



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

INTERAKCE MODIFIKOVANÝCH POLYMERŮ S LIPOSOMY

INTERACTION OF MODIFIED POLYMERS WITH LIPOSOMES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Aleksandra Dimidova

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1900/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Aleksandra Dimidova**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Interakce modifikovaných polymerů s liposomy

Zadání bakalářské práce:

- 1) Rešerše na téma interakce modifikovaných polymerů a vezikulárních systémů, s přihlédnutím k hydrofobně modifikovaným biopolymerům.
- 2) Na základě rešerše a dostupnosti modifikovaných polymerů navrhnout experimenty pro studium interakce mezi polymery a vezikulárními systémy.
- 3) Provést experimenty potvrzující interkaci mezi modifikovaným polymerem a vybraným vezikulárním systémem.
- 4) Zhodnocení dosažených výsledků z hlediska potencionální medicínské aplikace takovýchto systémů.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2024:

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

Aleksandra Dimidova
studentka

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo zkoumat interakce modifikovaných polymerů s vezikulárními systémy, se zaměřením na hydrofobně modifikované biopolymery. Práce zahrnovala rešerši literatury, návrh experimentů pro studium těchto interakcí, provedení experimentů a zhodnocení jejich výsledků z hlediska potenciální medicínské aplikace. Byly studovány různé metody přípravy liposomů s cílem optimalizovat jejich fyzikálně-chemické vlastnosti pro efektivní doručování léčiv. Přestože příprava liposomů z DPPC čelila problémům kvůli kvalitě chemikálií, metoda ethanolového přikapávání vedla k tvorbě stabilních liposomů. Tyto liposomy prokázaly dobrou velikost a stabilitu, a jejich interakce s palmitoyl hyaluronátem sodným naznačila potenciál pro zvýšení velikosti liposomů a ovlivnění jejich stability.

ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the interactions of modified polymers with vesicular systems, focusing on hydrophobically modified biopolymers. The work included a literature search, design of experiments to study these interactions, execution of the experiments and evaluation of the results in terms of potential medical applications. Different methods of preparing liposomes were studied in order to optimize their physicochemical properties for efficient drug delivery. Although the preparation of liposomes from DPPC faced problems due to the quality of chemicals, the ethanol addition method resulted in the formation of stable liposomes. These liposomes showed good size and stability, and their interaction with sodium palmitoyl hyaluronate indicated the potential for increasing the size of liposomes and affecting their stability.

KLÍČOVÁ SLOVA

DPPC, lecitin, cholesterol, hydrofobně modifikovaný hyaluronan, dynamický rozptyl světla (DLS), elektroforetický rozptyl světla (ELS)

KEY WORDS

DPPC, lecithin, cholesterol, hydrophobically modified hyaluronan, dynamic light scattering (DLS), electrophoretic light scattering (ELS)

DIMIDOVA, Aleksandra. *Interakce modifikovaných polymerů s liposomy* [online]. Brno, 2024 [cit. 2024-04-23]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156603>. 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 využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
Podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce, Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D., za jeho čas a odborné rady. Velké poděkování patří také Ing. Ivaně Málkové za nápady, cenné rady, připomínky, za pomoc při provedení a zpracování experimentální části a trpělivost během celé této práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za jejich lásku a podporu během celého studia.

ÚVOD	6
1 TEORETICKÁ ČÁST	7
1.1 Vezikulární systémy	7
1.2 Liposomy.....	7
1.2.1 Složení liposomů	8
1.2.2 Fosfolipidy.....	9
1.2.3 Lecitin.....	9
1.2.4 DPPC	10
1.3 Stabilita liposomů.....	11
1.3.1 Cholesterol.....	11
1.4 Fyzikálně-chemické vlastnosti liposomů	12
1.4.1 Nadmolekulární struktury.....	13
1.4.2 Tvar agregátů.....	13
1.4.3 Rozdělení liposomů.....	14
1.5 Využití liposomů	16
1.6 Hyaluronan.....	17
1.6.1 Modifikace hyaluronanu.....	18
1.6.2 Palmitoyl hyaluronát sodný.....	18
1.7 Dynamický rozptyl světla.....	19
1.8 Elektroforetický rozptyl světla	20
1.9 Současný stav řešené problematiky.....	21
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
2.1 Použité chemikálie	24
2.2 Použité laboratorní vybavení.....	25
2.3 Pracovní postup.....	25
2.3.1 Příprava liposomů metodou rehydratace na kuličkách.....	25
2.3.2 Příprava liposomů metodou rehydratace tenké vrstvy ve vialkách	25
2.3.3 Příprava zásobního roztoku hydrofobně modifikovaného hyaluronanu.....	25
2.3.4 Příprava liposomů metodou ethanolového přikapávání	26
2.3.5 Příprava systémů liposom – palmitoyl hyaluronát	26
2.4 Měření a zpracování výsledků.....	26
3 VÝSLEDKY A DISKUZE	27
3.1 Liposomy připravené z DPPC.....	27
3.2 Liposomy připravené z DPPC s přídavkem DOTAP	28
3.3 Liposomy připravené z lecitinu.....	29
4 ZÁVĚR	32
5 POUŽITÁ LITERATURA	33
6 SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK	40
6.1 Seznam zkratk	40
6.2 Seznam symbolů	40
7 PŘÍLOHY	41

ÚVOD

Interakce mezi modifikovanými polymery a liposomy představuje klíčovou roli v oblasti farmaceutického výzkumu a vývoje. Tato interakce má potenciál vytvářet nové systémy pro cílenou lékovou terapii, které mohou zlepšit účinnost léčiv a minimalizovat nežádoucí vedlejší účinky.

Tato bakalářská práce se zabývá studiem interakce liposomálního systému, připraveného na bázi vaječného lecitinu, s modifikovaným polymerem – palmitoyl hyaluronátem sodným. Palmitoyl hyaluronát sodný je derivát kyseliny hyaluronové, která je přirozenou součástí extracelulární matrix v lidském těle. Hyaluronová kyselina je známá svými vynikajícími vlastnostmi v oblasti biokompatibility a schopností vázat vodu, což ji činí vhodnou pro různé biomedicínské aplikace. Modifikace palmitoylem zvyšuje hydrofobní charakter molekuly, což může usnadnit její interakci s liposomy a následnou stabilizaci celkové struktury.

V experimentální části této práce byla navržena metoda přípravy liposomů z vaječného lecitinu a byla sledována jejich interakce s palmitoyl hyaluronátem sodným. Úspěšnost této interakce byla stanovena pomocí metod dynamického rozptylu světla (DLS) a elektroforetického rozptylu světla (ELS). DLS poskytuje informace o velikosti a distribuci částic, zatímco ELS umožňuje měření zeta potenciálu, což je klíčový parametr pro hodnocení stability koloidních systémů. Na závěru všech výsledků byla diskutována také potencionální medicínská aplikace takového systému.

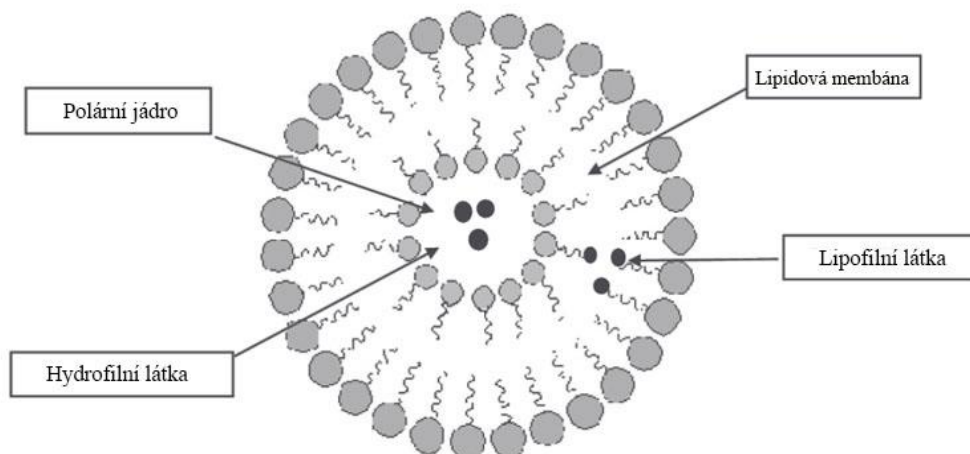
1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Vezikulární systémy

V současné době je vědecký výzkum intenzivně zaměřen na systematické zkoumání vezikulárních systémů jako perspektivního směru ve vývoji nosičů léčiv. Tyto systémy se prokazují jako potenciální alternativa díky své analogii s přirozenými strukturami v organismu, což zaručuje jejich netoxičnost a biodegradabilitu. Jedním z hlavních přínosů těchto systémů je možnost jejich využití jako nosičových systémů. Díky hydrofobní a hydrofilní doméně, je do vezikulárních systémů možné inkorporovat celou řadu léčiv různého druhu a charakteru [1].

Vezikulární systémy představují obecné označení asociativních koloidních systémů. Tyto systémy mohou být složeny z tenzidů, také známé jako povrchově aktivní látky. V našem konkrétním případě je vezikulární systém složen z fosfolipidů, které formují liposomy, což je specifický typ vezikul. Strukturálně jsou tyto systémy charakterizovány jádrem a lipidovou dvojrůstvou, které umožňují transport jak polárních, tak i nepolárních látek (Obrázek 1).

Udržení léků v lipidových systémech usnadňuje průchod buněčnou membránou, což ovlivňuje rychlost absorpce a oddaluje eliminaci léčiv. Tento systém se osvědčuje při manipulaci s léčivy, která jsou určena k rychlé metabolizaci a funguje jako systém s kontrolovaným uvolňováním. Efektivně řeší problémy spojené s nerozpustností, nestabilitou a degradací léků. V návaznosti na tuto problematiku bylo vyvinuto několik doručovacích systémů, včetně liposomů, ethosomů atd. [2]. Různé vezikulární systémy, které byly objektem výzkumu, vykazují nejednoznačnou míru úspěšnosti. Nejnovější studie naznačují, že pro tento účel mají liposomy největší potenciál.



Obrázek 1: Obecné schéma struktury a typu zadržování lipofilních a hydrofilních látek ve vezikulárních systémech [1].

1.2 Liposomy

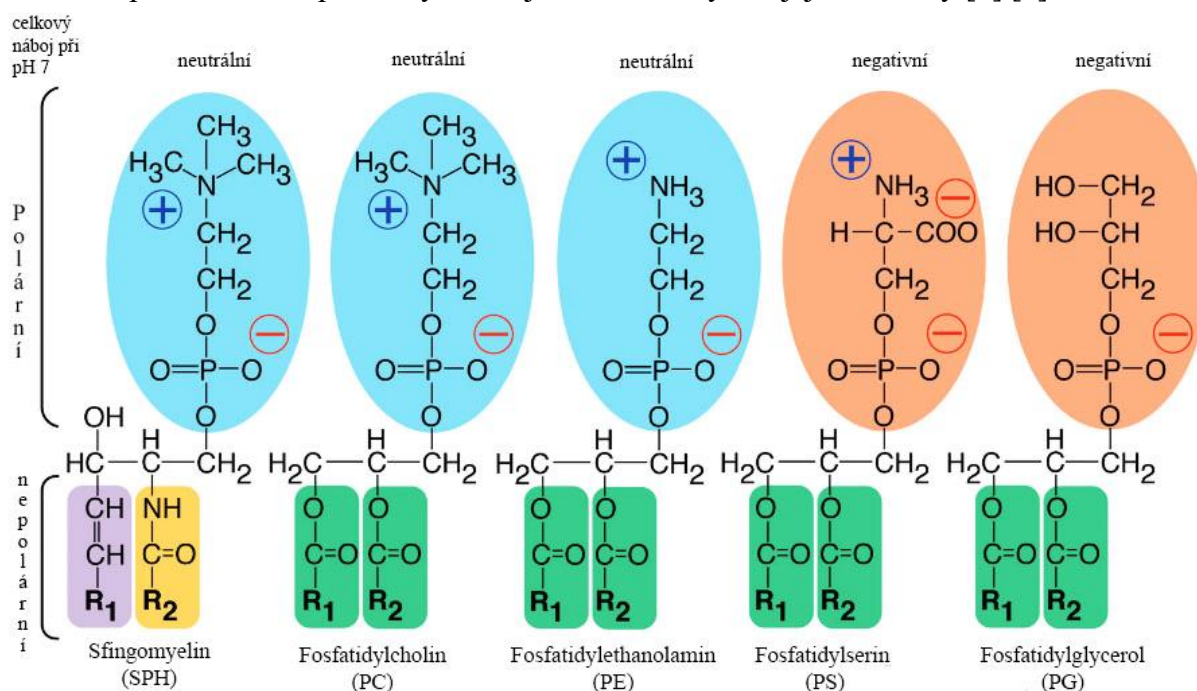
Liposomy byly poprvé objeveny v 60. letech dvacátého století britským hematologem Dr. Alecem Banghamem. Tyto struktury představují koloidní sférické útvary s průměrem od 50 do 500 nm, a svou velikostí jsou na pomezí klasifikace nanočástic až mikročástic.

Liposomy jsou tvořeny amfifilními molekulami lipidů (fosfolipidů), které v roztoku vykazují samoorganizační schopnosti závislé na polaritě rozpouštědla [3].

1.2.1 Složení liposomů

Liposomy vznikají prostřednictvím třech základních interakcí, jako je například hydrofilní působení mezi částmi řetězce fosfolipidů, Van der Waalsovými silami mezi uhlovodíkovými řetězci, díky kterým jsou tyto řetězce udržovány pohromadě a vodíkovými vazbami s molekulami vody. Hydrofobní části molekuly vykazují odpudivost vůči molekulám vody, což vede k samovolnému uspořádání liposomů do uzavřených systémů, tvořených dvojitou vrstvou, pouze v případě, když hodnota packing parametru umožňuje takové uskupení. Liposomální membrána je složena z jedné nebo více lipidových dvojvrstev, známých také jako lamely, které jsou pečlivě uspořádány kolem vnitřního jádra. V této struktuře jsou polární skupiny (hlavy) orientovány směrem ven a hydrofobní skupiny (řetězce) směřují do objemu membrány. Toto charakteristické uspořádání fosfolipidů v liposomální struktuře má významné biologické důsledky, zejména v rámci transportu a interakcí s biologickými membránami [4].

V závislosti na charakteristikách hlav fosfolipidů mohou liposomy nabývat kladného, záporného nebo neutrálního náboje [6] (Obrázek 2). Konečné vlastnosti liposomů jsou ovlivněny strukturou a charakteristikami fosfolipidů. Liposomy mohou plnit různé funkce v závislosti na variacích hlavních skupin, alifatických řetězců a nasycenosti mastných kyselin [7]. Stabilita liposomů může být zlepšena použitím fosfolipidů s delšími hydrofobními skupinami a nízkým stupněm nenasycenosti těchto řetězců, stejně jako přítomností etherových vazeb. Fosfolipidy s delšími nasycenými uhlovodíkovými řetězci vykazují vyšší schopnost vzájemné interakce a formují pevně uspořádané struktury dvojvrstev. Naopak fosfolipidy s kratšími nenasycenými uhlovodíkovými řetězci vedou ke vzniku liposomů s neuspořádanými dvojvrstvami a zvýšení jejich fluidity [8],[9].



Obrázek 2: Příklady nabitých a nenabitých fosfolipidů při neutrálním pH roztoku [10].

1.2.2 Fosfolipidy

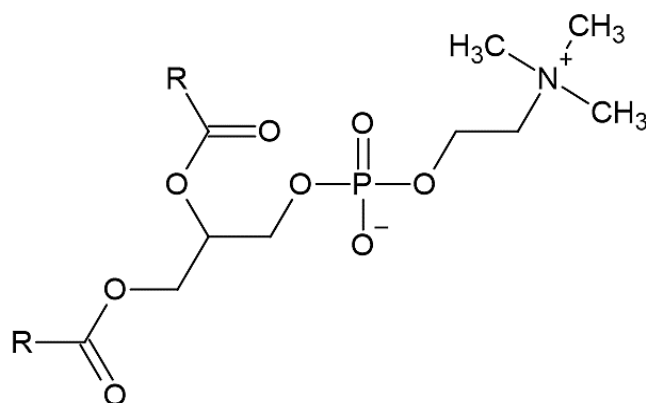
Podstatnou složkou membrány liposomů jsou amfifilními lipidy nazývané glycerofosfolipidy. Základem těchto komponentů je molekula glycerolu, na kterou je esterově vázána fosfátová skupina a dva řetězce mastných kyselin, které podle své struktury mohou být nasycené nebo nenasycené. Fosfátová skupina může být také vázána na jinou organickou molekulu. Podle této organické skupiny jsou přírodní fosfolipidy klasifikovány jako kyselina fosfatidová (PA), fosfatidylcholin (PC), fosfatidyletanolamin (PE), fosfatidylinositol (PI), fosfatidylglycerol (PG) a fosfatidylserin (PS) [6]. Glycerofosfolipidy, nejčastější stavební složky membrán liposomů, lze rozdělit do dvou základních skupin: přírodní a syntetické. Nejčastěji používané přírodní fosfolipidy jsou fosfatidylcholin (PC) a fosfatidyletanolamin (PE), které jsou přítomné v rostlinách a zvířatech. Hlavními zdroji přírodních fosfolipidů jsou vaječný žloutek nebo sójové boby. Syntetické fosfolipidy jsou formovány z přírodních lipidů. Modifikace hlavních skupin, alifatických řetězců a alkoholů přírodních fosfolipidů vytváří širokou škálu syntetických fosfolipidů. Takto uměle vzniklé molekuly prokázaly vyšší odolnost a stabilitu ve srovnání s přírodní formou fosfolipidů. Příkladem syntetického fosfolipidu je dipalmitoylfosfatidylcholin (DPPC) [11].

Dva typy chemických degradačních procesů mohou ovlivnit fosfolipidovou dvojvrstvu a tím i efektivitu liposomů: hydrolýza esterových vazeb, které spojují mastné kyseliny s molekulou glycerolu a peroxidace nenasycených acylových řetězců (v případě jejich přítomnosti). Oxidace a hydrolýza lipidů mohou vést k vytvoření lipidů s krátkým řetězcem a následně k tvorbě rozpustných derivátů v membráně, což může narušit, případně snížit kvalitu liposomových produktů [11].

Kromě toho fyzikální proces, jako je agregace neboli shlukování, může ovlivnit dobu uchovávání liposomů tím, že může docházet k uvolnění léčiva nebo změnám velikosti. Je důležité zabezpečit dobrou stabilitu liposomů z hlediska tuhosti a pevnosti lipidové dvojvrstvy volbou správných lipidů s vysokou teplotou fázového přechodu (T_m), kterou ovlivňují mastné kyseliny, stupeň nenasycenosti, délka řetězce a polární hlavové skupiny [13].

1.2.3 Lecitin

Fosfatidylcholin (lecitin) je nejčastěji se vyskytujícím fosfolipidem v buněčných membránách, kde hraje důležitou roli ve struktuře a funkci. Zdrojem tohoto přírodního fosfolipidu je vaječný žloutek. Struktura molekuly lecitinu je tvořena fosfátovou skupinou, cholinovým zbytkem a dvěma řetězci mastných kyselin (Obrázek 3). Složení mastných kyselin ve fosfatidylcholinu může být různé, především záleží na délce řetězců a jejich stupni nasycenosti.



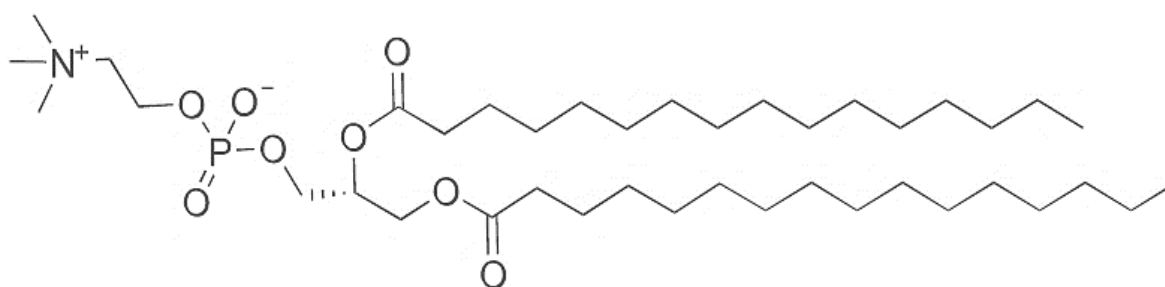
Obrázek 3: Strukturální vzorec fosfatidylcholinu (lecitinu).

Lecitin, jako základní membránový komponent, plní hlavní úlohu v organismu, a to udržování její integrity a fluidity. Lecitin je hlavním zdrojem cholinu, sloučeniny podstatné pro funkci nervového systému. Fosfolipid nachází široké využití v kosmetickém, farmaceutickém průmyslu a v potravinářství, kde slouží jako emulgátor [14].

1.2.4 DPPC

Dipalmitoylfosfatidylcholin (DPPC) je syntetický fosfolipid, skládající se ze dvou řetězců tvořených nasycenou mastnou kyselinou palmitovou, které jsou esterově vázány na molekulu glycerolu. Na poslední hydroxylové skupině glycerolu je navázaná fosfátová skupina, a na tu je následně připojen cholinový zbytek (Obrázek 4). Umělá forma dipalmitoylfosfatidylcholinu (DPPC) vzniká modifikací přírodních fosfolipidů. Nejčastěji je izolován z přírodních zdrojů, jako jsou sójové boby nebo žloutky [11].

Při teplotě 37°C DPPC se nachází v pevné, tzv. gelové fázi. Transitní teplota, při které probíhá přechod z gelové fáze na tekutou, se pohybuje kolem 41°C [15]. Při stejné teplotě nastává i kooperativní destrukce vazeb mezi lipidovými hlavami liposomů. DPPC hraje důležitou roli ve vytváření stabilní struktury membránové dvojvrstvy lipidů a díky tomu patří mezi základní stavební složky liposomů [16]. DPPC je nejčastěji dodáván jako krystalická pevná látka, která se snadno rozpouští v organickém rozpouštědle.



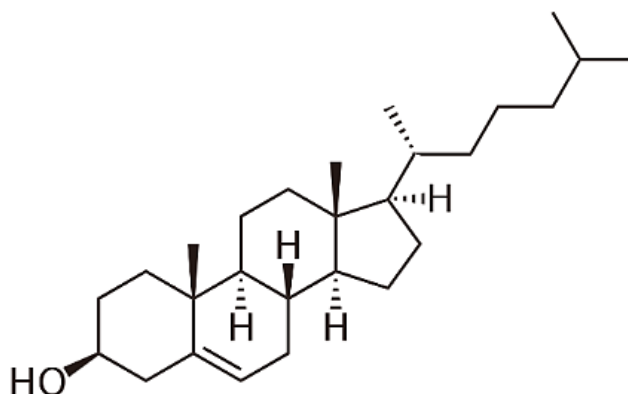
Obrázek 4: Strukturální vzorec dipalmitoylfosfatidylcholin (DPPC) [17].

1.3 Stabilita liposomů

Stabilita liposomů, je ovlivněna různými faktory, například chemické složení lipidové dvojvrstvy, délka a stupeň nasycenosti mastných kyselin složek lipidů, pH a iontová síla okolního média. Tato stabilita je také charakterizovaná teplotou fáze přechodu lipidové dvojvrstvy [16]. Kontrola fyzikální stability liposomů nese klíčový význam pro efektivní využití těchto nanočástic jako nosiče léčiv. Jakákoliv změna velikosti částic nosičů může ovlivnit bezpečnost, zaměření a účinnost liposomů [18]. Proto je důležité zajistit dobrou stabilitu liposomů z hlediska tuhosti lipidové dvojvrstvy. Velmi důležitým faktorem v liposomální struktuře, který je zodpovědný za stabilitu a tuhost membrány, je obsah cholesterolu.

1.3.1 Cholesterol

Cholesterol je organická molekula patřící do skupiny sterolů. Molekulární struktura cholesterolu obsahuje steroidní jádro a alifatický postranní řetězec (Obrázek 5). Hydroxylová skupina v cholesterolu hraje důležitou úlohu, protože dává hydrofobní sloučenině amfifilní charakter, čímž orientuje molekulu v membránách. Navíc má schopnost tvořit vodíkové vazby s molekulou vody a evidentně i s jinými lipidovými složkami buněčných membrán [19], [20].



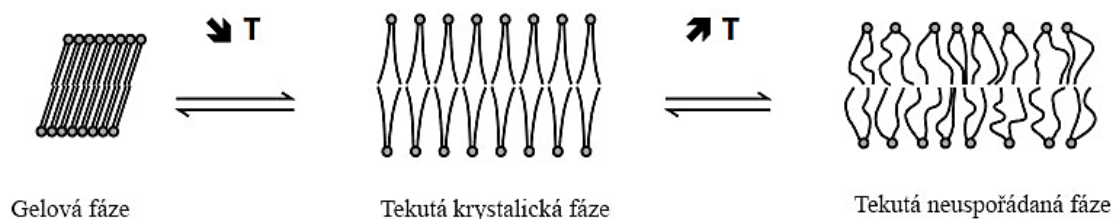
Obrázek 5: Strukturální vzorec molekuly cholesterolu [20].

Z biochemického hlediska je cholesterol nepostradatelným prekurzorem pro biosyntézu všech steroidních hormonů, vitaminů D a žlučových kyselin. V lidském těle se vyskytuje v buněčných membránách, kde jeho přítomnost ovlivňuje její fluiditu a tím i propustnost pro různé molekuly [21]. V důsledku začlenění do biomembrány, přítomnost cholesterolu může výrazně zvětšit velikost liposomální částice, pevnost, elasticitu a tuhost membrány tak, aby lipidové dvojvrstvy byly odolné vůči vysokým mechanickým stresům a docházelo ke snižování potenciálu úniku inkorporovaných léčiv. Cholesterol také brání před agregací liposomů. Molekula cholesterolu dokáže omezit laterální difúzi okolních molekul fosfolipidů, což je důležité pro adaptaci membrány pro různé podmínky (změna teploty, tlaků a jiné faktory) [21],[22],[23].

1.4 Fyzikálně-chemické vlastnosti liposomů

Konečná organizace, morfologie a fyzikálně-chemické vlastnosti liposomů závisí na povaze, velikosti a geometrii jejich lipidových složek, koncentraci, teplotě a povrchovém náboji. Charakter a složení liposomální struktury určuje fluiditu membrány, která je charakterizována teplotou mezifázového přechodu.

Teplota mezifázového přechodu (T_m) je definována jako teplota, která je potřebná k přechodu mezi dvěma fázemi. Z gelové fáze, kde jsou uhlovodíkové řetězce uspořádané v těsné blízkosti, na fázi tekutou, kde dochází k porušení pravidelného uspořádání hydrofobních řetězců a jejich náhodnému orientování (Obrázek 6). Různé molekuly lipidů mají různé teploty mezifázového přechodu v závislosti na délce a nasycenosti mastných kyselin (MK). Čím delší je délka nasycených mastných kyselin, tím je vyšší teplota mezifázového přechodu. Důvodem jsou silnější Van der Waalsovy interakce uhlovodíkových řetězců, které vyžadují větší energii na jejich překonání. Naopak nenasyčené mastné kyseliny mají nižší teplotu mezifázového přechodu, kvůli přítomnosti dvojných vazeb. Takže hodnota teploty přechodu závisí na míře pohyblivosti molekul MK a na jejich prostorovém uspořádání. Nasycené mastné kyseliny mají nižší míru pohyblivosti molekul v gelové fázi než nenasyčené. Toto omezení pohybu přispívá k vyšší teplotě fázového přechodu. Nenasyčené mastné kyseliny mají tendenci tvořit kompaktnější struktury ve varu krystalu, kde takové uspořádání vyžaduje vyšší teplotní změny. Teplota mezifázového přechodu je důležitým kritériem pro volbu správného typu fosfolipidu pro přípravu liposomů. Při použití fosfolipidů s vysokou T_m dojde k tvorbě velmi stabilní struktury membrány liposomů, díky čemu se zvýší i odolnost složek fosfolipidů proti denaturaci, avšak příliš velká hodnota teploty mezifázového přechodu může vést ke snížení možnosti úniku léčiva v cílovém místě. Proto je nezbytné zajistit výběr vhodného fosfolipidu, aby se předešlo dočasnému nebo pozdnímu úniku léčiva z liposomu a nedošlo k denaturaci při zvýšení teploty [24].



Obrázek 6: Fázový přechod membrány fosfolipidů [25].

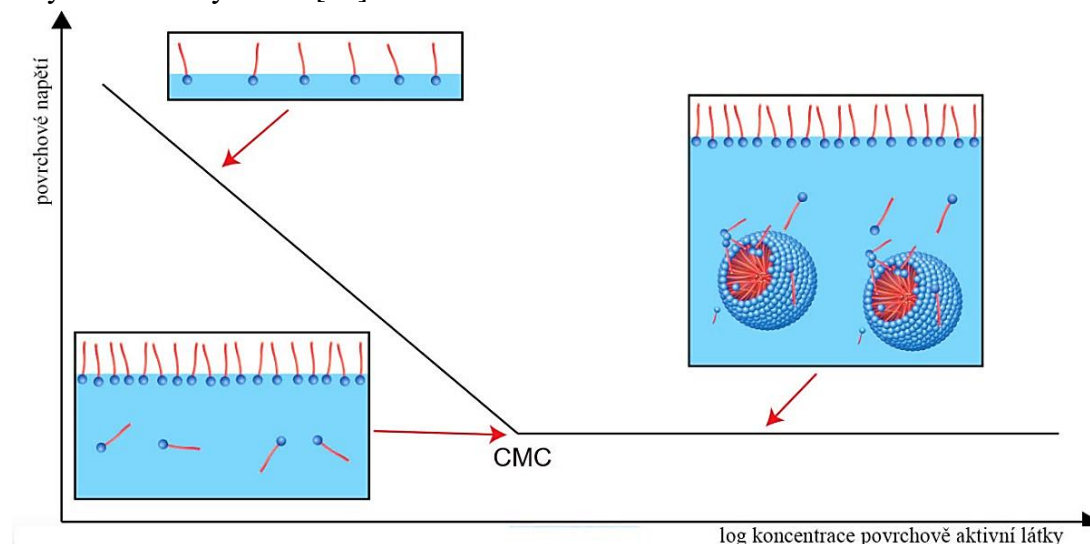
Termín fluidita popisuje pozorovanou resistenci základních strukturních složek biomembrán k pohybu. Je zásadně determinována zastoupením nenasyčených mastných kyselin v molekulách fosfolipidů. Vysoký obsah nenasyčených řetězců vede ke zvýšení fluidity membrány liposomu. Fluiditu je možné ovlivnit inkorporací lipofilních molekul, jako je například již zmíněný cholesterol, který má nezanedbatelný dopad na celkovou stabilitu liposomálních struktur. Kde při nízkých teplotách dokáže zvýšit fluiditu, zatímco při vyšších teplotách ji sníží [26].

1.4.1 Nadmolekulární struktury

Jak již bylo uvedeno, amfifilní makromolekuly, tvořící dvojvrstevné liposomy ve vodném roztoku, mají jak hydrofilní, tak hydrofobní části. Hydrofobní části se snaží minimalizovat svůj kontakt s vodou, zatímco hydrofilní části, ať již jsou nabitými nebo nenabitými, interagují příznivě s okolní vodou.

Při nízké koncentraci tenzidů v roztoku dochází k projevení hydrofobního efektu a nerovnoměrnému rozložení koncentrace. Hydrofobní části molekul jsou vytlačovány z roztoku, což vede k shromáždění molekul tenzidů na fázovém rozhraní a zvýšení jejich koncentrace vzhledem k objemové fázi.

Při dosažení určité koncentrace tenzidů, dochází k samovolnému uspořádání systému a tvorbě nadmolekulárních struktur. Koncentrace, při které dojde k vytvoření nadmolekulární struktury se označuje jako kritická micelární koncentrace (CMC z angl. *Critical Micelle Concentration*) a pro každý tenzid má charakteristickou hodnotu (Obrázek 7) [27]. Hodnota CMC klesá s narůstající délkou uhlovodíkového řetězce. Četnější rozvětvení uhlovodíkového řetězce a přítomnost dvojných vazeb naopak vedou k zvýšení hodnoty CMC [28].



Obrázek 7: Schéma shromáždění amfifilů na fázovém rozhraní před a po dosažení CMC [29].

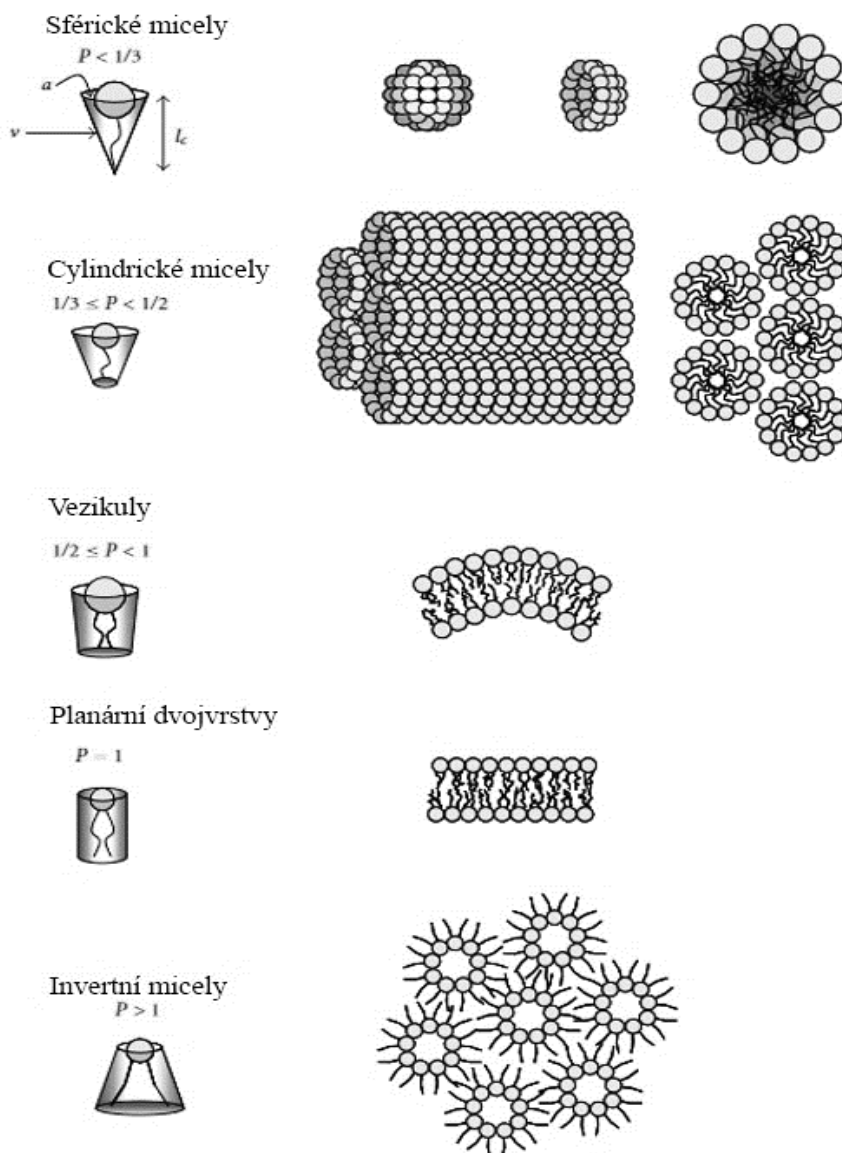
1.4.2 Tvar agregátů

Jelikož samoseskupení neboli agregace amfifilních molekul je dynamický proces, kde hnací silou jsou především hydrofobní interakce, tvar a velikost vzniklé nanočástice závisí na molekulární geometrii její komponentních povrchově aktivních látek a podmínkách roztoku, jako jsou koncentrace povrchově aktivní látky, teplota, pH a iontová síla. Předběžně odhadnout tvar a velikost lze pomocí analýzy kritického balícího parametru (CPP)

$$C_{pp} = \frac{V}{l \cdot a_0} \quad (1).$$

kde V je efektivní objem obsazený hydrofobními řetězci v jádře agregátu, l je maximální efektivní délka (kritická délka řetězce) hydrofobních ocásků, a_0 je efektivní plocha hlavičky na rozhraní mezi agregátem a roztokem.

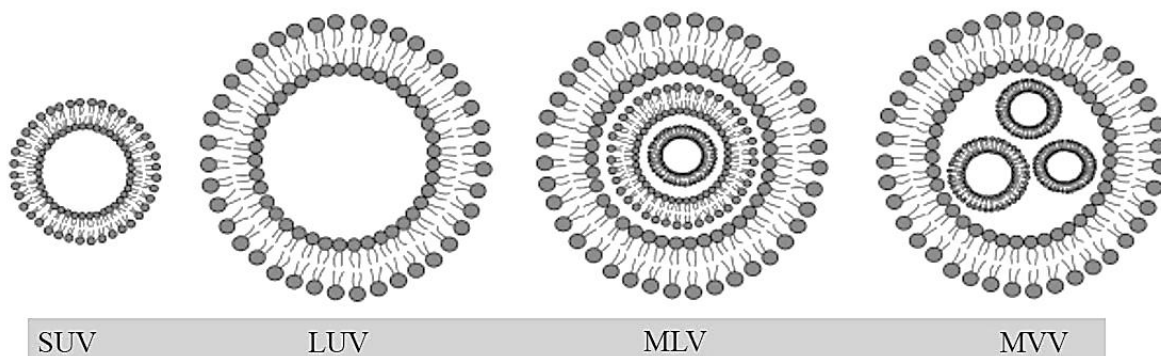
Hodnota parametru CPP je bezrozměrná veličina a odpovídá pouze tvaru struktury nanočástice. S nárůstem hodnoty CPP mohou vznikat sférické micely ($CPP \leq 1/3$), cylindrické neboli válcovité micely ($1/3 \leq CPP \leq 1/2$), vezikuly ($1/2 \leq CPP \leq 1$) a lamelární struktury, kde se formuje planární dvojvrstva ($CPP = 1$) (Obrázek 8). Při hodnotě parametru $CPP > 1$ dochází ke vzniku invertních neboli obrácených micel [30], [31].



Obrázek 8: Uspořádání struktur lipidů podle hodnoty kritického balícího parametru CPP [31].

1.4.3 Rozdělení liposomů

Podle své struktury jsou liposomy klasifikovány na základě velikosti vezikul a počtu lipidových dvojvrstev, známých jako lamely (Obrázek 9). Lamelárnost liposomů vede k rozdělení do tří hlavních kategorií: unilamelární (ULV, s rozsahem velikosti ve všech rozměrech), multilamelární (MLV, >500 nm) a multivezikulární (MVV, >1000 nm) vezikuly. Unilamelární liposomy mohou dále patřit do tří podkategorií podle velikosti: malé unilamelární vezikuly (SUV 20–100 nm), velké unilamelární vezikuly (LUV >100 nm) a obří unilamelární vezikuly (GUV >1000 nm) [32].



Obrázek 9: Rozdělení liposomů podle velikosti. Malé unilamelární vezikuly SUV (Small Unilamellar Vesicles), velké unilamelární vezikuly LUV (Large Unilamellar Vesicles), multilamelární MLV (Multilamellar Vesicles) a multivezikulární MVV (Multi Vesicular Vesicles).

Unilamelární liposomy (ULV) se vyznačují přítomností jedné lipidové dvojvrstvy, což zajišťuje jejich zvýšenou kapacitu enkapsulace hydrofilních sloučenin. Naopak, multilamelární liposomy (MLV) obsahují dvě nebo více koncentrických lipidových dvojvrstev, které jsou uspořádány do cibulovité struktury, což je výhodné pro efektivní enkapsulaci lipofilních sloučenin. Multivezikulární liposomy (MVV) představují struktury zahrnující několik malých a nekonzentrických vezikul uzavřených v jediné lipidové dvojvrstvě, což je ideální pro enkapsulaci velkých objemů hydrofilního materiálu [32],[33].

Liposomy lze dále klasifikovat podle své funkce a modifikace povrchové membrány. **Konvenční liposomy** představují běžný typ nanočástic, kde se membrána skládá převážně z neutrálních fosfolipidů. V důsledku této struktury vykazuje systém konvenčních liposomů nižší stabilitu, protože membrána má poměrně omezenou transportní kapacitu a vysokou propustnost. Liposomy dokážou snížit toxicitu *in vivo* a chrání okolní tkáň před nežádoucí kumulací léčiva, díky čemuž významně zvyšuje jeho terapeutický účinek v cílovém místě [36]. Povrch membrány konvenčních liposomů lze modifikovat různými ligandy nebo polymery pro další funkce, jako je zlepšení stability nebo aktivace specifických buněčných cest.

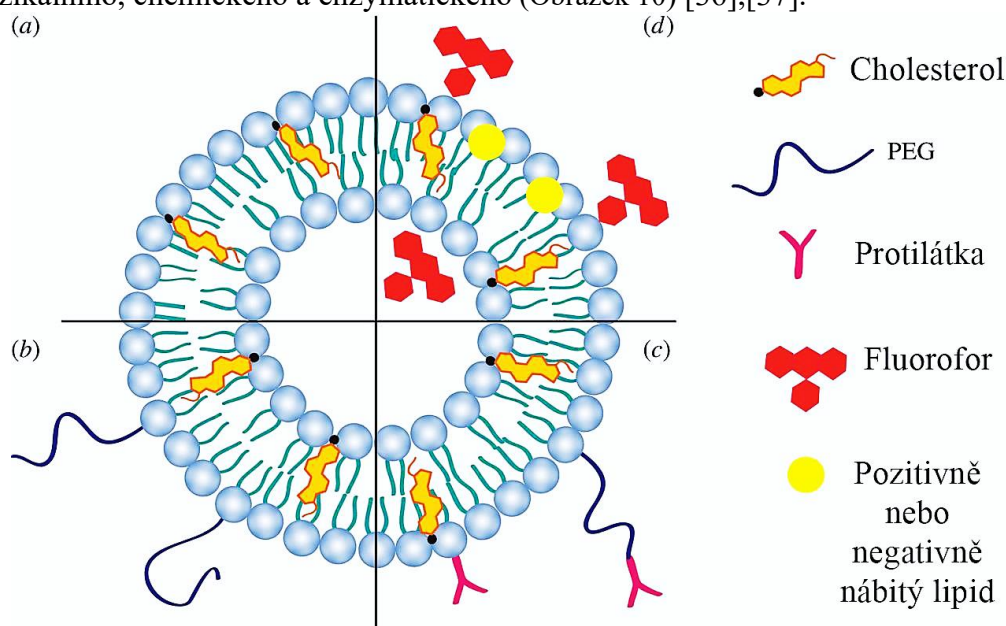
Citlivost imunitního systému je hodně vysoká k jakékoliv cizorodé látce, nesoucí libovolný náboj. Proto je důležité modifikovat povrch liposomu tak, aby došlo k minimalizaci interakcí s imunitním systémem a prodloužení jejich cirkulační doby v krevním oběhu.

Stealth liposomy představují speciální typ liposomů navržených tak, aby minimalizovali detekci imunitním systémem, zvýšily účinnost léčby a zlepšily kompatibilitu v těle. Membrána takových liposomů je obvykle modifikována polymery s dlouhými řetězci, především polyethylenglykolem (PEG). Polymer vytváří kolem liposomu hydrofilní síť, čímž minimalizuje snadné rozpoznání makrofágy a dalšími částmi imunitního systému [34],[35].

Podstatnou roli v účinném doručování léčiv a dalších látek hrají **cílené liposomy**, které jsou modifikovány tak, aby mohly specificky interagovat s určitým typem buňky nebo tkáň. Na povrchu cílených liposomů jsou přítomny charakteristické ligandy (protilátky, enzymy, peptidy atd.), které umožňují specifické navázání na povrch receptorů cílových buněk. Tím způsobem mají liposomy tendenci se selektivně akumulovat v cílových

oblastech, kde jsou tyto charakteristické buňky přítomny, což značně zlepšuje účinnost léčby a efektivitu terapie.

Nabité liposomy, nazývané také **lipoplexy** zahrnují liposomy, které obsahují nabitý fosfolipid. Tyto liposomy poskytují kovalentní interakci s opačně nabitými makromolekulami jako jsou DNA, RNA nebo proteiny a představují efektivní způsob přenosu látek s vysokou molekulovou hmotností. V jejich membráně je integrována chemická látka, která způsobuje změny fosfolipidové vrstvy pod vlivem vnějšího podnětu, a to fyzikálního, chemického a enzymatického (Obrázek 10) [36],[37].



Obrázek 10: Schematické znázornění typů liposomů: (a) konvenční liposomy; (b) Stealth liposomy; (c) liposomy cílené na ligandy; (d) fluorescenční liposomy a nabité liposomy [11].

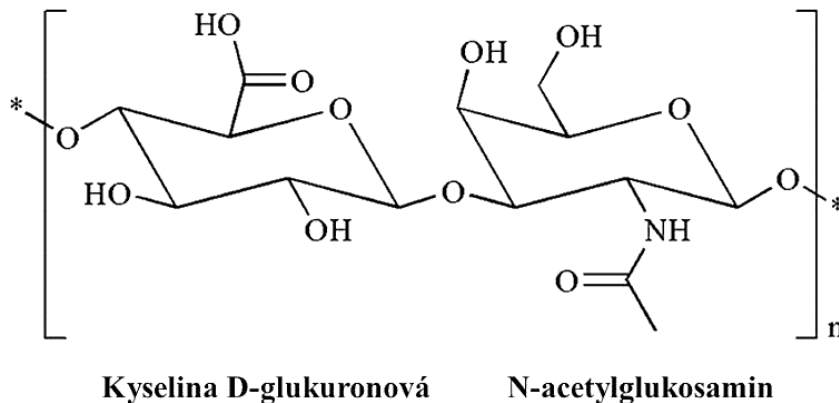
1.5 Využití liposomů

S ohledem na jejich biokompatibilitu, biodegradabilitu a nízkou imunogenicitu získávají liposomy stále větší pozornost jako perspektivní prostředek v rámci rozličných farmaceutických aplikací. Mezi tyto aplikace patří využití liposomů jako nanonosičů pro cílenou terapii, v oblasti lékařského zobrazování, nosičů vakcín a kosmetických přípravků. Liposomy vystupují jako ideální transportní systém pro širokou řadu farmaceutik a pro biologicky aktivní látky, kde jejich aplikace zajišťuje prodlouženou cirkulaci léčiv v krevním oběhu a postupné či řízené uvolňování specificky zacíleného léčiva. Jedním z jejich hlavních cílů je také optimalizace biodostupnosti léčiv s nízkou rozpustností. Současně se projevuje jejich schopnost efektivně zvyšovat buněčné vstřebávání léčiv s omezenou průchodností biologickými membránami, což vede k zvýšení biodistribuce léčiva na specifická místa *in vivo* s minimální systémovou toxicitou. Liposomy jsou též využívány k enkapsulaci velké řady labilních biologicky aktivních látek, včetně peptidů, enzymů atd. [38].

1.6 Hyaluronan

Kyselina hyaluronová (HA), představuje vysokomolekulární biopolysacharid, který se přirozeně vyskytuje jako nesulfátovaný glykosaminoglykan. Molekulární struktura HA je složena z opakujících se disacharidových jednotek kyseliny D-glukuronové a N-acetylglukosaminu s počtem opakování až do desítek tisíc. Tyto dvě složky jsou spojeny prostřednictvím energeticky stabilních β -1,3 a β -1,4 glykosidických vazeb (Obrázek 11). Molekulová hmotnost jedné disacharidové jednotky je zhruba 395 g/mol a celková hmotnost polymeru se dostává až na miliony Daltonů (MDa).

V současné době se název hyaluronan používá přednostně, protože tento polysacharid existuje v přírodě především ve formě soli, nikoliv v podobě kyseliny. Tato sůl se skládá z aniontů hyaluronanu a kationtů (například sodík, draslík, vápník atd.). Kyselina hyaluronová v podobě roztoku také existuje, avšak obvykle pouze v laboratořích, protože podstupuje okamžitou degradaci a roztok nabývá velmi kyselého pH. Z těchto důvodů je použití kyseliny hyaluronové za fyziologických podmínek v živých organismech omezené [39],[40].



Obrázek 11: Strukturní vzorec kyseliny hyaluronové [40].

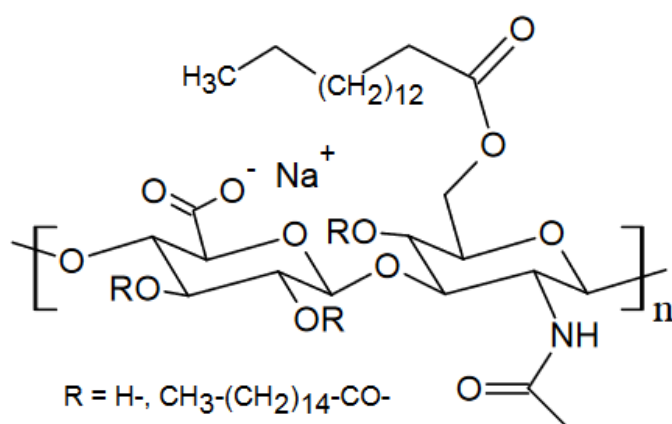
Hyaluronan je jednou z nejhydrofilnějších molekul v přírodě, což znamená, že má vysokou afinitu k vodě. Po hydrataci získá molekula HA viskózní až gelovitou strukturu. Taková forma kyseliny hyaluronové se vyskytuje přirozeně ve všech živých organismech, především v extracelulárním a pericelulárním matrix, stejně také její přítomnost byla prokázána i uvnitř buňky. Molekuly hyaluronanu jsou součástí pojivových, epiteliálních a nervových tkání [41]. Biologická funkce hydratované molekuly hyaluronanu je cílená na udržování elastoviskozity tekutých spojovacích tkání, jako jsou kloubní a oční tekutiny, hydratace tkání a transport vody. V závislosti na molekulové hmotnosti plní molekula HA další různé funkce. Například vysokomolekulární hyaluronan má protizánětlivý dopad. Aplikací HA s vysokou molekulovou hmotností ve formě injekcí přímo do kloubu dojde k primárnímu potlačení bolesti a zároveň ke zvýšení koncentrace hyaluronanu v kloubu. To následně vede k sekundárnímu potlačení bolesti v kloubu, díky tomu, že kloub je lépe lubrikován. HA ovlivňuje produkci buněk imunitního systému, tím podporuje regulaci první fáze hojení ran a regeneraci pojivových struktur. Jako aktivní látka HA nachází své uplatnění i při oftalmologických operacích, boji proti projevům kloubních onemocnění, jako nosiče léčiv nebo při péči o pleť [42],[43],[44].

1.6.1 Modifikace hyaluronanu

Přirozená forma hyaluronanu má vynikající vlastnosti, avšak pro praktické využití je často nezbytná jeho modifikace. Chemická modifikace spočívá v úpravě struktury hyaluronanu. Modifikace především může sloužit pro přidání nových biologických vlastností, úpravu fyzikálně-chemických vlastností molekuly hyaluronanu atd. Kyselina hyaluronová může být chemicky modifikována dvěma způsoby, a to jsou cross-linking neboli zesíťování a konjugace. Modifikace cross-linking se uplatňuje při narušení struktury HA pouze v jednom místě molekuly. Při konjugaci je struktura HA porušena ve dvou a více bodech. Molekula hyaluronanu má k dispozici tři funkční místa, která mohou být využívána k modifikaci. Karboxylová skupina podléhá takovým chemickým procesům jako jsou amidace, esterifikace a oxidace, hydroxylová skupina slouží k tvorbě etherů, hemiacetalů, esterů, karbamidů a aminoskupina [45].

1.6.2 Palmitoyl hyaluronát sodný

Palmitoyl hyaluronát sodný je acylový derivát hyaluronátu sodného. Při syntéze modifikovaného polymeru dochází k esterifikaci kyseliny hyaluronové s palmitovou kyselinou (Obrázek 12). To znamená, že palmitová kyselina s dlouhým 16uhlíkovým mastným řetězcem se váže na hydroxylové skupiny v molekulách kyseliny hyaluronové. Tato reakce zahrnuje reakci mezi hydroxylovými skupinami kyseliny hyaluronové a karboxylovými skupinami palmitové kyseliny. Následně se sodík váže na vytvořený ester, vytvářející palmitoylhyaluronát sodný.



Obrázek 12: Strukturální vzorec palmitoylhyaluronátu sodného [46].

Rozpustnost polymeru je ovlivněna molekulovou hmotností a stupněm substituce derivátu. Čím vyšší jsou tyto parametry, tím pomaleji se molekula ve vodě rozpouští. Rozpustnost lze zvýšit přidáním alkoholu nebo jiných organických rozpouštědel, například izopropylalkoholu.

Palmitoylhyaluronát sodný vykazuje minimální adhezi vůči membránám, díky čemuž umožňuje široké využití v oblasti vnitřní chirurgie, ve systému nosičů léčiv, může být součástí regenerativní medicíny při přípravě skafoldů a membránových mikrovláken [46],[47],[48].

1.7 Dynamický rozptyl světla

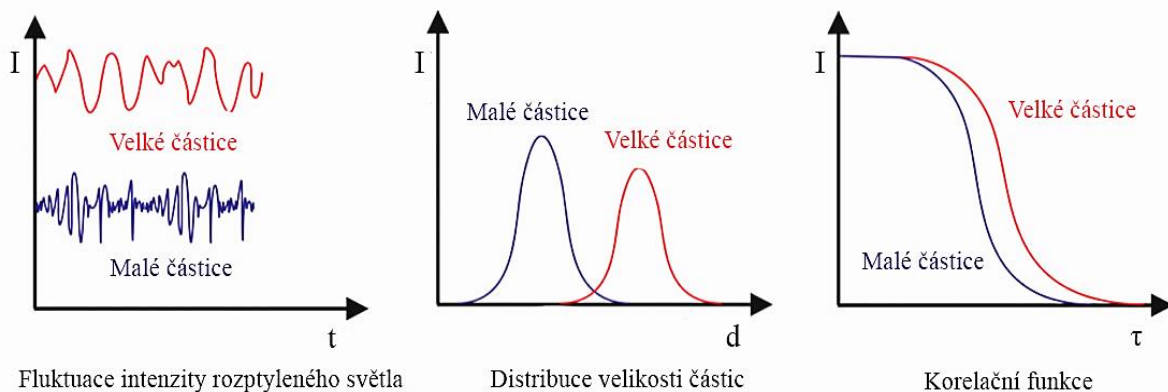
Metoda dynamického rozptylu světla (DLS z angl. *dynamic lighth scattering*) byla poprvé popsána v roce 1976 Robertem L. Fullerenem a Davidem L. DeRosierem.

Principem této metody je sledování změny fluktuace intenzity dopadajícího (rozptýleného) světla na detektor v čase. Fluktuace je následně může být analyzována pomocí autokorelační křivky. Pokud jsou částice v roztoku velké, fluktuace intenzity rozptýleného světla bude mít delší dobu trvání a korelační křivka bude mít pomalejší pokles. Zatímco pro malé částice doba fluktuace je kratší a korelační křivka bude mít výraznější pokles. Také rozptyl velkých částic bude vždy intenzivnější v malých úhlech a naopak (Obrázek 13). Ze znalosti korelačního difúzního koeficientu stanoveného z korelační křivky je možné prostřednictvím Stokes-Einsteinovy rovnice určit hodnotu velikosti částic přítomných v roztoku. Rovnice má tvar:

$$D(H) = \frac{k_b \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \mu \cdot D_{trans}} \quad (2).$$

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

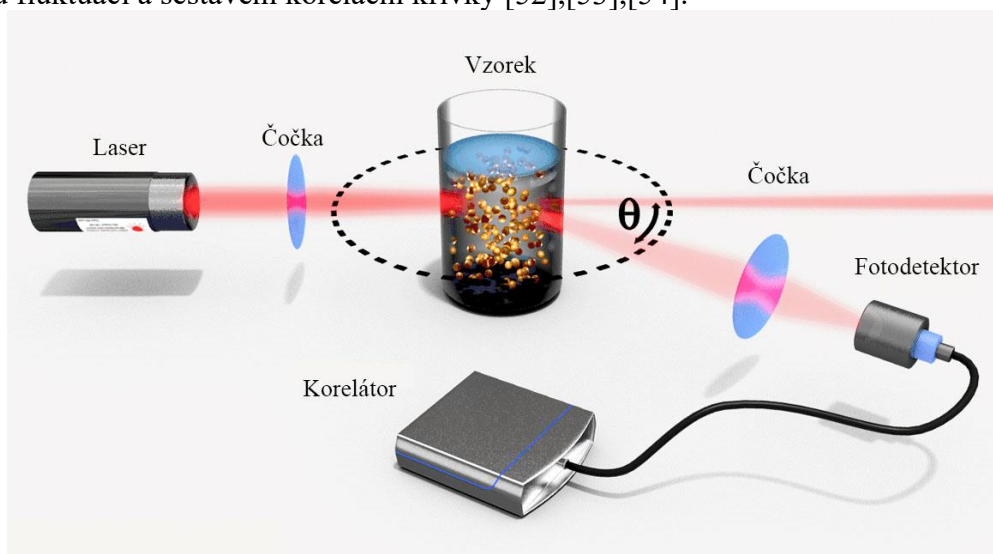
Autokorelační křivka udává autokorelační funkce, která umožňuje spočítat velikost různých nanočástic v koloidních systémech a následně stanovit jejich distribuci. Základem měření je náhodný pohyb nanočástic působící rozptyl světla vznikající pod vlivem **Brownova pohybu** [49],[50]. Pohyb je způsoben neustálými srážkami jednotlivých částic s molekulami disperzního prostředí. Rychlost tohoto pohybu je ovlivněna velikostí částic, kde malé molekuly se pohybují rychleji oproti velkým [51]. Intenzita rozptýleného záření závisí na vzdálenosti mezi částicí a detektorem, která se neustále mění.



Obrázek 13: Distribuce dynamického rozptylu světla (DLS) velkých a malých částic [52].

Instrumentační technika měření dynamického rozptylu světla se skládá z monochromatického koherentního světelného zdroje, optické soustavy, fotodetektoru a korelátoru. Nejčastěji využívaným zdrojem světla je laser pracující na bázi helium-neonového plynu (He-Ne) o vlnové délce 633 nm, který poskytuje monochromatické světlo. Optická soustava je složená z kolimátoru, který zajišťuje rovnoměrný a paralelní průchod světelného paprsku, a série čoček, které směřují světelný svazek jak na vzorek, tak i na detekční systém (Obrázek 14).

Detektorem je nejčastěji fotonásobič, který je umístěn pod úhlem 10° až 173° (dle zvoleného postupu měření atd.). Dalším typem detektoru je také fotodioda. Detektory snímají signál intenzity rozptýleného světla v čase, zatímco korelátor je zodpovědný za analýzu fluktuací a sestavení korelační křivky [52],[53],[54].



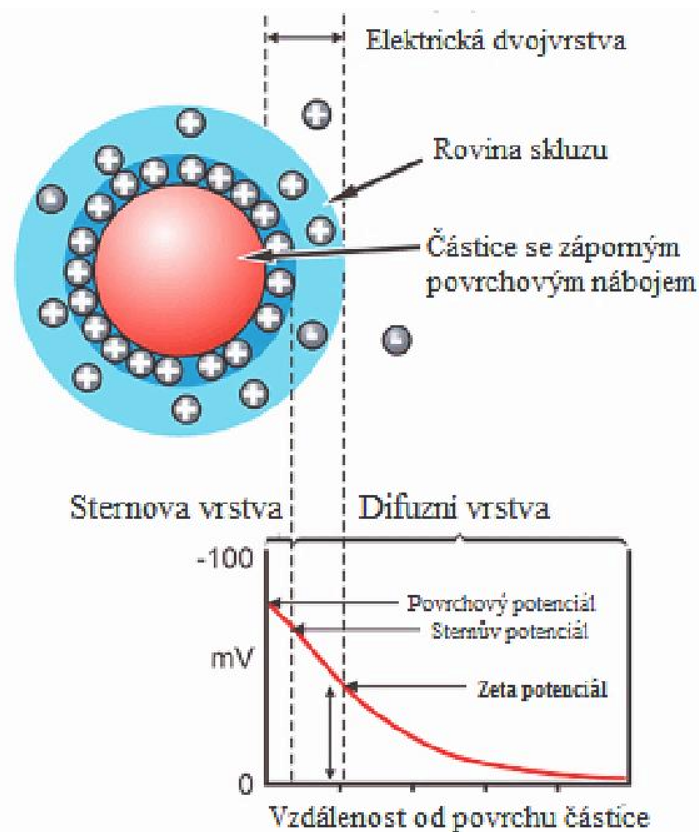
Obrázek 14: Instrumentace DLS měření [50].

1.8 Elektroforetický rozptyl světla

Elektroforetický rozptyl světla (ELS z angl. *electrophoretic light scattering*) je metoda sloužící ke stanovení elektroforetické mobility, charakterizaci povrchového náboje částic a celkové elektrostatické stability měřeného systému, a to pomocí určení zeta potenciálu [55].

Pokud je každá částice nesoucí jakýkoli náboj, dispergována v prostředí, tak dochází k tvorbě elektrické dvojvrstvy. Tato elektrická dvojvrstva se skládá ze dvou částí: z vnitřní oblasti, známé také jako **Sternova vrstva**, kde jsou ionty pevně a silně vázané na primární povrch nabitých částic prostřednictvím elektrostatických a adsorpčních sil, a vnější oblasti, nazývané také **difúzní vrstva**. Difúzní vrstva nevykazuje stabilní uspořádání, protože je tvořena pohyblivými ionty. Její struktura může být ovlivněna iontovou silou, koncentrací atd. Uvnitř difúzní vrstvy existuje pomyslná hranice nazývaná **rovina skluzu** (Obrázek 15) [53],[56],[57]. Potenciál existující na rovině skluzu, který je ovlivněn vzdáleností od povrchu částice, se nazývá **zeta potenciál**.

Základním principem ELS metody je elektroforéza, kde stanovení elektroforetické mobility a charakterizace částice je možné v důsledku vloženého napětí mezi dvěma elektrodami. Po aplikaci elektrického pole, částice, které mají absolutní náboj, budou migrovat směrem k opačně nabitým elektrodám rychlostí, známou jako mobilita, která souvisí také s jejich zeta potenciálem. Hodnota zeta potenciálu významně určuje stabilitu připraveného systému. Pokud se pohybuje v rozmezí hodnot -30 mV až $+30$ mV, systém se nachází v nestabilní oblasti a může docházet k agregaci částic. Naopak, systém částic nabývajících velkého záporného nebo kladného náboje zeta potenciálu má tendenci se navzájem odpuzovat, čímž se považuje za stabilní. Mezní hodnoty určující stabilitu systému jsou $(-\infty, +30$ mV) anebo naopak $(-30$ mV, $+\infty)$ [58],[59],[60].



Obrázek 15: Schéma elektrické dvojvrstvy [59].

1.9 Současný stav řešené problematiky

Jak již bylo zmíněno, liposomální systémy v poslední době nacházejí široké uplatnění v systémech doručování léčiv.

Bonechi C. a spol. zkoumali fyzikálně-chemické vlastnosti kyseliny hyaluronové (HA) a chitosanových (CH) liposomálních povlaků, které jsou široce používány v biomedicíně a kosmetice. Pro syntézu zwitterionických liposomů použili fosfolipidy DOPC a DOPE. Liposomy byly připraveny metodou hydratace tenkého filmu. CH liposomy byly vytvořeny rehydratací fosfolipidů v chloroformu a chitosanu v octové kyselině, zatímco HA liposomy byly syntetizovány hydratací lipidového filmu roztokem HA. Liposomy potažené CH a HA byly charakterizovány metodami DLS pro stanovení velikosti, polydisperzního indexu (PDI) a zeta potenciálu (ZP). Výsledky ukázaly, že povlak liposomů zvyšuje jejich velikost a ovlivňuje stabilitu v roztoku, přičemž CH vykazují vyšší stabilitu než HA. Liposomy obsahující kladný a záporný náboj (zwitterionické liposomy) byly připraveny z fosfolipidů DOPC a DOPE v konečném molárním poměru 1:0,5. CH liposomy byly vytvořeny rozpuštěním fosfolipidů v chloroformu, sušením ve vakuu, následnou rehydratací ultra čistou vodou a přidáním chitosanu v octové kyselině. HA liposomy byly připraveny hydratací lipidového filmu roztokem HA a následnými cykly mražení a extruze. Čištění liposomů probíhalo centrifugací a dialýzou. Výsledky měření pomocí DLS ukázaly, že průměrná velikost liposomů se zvýšila po nátěru CH a HA. Výsledky získané jsou uvedeny v Tabulka 1.

Tabulka 1: Rozložení velikosti s indexem (PDI) a ZP pro všechny syntetizované liposomy

Liposomální komplex	Velikost [nm]	Polydispersní index (PDI)	Zeta Potenciál [mV]
DOPC/DOPE	160,5 ± 3,3	0,15	25,5 ± 9,4
DOPC/DOPE-HA	264,4 ± 12,5	0,20	4,9 ± 3,3
DOPC/DOPE-CH	450,3 ± 16,7	0,35	55,3 ± 8,2

Charakterizace pomocí DLS ukázala, že prázdné zwitterionické liposomy měly velikost přes 100 nm s PDI naznačujícím monodisperzní systém a ZP (25,5 ± 9,4) mV, což znamená stabilitu v roztoku. HA liposomy měly velikost (264,4 ± 12,5) nm s PDI pro monodisperzní systém a ZP ukazující na možnou agregaci. CH liposomy vykazovaly velikost (450,3 ± 16,7) nm a polydispersní systém s vysokou stabilitou. Tyto výsledky naznačují správnost procesu potažení a fyzickou stabilitu liposomů, zejména u CH liposomů [61].

Laye C. a spol. se zabývali tvorbou liposomů potažených chitosanem s cílem zlepšit jejich stabilitu a vlastnosti pro použití v potravinářských a farmaceutických aplikacích. Sójový lecitin byl vybrán jako základní složka. Lecitinový roztok byl připraven dispergací lecitinu v acetátovém pufru, zatímco roztoky chitosanu byly připraveny dispergací chitosanu ve stejném roztoku. Primární liposomy s průměrem částic 100 a 200 nm byly připraveny ultrazvukovou sonifikací a vysokotlakou homogenizací. CH modifikované liposomy byly vytvořeny nanesením vrstvy chitosanu na povrch iontových liposomů, což vedlo k výrazně lepší stabilitě a snížení agregace liposomů. Střední průměr částic v suspenzi byl vysoce závislý na koncentraci chitosanu přidaného do liposomů. Měření ZP ukázalo změny povrchového náboje z aniontového -38 mV na kationtový +85 mV, což potvrzuje úspěšné potažení. Potažené liposomy vykazovaly lepší stabilitu a kontrolované uvolňování účinných látek, což je činí vhodnými pro zlepšení doručování bioaktivních látek v potravinářském a farmaceutickém průmyslu [62].

Otto K. Kari a spol. zkoumali světlem aktivované liposomy potažené kyselinou hyaluronovou pro cílené doručování léčiv. Cílem studie bylo zlepšit stabilitu a účinnost doručování léčiv do očních a systémových tkání. Dalším cílem bylo vyhodnotit, jak potahování HA ovlivňuje chování liposomů v různých biologických médiích. Pro syntézu liposomů byly použity fosfolipidy DPPC a 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-fosfocholín (DSPC). Byly syntetizovány HA-lipidové komplexy a liposomy o velikosti 100 nm. Pro porovnání byly také připraveny liposomy potažené polyethylenglykolem (PEG). Uvolňování léčiv aktivované světlem bylo testováno v různých médiích (pufr, plazma, sklivce). Byla provedena charakterizace liposomů z hlediska jejich stability a transportních vlastností. Byla měřena velikost částic, zeta potenciál a byly prováděny experimenty s uvolňováním léčiva. HA-liposomy vykazovaly zlepšenou stabilitu (nižší zeta potenciál) v plazmě ve srovnání s PEG-liposomy. Ovšem HA-liposomy vykazovaly také sníženou mobilitu ve sklivci, což bylo způsobeno interakcí s kolagenem. Vědci zjistili, že HA-potažené liposomy mají významně vyšší stabilitu v biologických médiích, což je důležité pro jejich potenciální využití v medicíně. Snížená mobilita ve sklivci naznačuje, že tyto liposomy by mohly být vhodné pro cílené doručování léčiv do očních tkání [63].

Chang N. a spol. zkoumali vliv kyseliny hyaluronové (HA) na penetraci a retenci léčiv v kůži s cílem navrhnout a ověřit HA-modifikované kationtové liposomy pro zlepšení transdermálního podání léčiv. Studie využívala různé zavedené techniky pro přípravu liposomů, včetně hydratace tenkého filmu. Pro přípravu liposomů byl použit vaječný lecitin.

Zjistili, že HA s nízkou molekulovou hmotností (5 kDa a 8 kDa) lépe proniká do epidermis a dermis než vysokomolekulární HA. HA-modifikované liposomy vykazovaly zvýšenou velikost částic a zeta potenciál, což svědčí o úspěšné modifikaci. Velikost částic se po modifikaci HA zvětšila na přibližně 150 nm. Tyto liposomy prokázaly lepší hydrataci a zadržování léčiva ve srovnání s nemodifikovanými liposomy, s velikostí částic ($230,61 \pm 2,83$) nm, zeta potenciálem +30,0 mV a účinností zachycení 97,45 %. Celkově HA s nízkou molekulovou hmotností (<8 kDa) vykazovala lepší schopnost porušit vnější bariéru kůže a zvýšit transdermální podání díky svému hydratačnímu účinku [64].

Smistad G. a spol. zkoumali vliv délky hydrofobního řetězce a stupně modifikace hydroxyethylcelulózy (HEC) na stabilitu a uvolňovací vlastnosti liposomů potažených hydrofobně modifikovanou hydroxyethylcelulózou (HM-HEC). Byly zahrnuty HM-HEC s různým stupněm hydrofobní modifikace (1 a 2 mol%) a hydrofobní skupiny s různou délkou řetězce (C8, C12, C16). Liposomy byly připraveny z lipidů, jako je fosfatidylcholin ze sójových bobů a vajec, a dipalmitoylfosfatidylcholin (DPPC) metodou tenkovrstvé hydratace a injekce ethanolem. Oba typy liposomů byly úspěšně potaženy HM-HEC obsahujícím 1 mol% hydrofobních skupin, zatímco 2 mol% nefungovaly pro zamýšlené farmaceutické aplikace, kvůli nízkým hodnotám propustnosti vzorků. Stabilita byla hodnocena měřením velikosti, zeta potenciálu a úniku obsahu po dobu 24 týdnů při 4°C. Polymerem potažené liposomy v gelové fázi byly stabilní, zatímco u liposomů v tekuté fázi bylo pozorováno zvětšení velikosti, zejména u C8 HM-HEC. Kratší hydrofobní řetězce vedly k méně stabilním liposomům v tekuté fázi, zatímco u gelové fáze nebyl pozorován žádný vliv délky řetězce [65].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V této kapitole je uveden přehled použitých chemikálií a laboratorního vybavení, spolu s principy a metodami přípravy vzorků a roztoků.

2.1 Použité chemikálie

Tabulka 2: Seznam použitých chemikálií

Lipidy	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfocholin 16:0 PC (DPPC) Avanti polar lipids, Inc. Lot: 850355P-1G-A-328 CAS: 63-89-8 M _w : 734,039
	L- α -Phosphatidylcholine from egg yolk, ~60% (TLC) 61755-25G Sigma Aldrich life Science Lot: BCBV3947 CAS: 8002-43-5 EC: 232-307-2
	1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (chloride salt) 18:1 TAP (DOTAP) Avanti polar lipids, Inc. Lot: 181TAP-158 CAS: 132172-61-3 M _w : 698,55
Polysacharidy	Palmitoyl hyaluronát sodný Contipro a.s. E16-230906-B 600-08-05 M _w : 55 kDa
Rozpouštědla	Chloroform stabilizovaný ethanol Penta chemicals unlimited CAS: 67-66-3 Index No: 602-006-00-4 M _w : 119,38
	Izopropylalkohol, Propan-2-ol Lach-ner, s.r.o. CAS: 67-63-0M _w : 60.1
	Deionizovaná voda (ELGA) Laboratorní ethanol
Ostatní	Cholesterol 3 β -Hydroxy-5-cholestene, 5 – Cholesten-3 β -ol Sigma Aldrich life Science 26732-25G-F CAS: 57-88-5 M _w : 386,65

2.2 Použité laboratorní vybavení

Tabulka 3: Seznam použitého laboratorního vybavení

Přístroj	Výrobce
1. Analytické váhy	Ohaus Corporation (Ohaus)
2. Vortex	IKA MS2 Minishaker
3. Magnetická míchačka	IKA RH digital KT/C safety control
5. Homogenizátor ultrazvukový	Bandelin Sonopuls, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG
6. Koloidní analyzátor Zetasizer Nano ZS	Malvern Panalytical Ltd.

2.3 Pracovní postup

2.3.1 Příprava liposomů metodou rehydratace na kuličkách

Pro přípravu roztoku liposomů byla nejdříve příslušná navážka DPPC rozpuštěna v chloroformu a následně byl přidán 1 ml tohoto chloroformového roztoku do pyrexky se skleněnými kuličkami. Zároveň byl připraven také chloroformový roztok cholesterolu, který byl následně přidán k roztoku DPPC. Výsledný roztok DPPC a cholesterolu byl promíchán na vortexu, aby došlo k pokrytí celého povrchu kuliček připravenými roztoky. Chloroform se nechal poté odpařit, aby na kuličkách zůstala tenká vrstva DPPC a cholesterolu. Po odpaření organického rozpouštědla bylo ke kuličkám přidáno 40 ml deionizované vody, aby došlo k rehydrataci liposomálního systému. Roztok byl poté sonifikován ponornou sondou za použití 50% amplitudy a byla dodána celková energie 25 kJ, aby došlo ke vzniku liposomů se stejnou velikostí. Připravený roztok byl následně charakterizován jak vizuálně, tak pomocí metod DLS a ELS.

Navážky DPPC a cholesterolu byly zvoleny tak, aby výsledná koncentrace DPPC ve 40 ml MQ vody byla 2 mM a množství cholesterolu odpovídalo 40 hm.%.

2.3.2 Příprava liposomů metodou rehydratace tenké vrstvy ve vialkách

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky DPPC, DOTAP a cholesterolu v chloroformu. Roztoky DPPC a DOTAP byly smíchány ve vialce v poměru 9:1, v celkovém objemu 0,5 ml. K roztokům DPPC a DOTAP byl přidán také roztok cholesterolu. Směs roztoků byla promíchána na vortexu a rozpouštědlo bylo ponecháno k odpaření. Následně byla provedena rehydratace MQ vodou na objem 3 ml. Roztok byl sonifikován v ultrazvukové lázni při teplotě 50 °C.

Koncentrace zásobních roztoků byly zvoleny tak, aby konečná koncentrace liposomů byla 2 mM a obsah cholesterolu v liposomech byl 40 hm.%. Připravené roztoky byly charakterizovány vizuálně a pomocí DLS a ELS metod.

2.3.3 Příprava zásobního roztoku hydrofobně modifikovaného hyaluronanu

Navážka palmitoyl hyaluronátu sodného o molekulové hmotnosti zhruba 55 kDa byla rozpuštěna za intenzivního míchání na magnetické míchačce v 50% roztoku isopropanolu. Koncentrace zásobního roztoku činila 2,5 mg/l. Následně roztok byl použit pro přípravu systémů liposom – palmitoyl hyaluronát.

2.3.4 Příprava liposomů metodou ethanolového přikapávání

Navážka vaječného lecitinu byla rozpuštěna v 5 ml laboratorního ethanolu a pomocí injekční stříkačky s jehlou byl ethanolový roztok pomalu přikapáván do ultračisté vody. Ta byla během přikapávání intenzivně míchána na magnetické míchačce. Takto připravený roztok byl nechán míchat se přes noc, aby došlo k tvorbě komplexu liposom – hyaluronát. Potřebné množství vaječného lecitinu bylo napočítáno tak, aby výsledná koncentrace v 80 ml deionizované vody byla zhruba 2 mM. Ethanol se nechal následně vytékat a připravený roztok liposomů byl charakterizován metodami DLS a ELS.

2.3.5 Příprava systémů liposom – palmitoyl hyaluronát

Do čistých a suchých vialek byly vždy napipetovány 2 ml 2mM zásobního roztoku liposomů z vaječného lecitinu. Následně bylo přidáno vybrané množství roztoku hydrofobně modifikovaného hyaluronanu. V závislosti na přídavku hyaluronanu byly vzorky doplněny ultračistou vodou na celkový objem 4 ml. Jednotlivé přídavky hyaluronanu a vody k objemu liposomů jsou uvedeny v Tabulka 4.

Tabulka 4: Množství a koncentrace přidaného hyaluronanu a liposomů

Vzorek	V _{lipo.} [ml]	C _{ipo.} [mM]	V _{HA} [ml]	C _{HA} [mg/l]	V _{H2O} [ml]	V _{celk.} [ml]
1	2,00	2,00	2,00	1,25	0,00	4,00
2	2,00	2,00	1,60	1,00	0,40	4,00
3	2,00	2,00	1,20	0,75	0,80	4,00
4	2,00	2,00	0,80	0,50	1,20	4,00
5	2,00	2,00	0,40	0,25	1,60	4,00
6	2,00	2,00	0,16	0,10	1,84	4,00
7	2,00	2,00	0,12	0,08	1,88	4,00
8	2,00	2,00	0,08	0,05	1,92	4,00
9	2,00	2,00	0,04	0,03	1,96	4,00
10	2,00	2,00	0,02	0,01	1,98	4,00

2.4 Měření a zpracování výsledků

Pro charakterizaci a ověření správnosti připravených liposomálních systémů bylo provedeno měření distribuci velikosti částic a zeta potenciálu na přístroji ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments).

Určení distribuce velikosti připravených částic probíhalo pomocí metody dynamického rozptylu světla. Měření bylo prováděno ve skleněných kyvetách při 25 °C, přičemž kalibrační doba byla nastavena na 10 vteřin. Každá kyveta byla nastavená na fixní hodnotu 1. Každý vzorek byl měřen čtyřikrát, na základě čeho, byl stanoven výsledný průměr. Výstupem měření byla závislost intenzity rozptýleného světla na velikosti částic.

Měření zeta potenciálu probíhalo pomocí metody elektroforetického rozptylu světla. Měření bylo prováděno ve skleněných kyvetách s přidáním DIP cell elektrody při 25 °C. Každý vzorek byl měřen čtyřikrát.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Liposomy připravené z DPPC

Na začátku experimentálních pokusů, pro přípravu liposomálních struktur byl vybrán prášek dipalmitoylfosfatidylcholinu. Tento výběr byl motivován jeho poměrně vysokou teplotou mezifázového přechodu (41 °C). Tato vlastnost umožňuje snadnější manipulaci s fosfolipidem a zabraňuje jeho případné degradaci během přípravy a měření.

Během procesu přípravy liposomů pomocí metody Příprava liposomů metodou rehydratace na kuličkách se opakovaně vyskytovaly problémy. Po odpaření roztoku chloroformu docházelo k slepení kuliček, což zatěžovalo následný proces. Po rehydrataci systému obsahujícího DPPC a cholesterolu, byl roztok sonifikován ponornou sondou. Po vložení celkové energie 25 kJ do systému, roztok zůstal výrazně zakaleným (Obrázek 16).

Metoda byla opakovaně aplikována s různými koncentracemi jak DPPC, tak i cholesterolu. Bohužel, všechny pokusy skončily neúspěšně, čímž byla prokázána nevhodnost této metody pro přípravu požadovaných liposomálních struktur. Později se ukázalo, že neúspěch této metody byl způsoben jak nekvalitní sérií dodané chemikálie (DPPC), tak i nevhodnou metodou.



Obrázek 16: Rehydratovaný systém liposomů (DPPC + cholesterol) před sonifikací (A) a po sonifikací (B)

3.2 Liposomy připravené z DPPC s přídavkem DOTAP

Po neúspěšném pokusu o syntézu liposomů ze samostatného prášku DPPC byla zvolena nová metoda, a to Příprava liposomů metodou rehydratace tenké vrstvy ve vialkách s přídavkem DOTAP. DOTAP byl zvolen jako kladně nabitý fosfolipid, který měl elektrostaticky stabilizovat celkový systém a zabránit případné agregaci nanočástic. I přesto však nebylo dosaženo očekávaných výsledků.

Po rehydrataci ultračistou vodou, systém liposomálních částic ve vialkách byl sonifikován v ultrazvukové lázni při teplotě 50 °C. Tato teplota byla zvolena s cílem překročit hodnotu T_m DPPC. Překročení této teploty má za následek pohyb jednotlivých molekul v membráně, což usnadňuje začlenění DOTAPu a cholesterolu do liposomů a zároveň stabilizuje systém. Avšak i přes tyto úpravy byly připravené roztoky stále výrazně zakalené a nevhodné pro další pokračování v plánovaných experimentech (Obrázek 17).

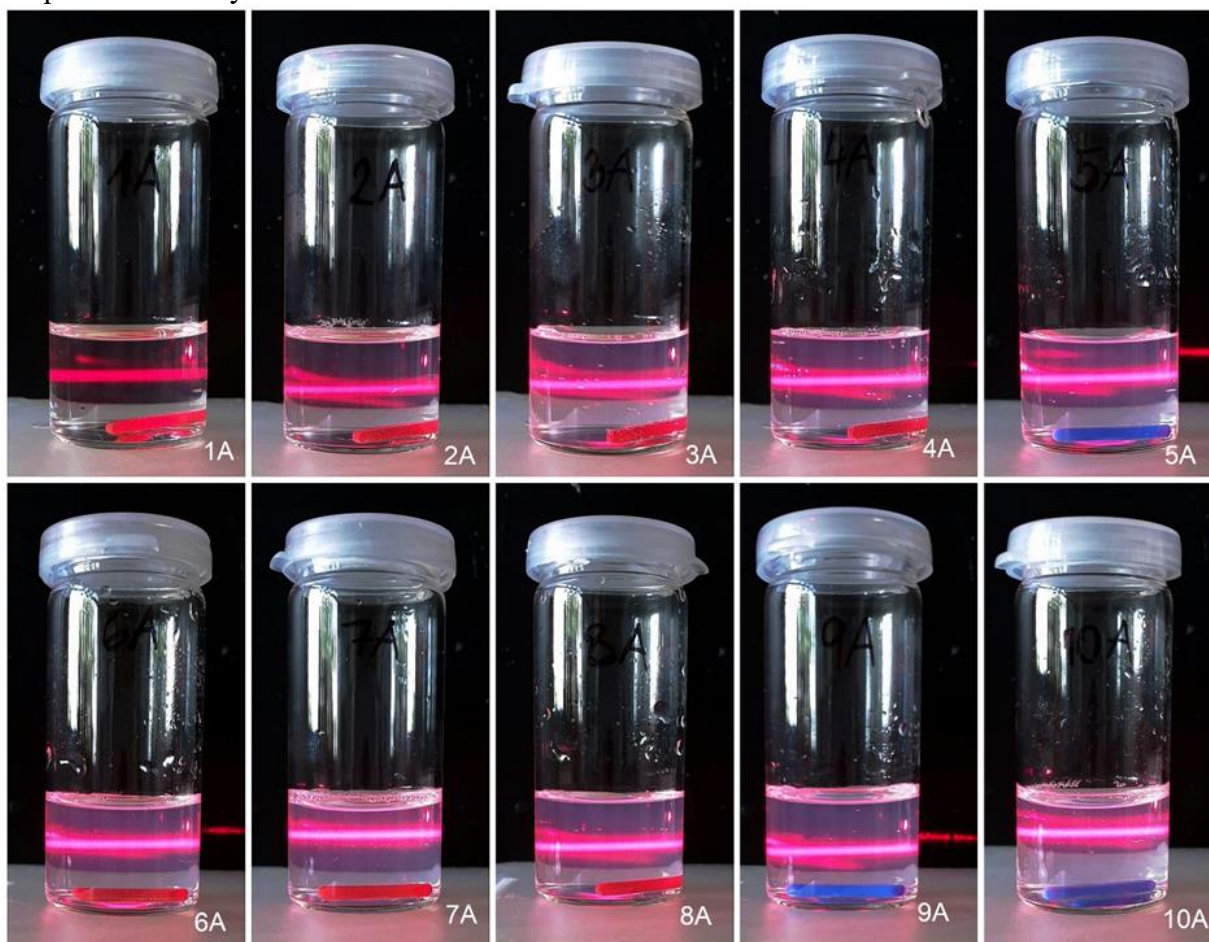


Obrázek 17: Komplex DOTAP +DPPC + Cholesterol po sonifikaci v ultrazvukové lázni

Tato metoda byla několikrát zopakována s modifikacemi ve formě různých teplot a časů sonifikace, ale všechny pokusy skončily neúspěšně, čímž byla také prokázána nevhodnost této metody pro přípravu požadovaných liposomálních struktur. Hlavní příčinou neúspěchu byla stále nekvalitní série chemikálií DPPC, kterou se nepodařilo stabilizovat.

3.3 Liposomy připravené z lecitinu

Jako alternativa k nekvalitnímu prášku DPPC byl zvolen vaječný lecitin, jehož hlavní složkou je stále fosfatidylcholin. Postup přípravy vzorků se významně lišil od předchozích pokusů. Díky pomalému přikapávání ethanolového roztoku lecitinu do míchající se ultračisté vody, tvorba liposomů byla pozorovatelná nárůstem opalescence roztoku. Nevýhodou tohoto postupu je, že se při přikapávání ethanolu do vody dochází k tvorbě azeotropní směsi, z důvodu smíšení roztoků, které následně nejde oddělit. Ethanol se začíná chovat jako voda a naopak. Z toho důvodu není možné odpařit veškerý ethanol, proto je důležité dbát na jeho koncentraci při potenciální medicínské aplikaci takového liposomálního systému.



Obrázek 18: Řada připravených liposomálních systémů s různými koncentracemi HA, prokazující přítomnost opalescenčního roztoku (1A nejvíce koncentrovaný; 10A nejméně koncentrovaný).

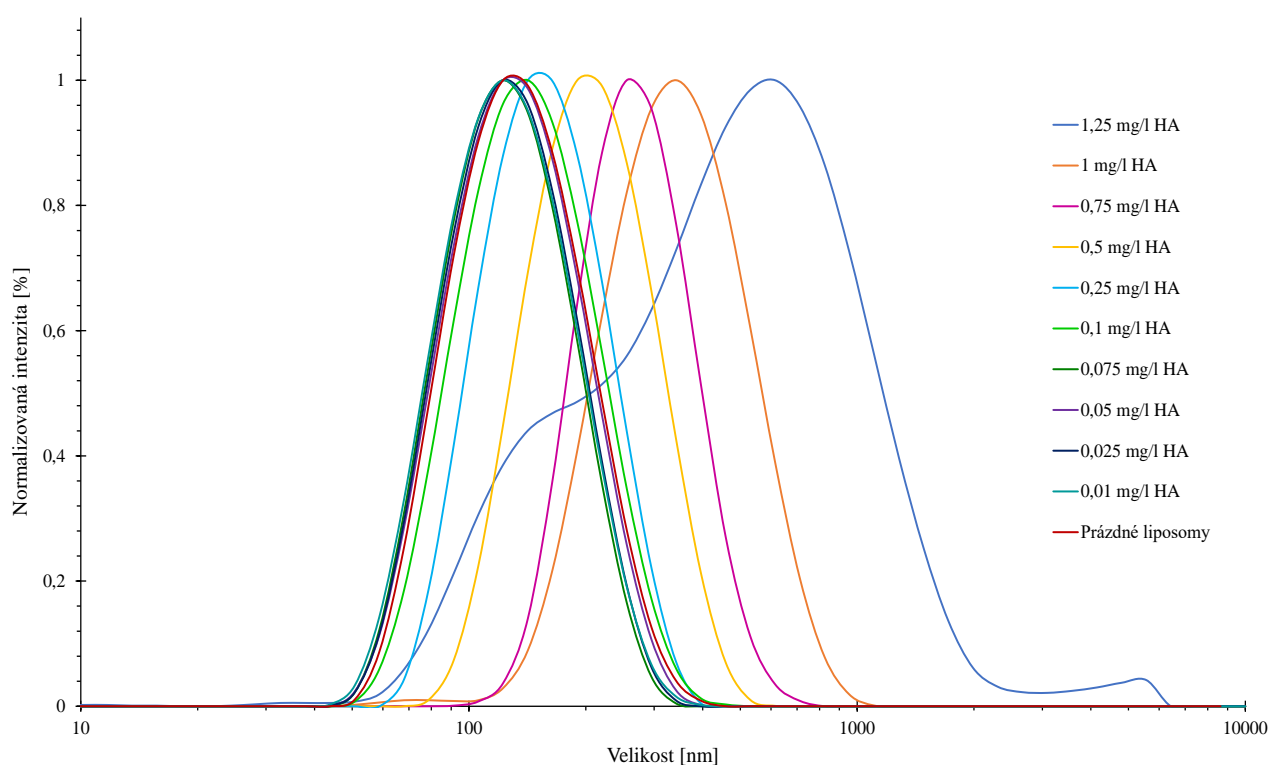
Byla připravena série vzorků označených od 1 do 10. Každý vzorek byl připraven 3krát a označen jako A, B a C, což umožnilo posoudit odchylku jednotlivých měření. Na Obrázek 18 jsou zobrazeny jednotlivé vialky obsahující komplexy liposomů a modifikovaného hyaluronanu s odpovídajícími koncentracemi, jak je uvedeno v Tabulka 4. Takto připravené systémy byly analyzované pomocí DLS a ELS metod.

Jednotlivé intenzity byly pro každé měření normalizovány a na základě těchto hodnot byl sestaven graf distribuce velikosti připravených liposomů (Obrázek 19). Střední hodnota velikosti prázdných liposomů byla $(142,9 \pm 3,9)$ nm a jejich hodnota zeta potenciálu (ZP)

činila ($-30,8 \pm 3,3$) mV. Tyto hodnoty naznačují, že připravené systémy se nachází v oblasti stability. Další výstupní grafy pro každý vzorek od 1 do 10 jsou uvedeny v 7 kapitole.

Tabulka 5: Naměřené hodnoty velikosti a zeta potenciálů

Vzorek	C _{lip.} [mM]	C _{HYA} [mg/l]	Střední velikost [nm]	Zeta Potenciál [mV]
1	1,00	1,25	655,9 ± 38,5	-8,2 ± 1,5
2	1,00	1,00	365,9 ± 6,2	-11,8 ± 1,1
3	1,00	0,75	282,9 ± 5,5	-16,5 ± 1,2
4	1,00	0,50	216,3 ± 3,5	-17,8 ± 1,6
5	1,00	0,25	163,4 ± 3,4	-21,3 ± 7,8
6	1,00	0,10	144,9 ± 5,4	-27,7 ± 3,0
7	1,00	0,08	132,6 ± 2,2	-33,8 ± 2,0
8	1,00	0,05	139,7 ± 2,7	-32,9 ± 3,5
9	1,00	0,03	134,9 ± 2,2	-36,5 ± 1,5
10	1,00	0,01	133,6 ± 2,9	-35,6 ± 2,6

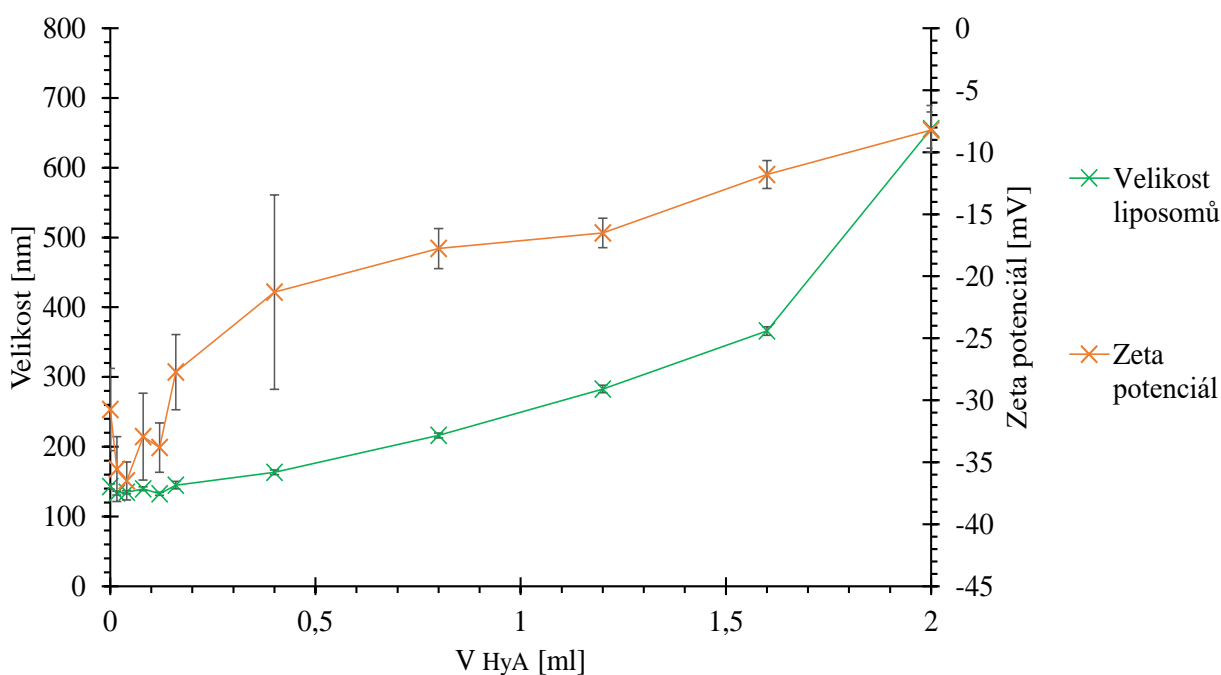


Obrázek 19: Distribuce velikosti liposomů ve všech vzorcích

Vzorek č. 1 byl nejvíce koncentrovaný (Tabulka 5). Velká koncentrace HA a obsah izopropylalkoholu způsobily vysokou hodnotu velikosti. Nadbytek izopropylalkoholu jako rozpouštědla může vést k rozpuštění, narušení nebo agregaci struktury membrány. Pravděpodobně došlo k problému začlenění molekul palmitoyl hyaluronanu do membrány liposomů, kdy většina HA zůstala mimo strukturu nanočástic. Menší množství přidaného rozpouštědla ve vzorku č. 2 výrazně zlepšilo možnou inkorporaci HA do membrány liposomů, avšak velikost liposomů zůstala při této koncentraci stále velká. Bylo také pozorováno, že při takovém poměru liposomů a HA se roztok ve vialce začal mírně zamlžovat.

Rozdíly hodnot zeta potenciálu vzorků č. 7, 8, 9 a 10 byly pravděpodobně způsobeny nerovnoměrnou distribucí částic kvůli relativně malému přídávku palmitoyl hyaluronátu sodného. Při těchto koncentracích molekuly hyaluronanu nebyly schopny rovnoměrně obalit liposomy.

Během měření byl pozorován trend zvyšování velikosti liposomů a snižování jejich stability s rostoucí koncentrací přídávku palmitoyl hyaluronátu sodného (Obrázek 20). Tento trend naznačuje, že přidání HA má vliv na velikost liposomů, a to pravděpodobně z důvodu tvorby kompletnější struktury, kvůli možnému začlenění palmitoylové části řetězců hyaluronanu do membrán liposomů. Při nižších koncentracích HA jsou liposomy menší a mají více stabilní strukturu, což může být způsobeno menším množstvím HA přítomným v roztoku k interakci s liposomy. Naopak při vyšších koncentracích HA je více HA dostupného pro interakci s liposomy, což vede k většímu množství absorbujících se HA molekul a tím ke zvětšení velikosti liposomů. To je způsobeno možným, avšak pouze částečným začleněním dlouhého hydrofobního řetězce HA do membrán.



Obrázek 20: Závislost velikosti a zeta potenciálu na objemu přidaného hyaluronátu.

4 ZÁVĚR

V rámci této práce byly studovány různé metody přípravy liposomů s cílem optimalizovat jejich fyzikálně-chemické vlastnosti pro účinné doručování léčiv. Výchozí metodou byla příprava liposomů z dipalmitoylfosfatidylcholinu (DPPC), která se ukázala jako problematická kvůli nekvalitní sérii dodaných chemikálií. Navzdory opakovaným pokusům s různými koncentracemi DPPC a cholesterolu byly výsledné roztoky zakalené a nevhodné pro další použití. Přechod na metodu rehydratace s přídavkem DOTAP měl za cíl elektrostaticky stabilizovat systém. Nicméně, ani tato metoda nevedla k uspokojivým výsledkům, což opět poukazuje na problémy s kvalitou použitého DPPC.

Konečně, alternativní metoda ethanolového přikapávání ukázala úspěšné výsledky. Pomocí pomalého přikapávání ethanolového roztoku lecitinu do míchající se ultračisté vody došlo k postupné tvorbě liposomů, což bylo pozorováno nárůstem opalescence roztoku. Liposomy, připravené metodou ethanolového přikapávání vykazaly poměrně dobrou velikost a stabilitu. Střední velikost prázdných liposomů byla $(142,9 \pm 3,9)$ nm a jejich zeta potenciál byl $(-30,8 \pm 3,3)$ mV, což odpovídá tomu, že připravený systém leží ve stabilní oblasti. Interakci s palmitoyl hyaluronátem sodným byl pozorován trend, zvětšování velikosti liposomů s rostoucím přídavkem polymeru. Dá se předpokládat, že část řetězců hyaluronanu byla schopna navázat se do membrány liposomů, kvůli tomu došlo ke zvětšení velikosti a snížení celkové stability. Z výsledných hodnot zeta potenciálů se dá také posoudit, že při nejmenších koncentracích přidaného hyaluronanu, stabilita potažených liposomů byla vyšší (vyšší záporný zeta potenciál), díky záporně nabitým hydroxylovým skupinám molekula hyaluronanu, které po začlenění jsou schopné ovlivnit celkový povrchový náboj liposomů.

Nevýhodou této metody je tvorba azeotropní směsi v průběhu přikapávání ethanolu do vody. Veškerý ethanol není schopen se odpařit. Z těchto důvodů je důležité dbát na koncentraci ethanolu při potenciální medicínské aplikaci, aby se minimalizovaly potenciální toxické účinky na organismus.

5 POUŽITÁ LITERATURA

- [1]. KAPOOR, Bhupinder; GUPTA, Reena; GULATI, Monica; SINGH, Sachin Kumar; KHURSHEED, Rubiya et al. The Why, Where, Who, How, and What of the vesicular delivery systems. Online. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2019, roč. 271. ISSN 00018686. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.07.006>. [cit. 2024-01-25].
- [2]. TALEGAONKAR, Sushama; MISHRA, PR; KHAR, RK a BIJU, SS. Vesicular systems: An overview. Online. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006, roč. 68, č. 2. ISSN 0250-474X. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/0250-474X.25707>. [cit. 2024-01-25].
- [3]. BANGHAM, A.D. a HORNE, R.W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. Online. *Journal of Molecular Biology*. 1964, roč. 8, č. 5, s. 660-IN10. ISSN 00222836. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(64\)80115-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(64)80115-7). [cit. 2024-01-25].
- [4]. NSAIRAT, Hamdi; KHATER, Dima; SAYED, Usama; ODEH, Fadwa; AL BAWAB, Abeer et al. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. Online. *Heliyon*. 2022, roč. 8, č. 5. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394>. [cit. 2024-05-15].
- [5]. GUIMARÃES, Diana; CAVACO-PAULO, Artur a NOGUEIRA, Eugénia. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021, roč. 601. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120571>. [cit. 2024-01-25].
- [6]. TSUJI, Tokuji; MORITA, Shin-ya; IKEDA, Yoshito a TERADA, Tomohiro. Enzymatic fluorometric assays for quantifying all major phospholipid classes in cells and intracellular organelles. Online. *Scientific Reports*. 2019, roč. 9, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45185-0>. [cit. 2024-01-25].
- [7]. LIU, Weilin; YE, Aiqian; HAN, Feifei a HAN, Jianzhong. Advances and challenges in liposome digestion: Surface interaction, biological fate, and GIT modeling. Online. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2019, roč. 263, s. 52-67. ISSN 00018686. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.11.007>. [cit. 2024-01-26].
- [8]. KAPOOR, Mamta; LEE, Sau L. a TYNER, Katherine M. Liposomal Drug Product Development and Quality: Current US Experience and Perspective. Online. *The AAPS Journal*. 2017, roč. 19, č. 3, s. 632-641. ISSN 1550-7416. Dostupné z: <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0049-9>. [cit. 2024-01-26].
- [9]. RAWICZ, W.; OLBRICH, K.C.; MCINTOSH, T.; NEEDHAM, D. a EVANS, E. Effect of Chain Length and Unsaturation on Elasticity of Lipid Bilayers. Online. *Biophysical Journal*. 2000, roč. 79, č. 1, s. 328-339. ISSN 00063495. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76295-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76295-3). [cit. 2024-01-26].
- [10]. KRAFT, John C.; FREELING, Jennifer P.; WANG, Ziyao. a HO, Rodney J.Y. Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems. Online. *Journal of Pharmaceutical Sciences*.

- 2014, roč. 103, č. 1, s. 29-52. ISSN 00223549. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jps.23773>. [cit. 2024-01-28].
- [11]. MONTEIRO, Nelson; MARTINS, Albino; REIS, Rui L. a NEVES, Nuno M. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. Online. *Journal of The Royal Society Interface*. 2014, roč. 11, č. 101. ISSN 1742-5689. Dostupné z: <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0459>. [cit. 2024-01-25].
- [12]. BRIUGLIA, Maria-Lucia, Chiara ROTELLA, Amber MCFARLANE and Dimitrios A. LAMPROU. 2015. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Delivery and Translational Research* [online]. **5**(3), 231-242. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s13346-015-0220-8>
- [13]. CEH, B. a LASIC, D. D. A rigorous theory of remote loading of drugs into liposomes. Online. *Langmuir*. 1995, roč. 11, č. 9, s. 3356-3368. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/la00009a016>. [cit. 2024-04-21].
- [14]. *PROFIL PRODUKTU LECITIN*. Online. In: NEF DE SANTÉ, A.S. Lecitin – pro psychickou i fyzickou kondici. Copyright nefdesanté® 2013. Dostupné z: http://www.nefdesante.cz/files/soubory/profil/profil_produkту_lecitin.pdf. [cit. 2024-05-11].
- [15]. SINGH, A.; IYER, A.K.; AMIJI, M. a GANTA, S. Multifunctional nanosystems for cancer therapy. Online. In: *Biomaterials for Cancer Therapeutics*. Elsevier, 2013, s. 387-413. ISBN 9780857096647. Dostupné z: <https://doi.org/10.1533/9780857096760.3.387>. [cit. 2024-02-13].
- [16]. KHVEDELIDZE, Mariam; MDZINARASHVILI, Tamaz; SHEKILADZE, Eka; SCHNEIDER, Marc; MOERSDORF, Daniel et al. Structure of drug delivery DPPA and DPPC liposomes with ligands and their permeability through cells. Online. *Journal of Liposome Research*. 2014, roč. 25, č. 1, s. 20-31. ISSN 0898-2104. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/08982104.2014.911316>. [cit. 2024-02-07].
- [17]. BAYKAL-CAGLAR, Eda; HASSAN-ZADEH, Ebrahim; SAREMI, Bahar a HUANG, Juyang. Preparation of giant unilamellar vesicles from damp lipid film for better lipid compositional uniformity. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2012, roč. 1818, č. 11, s. 2598-2604. ISSN 00052736. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.05.023>. [cit. 2024-02-13].
- [18]. Tseng, L. P., Liang, H. J., Chung, T. W., Huang, Y. Y., & Liu, D. Z. (2007). Liposomes incorporated with cholesterol for drug release triggered by magnetic field. *Journal of Medical and Biological Engineering*, *27*(1), 29-34.
- [19]. BITTMAN, Robert (ed.). *Cholesterol: Its Functions and Metabolism in Biology and Medicine*. Online. Subcellular Biochemistry. Boston, MA: Springer US, 1997. ISBN 978-0-306-45478-3. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5901-6>. [cit. 2024-02-14].
- [20]. OHVO-REKILÄ, H. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research*. Roč. 41, č. 1, s. 66-97. ISSN 01637827. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(01\)00020-0](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00020-0).

- [21]. KARLSON, Peter. *Základy biochemie*. Vyd. 3. (přepřac.). Přeložil Jan KOCOUREK, přeložil Sylva LEBLOVÁ, přeložil Lumír MACHOLÁN, přeložil Ladislav SKURSKÝ. Praha: Academia, 1981.
- [22]. NAKHAEI, Pooria; MARGIANA, Ria; BOKOV, Dmitry O.; ABDELBASSET, Walid Kamal; JADIDI KOUHBANANI, Mohammad Amin et al. Liposomes: Structure, Biomedical Applications, and Stability Parameters With Emphasis on Cholesterol. Online. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021, roč. 9. ISSN 2296-4185. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.705886>. [cit. 2024-02-17].
- [23]. VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [24]. KULKARNI, Vitthal S. Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetics Products. William Andrew, Inc., 2005. Liposomes in personal Care Products, s. 285-302. ISBN 978-0-8155-1682-8.
- [25]. JEBBAR, Mohamed; FRANZETTI, Bruno; GIRARD, Eric a OGER, Philippe. Microbial diversity and adaptation to high hydrostatic pressure in deep-sea hydrothermal vents prokaryotes. Online. *Extremophiles*. 2015, roč. 19, č. 4, s. 721-740. ISSN 1431-0651. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00792-015-0760-3>. [cit. 2024-05-10].
- [26]. PANDEY, Himanshu; RANI, Radha a AGARWAL, Vishnu. Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. Online. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2016, roč. 59. ISSN 1516-8913. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016150477>. [cit. 2024-02-20].
- [27]. ŠMIDRKAL, Jan. *Tenzidy*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2020. ISBN 978-80-7592-056-0.
- [28]. 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
- [29]. DATAPHYSICS INSTRUMENTS GMBH. *Critical micelle formation concentration explained*. Online. DataPhysics Instruments GmbH. © DataPhysics Instruments GmbH 2024. Dostupné z: <https://www.dataphysics-instruments.com/knowledge-hub/cmc/>. [cit. 2024-05-10].
- [30]. LOMBARDO, Domenico; CALANDRA, Pietro; BARRECA, Davide; MAGAZÙ, Salvatore a KISELEV, Mikhail. Soft Interaction in Liposome Nanocarriers for Therapeutic Drug Delivery. Online. *Nanomaterials*. 2016, roč. 6, č. 7. ISSN 2079-4991. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nano6070125>. [cit. 2024-02-20].
- [31]. BALAZS, Daniel A. a GODBEY, WT. Liposomes for Use in Gene Delivery. Online. *Journal of Drug Delivery*. 2011, roč. 2011, s. 1-12. ISSN 2090-3014. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2011/326497>. [cit. 2024-02-20].
- [32]. EMAMI, Shiva; AZADMARD-DAMIRCHI, Sodeif; PEIGHAMBARDOUST, Seyed Hadi; VALIZADEH, Hadi a HESARI, Javad. Liposomes as carrier vehicles for functional compounds in food sector. Online. *Journal of Experimental*

- Nanoscience*. 2016, roč. 11, č. 9, s. 737-759. ISSN 1745-8080. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/17458080.2016.1148273>. [cit. 2024-01-26].
- [33]. MAHERANI, B.; ARAB-TEHRANY, E.; R. MOZAFARI, M.; GAIANI, C. a LINDER, M. Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. Online. *Current Nanoscience*. 2011, roč. 7, č. 3, s. 436-452. ISSN 15734137. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/157341311795542453>. [cit. 2024-01-26].
- [34]. MOHAMED, Marwa; ABU LILA, Amr S.; SHIMIZU, Taro; ALAAELDIN, Eman; HUSSEIN, Amal et al. PEGylated liposomes: immunological responses. Online. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2019, roč. 20, č. 1, s. 710-724. ISSN 1468-6996.
- [35]. NUNES, Shirleide Santos; FERNANDES, Renata Salgado; CAVALCANTE, Carolina Henriques; DA COSTA CÉSAR, Isabela; LEITE, Elaine Amaral et al. Influence of PEG coating on the biodistribution and tumor accumulation of pH-sensitive liposomes. Online. *Drug Delivery and Translational Research*. 2019, roč. 9, č. 1, s. 123-130. ISSN 2190-393X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13346-018-0583-8>. [cit. 2024-02-20].
- [36]. RIAZ, Muhammad; RIAZ, Muhammad; ZHANG, Xue; LIN, Congcong; WONG, Ka et al. Surface Functionalization and Targeting Strategies of Liposomes in Solid Tumor Therapy: A Review. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, roč. 19, č. 1. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms19010195>. [cit. 2024-02-20].
- [37]. GOMEZHENS, A a FERNANDEZROMERO, J. Analytical methods for the control of liposomal delivery systems. Online. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2006, roč. 25, č. 2, s. 167-178. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2005.07.006>. [cit. 2024-02-20].
- [38]. PUZYN, Tomasz; CIURA, Krzesimir; JARZYNSKA, Kamila a GAJEWICZ-SKRETNÁ, Agnieszka. Predicting Zeta Potential of Liposomes from Their Structure: A Nano-QSPR Model for DOPE, DC-Chol, DOTAP, and EPC Formulations. Online. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2024. ISSN 20010370. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2024.01.012>. [cit. 2024-01-25].
- [39]. PRŮŠOVÁ, A.; ŠMEJKALOVÁ, D.; CHYTILOVÁ, M.; VELEBNÝ, V. a KUČERÍK, J. An alternative DSC approach to study hydration of hyaluronan. Online. *Carbohydrate Polymers*. 2010, roč. 82, č. 2, s. 498-503. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.05.022>. [cit. 2024-02-27].
- [40]. FALLACARA, Arianna; BALDINI, Erika; MANFREDINI, Stefano a VERTUANI, Silvia. Hyaluronic Acid in the Third Millennium. Online. *Polymers*. 2018, roč. 10, č. 7. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym10070701>. [cit. 2024-02-27].
- [41]. THEOCHARIS, Achilleas D.; SKANDALIS, Spyros S.; GIALELI, Chrysostomi a KARAMANOS, Nikos K. Extracellular matrix structure. Online. *Advanced Drug*

- Delivery Reviews*. 2016, roč. 97, s. 4-27. ISSN 0169409X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>. [cit. 2024-02-27].
- [42]. ROSEN, Jeffrey; NIAZI, Faizan a DYSART, Stan. Cost-Effectiveness of Treating Early to Moderate Stage Knee Osteoarthritis with Intra-articular Hyaluronic Acid Compared to Conservative Interventions. Online. *Advances in Therapy*. 2020, roč. 37, č. 1, s. 344-352. ISSN 0741-238X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12325-019-01142-x>. [cit. 2024-02-27].
- [43]. HUYNH, Alexander a PRIEFER, Ronny. Hyaluronic acid applications in ophthalmology, rheumatology, and dermatology. Online. *Carbohydrate Research*. 2020, roč. 489. ISSN 00086215. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.107950>. [cit. 2024-02-27].
- [44]. BAEVA, Larissa F.; LYLE, Daniel B.; RIOS, Maria; LANGONE, John J. a LIGHTFOOTE, Marilyn M. Different molecular weight hyaluronic acid effects on human macrophage interleukin 1 β production. Online. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2014, roč. 102, č. 2, s. 305-314. ISSN 1549-3296. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34704>. [cit. 2024-02-27].
- [45]. KOGAN, Grigorij; ŠOLTÉS, Ladislav; STERN, Robert a GEMEINER, Peter. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. Online. *Biotechnology Letters*. 2006, roč. 29, č. 1, s. 17-25. ISSN 0141-5492. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9219-z>. [cit. 2024-02-27].
- [46]. Speciality hyaluronan chemicals: product catalog. 10/2015. Contipro a.s. Dolní Dobrouč, 2015. Dostupné také z: <https://contipro.cz/images/documents/Speciality-Hyaluronan-Chemicals.pdf>
- [47]. SCHANTÉ, Carole E.; ZUBER, Guy; HERLIN, Corinne a VANDAMME, Thierry F. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. Online. *Carbohydrate Polymers*. 2011, roč. 85, č. 3, s. 469-489. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.03.019>. [cit. 2024-02-27].
- [48]. LIU, Yanhua; SUN, Jin; CAO, Wen; YANG, Jianhong; LIAN, He et al. Dual targeting folate-conjugated hyaluronic acid polymeric micelles for paclitaxel delivery. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011, roč. 421, č. 1, s. 160-169. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.09.006>. [cit. 2024-02-27].
- [49]. LIU, Lili; CAI, Xiaoshu; ZHANG, Jie a XU, Chengze. Particle-size Measurements in a Micro-channel with Image Dynamic Light Scattering Method. Online. *Procedia Engineering*. 2015, roč. 102, s. 904-910. ISSN 18777058. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2015.01.211>. [cit. 2024-03-05].
- [50]. LS INSTRUMENTS AG. *Dynamic Light Scattering DLS*. Online. LS Instruments AG. 2022. Dostupné z: <https://lsinstruments.ch/en/theory/dynamic-light-scattering-dls/introduction>. [cit. 2024-03-05].
- [51]. ŠEVČÍKOVÁ, Petra, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Jiří KREJČÍ a Pavlína VLTAVSKÁ. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické listy* [online].

- 2014, vol. 108, iss. 5, s. 479-482. [cit. 2024-03-05]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/506>.
- [52]. 3P INSTRUMENTS GMBH & CO. KG. *Particle size measurement using multiangle dynamic light scattering*. Online. 3P INSTRUMENTS GMBH & CO. KG. Particle size measurement using multiangle dynamic light scattering. Dostupné z: <https://www.3p-instruments.com/measurement-methods/dynamic-light-scattering/>. [cit. 2024-03-05].
- [53]. BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? Online. *Journal of Controlled Release*. 2016, roč. 235, s. 337-351. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>. [cit. 2024-03-05].
- [54]. BABICK, Frank. Dynamic light scattering (DLS). Online. In: *Characterization of Nanoparticles*. Elsevier, 2020, s. 137-172. ISBN 9780128141823. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00010-9>. [cit. 2024-03-05].
- [55]. Electrophoretic Light Scattering. Online. In: SCARLETT, Brian (ed.). *Particle Characterization: Light Scattering Methods*. Particle Technology Series. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002, s. 289-343. ISBN 0-7923-6300-0. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/0-306-47124-8_6. [cit. 2024-03-13].
- [56]. NANOFASE. *Electrophoretic Light Scattering – ELS*. Online. Electrophoretic Light Scattering – ELS. Dostupné z: http://nanofase.eu/show/electrophoretic-light-scattering---els_1278/. [cit. 2024-03-07].
- [57]. CZECH AND SLOVAK CRYSTALLOGRAPHIC ASSOCIATION (CSCA). *Zeta potenciál zeta*. Online. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>. [cit. 2024-03-07].
- [58]. MALVERN PANALYTICAL LTD IS A SPECTRIS COMPANY. *Electrophoretic Light Scattering (ELS)*. Online. Electrophoretic Light Scattering (ELS). © Copyright 2024. Dostupné z: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/light-scattering/electrophoretic-light-scattering>. [cit. 2024-03-07].
- [59]. Zetasizer Nano Příručka pro uživatele. 3. vydání. Malvern instruments Ltd., Spojené království, 2007, 191 s
- [60]. CORBETT, Jason CW a MCNEIL-WATSON, Fraser. Electrophoretic Light Scattering. Online. In: ROBERTS, Gordon a WATTS, Anthony (ed.). *Encyclopedia of Biophysics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018, s. 1-10. ISBN 978-3-642-35943-9. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-642-35943-9_288-1. [cit. 2024-03-13].
- [61]. BONECHI, Claudia; TAMASI, Gabriella; DONATI, Alessandro; LEONE, Gemma; CONSUMI, Marco et al. Physicochemical Characterization of Hyaluronic Acid and Chitosan Liposome Coatings. Online. *Applied Sciences*. 2021, roč. 11, č. 24. ISSN 2076-3417. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/app112412071>. [cit. 2024-05-18].
- [62]. LAYE, C.; MCCLEMENTS, D.J. a WEISS, J. Formation of Biopolymer-Coated Liposomes by Electrostatic Deposition of Chitosan. Online. *Journal of Food*

- Science*. 2008, roč. 73, č. 5. ISSN 0022-1147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00747.x>. [cit. 2024-05-19].
- [63]. KARI, Otto K.; TAVAKOLI, Shirin; PARKKILA, Petteri; BAAN, Simone; SAVOLAINEN, Roosa et al. Light-Activated Liposomes Coated with Hyaluronic Acid as a Potential Drug Delivery System. Online. *Pharmaceutics*. 2020, roč. 12, č. 8. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080763>. [cit. 2024-05-18].
- [64]. NI, Chang; ZHANG, Zijun; WANG, Yuling; ZHANG, Zhenhai; GUO, Xueping et al. Hyaluronic acid and HA-modified cationic liposomes for promoting skin penetration and retention. Online. *Journal of Controlled Release*. 2023, roč. 357, s. 432-443. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.03.049>. [cit. 2024-05-19].
- [65]. SMISTAD, Gro; NYSTRÖM, Bo; ZHU, Kaizheng; GRØNVOLD, Marthe Karoline; RØV-JOHNSEN, Anne et al. Liposomes coated with hydrophobically modified hydroxyethyl cellulose: Influence of hydrophobic chain length and degree of modification. Online. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017, roč. 156, s. 79-86. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.04.061>. [cit. 2024-05-19].

6 SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

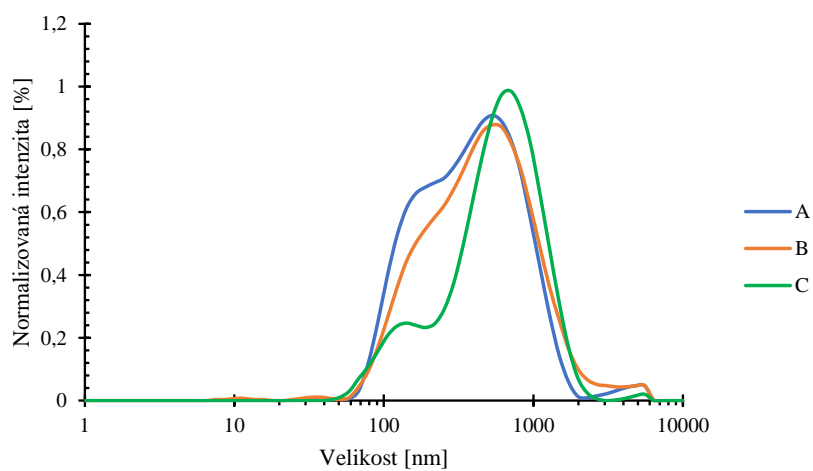
6.1 Seznam zkratek

PC	Fosfatidylcholin
PE	Fosfatidyletanolamin
PI	Fosfatidylinositol
PG	Fosfatidylglycerol
PS	Fosfatidylserin
DPPC	1,2 – Dipalmitoylfosfatidylcholin
DOTAP	1,2 – Dioleoyl-3-trimethylammonium-propan
MK	Mastné kyseliny
CMC	Kritická micelární koncentrace
CPP	Kritický balící parametr
ULV	Unilamelární vezikuly
SUV	Malé unilamelární vezikuly
LUV	Velké unilamelární vezikuly
GUV	Obří unilamelární vezikuly
MLV	Multilamelární vezikuly
MVV	Multivezikulární vezikuly
PEG	Polyethylenglykol
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
T_m	Teplota fázového přechodu
HA	Hyaluronová kyselina
DLS	Dynamický rozptyl světla
ELS	Elektroforetický rozptyl světla
ZP	Zeta potenciál
DSPC	1,2 – Distearoyl-sn-glycero-3-fosfocholin
DOPE	Dioleoylfosfatidylethanolamin
DOPC	1,2 – Dioleoyl-sn-glycero-3-fosfocholin
HEC	Hydroxyethylcelulózy
HM-HEC	hydrofobně modifikovaná hydroxyethylcelulózy

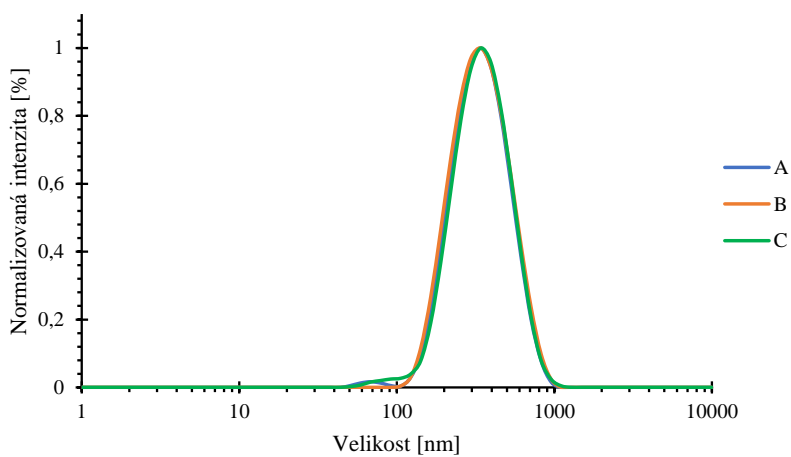
6.2 Seznam symbolů

V	Efektivní objem
L	Maximální efektivní délka
a_0	Efektivní poloha
D	Hydrodynamický průměr částic
k_b	Boltzmannova konstanta
T	Teplota
D	Difuzní koeficient
μ	Viskozita

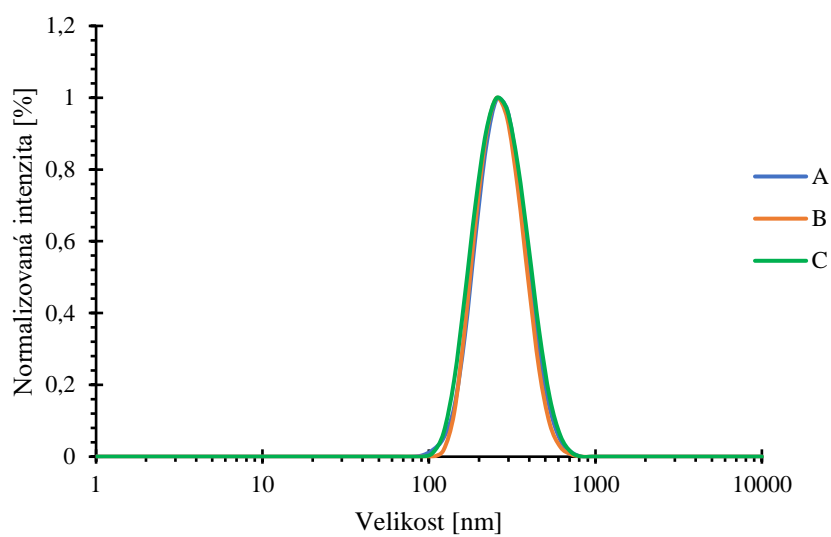
7 PŘÍLOHY



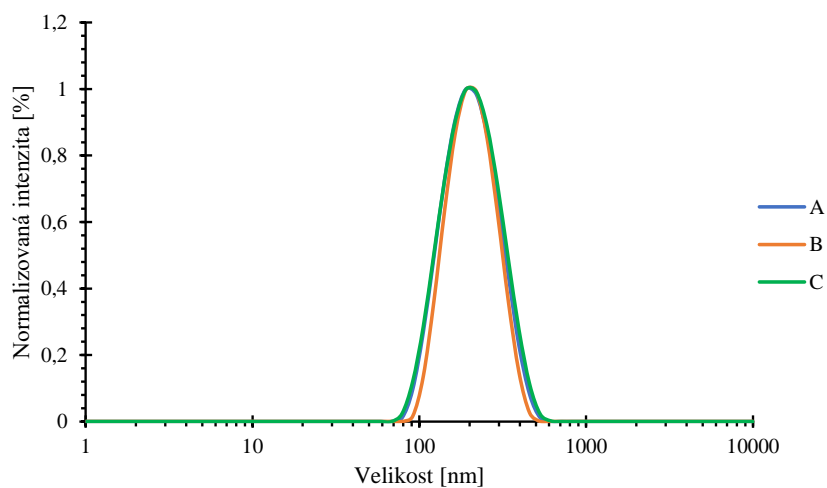
Obrázek 21: Distribuce velikosti liposomů vzorku č. 1 (1,25 mg/l HyA).



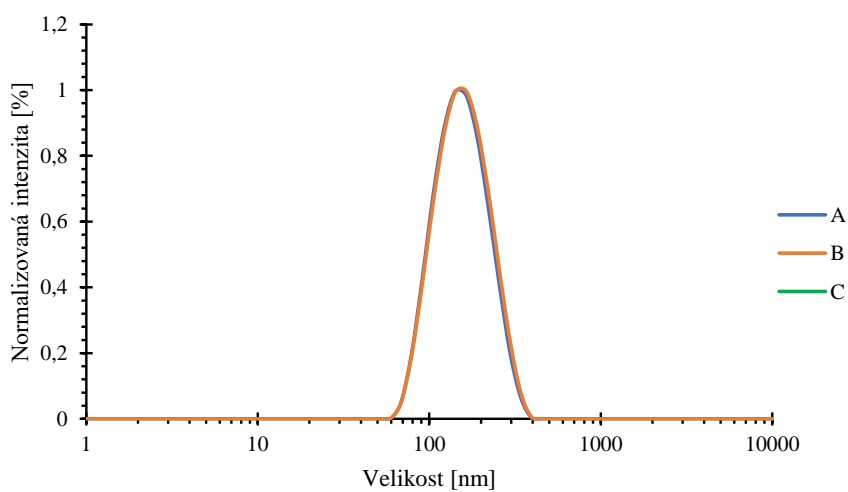
Obrázek 22: Distribuce velikosti liposomů vzorku č. 2 (1 mg/l HyA).



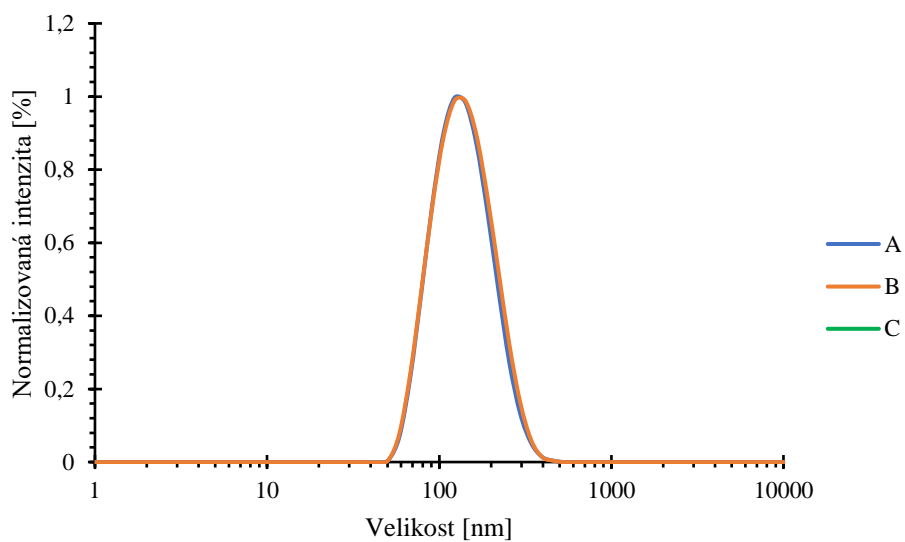
Obrázek 23: Distribuce velikosti liposomů vzorku č. 3 (0,75 mg/l HyA).



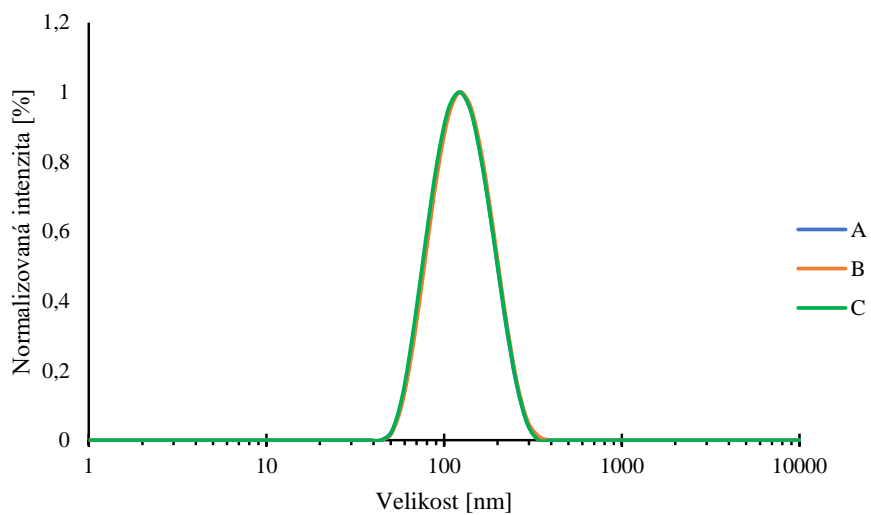
Obrázek 24: Distribuce velikosti liposomů vzorku č. 4 (0,5 mg/l HyA).



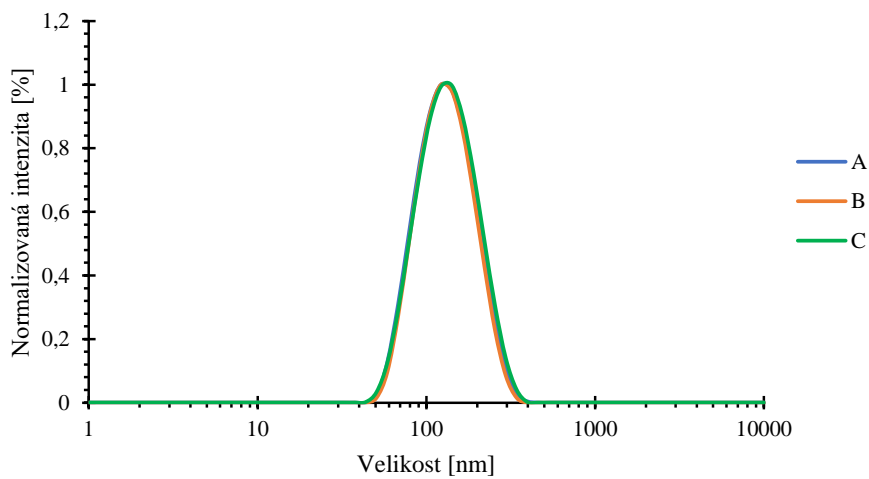
Obrázek 25: Distribuce velikosti liposomů vzorku č. 5 (0,25 mg/l HyA).



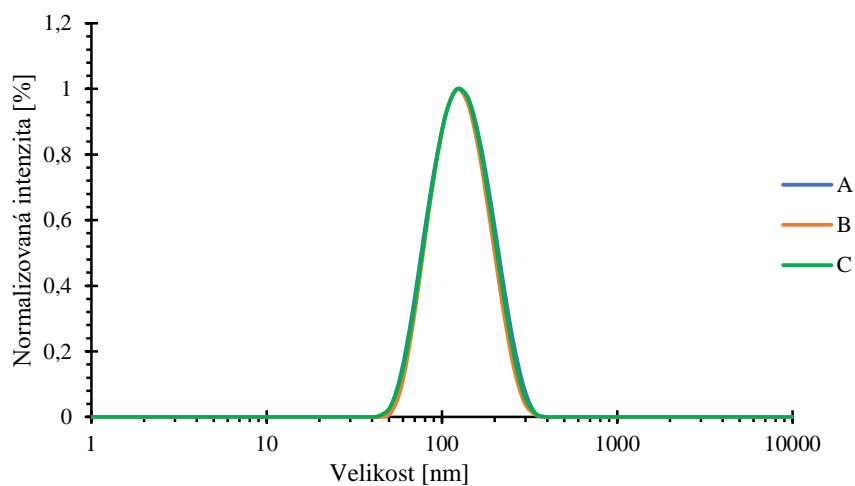
Obrázek 26: Distribuce velikosti liposomů vzorku č. 6 (0,1 mg/l HyA).



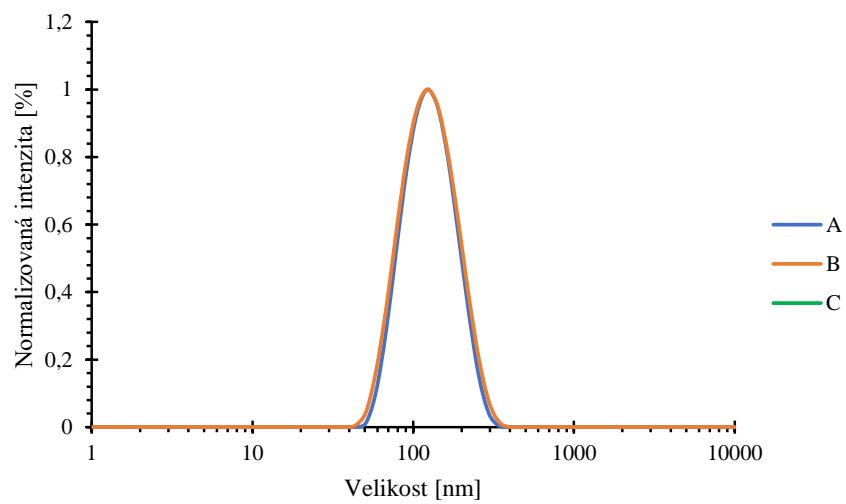
Obrázek 27: Distribuce velikosti liposomů vzorku č. 7 (0,075 mg/l HyA).



Obrázek 28: Distribuce velikosti liposomů vzorku č. 8 (0,05 mg/l HyA).



Obrázek 29: Distribuce velikosti liposomů vzorku č. 9 (0,025 mg/l HyA).



Obrázek 30: Distribuce velikosti liposomů vzorku č. 10 (0,01 mg/l HyA).