek lipozomů [107]. Rehydratací fosfolipidové dvojvrstvy roztokem HPTS však vznikají lipozomy o velikosti nepatrně menší. Hodnota střední velikosti lipozomů činila  $(85 \pm 4)$  nm a zeta potenciál odpovídal hodnotě  $(-12,2 \pm 0,3)$  mV. Odpuzivé síly mezi souhlasnými náboji HPTS a povrchem lipozomů s inkorporovaným cholesterolem obnažujícím fosfátové skupiny a zápornou kyselinou fosfatidovou měly za následek jak mírný pokles střední velikosti, tak pokles zeta potenciálu.

Odstraněním části neenkapsulovaného podílu HPTS se lipozomy zvětšily na hodnotu  $(102 \pm 4)$  nm a zeta potenciál opět poklesl na hodnotu  $(-26,4 \pm 1,4)$  mV, ve které již lipozomy vykazují určitou stabilitu. Druhá dialýza způsobila další nárůst střední velikosti lipozomů na hodnotu  $(119 \pm 3)$  nm a pokles zeta potenciálu na  $(-30,6 \pm 2,4)$  mV. Enkapsulace záporně nabitého HPTS pravděpodobně vyvolalo inkorporaci většiny kyseliny fosfatidové a cholesterolu do vnější fosfolipidové vrstvy, což způsobilo nárůst velikosti lipozomů i pokles zeta potenciálu do stabilních hodnot. Je nutné zmínit, že zeta potenciál mohl být měřen na rovině skluzu, která se vyskytovala uvnitř vrstvy polyethylenglykolu. Lze tedy poznamenat, že v případě rehydratace fosfolipidového filmu roztokem HPTS nebyla koncentrace PEG<sub>5000</sub>-PE dostatečná, aby překryla povrchový náboj stealth lipozomů. Distribuce velikostí po první i druhé dialýze zůstala zachována, jak je patrné z obr. 23.



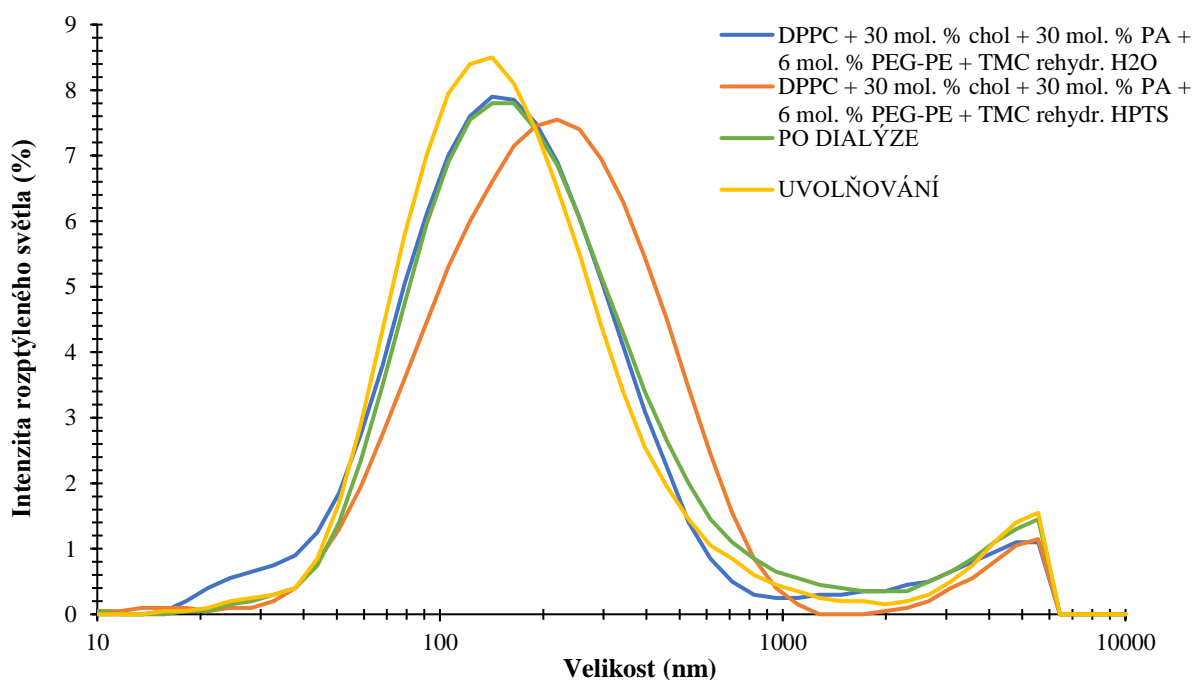
Obr. 23: Distribuce velikostí lipozomů z DPPC, cholesterolu, PA a PEG<sub>5000</sub>-PE

### 5.2.8 Lipozomy z DPPC s přídavkem 30 mol. % cholesterolu, 30 mol. % PA, 6 mol. % PEG a 0,1 % TMC

Po rehydrataci fosfolipidového filmu stealth lipozomů deionizovanou vodou a kombinací s trimethylchitosanem se nám podařilo připravit lipozomální komplex se střední velikostí odpovídající hodnotě  $(139 \pm 3)$  nm. Zeta potenciál nabýval stability dané hodnotou

( $34,2 \pm 1,4$ ) mV, která potvrzuje vazbu trimethylchitosanu na záporné komponenty fosfolipidové dvojvrstvy. Tvorba vrstvy trimethylchitosanu na povrchu stealth lipozomů měla za následek zvýšení jejich střední velikosti a posun distribuce velikostí k vyšším hodnotám. Rehydratací roztokem HPTS se střední velikost lipozomů změnila na ( $167 \pm 5$ ) nm a zeta potenciál klesl na ( $14,9 \pm 2,6$ ) mV. Tato změna střední velikosti a zeta potenciálu oproti lipozomům rehydratovanými deionizovanou vodou byla vyvolána interakcí HPTS s kladně nabitým trimethylchitosanem. Tuto skutečnost znázorňuje rozšíření distribuce velikostí lipozomů po rehydrataci fosfolipidového filmu roztokem HPTS na *obr. 24*.

Oddialyzování neenkapsulovaného podílu HPTS z lipozomálního roztoku vedlo ke vzniku lipozomů s menší střední velikostí odpovídající hodnotě ( $156 \pm 3$ ) nm. Důvodem této změny je odstranění přebytečného HPTS navázaného na trimethylchitosanu, což také zvýšilo hodnotu zeta potenciálu na ( $20,2 \pm 0,8$ ) mV. Po druhé dialýze, ve které došlo k uvolňování části HPTS enkapsulovaného uvnitř vodného středu lipozomů, se střední velikost lipozomů odpovídající hodnotě ( $151 \pm 3$ ) nm v rámci odchylek nesnížila. Avšak zeta potenciál se zvýšil na hodnotu rovnou ( $36,7 \pm 2,9$ ) mV, čímž systém dosáhl značné stability. S jistotou můžeme konstatovat, že se nám podařilo připravit vhodný systém pro potencionální využití při inhalačním podání léčiv. Díky stabilitě, velikosti a kladnému náboji komplexu lipozom-TMC by se měl lipozom bez problému dostat přes těsné spoje plicních alveol přímo do krve.



*Obr. 24: Distribuce velikostí lipozomů z DPPC, cholesterolu, PA, PEG<sub>5000</sub>-PE a TMC*

### 5.3 Enkapsulační účinnost lipozomů

Intenzita fluorescence po první dialýze byla u každého vzorku změřena třikrát. Z těchto měření byl stanoven průměr, z něhož byla na základě znalosti kalibrační křivky uvedené v kapitole 5.1 zjišťována koncentrace HPTS enkapsulovaného uvnitř vodného středu lipozomů složených z odlišných komponent. Enkapsulační účinnost byla spočítána podle vzorce uvedeného v kapitole 4.6. Výsledky uvádí následující *tab. 1*.

Tab. 1: Enkapsulační účinnost jednotlivých lipozomálních systémů po první dialýze

LIPOZOMÁLNÍ SYSTÉM	n (%)
DPPC	5,66 ± 0,02
DPPC + 30 mol. % cholesterolu	6,49 ± 0,41
DPPC + 30 mol. % PA	13,74 ± 0,20
DPPC + 30 mol. % cholesterolu + 30 mol. % PA	7,25 ± 0,17
DPPC + 6 mol. % PEG <sub>5000</sub> -PE	3,49 ± 0,39
DPPC + 30 mol. % cholesterolu + 6 mol. % PEG <sub>5000</sub> -PE	6,87 ± 0,26
DPPC + 30 mol. % cholesterolu + 30 mol. % PA + 6 mol. % PEG <sub>5000</sub> -PE	9,71 ± 0,02
DPPC + 30 mol. % cholesterolu + 30 mol. % PA + 6 mol. % PEG <sub>5000</sub> -PE + TMC	9,79 ± 0,02

Přídavek cholesterolu k základní komponentě DPPC zvýšil enkapsulační účinnost vlivem schopnosti cholesterolu ztuzit fosfolipidovou dvojvrstvu, což do určité míry zabránilo úniku sondy z vodného středu při první dialýze. Jak si můžeme všimnout, nejvyšší enkapsulační účinnost byla naměřena u lipozomálního systému skládajícího se z DPPC a přídavku 30 mol. % kyseliny fosfatidové. Enkapsulace HPTS pravděpodobně způsobila umístění většiny kyseliny fosfatidové do vnější lipozomální dvojvrstvy. Menší část kyseliny fosfatidové se vyskytovala na vnitřní vrstvě. Tyto odpuzivé síly mezi souhlasně nabitou vnitřní fosfolipidovou vrstvou a strukturou HPTS zpomalily únik většího množství enkapsulovaného HPTS. Kombinace přídavku cholesterolu a kyseliny fosfatidové vedla v porovnání s lipozomy z DPPC a cholesterolu k navýšení enkapsulační účinnosti pravděpodobně kvůli zápornému náboji na kyselině fosfatidové. V porovnání s lipozomy z DPPC a kyseliny fosfatidové došlo inkorporací cholesterolu ke snížení enkapsulační účinnosti. Roli v tomto snížení může hrát jiný agregační mechanismus lipozomů, který mohl způsobit enkapsulaci menšího množství HPTS, nebo příliš vysoký záporný náboj, který je ovlivněn jak přítomností cholesterolu, tak kyseliny fosfatidové. Nejnižší enkapsulační účinnost byla stanovena u DPPC s přídavkem 6 mol. % PEG<sub>5000</sub>-PE, a to s největší pravděpodobností díky jeho schopnosti skrýt náboj fosfolipidové dvojvrstvy. Usuzujeme inkorporaci malé části PEG<sub>5000</sub>-PE na vnitřní stranu, kvůli které byla vazba HPTS do vodného středu ze všech variant lipozomálních systémů nejobtížnější. U ostatních stealth lipozomů byla enkapsulační účinnost vyšší než v případě lipozomů o stejném složení bez přítomnosti polyethylenglykolu. Stealth lipozomy s inkorporovaným cholesterolem byly chráněny před nadbytečným uvolňováním HPTS při první dialýze ztuzením a vrstvou polyethylenglykolu. V případě stealth lipozomů s přídavkem cholesterolu a kyseliny fosfatidové již problém s enkapsulací nenastává vlivem pokrytí povrchového náboje lipozomů polyethylenglykolem. Míra uvolnění bude pravděpodobně z hlediska ztuzení, přítomnosti záporných komponent a vrstvě polyethylenglykolu nejnižší. Přídavek trimethylchitosanu k vytvořeným stealth lipozomům mírně pozitivně ovlivnil enkapsulaci HPTS. Záporně nabitý HPTS se mohlo navázat na kladné náboje trimethylchitosanu a ovlivnit tak enkapsulační účinnost. Nicméně tyto molekuly modelového léčiva nejsou enkapsulované ve vodném středu lipozomů.

## 5.4 Uvolňování HPTS z lipozomů

Po druhé dialýze byla intenzita fluorescence jednotlivých lipozomálních systémů proměřena opět třikrát. Z těchto měření byl sestaven průměr a ze znalosti kalibrační křivky uvedené v kapitole 5.1 byla vypočítána zbylá koncentrace HPTS uvnitř lipozomů. Množství oddialyzovaného HPTS bylo určeno z poměru koncentrací HPTS enkapsulovaného v lipozomech po druhé dialýze a koncentrace HPTS enkapsulovaného v lipozomech při první dialýze. V tab. 2 jsou uvedeny koncentrace HPTS jednotlivých lipozomálních systémů, které i po druhém dialyzačním procesu zůstalo v lipozomech.

Tab. 2: Zůstatek HPTS v jednotlivých lipozomálních systémech po druhé dialýze

LIPOZOMÁLNÍ SYSTÉM	n (%)
DPPC	62,8 ± 0,4
DPPC + 30 mol. % cholesterolu	78,9 ± 1,1
DPPC + 30 mol. % PA	79,4 ± 0,3
DPPC + 30 mol. % cholesterolu + 30 mol. % PA	88,7 ± 1,7
DPPC + 6 mol. % PEG <sub>5000</sub> -PE	78,4 ± 0,1
DPPC + 30 mol. % cholesterolu + 6 mol. % PEG <sub>5000</sub> -PE	84,3 ± 1,0
DPPC + 30 mol. % cholesterolu + 30 mol. % PA + 6 mol. % PEG <sub>5000</sub> -PE	93,5 ± 0,1
DPPC + 30 mol. % cholesterolu + 30 mol. % PA + 6 mol. % PEG <sub>5000</sub> -PE + TMC	93,6 ± 0,5

Nejvyšší míru uvolnění HPTS vykazuje lipozomální systém složený pouze z DPPC, a to kvůli rovnoměrnému rozložení kladného a záporného náboje. Nic tedy nebrání průniku HPTS přes membránu. To se však mění přidáním komponent. Přidání cholesterolu způsobuje ztužení fosfolipidové dvojvrstvy, jak už bylo řečeno dříve, proto je pro HPTS obtížnější přes ni projít. Uvolňování HPTS z vodného středu lipozomů zpomalila přítomnost záporně nabitých kyselin fosfatidových vlivem dostatečně silných odpudivých sil mezi HPTS a kyselinou fosfatidovou. Kombinací těchto dvou komponent došlo k navýšení HPTS, které zůstalo v lipozomech enkapsulováno. Vysvětlením je s největší pravděpodobností opět ztužení této vrstvy cholesterolem a inkorporace kyseliny fosfatidové. To znemožňuje odstranění HPTS vlivem jeho snížené schopnosti projít přes souhlasně nabitou fosfolipidovou dvojvrstvu. Přidání PEG<sub>5000</sub>-PE nejspíše nadále snižuje množství oddialyzovaného HPTS oproti lipozomům z DPPC. Hlavním důvodem je tvorba vrstvy polyethylenglykolu na povrchu těchto lipozomů. Co se týká stealth lipozomů s přidáním cholesterolu a kyseliny fosfatidové, systém vykazuje minimální uvolnění HPTS, a to díky přítomnosti všech tří složek, které vyvolaly synergický efekt. Po přidání trimethylchitosanu k těmto lipozomům nedošlo k žádné změně zadržení fluorescenční sondy. Množství HPTS, které zůstalo enkapsulované uvnitř lipozomů po druhé dialýze, bylo totožné jako v případě stealth lipozomů o stejném složení bez přidání TMC. Lze konstatovat, že přidání trimethylchitosanu neovlivnil dialyzační proces modelového léčiva.

## 6 ZÁVĚR

Při řešení bakalářské práce se nám podařilo splnit všechny zadané cíle. Na základě literární rešerše jsme zvolili jako vhodnou metodu pro enkapsulaci hydrofilních látek metodu rehydratace fosfolipidového filmu. Podařilo se nám vytvořit standardní operační postup pro enkapsulaci hydrofilních látek. Rozhodli jsme se, že základní komponentu lipozomů bude tvořit DPPC, který byl zvolen z toho důvodu, že je nejhojněji zastoupeným fosfolipidem nacházejícím se v surfaktantu plicních alveol. K této základní komponentě byl přidán cholesterol pro zajištění stability, záporná kyselina fosfatidová jako pilíř pro navázání trimethylchitosanu, polyethyleglykol navázaný na fosfatidylethanolamin pro zajištění prodloužené cirkulace v krvi a nakonec trimethylchitosan. Důležitou vlastností trimethylchitosanu je schopnost díky jeho kladnému náboji přejít přes těsné spoje z plic do krve. Hlavní náplní bylo zkoumání vlivu jednotlivých komponent lipozomálního systému na enkapsulační účinnost fluorescenční sondy HPTS.

První lipozomální systém byl tvořen pouze základní komponentou DPPC. HPTS v tomto případě podmínilo vznik velkých agregátů, které sedimentovaly. Enkapsulační účinnost lipozomů činila ( $5,66 \pm 0,02$ ) % z původního množství HPTS, kterým byl rehydratován fosfolipidový film. Tato hodnota enkapsulační účinnosti odpovídá tomu, že DPPC má ve fosfolipidové dvojvrstvě rovnoměrně rozložený kladný i záporný náboj a není stabilizován. Z tohoto důvodu docházelo k vysokému uvolnění enkapsulovaného HPTS i během druhé dialýzy. Enkapsulováno zůstalo pouze ( $62,8 \pm 0,4$ ) % HPTS.

Jako první přídavek byl zvolen cholesterol, po jehož inkorporaci do fosfolipidové dvojvrstvy vznikly lipozomy s HPTS o dvou frakcích. Vyšší frakce v průběhu první dialýzy sedimentovala, proto se i v tomto případě vycházelo z měření supernatantu. Přídavek cholesterolu zvýšil enkapsulační účinnost na ( $6,49 \pm 0,41$ ) %. Důvodem je schopnost cholesterolu snížit fluiditu fosfolipidové membrány. Proto po druhé dialýze v lipozomech zůstalo enkapsulováno ( $78,9 \pm 1,1$ ) % z původního množství HPTS.

Dalším přídavkem byla kyselina fosfatidová, která se díky enkapsulaci záporné složky inkorporovala majoritně na vnější vrstvu fosfolipidové dvojvrstvy. Vlivem odpuzivých sil mezi souhlasně nabitým povrchem lipozomů a strukturou HPTS nebyla schopna fluorescenční sonda tak lehce uniknout, a proto enkapsulační účinnost nabyла nejvyšší hodnoty ze všech lipozomálních systémů rovné ( $13,74 \pm 0,20$ ) %. Ze stejného důvodu byl omezen i druhý dialyzační proces, po němž zůstalo v lipozomech enkapsulováno ( $79,4 \pm 0,3$ ) % HPTS.

Kombinací cholesterolu a kyseliny fosfatidové činila enkapsulační účinnost lipozomálního systému po první dialýze ( $7,25 \pm 0,17$ ) % HPTS. V porovnání s lipozomy z DPPC a cholesterolu došlo k navýšení enkapsulační účinnosti pravděpodobně kvůli zápornému náboji na kyselině fosfatidové. V porovnání s lipozomy z DPPC a kyseliny fosfatidové došlo inkorporací cholesterolu ke snížení enkapsulační účinnosti. Důvodem může být jiný agregační mechanismus lipozomů, který mohl způsobit enkapsulaci menšího množství HPTS, nebo příliš vysoký záporný náboj způsobený přítomností těchto dvou komponent. Zůstatek HPTS v lipozomech činil ( $88,7 \pm 1,7$ ) %.

Pomocí PEGylace lipozomů z DPPC byl připraven další lipozomální systém. Důležitou vlastností polyethylenglykolu je překrytí povrchového náboje lipozomů, proto se domníváme, že vzhledem k nejnižší enkapsulační účinnosti došlo k inkorporaci malého množství

do vodného středu lipozomů. Enkapsulační účinnosti činila pouhých  $(3,49 \pm 0,39)$  % HPTS. Z tohoto důvodu je pravděpodobné relativně rychlé uvolňování –  $(78,42 \pm 0,08)$  % zůstalo z původního množství HPTS enkapsulovaného při první dialýze.

K lipozomům z DPPC s přidavkem cholesterolu byl přidán polyethyleglykol navázaný na fosfatidylethanolamin. Jak už bylo zmíněno výše, cholesterol snížil fluiditu membrány a polyethyleglykol vytvořil vrstvu na povrchu lipozomů. Proto se enkapsulační účinnost oproti stejným lipozomům bez přidavku polyethyleglykolu zvýšil na hodnotu  $(6,87 \pm 0,26)$  %. Ze stejného důvodu zůstalo enkapsulováno ve vodném jádře lipozomů  $(84,4 \pm 1,0)$  % HPTS, které se v lipozomech vyskytovalo po první dialýze.

PEGylované lipozomy s přidavkem cholesterolu a kyseliny fosfatidové se chovaly obdobně jako v předchozím případě. Cholesterol ztuhlil membránu a polyethyleglykol vytvořil vrstvu na povrchu lipozomů. Větší část kyseliny fosfatidové se nacházela díky enkapsulaci záporné sondy na vnější straně fosfolipidové dvojvrstvy. Tyto tři složky fungovaly jako synergisté, čímž se znesnadnil únik záporně nabitě složky, a proto se enkapsulační účinnosti oproti stejným lipozomům bez přidavku polyethyleglykolu zvýšila na  $(9,71 \pm 0,02)$  %. Po druhé dialýze zůstalo enkapsulováno  $(93,5 \pm 0,1)$  % HPTS.

Po přidavku trimethylchitosanu ke stealth lipozomům s přidavkem cholesterolu a kyseliny fosfatidové enkapsulační účinnost činila  $(9,79 \pm 0,02)$  % HPTS, tedy velmi obdobné množství jako u stealth lipozomů bez přidavku trimethylchitosanu – lehké zvýšení je předpokládáno díky kladnému náboji TMC. Také zůstatek enkapsulovaného množství HPTS bylo obdobné. Činilo  $(93,5 \pm 0,5)$  % z HPTS enkapsulovaného po první dialýze. Dalo by se tvrdit, že trimethylchitosan i přes svůj kladný náboj neovlivňuje první ani druhý dialyzační proces.

Na základě výsledků můžeme tvrdit, že se nám podařilo z hlediska všech fyzikálně-chemických vlastností připravit vhodný lipozomální systém pro inhalační podání hydrofilních léčiv. Tímto systémem jsou lipozomy z DPPC s přidavkem 30 mol. % cholesterolu, 30 mol. % PA, 6 mol. % PEG<sub>5000</sub>-PE a 0,1 % TMC, které jsou biokompatibilní a biodegradabilní. Přestože není enkapsulační účinnost tohoto lipozomálního systému nejvyšší, je pro použití v souvislosti s velmi pomalým uvolňováním léčiva více než dostatečná. Obecně lze tvrdit, že enkapsulační účinnost hydrofilních látek je v porovnání s látkami hydrofobními velmi malá. Roli v tom hraje skutečnost, že hydrofobní látky upřednostňují nepolární prostředí, a proto jsou schopny se inkorporovat pouze do fosfolipidové dvojvrstvy. Pro hydrofilní látky je typické polární prostředí, které se nachází ve středu lipozomů, ale také je toto prostředí obklopuje. Z toho důvodu je enkapsulace hydrofilních látek obtížná. Míra enkapsulační účinnosti komplexu lipozom-TMC je způsobena přítomností velkého množství záporných komponent, které synergicky působí proti uvolňování HPTS při prvním i druhém dialyzačním procesu. Přidavkem trimethylchitosanu by se měly lipozomy snadno dostat přes těsné spoje plicních alveol přímo do krevního řečiště pacienta. Díky vhodné velikosti a stabilitě vyvolané vrstvou polyethyleglykolu na jejich povrchu mají navíc lipozomy dostatek času na zacílení do místa nádoru.



## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] SZABOVÁ, Jana. Příprava a charakterizace komplexních liposomálních systémů pro distribuci léčiv. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zavprace/detail/113578>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec
- [2] ÇAĞDAŞ, Melis a kol. Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery. *Intech* [online]. 2014, 2014(6), 1-50 [cit. 2020-02-21]. DOI: 10.5772/58459.
- [3] MUFAMADI, Maluta S., Viness PILLAY a Yahya E. CHOONARA. A Review on Composite Liposomal Technologies for Specialized Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery* [online]. 2011, roč. 2011, s. 19 [cit. 2020-02-22]. DOI: 10.1155/2011/939851. ISSN 2090-3014.
- [4] FANG J. Y., T. L. HWANG and Y. L. HUANG. *Liposomes as vehicles for enhancing drug delivery via skin routes*. Current Nanoscience, vol. 2, no. 1, pp. 55–70, 2006. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/55230/article>
- [5] MEIJER, CATHARINA. Green werkzame stof in creme zonder goede aflevertechniek. *Beauty Journaal* [online]. 2015, 2015(6) [cit. 2016-08-23]. Dostupné z: <http://www.beautyjournaal.nl/2015/07/07/geen-werkzame-stof-increme-zonder-goede-aflevertechniek/>
- [6] SURENDIRAN, A., S. SYNDHIYA, S. C. PRADHAN a C. ADITHAN. Nanotechnology in medicine: Novel applications of nanotechnology in medicine. *The Indian journal of medical research* [online]. Prosinec 2009, 689-701 [cit. 2020-03-16].
- [7] MASHAGHI, Samaneh, Tayebeh JADIDI, Gijsje KOENDERINK, Alireza MASHAGHI. Lipid Nanotechnology. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. The Netherlands, 2013, 14(2), 4242-4282 [cit. 2020-02-21]. DOI: 10.3390/ijms14024242.
- [8] KRAFT, John, Jennifer FREELING, WANG a Rodney HO. Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. Elsevier Inc, 2014, roč. 103, č. 1, s. 29-52 [cit. 2020-02-21]. DOI: 10.1002/jps.23773. ISSN 0022-3549.
- [9] OHVO-REKILÄ, Henna, Bodil RAMSTEDT, Petra LEPPIMÄKI a J. Peter SLOTTE. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research* [online]. 2002, 2001, 41(1), 66-97 [cit. 2020-02-21]. DOI: 10.1016/S0163-7827(01)00020-0. ISSN 0163-7827.
- [10] KUROKI, Y., T. AKINO. Pulmonary surfactant protein A (SP-A) specifically binds dipalmitoylphosphatidylcholine. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 1991, 266(5), 3068-3073 [cit. 2020-10-21].
- [11] Cholesterol. *Wikipedie* [online]. 2019 [cit. 2020-05-11]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Cholesterol>
- [12] PANDEY, Himanshu a kol. Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. *Brazilian Archives of Biology and Technology* [online]. 2016, 59(8), 1-10 [cit. 2020-02-22]. DOI: 10.1590/1678-4324-2016150477. ISSN: 1678-4324.



- [13] MARWA, M., A. S. A. LILA, T. SHIMIZU, et. Al. PEGylated liposomes: immunological responses. *Science and Technology of Advances Materials* [online]. 2019, 20(1), 710-724 [cit. 2020-12-22]. DOI:10.1080/14686996.2019.1627174
- [14] MOURYA, V. K., N. N. INAMDAR. Trimethyl Chitosan and its application in drug delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2009, 20 (5), 1057-1079 [cit. 2020-12-22]. DOI: 10.1007/s10856-008-3659-z
- [15] SLEVIN, M., J. KRUPINSKI, J. GAFFNEY, et al. Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: Uncovering PHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biology* [online]. 2007, 26, 58-68 [cit. 2021-02-22]. DOI: 10.1016/j.matbio.2006.08.261
- [16] ANDRADE, F., F. GOYCOOLEA, D. A. CHIAPPETTA, et. al. Chitosan-Grafted Copolymers and Chitosan-Ligand Conjugates as Matrices for Pulmonary Drug Delivery. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* [online]. 2011, 1-14 [cit. 2021-02-16]. DOI: 10.1155/2011/865704
- [17] KRAFT, J. C., J. P. FREELING, Z. WANG, R. J. Y. HO. Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2014, 103(1), 29-52 [cit. 2020-03-26]. DOI:10.1002/jps.23773
- [18] PANDEY, H., R. RANI, V. AGARWAL. Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. *Brazilian Archives of Biology and Technology* [online]. 2016, 59(0), 1-10 [cit. 2020-03-27]. DOI:10.1590/1678-4324-2016150477. ISSN 1678-4324.
- [19] What is the transition temperature of the lipid. *Avanti Polar Lipids, Inc.* [online]. Alabama, 2016 [cit. 2020-03-31]. Dostupné z: <https://avantilipids.com/tech-support/faqs/transition-temperature>
- [20] Phase Transition Temperatures for Glycerophospholipids. *Avanti, Polar lipids, Inc.* [online]. Alabama, 2016 [cit. 2020-05-11]. Dostupné z: <https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/phase-transition-temps/>
- [21] ISRAELACHVILI, J. N., D. J. MITCHEL, B. W. NINHAM. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of the Chemical Society* [online]. 1976, č. 72, s. 1525–1568 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1039/f29767201525.
- [22] Co je co v povrchové koloidní chemii. *Výkladový slovník* [online]. VŠCHT PRAHA, 2005 [cit. 2020-03-12]. Dostupný také z: [http://147.33.74.135/knihy/uid\\_es-001/ebook.help.htm](http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/ebook.help.htm)
- [23] VOCETKOVÁ, K., A. MÍČKOVÁ a T. JAROŠÍKOVÁ. Liposomes—their characterization, preparation and embedding into nanofibers. *Lékař a technika* [online]. 5/2014, roč. 44, s. 11-18 [cit. 2020-03-12], DOI: 10.14311/CTJ.2014.2.%X. ISSN 0301-5491.
- [24] BALAZS. D. A., W. T. GODBEY. Liposomes for Use in Gene Delivery. *Journal of Drug Delivery* [online]. 2011, 1-12 [cit. 2020-05-11]. DOI:10.1155/2011/326497
- [25] HADAŠOVÁ, Eva. Liposomální léčivé formy. *Remedia* [online]. 2006, 16(4), 433–437 [cit. 2020-04-16]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Lekoveformy/Lipozomalni-lekove-formy/6-H-gC.magarticle.aspx>

- [26] LASIC, D. D. Liposomes in gene delivery. CRC-Press, 1997. 320 p. Boca Raton. New York. ISBN 978-0849331091.
- [27] GÓMEZ-HENS, A., J. FERNÁNDEZ-ROMERO. Analytical methods for the control of liposomal delivery systems. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2/2006, roč. 25, s. 167–178 [cit. 2020-03-18], ISSN 0165-993. DOI: 10.1016/j.trac.2005.07.006.
- [28] PATIL, Y. P. a Sameer JADHAV. Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids* [online]. Indian Institute of Technology Bombay, Powai, Mumbai 400 076, India, 2014, 177, 8-18 [cit. 2020-03-18]. DOI: 0.1016/j.chemphyslip.2013.10.011.
- [29] AKBARZADEH, A., R. REZAEI-SADABADY, S. DAVARAN, S. W. JOO, N. ZARGHEMI, Y. HANIFEHPOUR, K. NEJATI-KOSHKI. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2013, 8(1), 102 [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.1186/1556-276x-8-102.
- [30] MUNEER, S., Z. MASOOD, S. BUTT, S. ANJUM, H. ZAINAB, et al. Proliposomes as Pharmaceutical Drug Delivery System: A Brief Review. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology* [online]. 2017, 8(3), 1-5 [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.4172/2157-7439.1000448. ISSN 2157-7439.
- [31] TURÁNEK, J., A. KAŠNÁ, D. ZÁLUSKÁ, J. NEČA. Preparation of Sterile Liposomes by Proliposome–Liposome Method. *Methods in Enzymology* [online]. 2003, 367, 111–125 [cit. 2020-03-18]. DOI:10.1016/s0076-6879(03)67009-6.
- [32] SHI, N. Q., X. R. QI. Preparation of Drug Liposomes by Reverse-Phase Evaporation. *Liposome-Based Drug Delivery Systems* [online]. 2017, 1–10 [cit. 2020-03-19]. DOI:10.1007/978-3-662-49231-4\_3-1.
- [33] WALDE, Peter a kol. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. *Biomolecular Engineering* [online]. 2001, 18(4), 143–177 [cit. 2020-03-25]. DOI: 10.1016/S1389-0344(01)00088-0.
- [34] MEURE, L., N. R. FOSTER, F. DEGHAN. Conventional and Dense Gas Techniques for the Production of Liposomes: A review. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2008, 9(3), 798-809 [cit. 2020-11-20]. DOI: 10.1208/s12249-008-9097-x
- [35] ARAJO LOPES, Svía Caldeira de, Cristiane dos SANTOS GIUBERTI, TalitaGuieiro RIBEIRO, Digo dos SANTOS FERREIRA, Elaine AMARAL LEITE a Mnica CRISTINA. Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs. *Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches* [online]. InTech, 2013, 85-124 [cit. 2016-10-09]. DOI: 10.5772/55290. ISBN 978-953-51-1098-9.
- [36] Liposome Preparation. *Avanti Polar Lipids, Inc.* [online]. Alabama, 2016 [cit. 2020-03-18]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/liposome-preparation.html>
- [37] PATTNI, B. S., V. V. CHUPIN, V.P. TORCHILIN. New developments in liposomal drug delivery. *Chemical Reviews* [online]. 2015; 115, 10938-10966 [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00046
- [38] SRIVASTARA, D., V. A. ANSARI, S. P. SINGH, S. ALI, J. AKHTAR. Devepopment of liposomal cosmeceuticals. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* [online]. 2016, 8(2), 834-838 [cit. 2020-11-20]. Dostupné také z:

- [https://www.researchgate.net/publication/296695424\\_Development\\_of\\_liposomal\\_cosmeceuticals](https://www.researchgate.net/publication/296695424_Development_of_liposomal_cosmeceuticals)
- [39] LAPINSKY, M. M., A. CASTRO-FORERO, A. J. GREINER, R. Y. OFOLI, G. J. BLANCHARD. Comparison of Liposomes Formed by Sonication and Extrusion: Rotational and Translational Diffusion of an Embedded Chromophore. *Langmuir* [online]. 2007, 23(23), 11677–11683 [cit. 2020-03-25]. DOI:10.1021/la7020963.
- [40] KATARIA, S., P. SANDHU, A. BILANDI, M. AKANKSHA, B. KAPOOR, G. L. SETH, S. D. BIHANI. Stealth liposomes: a review. *IJRAP* [online]. 2011, 2(5), 1534–1538 [cit. 2020-03-19].
- [41] ONG, S., M. CHITNENI, K. LEE, L. MING, K. YUEN. Evaluation of Extrusion Technique for Nanosizing Liposomes. *Pharmaceutics* [online]. 2016, 8(4) [cit. 2020-03-25]. DOI:10.3390/pharmaceutics8040036.
- [42] DEAMER, D., A. D. BANGHAM. Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochimica et Biophysica Acta* [online]. 1976, 443(3), 629–634 [cit. 2020-03-19]. DOI:10.1016/0005-2736(76)90483-1.
- [43] CASTILE, Jonathan D a Kevin M.G TAYLOR. Factors affecting the size distribution of liposomes produced by freeze–thaw extrusion. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 1999, 188(1), 87–95 [cit. 2020-03-25]. DOI: 10.1016/S0378-5173(99)00207-0. ISSN 03785173.
- [44] PIACENTINI, E. Encapsulation Efficiency. *Encyclopedia of Membranes* [online]. 2016, 706–707 [cit. 2020-03-31]. DOI:10.1007/978-3-662-44324-8\_1945.
- [45] KULKARNI, S. B., G. V. BETAGERI, M. SINGH. Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes. *Journal of Microencapsulation* [online]. 1995, 12(3), 229–246 [cit. 2020-03-31]. DOI:10.3109/02652049509010292
- [46] HUPFELD, S., A. M. HOLSAETER, M. SKAL, et. al. Liposome Size Analysis by Dynamic Static Light Scattering upon Size Exclusion-/Ficls Flow-Fractionation. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* [online]. 2006, 6(9), 3025–3031 [cit. 2021-02-16]. DOI: 10.1166/jnn.2006.454
- [47] ELOY, J. O., M. CLARO DE SOUZA, R. PETRILLI, J. P. A. BARCELLOS, R. J. LEE, J. M. MARCHETTI. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2014, 123, 345–363 [cit. 2020-04-07]. DOI:10.1016/j.colsurfb.2014.09.029.
- [48] XU, X., M. A. KHAN, D. J.BURGESS. Predicting hydrophilic drug encapsulation inside unilamellar liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2012, 423(2), 410–418 [cit. 2020-04-07]. DOI:10.1016/j.ijpharm.2011.12.019.
- [49] Antibiotika. *Moje lékárna* [online]. 2009 [cit. 2020-11-11]. Dostupné z: <https://www.mojelekarna.cz/poradna-moje-lekarna/o-lecich/antibiotika.html>
- [50] ALLEN, Joanna, Charlotte HALL, Kate ADAMS, Gavin BARLOW. Optimising antimicrobial therapy in critically ill patients. *British Journal of Intensive Care* [online]. 2012, 22(3), 82–85 [cit. 2020-11-18]. Dostupné také z: [https://www.researchgate.net/publication/269809106\\_Optimising\\_antimicrobial\\_therapy\\_in\\_critically\\_ill\\_patients](https://www.researchgate.net/publication/269809106_Optimising_antimicrobial_therapy_in_critically_ill_patients)
- [51] BALDWIN, C.M., Katherine A. LYSENG-WILLIAMSON, Susan J. KEAM. Meropenem: a review of its use in the treatment of serious bacterial infection. *ADIS*

- Drug evaluation* [online]. 2008, 68(6), 803-838 [cit. 2020-11-18]. DOI: 10.2165/00003495-200868060-00006
- [52] BROGDEN, R.N., R. C. HEEL. Aztreonam: A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs* [online]. 1986, 31(2), 96-130 [cit. 2020-11-18]. DOI: 10.2165/00003495-198631020-00002.
- [53] Ceftriaxone Injection. *MedlinePlus* [online]. 2016 [cit. 2020-11-18]. Dostupné také z: <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a685032.html>
- [54] MELCHIONDA, V., H. WYATT, S. CAPOCCI, R. G. MEDINA a kol. Amikacin treatment for multidrug resistant tuberculosis: how much monitoring is required? *European Respiratory Journal* [online]. 2013, 42, 1148-1150 [cit. 2020-11-18]. DOI: 10.1183/09031936.00184312
- [55] AMENT, P. W., N. JAMSHED, J. P. HORNE. Linezolid: Its Role in the Treatment of Gram-Positive, Drug-Resistant Bacterial Infections. *American Family Physician* [online]. 2002, 65(4), 663-671 [cit. 2020-11-18]. Dostupné také z: <https://www.aafp.org/afp/2002/0215/p663.html>
- [56] Gentamicin. *Wiktionary* [online]. 2021 [cit. 2021-02-16]. Dostupné také z: <https://en.wiktionary.org/wiki/gentamicin>
- [57] EWER, M. S., D. D. VON HOFF, R. S. BENJAMIN. A Historical Perspective of Anthracycline Cardiotoxicity. *Heart Failure Clinics* [online]. 2011, 7(3), 363–372 [cit. 2020-04-07]. DOI:10.1016/j.hfc.2011.03.001.
- [58] PETRUŽELKA, Luboš. Lipozomální doxorubicin. *Remedia* [online]. 2007, 17, 197-200 [cit. 2020-04-15]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Lekove-formy/Lipozomalni-doxorubicin/6-H-hF.magarticle.aspx>
- [59] MOMPALER, R. L. Optimization of cytarabine (ARA-C) therapy for acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology and Oncology* [online]. 2013, 2(1), 1-5 [cit. 2020-04-15]. DOI:10.1186/2162-3619-2-20.
- [60] KOLLMANNBERGER, C., K. MROSS, A. JAKOB, L. KANZ, C. BOKEMEYER. Topotecan – A Novel Topoisomerase I Inhibitor: Pharmacology and Clinical Experience. *Oncology* [online]. 1999, 56(1), 1–12 [cit. 2020-04-15]. DOI:10.1159/000011923.
- [61] KWOK, K. K., E. C. VINCENT a J. N. GIBSON. Antineoplastic Drugs. DOWN, F. J., A. J. MARIOTTI a B. S. JOHNSON. *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry* [online]. 7. Mosby, 2017, s. 530-562 [cit. 2020-11-18]. ISBN 978-0-323-39307-2.
- [62] FÍNEK, Jindřich. Nivolumab. *Remedia* [online]. 2019, 29: 241–246 [cit. 2020-11-18]. Dostupné také z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Lekove-profilu/Nivolumab/6-I-2Lz.magarticle.aspx>
- [63] KRAJSOVÁ, Ivana. Nivolumab v léčbě metastazujícího melanomu. *Remedia* [online]. 2015; 25: 408–410 [cit. 2020-11-18]. Dostupné také z: <http://www.remédia.cz/Okruhy-temat/Dermatovenerologie/Nivolumab-v-lecbe-metastazujiciho-melanomu/8-U-1Yc.magarticle.aspx>
- [64] Chlorpromazine. *MedlinePlus* [online]. 2017 [cit. 2020-11-18]. Dostupné také z: <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a682040.html>
- [65] Pimavanserin. *MedlinePlus* [online]. 2018 [cit. 2020-11-18]. Dostupné také z: <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a616032.html>
- [66] SRINIVASAN, S., R. R. TAMPI, K. BALARAM, A. KAPOOR. Pimavanserin for treatment of psychosis in Alzheimer's disease: A literature review. *World Journal of*

- Psychiatry* [online]. 2020, 10(7), 162-174 [cit. 2020-11-18]. DOI: 10.5498/wjp.v10.i7.162
- [67] Venlafaxine. *MedlinePlus* [online]. 2017 [cit. 2020-11-18]. Dostupné také z: <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a694020.html>
- [68] AMBLER, Zdeněk, Jiří HOVORKA. Pregabalin. *Remedia* [online]. 2006, 16, 367-375 [cit. 2020-11-18]. Dostupné také z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Lekove-profilu/Pregabalin/6-I-gr.magarticle.aspx>
- [69] MIGNOT, Emmanuel J. M. A Practical Guide to the Therapy of Narcolepsy and Hypersomnia Syndromes. *Neurotherapeutics* [online]. 2012, 9, 739-752 [cit. 2020-11-18]. DOI: 10.1007/s13311-012-0150-9
- [70] HEINC, Petr. Současný pohled na antiarytmika. *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. 2009, 23(2), 64-70 752 [cit. 2020-11-19]. Dostupné také z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2009/02/05.pdf>
- [71] VÍTOVEC, Jiří, Ján MURÍN. Vernakant. *Remedia* [online]. 2012, 22, 175-176 [cit. 2020-11-19]. Dostupné také z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Aktuality/Vernakalant/6-E-1gb.magarticle.aspx>
- [72] Verapamil. *MedlinePlus* [online]. 2017 [cit. 2020-11-19]. Dostupné také z: <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a684030.html>
- [73] Diltiazem. *MedlinePlus* [online]. 2017 [cit. 2020-11-19]. Dostupné také z: <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a684027.html>
- [74] BUBIŠKOVÁ, Miroslava. Perorální matricové tablety s řízeným uvolňováním léčiva. *Remedia* [online]. 2007, 17, 188-192 [cit. 2020-11-19]. Dostupné také z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Lekove-formy/Peroralni-matricove-tablety-s-rizenym-uvolnovanim-leciva/6-H-hD.magarticle.aspx>
- [75] WIEDEMAN, N., D. A. HAUSER, P. MASER. 100 Years of Suramin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2020, 64(3), 1-14 [cit. 2020-11-19]. DOI: 10.1128/AAC.01168-19
- [76] TULKENS, J., L. LIPPENS, G. VERGAUWEN. Extracellular vesicles to diagnose and treat cancer. *BJMO* [online]. 2017, 11(3), 92-105 [cit. 2020-05-11]. Dostupné také z: <file:///C:/Users/42060/Downloads/BJMOreview.pdf>
- [77] ALLENI, T.M. and P.R. CULLIS. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2013, 65, 36-48 [cit. 2020-04-15]. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.037.
- [78] LAKOWICZ, Joseph R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 03-873-1278-1.
- [79] VALEUR, Bernard a M. N. BERBERAN-SANTOS. Molecular fluorescence: principles and applications. Second edition. Chichester, England: Wiley-VCH Verlag, 2012. ISBN 978-3-527-32837-6.
- [80] Fluorofory v biomedicíně [online]. [cit. 2020-10-29]. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfsisar/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>
- [81] VENDRELL, M., D. ZHAI, J.C. ER, Y.T. CHANG. Combinatorial strategies in fluorescent probe development. *Chem Rev* [online], 112 (2012), pp. 4391-4420 [cit. 2020-10-29]. DOI: 10.1021/cr200355j
- [82] KUMAR, R., R. YADAV, M. A. KOLHE, Rajesh S. BHOSALE a Ramanuj NARAYAN. 8-Hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (HPTS) based high fluorescent, pH stimuli waterborne polyurethane coatings. *Polymer* [online]. 2018, 136, 157- 165 [cit. 2020-10-29]. DOI: 10.1016/j.polymer.2017.12.056.
- [83] KANO, K., J. H. FENDLER. Pyranine as a sensitive pH probe for liposomes interiors and surfaces. pH gradient across phospholipids vesicles. *Biochimica et Biophysica*

- Acta – Biomembranes* [online]. 1977, 509, 289-299 [cit. 2020-11-05]. DOI: 10.1016/0005-2736(78)90048-2.
- [84] CLEMENT, N. R., J. M. GOULD. Pyranine (8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonate) as a probe of internal aqueous hydrogen ion concentration in phospholipid vesicles. *Biochemistry* [online]. 1981, 20, 1534-1538 [cit. 2020-11-05]. DOI: 10.1021/bi00509a019.
- [85] CHUNG, M. H., Y.CH. CHUNG. Polymerized ion pair amphiphile that shows remarkable enhancement in encapsulation efficiency and very slow release of fluorescent markers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2002, 24, 111-121 [cit. 2020-11-05]. DOI: 10.1016/S0927-7765(01)00223-5.
- [86] STRAUBING, R. M., D. PAPAHAJIOPOULOS, K. HONG. Endocytosis and intracellular fate of liposomes using pyranine as a probe. *Biochemistry* [online]. 1990, 29, 4929-4939 [cit. 2020-11-05]. DOI: 10.1021/bi00472a025.
- [87] JONASZ, Miroslaw a G FOURNIER. Light scattering by particles in water: theoretical and experimental foundations. London, UK: Academic Press, 2007, x, 704 p.
- [88] ŠEVČÍKOVÁ, Petra, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Jiří KREJČÍ, Pavlína VLTAVSKÁ. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické listy* [online]. 2017, 108, 479-482 [cit. 2020-11-05]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/common/content-issue\\_5-volume\\_108-year\\_2014.html](http://www.chemicke-listy.cz/common/content-issue_5-volume_108-year_2014.html)
- [89] Optické vlastnosti koloidních soustav: (fyzikální princip metody měření velikosti částic a zeta potenciálu). *Krystalografická společnost* [online]. Praha, 2005. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/texty-ulohy-uvod.pdf>.
- [90] Dynamic Light Scattering Spectrophotometer DLS-8000 series. *Otsuka* [online]. 2020 [cit. 2020-05-11]. Dostupné z: <https://www.otsukael.com/product/detail/productid/23>
- [91] Zeta potenciál a molekulová hmotnost. *ANAMET* [online]. 2020 [cit. 2021-02-11]. Dostupné také z: <https://www.anamet.cz/techniky/zeta-potencial-molekulova-hmotnost>
- [92] HUANG, G., B. XU, J. QIU, L. PENG, et al. Symmetric alectrophoretic light scattering for determination of the zeta potenciál of colloidal systems. *Colloids and Surfaces A* [online]. 2020, 587, 1-6 [cit. 2021-02-11]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2019.124339
- [93] XU, By Renliang. *Particle characterization: light scattering methods*. Digital print. Dordrecht [u.a.]: Kluwer, 2001. ISBN 14-020-0357-9.
- [94] BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and they are not? *Journal of Controlled Release* [online]. 2016, 1-37 [cit. 2021-02-11]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017
- [95] Stabilita suspenzí a disperzí – Proč jsou parametry jako velikost částic, zeta potenciál a reologické vlastnosti tak důležité? *ANAMET* [online]. 2020 [cit. 2021-02-15]. Dostupné také z: [https://www.anamet.cz/odborne\\_akce/stabilita-suzpenzi-disperzi-proc-jsou-parametry-jako-velikost-castic-zeta-potencial](https://www.anamet.cz/odborne_akce/stabilita-suzpenzi-disperzi-proc-jsou-parametry-jako-velikost-castic-zeta-potencial)
- [96] CORDEIRO, C., D. J. WISEMAN, P. LUTWYCHE, et al. Antibacterial Efficacy of Gentamicin Encapsulated in pH-Sensitive Liposomes against an In Vivo Salmonella enterica Serovar Typhimurium Intracellular Infection Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2000, 44(3), 533-539 [cit. 2020-11-26]. DOI: 10.1128/aac.44.3.533-539.2000
- [97] EL-RIDY, M. S., A.-E. A. EL-SHAMY, A. RAMADAN, et al. Liposomal Encapsulation of Amikacin Sulphate for Optimizing Its Efficacy and Safety. *British Journal of Pharmaceutical Research* [online]. 2015, 5(2), 98-116 [cit. 2020-11-26]. DOI: 10.9734/BJPR/2015/9298

- [98] LIU, J. J., R. L. HONG, W. F. CHENG, et al. Simple and efficient liposomal encapsulation of topotecan by ammonium sulfate gradient: stability, pharmacokinetic and therapeutic evaluation. *Anti-Cancer Drug* [online]. 2002, 13, 709-717 [cit. 2020-11-29]. DOI: 10.1097/00001813-200208000-00005
- [99] MESSERER, C. L., E. C. RAMSAY, D. WATERHOUSE, R. NG, et al. Liposomal Irinotecan: Formulation Development and Therapeutic Assessment in Murine Xenograft Models of Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research* [online]. 2004, 10, 6638-6649 [cit. 2020-11-29]. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0221
- [100] KIM., Chong-Kook, Dong-Kyu PARK. Stability and Drug Release Properties of Liposomes Containing Cytarabine as a Drug Carrier. *Archives of Pharmacal Research* [online]. 1987, 10(2), 75-79 [cit. 2020-12-01]. DOI: 10.1007/bf02857770
- [101] MARTÍ, A., X. ARMENGOL, J. ESTELRICH, J. HERNÁNDEZ-BORREL. Encapsulation of doxorubicin in neutral liposomes by passive methods: evidence of drug-lipid interaction at neutral pH. *Journal of Microencapsulation* [online]. 1992, 9(2), 191-200 [cit. 2020-12-01]. DOI: 10.3109/02652049109021236
- [102] MIRZAEI, M., P. OWLIA, M. R. MEHRABI, A. GHARIB. In Vitro Bactericidal Activity of Encapsulated Amikacin in Liposomes. *Iranian Journal of Pathology* [online]. 2009, 4(4), 151-156 [cit. 2020-12-22]. Dostupné také z: [http://ijp.iranpath.org/article\\_8849.html](http://ijp.iranpath.org/article_8849.html)
- [103] ZAHRA, M. J., H. HAMED, R. Y. MOHAMMAD, et al. Evaluation and study of antimicrobial activity of nanoliposomal meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* [online]. 2017, 45(5), 975-980 [cit. 2021-02-08]. DOI: 10.1080/21691401.2016.1198362.
- [104] MASTRANGELO, E., S. MAZZITELLI, J. FABBRI, J. ROHAYEM, et al. Delivery of Suramin as an Antiviral Agent through Liposomal Systems. *ChemMedChem* [online]. 2014, 9, 933-939 [cit. 2021-02-08]. DOI: 10.1002/cmde.201300563
- [105] EBRAHIMI, S., N. FARHADIAN, M. KARIMI, M. EBRAHIMI. Enhanced bactericidal effect of ceftriaxone drug encapsulated in nanostructured lipid carrier against gram-negative *Escherichia coli* bacteria: drug formulation, optimization and cell culture study. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* [online]. 2020, 9(1), 1-12 [cit. 2021-02-09]. DOI: 10.1186/s13756-20-0690-4
- [106] JITHAN, A. V., M. SWATHI. Development of Topical Diclofenac Sodium Liposomal Gel for Better Anti-inflammatory Activity. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology* [online]. 2010, 3(2), 986-993 [cit. 2021-02-09]. DOI: 10.37285/ijpsn.3.32.12
- [107] ISRAELACHVILI, J., D. J. MITCHELL, B. W. NINHAM. Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* [online]. 1997, 470 (2), 185-201 [cit. 2021-07-13]. DOI: 10.1016/0005-2736(77)90099-2
- [108] SZABOVÁ, J., O. MIŠÍK, M. HAVLÍKOVÁ, F. LÍZAL, F. MRAVEC. Influence of liposomes composition on their stability during nebulization process by vibrating mesh nebulizer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2021, 204, 1-7 [cit. 2021-07-13]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2021.111793
- [109] BOHINC, K., T. SLIVNIK, A. IGLIČ, M. BRUMEN, V. KRALJ-IGLIČ. Transmembrane Distribution of Membrane Constituents in Organism Nanotubes Driven by Electric Charge and Intrinsic Anisotropy of Molecules. *Journal of Physical Chemistry C* [online]. 2007, 111, 9709-9718 [cit. 2021-07-13]. DOI: 10.1021/jp068889e

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

### 8.1 Seznam zkratek

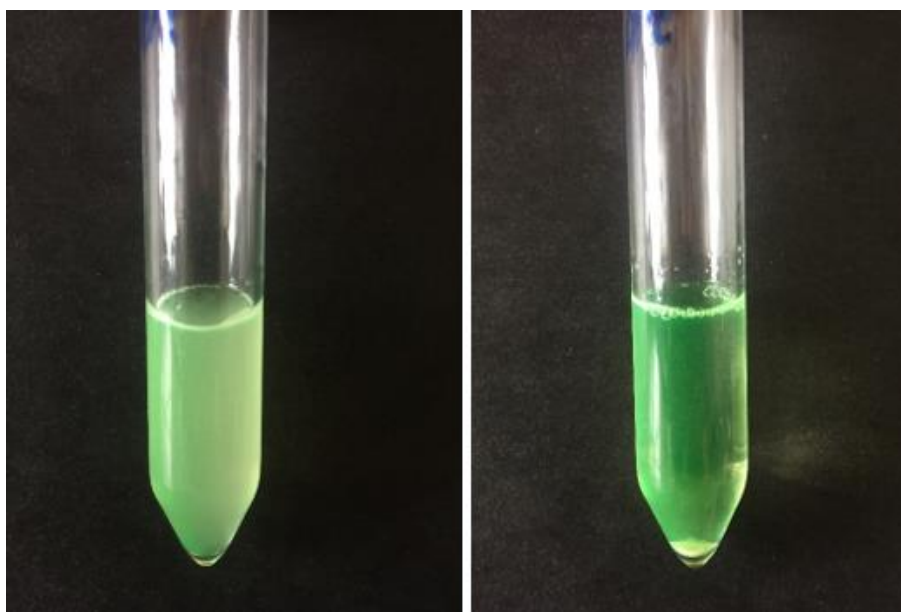
DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfocholin
PEG	polyethyleglykol
CMC	kritická micelární koncentrace
CPP	kritický sbalovací parametr
$T_c$	teplota mezifázového přechodu
SUV	malá unilamelární vezikula
LUV	velká unilamelární vezikula
OLM	velká oligolamelární vezikula
MLV	velká multilamelární vezikula
MVV	multivezikulární vezikula
DOTAP	1,2-diolelyl-3-trimethylammonium-propan
$S_0$	základní hladina singletového excitovaného stavu
$S_1$	první hladina singletového excitovaného stavu
$S_2$	druhá hladina singletového excitovaného stavu
$T_1$	první hladina tripletového excitovaného stavu
HPTS	trisodná sůl kyseliny 8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonové (pyranin)
PA	kyselina fosfatidová
PEG <sub>500</sub> -PE	polyethyleglykol o Mr 5000 navázaný na PE
PE	fosfatidylethanolamin
TMC	trimethylchitosan
EE	enkapsulační účinnost
HPLC	vysokoúčinná kapalná chromatografie
DSPC	1,2-distearoylfosfatidylcholin
UV	ultrafialová oblast světla
UV-VIS	oblast ultrafialového a viditelného světla

### 8.2 Seznam symbolů

$V$	volný objem
$l$	efektivní délka alkylového řetězce
$a_0$	efektivní plocha hydrofilní hlavičky
$d(H)$	hydrodynamický průměr částic
$D$	translační difuzní koeficient
$k_b$	Boltzmannova konstanta
$T$	termodynamická teplota
$\mu$	viskozita disperzního prostředí
$\eta$	elektrokinetický potenciál
$\xi$	zeta potenciál
$F$	funkce související s tvarem částice
$C_E$	koncentrace HPTS po enkapsulaci
$C_R$	koncentrace HPTS při rehydrataci fosfolipidového filmu



## 9 PŘÍLOHY



*Obr. 25: Lipozomy z DPPC před a po centrifugaci (vznik sedimentu)*