

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2025

Valeriya Pervushkina



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

INOVAČNÍ PŘÍSTUPY KE STABILIZACI RNA MOLEKUL V NANOČÁSTICÍCH PRO BIOMEDICÍNSKÉ APLIKACE

INNOVATIVE APPROACHES TO STABILIZATION OF RNA MOLECULES IN NANOPARTICLES FOR
BIOMEDICAL APPLICATIONS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Valeriya Pervushkina

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

BRNO 2025

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK2077/2024 Akademický rok: 2024/25
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Valeriya Pervushkina**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **prof. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Inovační přístupy ke stabilizaci RNA molekul v nanočásticích pro biomedicínské aplikace

Zadání bakalářské práce:

- Literární rešerše nanočástice a RNA
- Příprava RNA struktur různých délek
- Studium vlivu délky struktury na stabilitu RNA molekul a stabilitu samotných částic
- Stanovení enkapsulační účinnosti (elektroforéza), velikosti liposomů (DLS) a dlouhodobé a krátkodobé stability připravených funkcionalizovaných částic (DLS)

Termín odevzdání bakalářské práce: 26.5.2025:

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

Valeriya Pervushkina
studentka

prof. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 3.2.2025

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
Děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá studiem enkapsulace nukleových kyselin do liposomálních částic připravovaných metodou ultrazvukové sonifikace. Nukleové kyseliny, jako jsou DNA a RNA, představují významné biomolekuly s širokým uplatněním v oblasti biomedicíny, zejména při vývoji nových terapeutických a diagnostických metod. Jejich praktické využití je však limitováno nízkou stabilitou v biologickém prostředí, kde podléhají rychlé degradaci. Jednou z efektivních strategií ochrany těchto molekul je jejich enkapsulace do nanonosičů, jako jsou například liposomy. Cílem této práce byla optimalizace metody přípravy liposomálních částic s enkapsulovanou plazmidovou DNA a syntetickými oligonukleotidy a následné hodnocení jejich enkapsulační účinnosti a stability. V rámci optimalizace byly v experimentální části připraveny liposomy s různým poměrem lecitinu a cholesterolu, do nichž byly následně enkapsulovány nukleové kyseliny. Pro charakterizaci připravených částic byla využita metoda dynamického rozptylu světla (určení velikosti a polydisperzity částic) a měření zeta potenciálu (posouzení jejich stability). Enkapsulační účinnost byla hodnocena pomocí horizontální elektroforézy. Za nejvýznamnější výsledek této práce lze považovat optimalizaci přípravy liposomů při menším reakčním objemu a dosažení vysoké enkapsulační účinnosti u komerčně dodaných syntetických nukleotidů, zatímco u plazmidové DNA byla účinnost nižší, zejména při vyšších koncentracích. Tyto poznatky poskytují pevný základ pro další úpravy těchto systémů směrem k jejich využití v biomedicínských aplikacích.

KLÍČOVÁ SLOVA

liposomy, enkapsulace, nukleové kyseliny, plazmidová DNA, oligonukleotidy, ultrazvuková sonifikace, enkapsulační účinnost, nanonosiče, dynamický rozptyl světla, zeta potenciál, stabilita, biomedicínské aplikace

ABSTRACT

This bachelor's thesis focuses on the study of nucleic acid encapsulation into liposomal particles prepared using ultrasonic sonication. Nucleic acids, such as DNA and RNA, are essential biomolecules with broad applications in biomedicine, particularly in the development of novel therapeutic and diagnostic approaches. However, their practical use is limited by their low stability in biological environments, where they are rapidly degraded. One effective strategy for protecting these molecules is their encapsulation into nanocarriers, such as liposomes. The aim of this work was to optimize the method of preparing liposomal particles encapsulating plasmid DNA and synthetic oligonucleotides, and to evaluate their encapsulation efficiency and stability. During the optimization process, liposomes with various lecithin-to-cholesterol ratios were prepared and subsequently loaded with nucleic acids. The resulting particles were characterized using dynamic light scattering (to determine particle size and polydispersity) and zeta potential measurements (to assess their stability). Encapsulation efficiency was evaluated by horizontal gel electrophoresis. The most significant outcome of this study is the successful optimization of liposome preparation in a smaller reaction volume and the achievement of high encapsulation efficiency for commercially supplied synthetic nucleotides, while the efficiency for plasmid DNA was lower, particularly at higher concentrations. These findings provide a solid foundation for further development of these systems toward their application in biomedical fields.

KEYWORDS

liposomes, encapsulation, nucleic acids, plasmid DNA, oligonucleotides, ultrasonic sonication, encapsulation efficiency, nanocarriers, dynamic light scattering, zeta potential, stability, biomedical applications

PERVUSHKINA, Valeriya. *Inovační přístupy ke stabilizaci RNA molekul v nanočásticích pro biomedicínské aplikace*. Bakalářská práce. Václav BRÁZDA (vedoucí práce). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2025.

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

Ráda bych touto cestou poděkovala Mgr. Václavu Brázdovi, Ph.D. za odborné vedení této bakalářské práce, cenné rady, trpělivost a podporu během celého jejího zpracování. Dále bych chtěla poděkovat konzultantkám Ing. Lucii Dzurické a Ing. Libuši Kratochvilové za jejich ochotu, cenné připomínky a odbornou pomoc při řešení praktické části práce. Velké díky patří také celému kolektivu Biofyzikálního ústavu AV ČR za poskytnuté zázemí a vstřícnost během experimentů.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Nukleové kyseliny	9
2.1.1	Dusíkaté báze	9
2.1.2	Tvorba nukleosidů a nukleotidů v nukleových kyselinách	10
2.1.3	Struktura a biologická funkce DNA	10
2.1.4	Extrachromozomální DNA	12
2.1.5	Struktura a biologická funkce RNA	13
2.1.6	Využití nukleových kyselin v biomedicíně	14
2.2	Liposomy	15
2.2.1	Klasifikace liposomů	16
2.2.2	Dělení liposomu podle náboje	17
2.3	Metody přípravy liposomů	18
2.4	Hodnocení stability liposomů pomocí dynamického rozptylu světla	19
2.5	Elektroforetický rozptyl světla a měření povrchového náboje	20
2.6	Stabilizace nanočástic	22
2.7	Stabilizace RNA v nanočásticích	22
3	CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	24
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
4.1	Materiály	25
4.1.1	Použitý genetický materiál	25
4.1.2	Přístroje a pomůcky	25
4.1.3	Chemikálie	26
4.1.4	Použitá média a roztoky	26
4.2	Izolace plazmidové DNA (pDNA)	27
4.3	Horizontální elektroforéza pDNA	27
4.4	Vertikální polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE)	27
4.5	Odstranění lecitinu ze vzorků DNA	28
4.5.1	Izolace pomocí precipitace ethanolem	28
4.5.2	Izolace pomocí kolonek	28
4.6	Příprava liposomů	28
4.6.1	Enkapsulace plazmidové DNA do liposomů	29
4.6.2	Enkapsulace syntetických oligonukleotidů	29
4.7	Stanovení velikosti a stability částic	29
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	31
5.1	Optimalizace složení lipidové směsi	31
5.2	Optimalizace přípravy částic s pDNA	32
5.3	Testování vhodných metod pro stanovení enkapsulační účinnosti	33
5.4	Velikost a stabilita liposomů s plazmidovou DNA	35
5.5	Stanovení enkapsulační účinnosti horizontální elektroforézou	37
5.6	Analýza stability a velikosti částic oligonukleotidů	38
5.7	Enkapsulační účinnost oligonukleotidů	40
6	ZÁVĚR	42
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	44
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	53

1 ÚVOD

Liposomy jsou považovány za významný nástroj v oblasti biomedicíny a farmaceutického výzkumu, zejména jako nosiče léčiv a genetického materiálu [1]. Díky své lipidové dvojvrstvě, která napodobuje biologické membrány, je umožněna enkapsulace hydrofilních i hydrofobních látek a jejich cílené doručení do buněk [2]. Tento mechanismus je využíván nejen v terapii nádorových onemocnění a vakcinaci, ale také v oblasti genové terapie, kde je aplikován k transportu nukleových kyselin [3].

RNA (ribonukleová kyselina) a G-kvadruplexové aptamery jsou v současnosti považovány za významné biomolekuly s širokým využitím v moderních biotechnologiích. RNA se jednak uplatňuje u fundamentálních biologických procesů podílejících se na regulaci genové exprese, ale lze ji rovněž využít pro moderní terapeutické účely [4], jako je tomu například u specifických oligonukleotidů, jako jsou aptamery MS3, které je možné uplatnit při cílené terapii genetických onemocnění. Aptamery formující tzv. G-kvadruplexové struktury jsou navíc ceněny pro svou odolnost vůči enzymům. Bylo prokázáno, že aptamer MS3 zůstává stabilní v séru po dobu až 48 hodin, což naznačuje, že by mohl být vysoce účinný i při běžné lékařské praxi [5]. Přesto zůstává celková stabilita nukleových kyselin (zejména RNA) v biologických podmínkách výzvou, jelikož v těle pacientů jsou degradovány enzymy, například nukleázami, a mohou být rychle eliminovány z oběhu. Enkapsulace nukleových kyselin do liposomů je proto považována za jednu z nejúčinnějších metod ochrany nukleových kyselin zajišťující taktéž zvýšení jejich biodostupnosti [1].

Cílem této práce je optimalizace metody enkapsulace nukleových kyselin různých délek do liposomálních částic pomocí ultrazvukové sonifikace a následné vyhodnocení vlivu délky nukleových kyselin na účinnost enkapsulace a stabilitu připravených systémů. Pro počáteční optimalizaci metody byla jako modelový systém použita plazmidová DNA, a to vzhledem k omezenému množství dostupných syntetických oligonukleotidů (MS3-17, MS3-17RNA, RAN-17 a RAN-17RNA). Následně byly připraveny a charakterizovány funkcionalizované vezikuly s enkapsulovanými RNA strukturami různých délek. K analýze byly využity metody horizontální i vertikální elektroforézy, dynamického rozptylu světla (DLS) a měření zeta potenciálu, jimiž bylo umožněno stanovení enkapsulační účinnosti a sledování krátkodobé i dlouhodobé stability částic. Výsledky této studie mohou být využity pro další výzkum v oblasti cíleného doručování RNA a vývoj efektivních liposomálních nosičů pro biomedicínské aplikace.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny jsou zásadní biomolekuly, které uchovávají a předávají genetickou informaci všem živým organismům a mnoha virů [6]. První zmínky o jejich existenci pocházejí z roku 1869, kdy švýcarský lékař Friedrich Miescher při zkoumání bílých krvinek izolovaných z hnisu nemocničních obvazů objevil novou látku, kterou nazval nuklein [7]. Pozdější výzkumy prokázaly, že se jedná o univerzální složku buněk, kterou lze najít v různých biologických materiálech [6].

Existují dva hlavní typy nukleových kyselin – DNA (deoxyribonukleová kyselina) a RNA (ribonukleová kyselina). DNA a RNA jsou základní nukleové kyseliny, které zajišťují uchování a přenos genetické informace. Přestože obě molekuly sdílejí podobnou strukturu, existují mezi nimi klíčové rozdíly. DNA je stabilní, obvykle dvouřetězcová (dsDNA), molekula zodpovědná za dlouhodobé uchovávání genetických instrukcí, zatímco RNA, která je obvykle jednovláknová molekula (ssRNA) zajišťující zásadní roli při přenosu genetické informace a syntéze proteinů [8].

Jak DNA, tak RNA jsou tvořeny nukleotidy, což jsou základní stavební jednotky složené z dusíkaté báze, pentózového cukru a fosfátové skupiny. Nukleotidy se vzájemně propojují fosfodiesterovými vazbami, což umožňuje vznik dlouhých řetězců, které se podílejí na různých biologických funkcích [8].

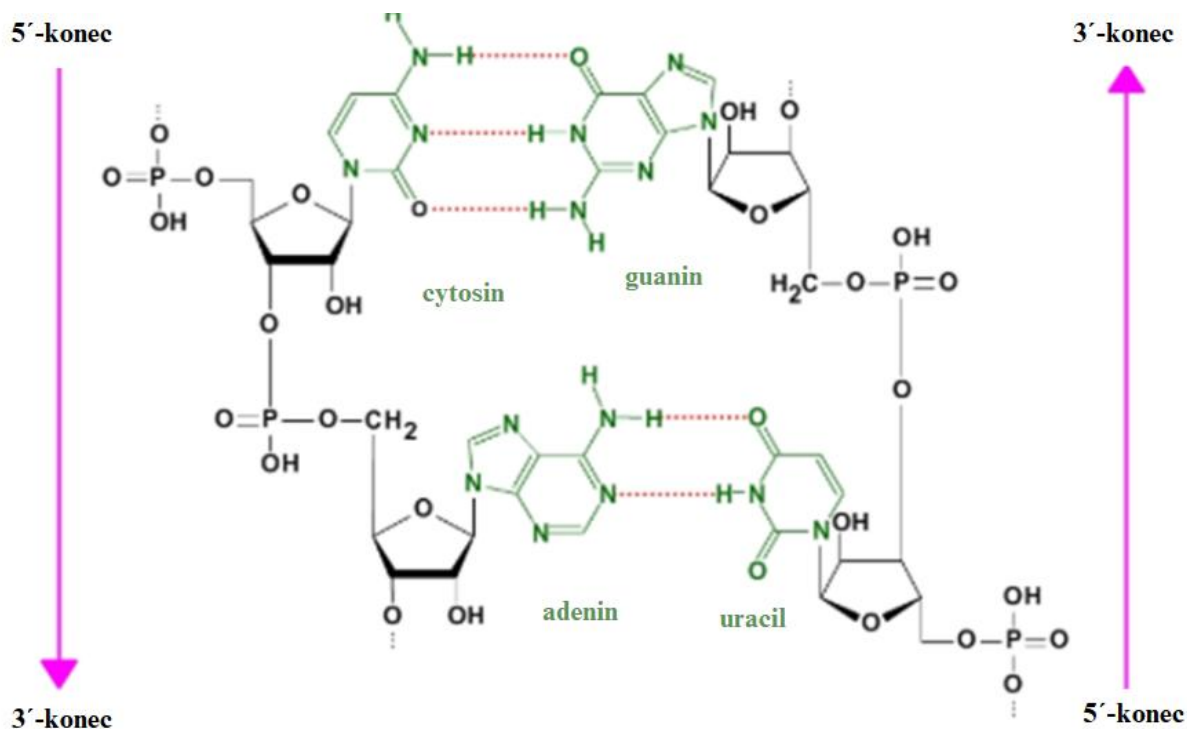
2.1.1 Dusíkaté báze

Dusíkaté báze jsou heterocyklické sloučeniny, které tvoří základní stavební jednotky DNA a RNA. Báze adenin (A) a guanin (G) patří mezi purinové báze, zatímco báze cytosin (C), thymin (T) a uracil (U) jsou odvozeny od pyrimidinu. Adenin, guanin a cytosin se vyskytují v obou typech nukleových kyselin, přičemž thymin je přítomen pouze v DNA, zatímco uracil se nachází výhradně v RNA. Vedle těchto základních bází mohou být v některých DNA detekovány modifikované báze, jako je methylcytosin, který vzniká chemickou modifikací – methylací a hraje roli v regulaci genové exprese [6].

Dusíkaté báze tvoří prostřednictvím slabých nekovalentních interakcí komplementární páry, přičemž vazby vznikají ve většině sekundárních struktur mezi purinovou a pyrimidinovou bází. V DNA se adenin páruje s thyminem prostřednictvím dvou vodíkových vazeb, zatímco guanin tvoří tři vodíkové vazby s cytosinem. Tyto interakce hrají klíčovou roli při stabilizaci dvoušroubovice DNA, přičemž trojnásobná vazba mezi guaninem a cytosinem přispívá k větší stabilitě těchto úseků ve srovnání s páry adenin-thymin [9].

V RNA se princip párování bází liší v tom, že místo thyminu se v RNA vyskytuje uracil, jak je uvedeno na obrázku 1. Adenin tedy v RNA tvoří dvě vodíkové vazby s uracilem, zatímco se guanin páruje s cytosinem prostřednictvím tří vodíkových vazeb. Na rozdíl od DNA se RNA vyskytuje převážně ve formě jednovláknových molekul, které mohou vytvářet sekundární struktury, jako jsou vlásenkové smyčky a pseudouzly, kde dochází k lokálnímu párování bází

[10]. Tyto struktury jsou důležité pro různé biologické funkce RNA, jako je katalýza (ribozomy), přenos genetické informace, nebo transport aminokyselin [8].



Obrázek 1: Párování bází RNA [11] (upraveno).

Vodíkové vazby mezi bázemi v DNA i RNA jsou zásadní nejen pro stabilizaci jejich struktur, ale také pro zajištění přesnosti procesů, jako je replikace DNA, transkripce a translace. Komplementární párování bází tak představuje základní princip genetické informace a jejího přenosu v živých organismech [9].

2.1.2 Tvorba nukleosidů a nukleotidů v nukleových kyselinách

Nukleosidy se tvoří propojením dusíkaté báze s cukernou složkou, kterou představuje buď ribóza (RNA), nebo 2-deoxyribóza (DNA). Tento typ spojení, označovaný jako N-glykosidická vazba, vzniká mezi atomem dusíku heterocyklické báze a prvním uhlíkem cukerné složky [8]. Pokud je cukernou složkou β -D-ribofuranóza, dochází k syntéze nukleosidů, jako jsou adenosin, guanosin, uridin, cytidin a tymidin. Přítomnost 2-deoxy- β -D-ribofuranózy vede k tvorbě deoxyadenosinu, deoxyguanosinu, deoxyuridinu, deoxycytidinu a deoxytymidinu [12]. Připojením fosfátové skupiny prostřednictvím esterové vazby, nejčastěji na pozici 5' uhlíku cukerné složky, dochází k přeměně nukleosidu na nukleotid. Tato vazba se vytváří reakcí hydroxylové skupiny cukru s kyselinou fosforečnou. Nukleotidy propojené prostřednictvím fosfodiesterových vazeb formují polynukleotidového řetězce, který tvoří základní strukturu nukleových kyselin [9, 12].

2.1.3 Struktura a biologická funkce DNA

Nejčastěji se vyskytující struktura DNA je tzv. B-DNA, která byla poprvé navržena Watsonem a Crickem v roce 1953. Navržený model tzv. Watson-Crickovské DNA byl tvořen dvěma vlákny

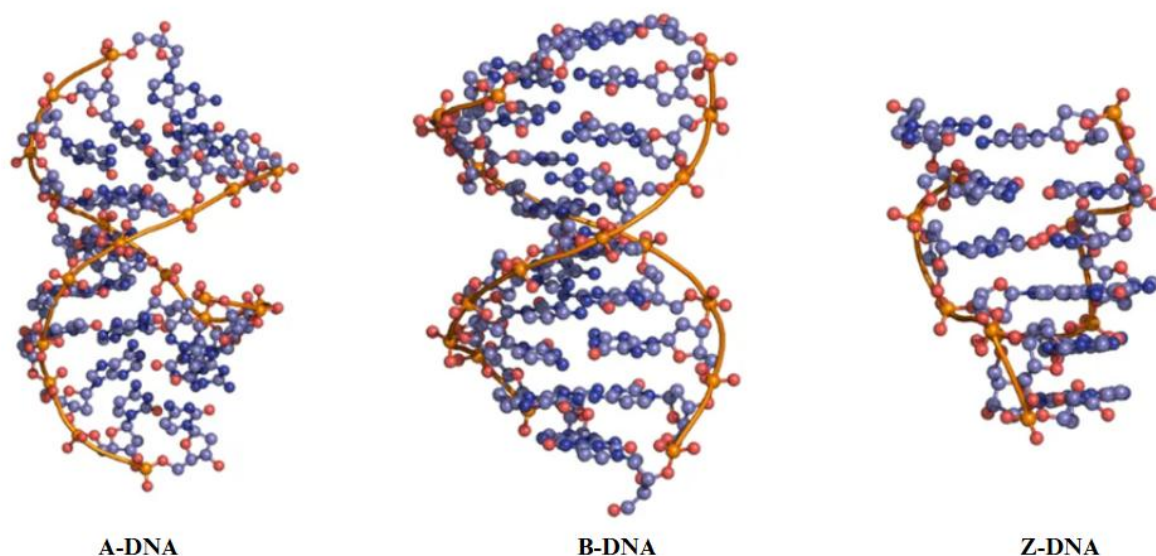
DNA zaujímavý tvar pravotočivé dvoušroubovice [10]. Páry bází v B-DNA jsou orientovány směrem dovnitř šroubovice ve vzdálenosti přibližně 0,34 nm. Jedna plná otáčka dvojité šroubovice obsahuje 10,50 párů bází, což odpovídá délce přibližně 3,40 nm. Tento pravidelný, organizovaný vzhled je nezbytný pro stabilitu molekuly a její funkci při replikaci a transkripci. DNA také obsahuje dva žlábků, které se vzájemně liší velikostí a úhlem, který zaujímají vůči středové ose DNA [13], a které jsou důležité pro vázání různých enzymů a proteinů nezbytných pro procesy jako replikace DNA, opravy poškození DNA a transkripce do RNA [10].

DNA může kromě B-DNA zaujímat i další konformace, jako jsou A-DNA a Z-DNA (viz Obrázek 2) [14]. A-DNA je rovněž pravotočivá dvoušroubovice, její struktura je na rozdíl od B-DNA více kompaktní a obsahuje 11 párů bází v rámci jedné otočky, zatímco B-DNA čítá 10,5 páru bází na otočku. Z-DNA, na rozdíl od A-DNA a B-DNA, je levotočivá a její výskyt je spojen s konkrétními biologickými procesy, jako je transkripce nebo odpověď na specifické chemické signály v buňce, jako je například methylace DNA nebo oxidační stres [9]. Kromě těchto forem může DNA vytvářet také nekanonické sekundární struktury, které hrají významnou roli v různých buněčných procesech. Mezi tyto struktury patří G-kvadruplexy, které se tvoří v oblastech DNA bohatých na guanin a podílejí se na regulaci genové exprese a stabilitě telomer [15]. Další významnou nekanonickou strukturou je triplexní DNA, která vzniká interakcí třetího vlákna nukleové kyseliny s běžnou dvoušroubovicí a může ovlivňovat transkripční regulaci [16]. Palindromické sekvence mohou indukovat tvorbu vlásenkových struktur, jež jsou spojovány s genetickou nestabilitou a regulací replikace DNA [17].

DNA je citlivá na změny v prostředí. Při zvýšené teplotě, změnách pH nebo při vystavení DNA organickým rozpouštědlům a tenzidům může dojít k procesu zvanému denaturace. Během denaturace se obě vlákna DNA oddělí, což vede k rozrušení původní struktury a vytvoření neuspořádané formy DNA. Proces denaturace je způsoben narušením nekovalentních interakcí, jako jsou vodíkové vazby a Van der Waalovy síly, které stabilizují dvoušroubovici. Denaturace je reverzibilní proces – při návratu k normálním podmínkám může dojít k renaturaci, při které se vlákna DNA opět spojí díky obnovení nekovalentních interakcí, což vede k obnovení původní struktury dvoušroubovice [9].

Molekula DNA nejen že slouží jako nositel genetické informace, ale její struktura je rovněž klíčová pro efektivní organizaci genetického materiálu v jádře eukaryotických buněk. V těchto organismech je DNA dále organizována do chromozomů, což umožňuje nejen efektivní regulaci genové exprese, ale také ochranu genetické informace během buněčného dělení [18]. Modifikace chromatinové struktury představují zásadní mechanismus regulace genové exprese. Histonové modifikace, zejména acetylace a deacetylace, jsou klíčovými procesy ovlivňujícími úroveň kondenzace chromatinu. Tyto změny následně determinují přístupnost DNA pro esenciální buněčné procesy [19]. Transkripce zaujímá centrální postavení v regulaci genové exprese. Tento komplexní proces zajišťuje přepis genetické informace do RNA molekul, které následně slouží jako templát pro syntézu proteinů. Přesná regulace těchto procesů je nezbytná pro zachování správné buněčné funkce a homeostázy [20]. Významnou roli v ochraně genomové integrity hrají telomery. Tyto specializované struktury, charakterizované přítomností repetitivních sekvencí bohatých na guanin, vytvářejí specifické G-kvadruplexové struktury [21]. Telomery tak efektivně chrání terminální oblasti chromozomů před nežádoucí degradací

a zkracováním během procesu buněčného dělení. Tento ochranný mechanismus je esenciální pro zachování genomové stability, která přímo ovlivňuje buněčnou proliferaci a celkovou životnost buněk [22].



Obrázek 2: Srovnání struktur A-DNA, B-DNA a Z-DNA [23] (upraveno).

2.1.4 Extrachromozomální DNA

Extrachromozomální DNA představuje genetický materiál, který se nachází mimo chromozomální DNA. Extrachromozomální DNA může být přítomna jak u prokaryotických, tak u eukaryotických organismů a často plní specializované funkce. Mezi nejvýznamnější formy extrachromozomální DNA patří plazmidová DNA (pDNA) u bakterií, mitochondriální DNA (mtDNA) u eukaryot a plastidová DNA (ptDNA) u rostlin a některých protist [24].

2.1.4.1 Plazmidová DNA

Plazmidová DNA je cirkulární, extrachromozomální DNA, která se nachází v bakteriálních buňkách jako doplněk k chromozomální DNA. Její molekulová hmotnost je nižší než u chromozomální DNA a typicky se vyskytuje ve formě kovalentně uzavřených kružnic [7]. Ačkoli je chemická struktura pDNA identická se strukturou chromozomální DNA, její uspořádání a vlastnosti jí umožňují vykonávat specifické funkce. Plazmidová DNA existuje v několika strukturních formách, mezi něž patří nadšroubovicová struktura, kovalentně uzavřená kružnice (ccc – z angl.: covalently closed circular), otevřená kružnice (oc – z angl.: open circular) a lineární forma. Nejčastější přirozenou formou plazmidu v buňkách je kovalentně uzavřená kružnice [7, 25].

Počet kopií plazmidu v jednotlivých buňkách závisí na jeho velikosti a mechanismu replikace a obvykle se pohybuje mezi jednou a stovkami kopií [25]. Molekuly pDNA přítomné v jedné buňce mohou být identické nebo se mohou lišit, což poskytuje prostor pro funkční rozmanitost. Plazmidová DNA není pro přežití bakteriální buňky nezbytná, avšak často jí propůjčuje selektivní výhody jako je např. rezistence vůči antibiotikům, těžkým kovům či jiným toxickým

látkám [25, 26]. Plazmidová DNA hraje zásadní roli v oblasti genového inženýrství díky své schopnosti autonomní replikace, která je nezávislá na chromozomální DNA. Tato vlastnost činí plazmidy ideálními nástroji pro molekulární klonování [27].

2.1.4.2 Mitochondriální a plastidová DNA

Mitochondriální DNA hraje klíčovou roli v buněčné energetice, jelikož kóduje vybrané proteiny a transferovou RNA (tRNA) nebo ribozomální RNA (rRNA), které jsou nezbytné pro funkci mitochondrií. Na rozdíl od jaderné DNA je mtDNA cirkulární a přítomná ve více kopiích v mitochondriální matrix. Její replikace a transkripce probíhají nezávisle na buněčném cyklu, přičemž mitochondriální RNA polymeráza zajišťuje syntézu mRNA, tRNA a rRNA potřebných pro mitochondriální translaci [28]. *In vitro* transkripce mtDNA se využívá zejména při studiu mitochondriálních chorob, kde se analyzuje exprese mutovaných variant mitochondriálních genů. Tento přístup umožňuje lepší pochopení molekulárních mechanismů mitochondriálních dysfunkcí, které jsou spojovány s neurodegenerativními onemocněními, metabolickými poruchami či procesy stárnutí [29].

Plastidová DNA (ptDNA) je přítomna v chloroplastech rostlin a některých protistů, kde kóduje proteiny podílející se na fotosyntéze a dalších metabolických procesech. Podobně jako mtDNA je i ptDNA cirkulární a vykazuje autonomní replikaci. Transkripce plastidové DNA je řízena specifickými RNA polymerázami, které se dělí na jaderně kódované polymerázy (NEP) a plastidově kódované polymerázy (PEP). *In vitro* transkripce ptDNA nachází využití v syntéze ribozomálních a messengerových RNA pro studium genové exprese plastidových genů, což má zásadní význam při genetické modifikaci rostlin, například za účelem zvýšení fotosyntetické účinnosti nebo zlepšení odolnosti vůči stresovým faktorům prostředí [30].

Stejně jako v případě plazmidové DNA představuje transkripce mtDNA a ptDNA *in vitro* cenný nástroj pro biotechnologický výzkum a terapeutické aplikace. Vývoj metod pro přesnou syntézu RNA z těchto extrachromozomálních genomů umožňuje detailní analýzu mechanismů genové regulace [26].

2.1.5 Struktura a biologická funkce RNA

RNA je tvořena nukleosidfosfáty obsahující ribózu spojenými fosfodiesterovými vazbami. Její hlavní funkcí je přenos genetické informace a transfer aminokyselin při syntéze proteinů. RNA existuje v různých typech podle její struktury a funkce: ribozomová RNA (rRNA), transferová RNA (tRNA) a mediátorová RNA (mRNA). Ribozomová RNA je základní složkou ribozomů, které jsou nezbytné pro syntézu proteinů, a tvoří přibližně 80 % RNA v buňce. Transferová RNA transportuje aminokyseliny z cytoplazmy na ribozomy během translace, přičemž každá aminokyselina má svou specifickou tRNA. Mediátorová RNA přenáší genetickou informaci z jádra buňky do cytoplazmy, kde slouží jako šablona pro tvorbu proteinů. Její životnost je však krátká, protože po translaci je rychle degradována [9, 12].

2.1.6 Využití nukleových kyselin v biomedicině

Nukleové kyseliny hrají klíčovou roli jak v diagnostice, tak i v léčbě různých onemocnění. V diagnostice jsou primárně využívány pro detekci patogenů, biomarkerů onemocnění a genetických mutací. Například polymerázová řetězová reakce (PCR) a její modifikace umožňují přesnou identifikaci specifických sekvencí DNA či RNA ve vzorcích [31]. Sekvenování nukleových kyselin poskytuje komplexnější informace o genomu patogenů nebo změnách v genomu pacienta. Kromě toho je možné molekuly DNA i RNA uplatnit i při vývoji moderních terapeutických přístupů v rámci cílené terapie [32].

Mezi hlavní „RNA technologie“ patří vakcíny na bázi mediátorové RNA (mRNA), malé interferující RNA (siRNA) a mikroRNA [4]. Vakcíny založené na mRNA, které se začaly intenzivně používat během pandemie SARS-CoV-2, fungují na principu přenosu genetické informace do buněk, které na základě vložené mRNA exprimují proteiny specifické pro patogen. Tyto proteiny následně indukují aktivaci imunitního systému [4]. Oproti tomu malé interferující RNA cíleně potlačuje expresi vybraných genů pomocí mechanismu zvaného RNA interference (RNAi). RNAi je biologický proces, který umožňuje sekvencně specifickou inhibici exprese cílových genů [33]. Mechanismus využívá krátké dvouvláknové RNA molekuly, jako jsou malé interferující RNA a mikroRNA, které způsobují degradaci mediátorové RNA nebo vedou k inhibici její translace. RNAi začíná štěpením dlouhých dvouvláknových RNA (dsRNA) enzymem Dicer na krátké duplexní RNA fragmenty o délce 20–25 nukleotidů [34]. Tyto fragmenty jsou následně inkorporovány do multiproteinového komplexu zvaného RNA indukovaný tichý komplex (RISC; z angl.: induced silencing complex), kde siRNA slouží jako vodítko pro cílovou mRNA. Po navázání RISC na cílovou mRNA může dojít k degradaci mRNA nebo k blokování translace, což efektivně potlačuje expresi daného genu [33]. Tato technologie se využívá hlavně v onkologii a virologii k eliminaci genů spojených s onemocněními. MikroRNA pak reguluje genovou expresi přirozeně a využívá se při léčbě geneticky podmíněných onemocnění [35].

V terapeutickém využití, se kromě výše zmíněných mRNA vakcín a RNAi technologií, uplatňují i další přístupy založené na nukleových kyselinách. Mezi tyto přístupy patří zejména aptamery a G-kvadruplexové *antisense* oligonukleotidy (G4-ASO) [31, 32]. Aptamery jsou krátké, jednovláknové sekvence DNA nebo RNA (obvykle o délce 20–80 nukleotidů), které se specificky vážou na cílové molekuly díky své unikátní trojrozměrné struktuře [31]. Jsou označovány jako "chemické protilátky", jelikož podobně jako protilátky imunitního systému rozpoznávají a vážou se na cílové molekuly s vysokou afinitou a specificitou [36]. Na rozdíl od „běžných“ protilátek, aptamery nabízejí několik výhod – jsou stabilnější, mohou být syntetizovány chemicky (bez potřeby živých organismů), jsou menší, snáze modifikovatelné a obvykle nevyvolávají imunitní odpověď [37]. V diagnostice jsou aptamery využívány jako biorozpoznávací elementy v biosenzorech, kde jejich navázání na cílové molekuly (např. proteiny, toxiny nebo patogeny) může být detekováno různými metodami. Terapeutické využití aptamerů zahrnuje cílení léčiv, inhibici proteinů souvisejících s onemocněním a modulaci buněčných signálních drah [5]. Aptamery jsou získávány procesem zvaným SELEX (z angl.: systematic evolution of ligands by exponential enrichment), který zahrnuje opakované cykly selekce a amplifikace vedoucí k identifikaci sekvencí s nejvyšší afinitou k cílové molekule [36].

Současný výzkum se zaměřuje na vývoj modifikovaných aptamerů se zvýšenou stabilitou v biologických tekutinách a na zlepšení metod jejich doručování do cílových tkání [5].

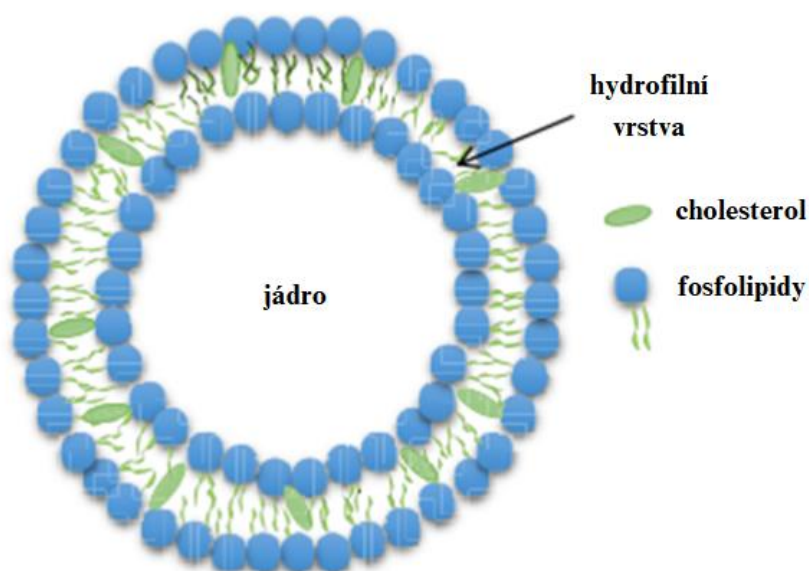
G-kvadruplexové *antisense* oligonukleotidy (G4-ASO) představují inovativní přístup v oblasti terapeutických nukleových kyselin. G4-ASO kombinující vlastnosti G-kvadruplexů (specifické sekundární struktury bohaté na guanin) a *antisense* oligonukleotidů pro cílené ovlivnění genové exprese [32]. G-kvadruplexy jsou čtyřvláknové struktury nukleových kyselin, které se tvoří v sekvencích bohatých na guanin díky Hoogsteenovu párování bází. Tyto struktury hrají důležitou roli v regulaci genové exprese, replikaci DNA a telomerové homeostáze. Včlenění G-kvadruplexových motivů do *antisense* oligonukleotidů vede k vytvoření hybridních molekul s vyšší stabilitou, lepším buněčným vychytáváním a silnějším inhibičním účinkem na cílové geny [32]. G4-ASO vykazují potenciál v léčbě nádorových onemocnění, virových infekcí a genetických onemocnění. Jejich výhodou je zvýšená odolnost vůči nukleázám, lepší farmakokinetické vlastnosti a možnost modulace jejich účinku prostřednictvím strukturních modifikací. Výzkum ukazuje, že G4-ASO mohou efektivně inhibovat expresi onkogenů a genů podílejících se na rezistenci vůči léčivům [32].

Molekulární nestabilita představuje jeden z hlavních problémů při využívání RNA v biomedicíně, jelikož tyto molekuly jsou náchylné k degradaci ribonukleázami, což omezuje jejich terapeutickou účinnost [31, 36]. K překonání této překážky jsou vyvíjeny ochranné systémy, jako jsou nanonosiče a liposomy [1]. Další výzvou je inkorporace RNA do buněk, limitovaná hydrofobní povahou buněčných membrán a negativním nábojem RNA molekul. Obdobné problémy se týkají i využití aptamerů a G4-ASO při dalších terapeutických přístupech [31, 32]. Přesto je využití léčiv založených na nukleových kyselinách slibnou alternativou pro cílenou a personalizovanou léčbu, přičemž pokračující výzkum chemických modifikací a doručovacích systémů postupně překonává tyto limitace a otevírá cestu k širšímu klinickému využití těchto inovativních biomolekul [5, 31].

2.2 Liposomy

Liposomy jsou sférické vezikuly s dvojrstvou lipidovou membránou, které vznikají samovolnou reorganizací fosfolipidů, například fosfatidylcholinu, ve vodném prostředí. Termín liposom poprvé použil Alec Douglas Bangham v roce 1964 k označení vezikul s dvojitou membránou, jejichž hlavní složkou je lecitin nebo jeho různé deriváty, například dipalmitoylfosfatidylcholin [2]. Tyto struktury mohou být tvořeny mastnými kyselinami s různou délkou řetězců (nad C14) a odlišným stupněm nasycení [38] a zároveň mohou obsahovat i další fosfolipidy, jako je fosfatidylglycerol, fosfatidyletanolamin a sfingomyelin [39]. Kromě fosfolipidů se při tvorbě liposomů často používá také cholesterol, který snižuje jejich fluiditu, čímž ovlivňuje stabilitu a propustnost membrány. Průměr liposomů se pohybuje v rozmezí od 20 nanometrů (nm) až po několik mikrometrů (μm) [40]. Struktura liposomů se skládá z lipidové dvojrstvy tvořené amfifilními lipidy, přičemž jejich hydrofilní části směřují k vnějšímu povrchu membrány a lipofilní části jsou orientovány dovnitř, čímž vytvářejí hydrofobní vnitřní vrstvu. Tato dvojrstva, která má tloušťku přibližně 5 nm formuje uzavřené lamelové membrány oddělující vnitřní vodní prostor od vnější vodní fáze, jak je znázorněno na obrázku 3 [1].

Liposomy, díky svým specifickým vlastnostem, představují perspektivní nosiče biologicky aktivních látek, a to nejen v kosmetickém průmyslu, ale i v lékařství a farmacii [3, 41, 42]. Tvorba liposomálních systémů umožňuje uzavření hydrofilních i lipofilních molekul, což zvyšuje stabilitu těchto látek a zajišťuje jejich ochranu před degradací, čímž se zvyšuje jejich biologická dostupnost. Tento přístup vede k potenciálnímu zvýšení terapeutické účinnosti léčiv a současně k redukci jejich toxicity při zachování potřebného terapeutického účinku [1]. V oblasti medicíny jsou liposomy široce využívány pro cílenou a kontrolovanou distribuci farmaceutických látek, jako jsou chemoterapeutika, antibiotika nebo vakcíny, čímž dochází k minimalizaci nežádoucích vedlejších účinků. Kromě toho se liposomy uplatňují i v genové terapii, kde slouží jako nosiče pro přenos genetického materiálu do specifických buněk [3]. V kosmetologii se liposomy využívají pro efektivní transport aktivních složek, jako jsou vitamíny, antioxidanty či hydratační látky, do hlubších vrstev pokožky, což zvyšuje jejich penetraci a účinnost [41].



Obrázek 3: Schematické znázornění liposomů [1] (upraveno).

2.2.1 Klasifikace liposomů

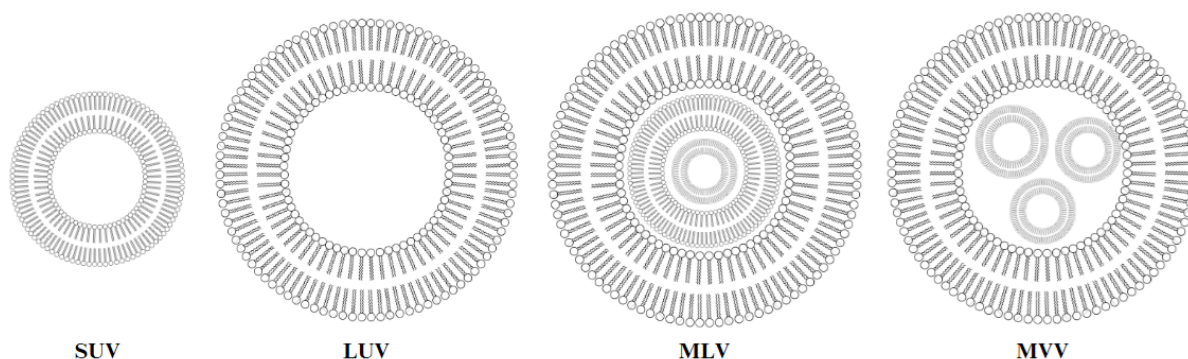
Liposomy lze klasifikovat na základě velikosti a počtu lipidových dvojvrstev, označovaných jako lamely. Tato charakteristika vedla k rozdělení liposomů do několika hlavních kategorií: unilamelární vezikuly (ULV), multilamelární vezikuly (MLV) a multivezikulární vezikuly (MVV). Unilamelární liposomy, které obsahují pouze jednu lipidovou dvojvrstvu, mohou být dále rozděleny do tří podkategorií v závislosti na jejich velikosti (viz Obrázek 4) [43]:

- Malé unilamelární vezikuly (SUV) – tyto vezikuly mají průměr v rozmezí 20–100 nanometrů (nm). Díky svým malým rozměrům jsou jejich fyzikálně-chemické vlastnosti výrazně ovlivněny elektrostatickými interakcemi mezi fosfolipidovými vrstvami.

- Velké unilamelární vezikuly (LUV) – jejich průměr přesahuje 100 nm, což snižuje vliv elektrostatických interakcí na jejich fyzikálně-chemické vlastnosti.
- Obří unilamelární vezikuly (GUV) – tyto vezikuly mají průměr přesahující 1 000 nm a jsou vhodné pro specifické aplikace vyžadující větší objem vodné fáze.

Multilamelární vezikuly mohou být dále rozděleny na základě počtu lamel a jejich uspořádání. První skupinu tvoří oligolamelární vezikuly, které obsahují omezený počet lipidových dvojvrstev. Dalším typem jsou multilamelární vezikuly, jež zahrnují větší množství lamel, což je činí komplexnějšími strukturami. Dále existují vezikuly s koncentrickým uspořádáním lamel, u nichž jsou jednotlivé lamely organizovány do soustředných kruhových struktur. Poslední kategorií jsou vezikuly s nekoncentrickým uspořádáním lamel, jejichž lamely nejsou uspořádány pravidelně a vykazují nepravidelnou strukturu. Jejich velikost se obvykle pohybuje v rozmezí od 100 nm do 20 μm [43, 44].

Multivesikulární vezikuly jsou komplexní liposomální útvary, které obsahují více menších vezikul, přičemž tyto jednotlivé vezikuly mohou mít různý nebo stejný počet lamel [43]. Velikost těchto struktur se pohybuje v rozmezí od 100 nm do 20 μm . Multivesikulární vezikuly se často formují jako vedlejší produkty během přípravy multilamelárních liposomů [44].



Obrázek 4: Rozdělení liposomů podle velikosti [43].

2.2.2 Dělení liposomu podle náboje

Liposomy jsou univerzální nosiče, které se klasifikují nejen podle velikosti, počtu lamel a struktury, ale také podle povrchového náboje, který hraje klíčovou roli v jejich fyzikálně-chemických vlastnostech, biologických interakcích a aplikačním potenciálu. Na základě povrchového náboje lze liposomy rozdělit do tří hlavních kategorií: neutrální, kationtové a aniontové liposomy. Tento parametr neovlivňuje pouze interakce liposomů s biologickými membránami, ale také hraje klíčovou roli v jejich stabilitě, způsobu rozložení v organismu a efektivitě při transportu aktivních látek [44].

Neutrální liposomy mají na svém povrchu nulový elektrický náboj. Tento typ liposomů je obvykle tvořen fosfolipidy, které neobsahují ionizovatelné skupiny, například fosfatidylcholin. Výhodou neutrálních liposomů je jejich minimální interakce s negativně

nabítenými molekulami v biologických prostředích, což zajišťuje jejich stabilitu a prodlužuje oběhový čas v krevním řečišti [45].

Kationtové liposomy, které nesou pozitivní náboj, jsou široce využívány v biotechnologiích, především pro transfekci buněk. Tento pozitivní náboj je obvykle zajištěn přítomností kationtových lipidů, jako je 1,2-dioleoyl-3-trimethylamonium-propan (DOTAP) nebo stearylamin [44]. V některých případech jsou kationtové liposomy specificky navrženy pro účely transfekce buněk a obsahují kladný fosfolipid známý jako cytofektin, což je termín odvozený od slov "cyto" (buňka) a "fectin" (transfekce). Cytofektin hraje klíčovou roli při zajišťování pozitivního náboje na povrchu liposomů, což je zásadní pro jejich schopnost interagovat s negativně nabitými biomolekulami, jako jsou nukleové kyseliny (DNA, RNA) a proteiny [46].

Aniontové liposomy jsou charakterizovány záporným nábojem, který vzniká použitím aniontových lipidů, jako jsou fosfatidylglycerol (PG), fosfatidylinositol (PI) nebo fosfatidylserin [47]. Tento záporný náboj má vliv na interakce liposomů s biologickými membránami, přičemž vykazují nižší afinitu k buněčným membránám, což může omezit jejich intracelulární dodání. Na druhé straně, nižší afinitou k buněčným membránám je spojena i snížená imunogenita těchto liposomů. Tato vlastnost aniontových liposomů je vysoce cenná pro aplikace, kde je kladeno důraz na omezené interakce s buňkami nebo na specifické cílené dodávání terapeutických látek [44, 47].

2.3 Metody přípravy liposomů

Příprava liposomů představuje klíčový krok v jejich využití jako nosičů léčiv. Metody jejich přípravy lze rozdělit na pasivní a aktivní techniky enkapsulace léčiv, přičemž každá z těchto strategií nabízí specifické výhody, ale i určitá omezení, například rozdílnou účinnost zapouzdření nebo stabilitu výsledné formulace [48].

Pasivní techniky zahrnují mechanické disperzní metody a metody založené na disperzi rozpouštědla. Mezi mechanické disperzní metody patří sonikace, extruze, metoda hydratace tenké vrstvy (TFH), lyofilizace následovaná rehydratací lipidového filmu a mikroemulgate. Tyto přístupy umožňují přípravu liposomů s různými velikostmi a lamelární strukturou v závislosti na podmínkách procesu a použité metodě [48].

Další skupinu pasivních metod enkapsulace představují techniky vstříkávání organického rozpouštědla, mezi něž se řadí zejména ethanolové vstříkávání, které patří k nejčastěji využívaným postupům. Tento proces spočívá v rychlém vstříkávání lipidového roztoku rozpuštěného v ethanolu do vodného roztoku při teplotě 55–65 °C, což vede k postupnému odpařování organického rozpouštědla a následné tvorbě liposomů [49]. Další významnou metodou je technika reverzní fáze, při níž dochází k iniciální tvorbě micel, které se následně transformují na liposomy v průběhu odstraňování organického rozpouštědla [50]. Kromě pasivních metod se v enkapsulaci využívají i aktivní techniky, při nichž jsou látky vkládány do již vytvořených liposomů, například pomocí pH gradientu. Tato metoda umožňuje dosáhnout až 100 % enkapsulační účinnosti, zejména u látek s protonizovatelnými aminoskupinami [51].

Sonikace představuje efektivní metodu pro přípravu liposomů, která využívá ultrazvukové vlny k vytvoření homogenních a malých vezikul, jež fungují jako nosiče terapeutických nebo bioaktivních látek [48]. Tento proces spočívá v aplikaci ultrazvukové energie na lipidovou suspenzi, což vede k její fragmentaci a následnému vytváření stabilních liposomálních částic [52]. Mechanismus sonikace zahrnuje generování kavitačních bublin, jejichž rychlý růst a kolaps vyvolávají lokální vysoké teploty a tlaky, což napomáhá rozštěpení větších lipidových agregátů a tvorbě homogenních nanostruktur [53]. Ultrazvuková sonikace je zvláště účinná při přípravě unilamelárních liposomů z hydratovaných multilamelárních vezikul [54]. Proces může být realizován dvěma základními způsoby - pomocí sondového sonikátoru nebo ultrazvukové lázně, přičemž klíčovými faktory ovlivňujícími výslednou velikost a stabilitu liposomů jsou intenzita ultrazvukového signálu, doba expozice a teplota [55]. Optimalizace těchto parametrů je nezbytná pro dosažení požadované velikosti a homogenity částic [56]. Mezi hlavní výhody sonikace patří její jednoduchost a rychlost při přípravě liposomů s homogenní velikostí. Nicméně tento proces může vést k degradaci citlivých molekul enkapsulovaných v liposomech, především vlivem lokálního zahřívání způsobeného intenzivním působením ultrazvukové energie [57]. Sonikace je považována za spolehlivou a efektivní metodu pro přípravu liposomálních nosičů, která umožňuje získání malých, uniformních částic s vysokým zatížením bioaktivními látkami, přičemž je možné přesně regulovat parametry ultrazvukového procesu, jako jsou amplituda, energie, čas a teplota [54].

Metoda tenké lipidové vrstvy je jednou z nejčastěji používaných technik pro přípravu liposomů pro enkapsulaci RNA, včetně krátkých oligonukleotidů. Tento postup je populární pro svou jednoduchost a šetrnost k citlivým molekulám, jako je RNA, čímž poskytuje ideální podmínky pro zachování její struktury a funkčnosti [44, 58]. Iniciální fáze přípravy liposomů zahrnuje vytvoření lipidového filmu. Tento proces začíná rozpuštěním specifických lipidů, zejména kationických lipidů, pomocných lipidů a cholesterolu, v organickém rozpouštědle, nejčastěji se využívá chloroform nebo směs chloroform/methanol. Následná evaporace rozpouštědla za sníženého tlaku vede k formaci tenkého lipidového filmu na stěně nádoby. V následující fázi dochází k hydrataci lipidového filmu vodným roztokem obsahujícím nukleové kyseliny (DNA nebo RNA). Tento proces probíhá za specifických teplotních podmínek, které musí převyšovat teplotu fázového přechodu použitých lipidů, což vede k spontánní formaci multilaminárních vezikul. Pro získání uniformní populace liposomů definované velikosti je nezbytná následná aplikace fyzikálních metod (například sonifikace). Finální krok přípravy zahrnuje purifikaci vzniklých lipoplexů od nezačleněných nukleových kyselin. K tomuto účelu se využívají separační metody jako centrifugace nebo gelová chromatografie, výběr konkrétní metody závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech připravených částic a požadované čistotě finálního produktu [58].

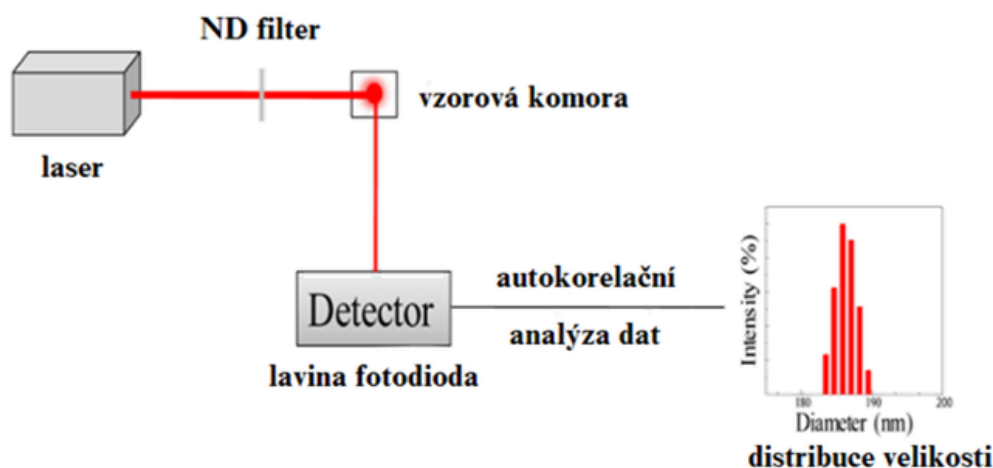
2.4 Hodnocení stability liposomů pomocí dynamického rozptylu světla

Liposomy jsou často hodnoceny podle jejich stability, což je klíčový faktor pro jejich úspěšné použití v různých aplikacích, včetně farmaceutického a kosmetického průmyslu [3, 41]. Stabilita liposomů může být ovlivněna mnoha faktory, jako je velikost částic, jejich povrchový náboj, složení lipidů a vnější podmínky (např. pH a teplota). K hodnocení stability liposomů

se používá několik technik, jako je dynamická světelná rozptýlenost (DLS), měření zeta potenciálu, mikroskopie a turbidimetrie. Při měření zeta potenciálu je rozptýl světla v elektrickém poli využíván pro výpočet potenciálu částic, což poskytuje důležité informace o stabilitě disperze [59].

Dynamický rozptýl světla je neinvazivní technika používaná k měření velikosti částic v roztoku na základě analýzy fluktuací intenzity rozptýleného světla způsobených Brownovým pohybem částic, kde menší molekuly se pohybují rychleji než větší. Velikost částic je určena pomocí Stokesova-Einsteinova vztahu [60]. DLS je ideální pro analýzu částic v širokém rozsahu velikostí, od nanometrů po mikrometry, což je užitečné například při studiu liposomů. Kromě stanovení velikosti částic může DLS poskytovat informace o jejich stabilitě, ale pro konkrétní hodnocení stability, zejména indikaci agregace nebo destabilizace systému, je klíčové měření zeta potenciálu. Zeta potenciál umožňuje sledovat interakce mezi částicemi a predikovat jejich tendenci k agregaci nebo dispersním změnám v průběhu času [59, 60].

Při aplikaci metody dynamického rozptýlu světla je na vzorek směřováno koherentní laserové světlo, které je následně rozptýlováno částicemi přítomnými v roztoku (viz Obrázek 5). Intenzita rozptýleného světla vykazuje fluktuace, které jsou monitorovány detektorem a podrobeny analýze pomocí autokorelační funkce. Tyto fluktuace jsou přímo závislé na rychlosti pohybu částic, které jsou v roztoku podrobeny Brownovu pohybu. Čím větší jsou částice, tím pomaleji se pohybují, což vede k pomalejším fluktuacím intenzity světla. Naopak menší částice se pohybují rychleji, což se projevuje rychlejšími fluktuacemi rozptýleného světla [61]. Tato dynamika pohybu částic je klíčová pro výpočet velikosti částic a jejich rozdělení ve vzorku [60].



Obrázek 5: Schéma měření DLS [62] (upraveno).

2.5 Elektroforetický rozptýl světla a měření povrchového náboje

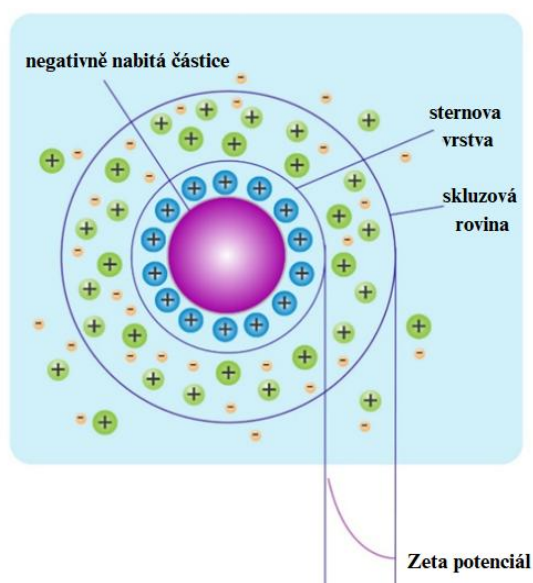
Elektroforetický rozptýl světla (ELS) je analytická technika, která umožňuje měření povrchového náboje částic na základě jejich pohybu v elektrickém poli [63]. Tento proces vychází z principu elektroforézy, kdy nabitě částice migrují v kapalném médiu pod vlivem aplikovaného elektrického pole, přičemž rychlost jejich pohybu, označovaná jako

elektroforetická mobilita, je přímo úměrná jejich zeta potenciálu. Měření probíhá prostřednictvím laserového paprsku, který interaguje s částicemi a sleduje změny ve frekvenci rozptýleného světla, což odpovídá Dopplerovu efektu [64].

Povrchový náboj částic hraje klíčovou roli v jejich interakcích a celkové stabilitě koloidních systémů. Dispergované nabitě částice vytvářejí elektrickou dvojvrstvu, která se skládá ze dvou hlavních oblastí: Sternovy vrstvy, kde jsou ionty pevně vázány na povrch částice elektrostatickými a adsorpčními silami, a difúzní vrstvy, která obsahuje volně pohyblivé ionty s dynamickou strukturou ovlivněnou faktory, jako je iontová síla a koncentrace solí. Uvnitř difúzní vrstvy se nachází tzv. rovina skluzu, ve které je měřen zeta potenciál – elektrický potenciál klesající se vzdáleností od povrchu částice (viz Obrázek 6) [63].

Hodnota zeta potenciálu je zásadním ukazatelem stability koloidního systému. Systémy, u nichž se zeta potenciál pohybuje v rozmezí přibližně -25 mV až $+25$ mV, jsou považovány za méně stabilní, protože slabé elektrostatické odpudivé síly umožňují agregaci částic. Naopak systémy s vyššími absolutními hodnotami zeta potenciálu, tedy nad $+25$ mV nebo pod -25 mV, vykazují silnější odpudivé síly, což přispívá k větší elektrostatické stabilitě a omezuje tendenci částic ke shlukování [65]

Charakter zeta potenciálu liposomů je přímo determinován chemickým složením jejich lipidové dvojvrstvy. Liposomy obsahující aminofosfolipidy mohou vykazovat pozitivní zeta potenciál, což je důsledkem ionizace aminových skupin, které vedou k tvorbě kladného náboje. Naopak liposomy tvořené aniontovými fosfolipidy, jako je fosfatidylglycerol, obvykle disponují negativním zeta potenciálem, jenž vyplývá z přítomnosti záporně nabitých funkčních skupin těchto fosfolipidů [59]. Díky své schopnosti poskytnout důležité informace o elektrostatických interakcích v roztoku se ELS široce využívá k charakterizaci koloidních systémů, včetně liposomálních formulací. Přesné určení zeta potenciálu pomocí této metody umožňuje optimalizaci složení a podmínek přípravy částic s cílem zajistit jejich dlouhodobou stabilitu a účinnost [63, 64].



Obrázek 6: Schéma elektrické dvojvrstvy a zeta potenciálu [64] (upraveno).

2.6 Stabilizace nanočástic

Stabilita liposomů je klíčovým faktorem pro zachování jejich účinnosti a bezpečnosti jako nosičů léčiv. Hlavními mechanismy destabilizace jsou hydrolyza esterových vazeb fosfolipidů a oxidace nenasycených vazeb [66]. Hydrolyza esterových vazeb vede k tvorbě lysofosfolipidů, které mohou být toxické a způsobují změny ve vlastnostech membrán. Tento proces je minimální při neutrálním pH a teplotách 1–25 °C, přičemž jeho monitoring lze provádět pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) nebo vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) [67]. Oxidaci nenasycených vazeb lze efektivně inhibovat přidávkou antioxidantů, jako je vitamín E, nebo chelatačních činidel, například kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA). Důležitým preventivním opatřením je také skladování při 4 °C a ochrana před expozicí kyslíku a světlu [68]. Chemická nestabilita může vést k úniku enkapsulovaných látek, fúzi nebo agregaci částic [69].

Stabilitu liposomálních systémů lze významně zvýšit několika způsoby. Přítomnost nabitých lipidů, jako je fosfatidylglycerol, zvyšuje elektrostatické odpuzování mezi částicemi, čímž brání jejich agregaci. Cholesterol přispívá ke stabilizaci membrány snížením její propustnosti a zvýšením odolnosti vůči vnějším vlivům [70]. Významnou roli hraje také pH prostředí – neutrální pufrů minimalizují hydrolyzu lipidů.

Lyofilizace představuje efektivní metodu pro dlouhodobou stabilizaci liposomů. Proces vyžaduje použití lyoprotektiv, především neredukujících disacharidů jako sacharóza, které chrání liposomy během zmrazování, dehydratace a rehydratace [71]. Tyto cukry interagují s polárními skupinami fosfolipidů, snižují teplotu fázového přechodu membránových fosfolipidů a udržují lipidy v tekutém stavu i v nepřítomnosti vody [72].

Pro dosažení optimální stability je nezbytné dodržovat specifické podmínky přípravy a skladování, včetně práce s čistými lipidy a rozpouštědly, kontroly teploty a pH, minimalizace přístupu kyslíku a zajištění sterility prostředí. Tyto faktory společně určují dlouhodobou stabilitu a funkčnost liposomálních systémů [73].

2.7 Stabilizace RNA v nanočásticích

Stabilita a biologická účinnost RNA v nanočásticových systémech závisí kriticky na různých ochranných mechanismech. Chemická modifikace RNA představuje jeden ze základních přístupů ke zvýšení stability a terapeutického potenciálu RNA-založených nanoterapeutik [74]. Pro zlepšení stability a biologické aktivity RNA molekul bylo vyvinuto několik klíčových modifikačních strategií.

Náhrada 2'-hydroxylové skupiny specifickými substituenty představuje jeden z nejúčinnějších přístupů ke stabilizaci RNA. Byly prokázány dva hlavní typy modifikací s významným potenciálem:

- 2'-O-methyl modifikace: Tato modifikace zahrnuje náhradu hydroxylové skupiny na 2' pozici methylovou skupinou, čímž vytváří sterickou bariéru, která chrání RNA před degradací nukleázami při zachování její prostorové konfigurace a biologické aktivity [75].

- 2'-fluoro modifikace: Při této modifikaci dochází k nahrazení 2' hydroxylové skupiny fluorem, což prokazatelně zvyšuje termodynamickou stabilitu a zlepšuje vazebné interakce. Výzkumy prokázaly, že 2'-fluoro modifikace významně zlepšují účinnost RNA interference a termální stabilitu [76].

Strukturální modifikace fosfodiesterové páteře RNA představují další přístup ke zvýšení stability. Methylfosfonátová modifikace, spočívající v přidání methylové skupiny na fosfodiesterovou vazbu, prokázala schopnost udržet stabilitu RNA při nižší toxicitě ve srovnání s jinými modifikacemi páteře [77].

Kromě chemických modifikací lze RNA stabilizovat pomocí strategií založených na polymerní ochraně. Interakce mezi polykationtovými materiály a negativně nabitou RNA představuje účinný přístup k ochraně. Polyethylenimin (PEI) komplexy, tyto vysoce větvené struktury účinně neutralizují negativní náboj RNA a zároveň usnadňují buněčnou internalizaci [78]. Systémy založené na dendrimerech nabízejí definovanou molekulární architekturu a variabilní povrchový náboj, což umožňuje přesnou kontrolu nad enkapsulací a uvolňováním RNA [79]. Ochrana založená na chitosanu spočívá v jeho polykationtové povaze, která umožňuje silnou interakci s nukleovými kyselinami. Díky tomu chitosan vytváří ochranné komplexy, které zvyšují buněčný příjem a zároveň brání degradaci nukleázami [80]. Chitosanové oligomery mohou podporovat stabilizaci RNA prostřednictvím vícenásobných elektrostatických interakcí [81].

Tyto různé přístupy ke stabilizaci RNA často působí synergicky a jejich kombinace v nanočásticových systémech může maximalizovat jak stabilitu, tak terapeutickou účinnost [74].

3 CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je prozkoumání vlivu délky RNA na její enkapsulaci do lipozomálních částic. Práce se zaměřuje na optimalizaci přípravy stabilní formy funkcionalizovaných vezikul metodou ultrazvukové sonifikace a jejich následnou charakterizaci s ohledem na enkapsulační účinnost a krátkodobou i dlouhodobou stabilitu. Součástí práce je dosažení následujících dílčích cílů:

- 1) Literární rešerše na téma nanočástic a nukleových kyselin
- 2) Příprava RNA struktur různých délek
- 3) Studium vlivu délky struktury na stabilitu RNA molekul a stabilitu samotných částic
- 4) Stanovení enkapsulační účinnosti (elektroforéza), velikosti liposomů (DLS) a dlouhodobé a krátkodobé stability připravených funkcionalizovaných částic (DLS)

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiály

Materiály a přístroje potřebné pro izolaci plazmidové DNA (E.Z.N.A.® Plasmid DNA Midi Kit, elektroforetická aparatura Mini-Sub Cell GT, zdroj napětí PowerPac 300) byly poskytnuty Oddělením biofyzikální chemie a molekulární onkologie Biofyzikálního ústavu Akademie věd České republiky, v. v. i. Ultrazvuková sonifikace byla provedena pomocí ultrazvukového homogenizátoru/dispergátoru Bandelin Sonopuls HD 3000 (Sonorex Technik, Německo). Veškeré materiály použité při přípravě nanočástic a přístroje pro měření dynamického rozptylu světla (DLS) a zeta potenciálu (Zetasizer Nano ZS) byly poskytnuty Fakultou chemickou Vysokého učení technického v Brně. Podrobnosti k použitým přístrojům a materiálům jsou uvedeny v kapitolách 4.1.1, 4.1.2 a 4.1.3

4.1.1 Použitý genetický materiál

V průběhu experimentů byl použit následující genetický materiál:

- Bakteriální kultura *Escherichia coli TOP10* (obsahující plazmidovou DNA pBluescript)
- DNA žebříček (1 000 bp *DNA Ladder*; New England Biolabs)
- DNA žebříček (*O'RangeRuler 10 bp DNA Ladder, ready-to-use*; Thermo Scientific)
- Izolovaná pDNA (o koncentraci 114 µg/ml)
- Syntetické oligonukleotidy (Eurofins Genomics; viz Tabulka 1)

Tabulka 1: Oligonukleotidy použité pro enkapsulaci do liposomů.

Oligonukleotid	Sekvence 5'–3'
MS3-17 DNA	AGGGAGGGAGGGAGGGA
RAN-17 DNA	GATTGCCATTCTCTCAA
MS3-17 RNA	AGGGAGGGAGGGAGGGA
RAN-17 RNA	GAUUGCCAUUCUCUCAA

4.1.2 Přístroje a pomůcky

- Spektrofotometr NanoDrop 2000, Thermo Scientific, (USA)
- Transiluminátor Amersham Imager 680, Cytiva, (USA)
- Software pro denzitometrickou analýzu elektroforetických pruhů ImageJ, National Institutes of Health (NIH, USA)
- DLS analyzátor – Zetasizer Nano ZS, Malvern (UK)
- Analytické váhy, Boeco (Nemecko)
- Automatické pipety v rôznom rozsahu objemu – Discovery (Nemecko), Biohit (Nemecko)
- Mikrocentrifúga Mikro 120, Hettich Zentrifugen (Nemecko)
- Temperovaná trepačka, Hiedolph Inkubator 1000 (Nemecko)
- Ultrazvukový homogenizátor/dispergátor – Bandelin Sonoplus HD3000 – Sonorex Technik (Nemecko)
- Centrifuga, Mini Spin plus, Eppendorf (Německo)

- Inkubátor, Innova 44, New Brunswick Scientific (USA)
- Magnetická míchačka, MSH-30 A, WiseStir (Jižní Korea)
- Předvážky, TE 412, Sartorius (Německo)
- Mikrovlnný autokláv, Microjet Personal Microwave Autoclave, Enbio (Švýcarsko)
- Vortex, IKA 4 digital, IKA (Německo)
- Zdroj napětí, PowerPac 300, Bio-Rad (USA)
- Elektroforetická aparatura, Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad (USA)
- Elektroforetická aparatura, Mini Protean Tetra Cell System, Bio-Rad (USA)
- Laminární box, Biosan, Biotech spol. s r.o. (Česká republika)

4.1.3 Chemikálie

V průběhu experimentální části byly použity následující chemikálie a reagenty:

- Ampicilin (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)
- E.Z.N.A.® Plasmid DNA Midi Kit – izolace pDNA (Omega BIO-TEK, USA)
- Ethanol (100 %) (Penta, Česko)
- Lecitin (Sigma-Aldrich, Německo)
- Cholesterol (Sigma-Aldrich, Německo)
- Agaróza (Serva, Německo)
- GEL Red – fluorescenční barvivo pro vizualizaci DNA (Sigma-Aldrich, Německo)
- Akrylamid:bisakrylamid 19:1 (Serva, Německo)
- Butanol (Penta, Česko)
- LB nanášecí barvivo 6× DNA Loading Buffer, ready-to-use; (Thermo Scientific, USA)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA; Lach-ner, Česko)
- Kvasinkový extrakt (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)
- Kyselina octová (Lach-ner, Česko)
- Peroxodisíran amonný (Promega, USA)
- Tetramethylethylendiamin – TEMED (Sigma-Aldrich, Německo)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan – Tris (Serva, Německo)
- Trypton (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)
- Chlorid sodný – NaCl (Penta, Česko)
- Chlorid draselný – KCl (Penta, Česko)
- Sacharóza (Lach-ner, Česko)
- Trypton (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)
- Kvasinkový extrakt (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)
- PCR-grade voda bez nukleáz (Sigma-Aldrich, Německo)
- 50× TAE pufr: Tris, kyselina octová, EDTA (vlastní příprava)
- 1× TBE pufr: Tris, kyselina boritá, EDTA (vlastní příprava)
- PBS – fosfátový pufr (VWR, USA)

4.1.4 Použitá média a roztoky

- Phosphate Buffered Saline (PBS), 10×, Ultra Pure Grade, VWR, USA.
- LB médium (100 ml): 1 % trypton, 0,5 % kvasinkový extrakt, 1 % NaCl,
- LB nanášecí pufr (10 ml): 40% sacharóza.

- Agarózový gel (50 ml): 1,0 % (w/v) agarózy, 2,0 % (v/v) 50× TAE pufru a 0,002 % (v/v) *GelRedu*.
- Polyakrylamidový gel (10 ml): 8,0 % (v/v) roztoku 19:1 akrylamid:bisakrylamid, 33,0 % (v/v) 1× TBE pufru (z 0,33× zásobního roztoku), 50 mM KCl, 0,005 % (w/v) persíranu amonného a 0,003 % (v/v) tetramethylethyldiaminu (TEMED).
- 50× TAE pufr: 24,2 % (w/v) Tris, 1,86 % (w/v) EDTA, a 5,71 % (v/v) kyseliny octové.

4.2 Izolace plazmidové DNA (pDNA)

Proces izolace plazmidové DNA zahrnoval přípravou a kultivací bakteriální kultury a následnou izolaci pDNA pomocí komerčně dostupného kitu. Byla provedena extrakce a purifikace plazmidové DNA z 50 ml kultury *E. coli TOP10*. Následná izolace probíhala v souladu s protokolem dodaným v soupravě *E.Z.N.A.® Plasmid DNA Midi Kit* (Omega Bio-tek). Po extrakci byla stanovena koncentrace izolované pDNA pomocí spektrofotometrického měření na přístroji Nanodrop. Plazmidová DNA byla následně uchována při teplotě -20 °C pro dlouhodobé skladování a další experimentální použití.

4.3 Horizontální elektroforéza pDNA

Byl připraven 1 % agarózový gel s přidavkem 0,002 % (v/v) interkalačního barviva (*GelRed*). Elektroforetická vana byla naplněna 1x koncentrovaným TAE pufrům tak, aby agarózový gel byl zcela ponořen. Do jednotlivých jamek gelu byly pipetovány připravené směsi obsahující DNA, barvivo (LB nanášecí pufr) a deionizovanou vodu. Pro každou jamku byla připravena směs obsahující 100 ng DNA, 2 µl LB nanášecího barviva o koncentraci 6× a deionizovanou vodu do celkového objemu 12 µl. Jako molekulární standard byl použit 1 000bp DNA žebříček, který sloužil k přesnému určení velikosti izolovaných fragmentů.

Elektroforéza byla provedena při konstantním napětí 90 V po dobu 45 minut. Po ukončení elektroforézy byl gel vyjmut a snímán na transiluminátoru. Vzorky izolované pDNA byly pro zajištění uniformity vzorků spojeny a výsledná koncentrace byla upravena na 114 µg/ml.

Enkapsulační účinnost byla vyhodnocena na základě porovnání intenzity elektroforetického pruhu volné pDNA v supernatantu se signálem odpovídajícím stejné koncentraci pDNA před enkapsulací. Analýza byla provedena pomocí programu ImageJ, kde byly kvantifikovány plochy pruhů (intenzity signálu). Enkapsulační účinnost (EE) byla vypočtena podle následujícího vztahu:

$$EE (\%) = 100 - \left(\frac{A_s}{A_0} \times 100 \right), \quad (1)$$

kde A_s je plocha pruhu volné pDNA v supernatantu, A_0 je plocha pruhu referenčního vzorku se stejnou koncentrací pDNA před enkapsulací.

4.4 Vertikální polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE)

Stanovení enkapsulační účinnosti u vzorků liposomálních částic obsahujících syntetické oligonukleotidy bylo provedeno pomocí vertikální elektroforézy v polyakrylamidovém gelu a následného stanovení denzitometrické analýzy programem ImageJ. Do gelu bylo přidáno

interkalační činidlo *GelRed* (Sigma-Aldrich) v koncentraci 0,005 % (v/v) pro následnou vizualizaci DNA.

Elektroforetická vana byla naplněna pufrům tak, aby hladina pokrývala povrch gelu a umožnila rovnoměrné vedení elektrického proudu. Do jednotlivých jamek byly aplikovány směsi obsahující DNA a LB nanášecí pufr. Pro každou jamku byla připravena směs o celkovém objemu 48 μ l, která obsahovala 40 μ l vzorku supernatantu po enkapsulaci a 8 μ l zátěžového barviva (40 % sacharóza). Jako molekulární standard byl použit 10 bp DNA žebříček, sloužící k přesnému určení velikosti fragmentů. Elektroforéza byla provedena při konstantním napětí 50 V po dobu 90 minut. Po jejím ukončení byl gel vyjmut a vizualizován pomocí transiluminátoru.

4.5 Odstranění lecitinu ze vzorků DNA

Za účelem odstranění interferující absorpce způsobené přítomností lecitinu ve vzorcích DNA byly testovány dvě purifikační metody: precipitace ethanolem a čištění pomocí komerčně dostupného kolonkového systému určeného k izolaci plazmidové DNA. Obě metody byly dále vyhodnoceny z hlediska účinnosti odstranění lecitinu, výtěžku DNA a vhodnosti pro následné spektrofotometrické stanovení.

4.5.1 Izolace pomocí precipitace ethanolem

V případě precipitace ethanolem byl ke 50 μ l vzorku DNA obsahujícímu lecitin přidán 2,5násobný objem (125 μ l) ledově vychlazeného 100 % ethanolu. Směs byla jemně promíchána převrácením zkumavky a inkubována při -20 °C přes noc, pro dosažení úplné precipitace DNA. Následně byl vzorek centrifugován při 14 000 ot/min po dobu 15 minut při 4 °C. Po odstranění supernatantu byla peleta promyta 200 μ l 70 % ethanolu (rovněž ledově vychlazeného) a opět odstředěna. Peleta byla poté ponechána volně vyschnout na vzduchu (5–10 minut) a znovu rozpuštěna v 10 μ l sterilní deionizované vody. Pro podporu rozpuštění byla provedena inkubace při 37 °C po dobu 10–15 minut.

4.5.2 Izolace pomocí kolonek

Druhou testovanou metodou byla purifikace pomocí kolonek z komerčně dostupné izolační sady pro pDNA. Do vzorku byla přidána potřebná množství ethanolu a roztok byl aplikován na čistou kolonku. Po odstředění při 12 000 ot/min po dobu 1 minuty bylo provedeno promytí kolonky 500 μ l isopropanolu (centrifugace 14 000 ot/min, 5 minut) a následně 700 μ l ethanolu (centrifugace 14 000 ot/min, 30 sekund). Po důkladném vysušení byla DNA eluována do čisté zkumavky pomocí 10 μ l elučního pufru s 5minutovou inkubací.

4.6 Příprava liposomů

Pro následnou enkapsulaci plazmidové DNA byly připraveny liposomální vzorky s navážkami lecitinu 18,0 mg, 9,0 mg, 4,5 mg a 0,5 mg, přičemž byl v každém případě zachován molární poměr lecitin:cholesterol 9:1. Vzorky byly doplněny deionizovanou vodou do celkového objemu 1 ml. Množství jednotlivých lipidových složek bylo ve variantách vzorků úměrně upraveno dle zvolené navážky lecitinu. Podrobné složení jednotlivých vzorků je uvedeno

v tabulce 2. Připravená směs byla následně sonifikována ultrazvukovým homogénizátorem/dispergátorem Bandelin Sonopuls HD 3200, Sonorex Technik, Německo, při intenzitě 50 % po dobu jedné minuty (pulzní režim: 6× 10 sekund), přičemž byla současně chlazená ve vodní lázni.

Tabulka 2: Použité koncentrace lipidových složek pro přípravu liposomů.

Označení	Množství lecitinu [mg/ml]	Množství cholesterolu [mg/ml]
Vzorek 1	18,0	2,0
Vzorek 2	9,0	1,0
Vzorek 3	4,5	0,5
Vzorek 4	1,8	0,2

4.6.1 Enkapsulace plazmidové DNA do liposomů

Příprava liposomů s plazmidovou DNA byla prováděna ve sterilním prostředí za použití laminárního boxu Biosan, dodaného firmou Biotech spol. s r.o., Česká republika. Pro enkapsulaci DNA byly připraveny tři varianty liposomálních vzorků lišící se koncentrací lipidových složek, a to vzorek 1, vzorek 2 a vzorek 3, které jsou uvedeny v tabulce 2. V rámci optimalizačního procesu byly do každé směsi enkapsulovány čtyři různé koncentrace pDNA (1,00 5,00 0,10 a 0,01 µg/ml). Připravené směsi byly následně sonikovány, jak je popsáno v kapitole 4.6. Pelet obsahující enkapsulované částice s pDNA byl resuspendován v deionizované vodě.

4.6.2 Enkapsulace syntetických oligonukleotidů

Na základě předchozího optimalizačního procesu byly stanoveny podmínky pro přípravu částic s plazmidovou DNA a následně aplikovány také při přípravě částic se syntetickými oligonukleotidy. Syntetické oligonukleotidy od společnosti Eurofins Genomics byly před enkapsulací rozpuštěny ve sterilním prostředí v 1 ml PCR vody bez nukleáz. Po centrifugaci při 14 000 otáčkách za minutu po dobu 60 minut byl supernatant odebrán a pelet obsahující enkapsulované částice byl resuspendován a inkubován v PBS pufru temperovaném na 37 °C.

4.7 Stanovení velikosti a stability částic

Resuspendované vzorky byly 100× naředěny destilovanou vodou. Velikost částic byla určena pomocí dynamického rozptylu světla (DLS) za použití přístroje Zetasizer. Roztoky částic byly převedeny do kyvety a následně byla změřena distribuce velikosti, průměrná velikost a polydisperzita částic.

Stabilita částic byla hodnocena na základě měření zeta potenciálu, rovněž pomocí přístroje Zetasizer. Roztoky částic byly opět 100× naředěny. Do kyvety bylo přemístěno 1 ml naředěného roztoku, vložen elektrodový nástavec a poté provedeno měření. Ze zjištěných hodnot zeta potenciálu byla odvozena stabilita částic. Částice s hodnotou zeta potenciálu vyšší než ±25 mV jsou obecně považovány za elektrostaticky stabilní, protože odpuzivé síly mezi nabitými částicemi zabraňují jejich agregaci [65]

Stabilita částic byla hodnocena ve dvou odlišných časových obdobích, odpovídajících krátkodobému a dlouhodobému sledování. Krátkodobá stabilita byla definována jako hodnota zeta potenciálu naměřená bezprostředně po přípravě částic. Dlouhodobá stabilita byla hodnocena po jednom týdnu a následně po dvou týdnech od přípravy. Po celou dobu byly vzorky uchovávány v roztoku PBS pufru (pH 7,4) při teplotě 37 °C a jemně promíchávány na laboratorní třepačce nastavené na 100 otáček za minutu. V jednotlivých časových bodech byly odebrány alikvóty, které byly podrobeny měření zeta potenciálu.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Před samotnou enkapsulací DNA a RNA oligonukleotidů a sledováním dlouhodobé i krátkodobé stability připravených částic bylo nezbytné proces enkapsulace nukleových kyselin optimalizovat. K optimalizaci byla využita plazmidová DNA o koncentraci 1,00; 5,00; 0,10 a 0,01 $\mu\text{g/ml}$, izolovaná z bakteriální kultury *E. coli* TOP10 navržené pro vysokou produkci cílového plazmidu, a čtyři různé směsi s navážkami lecitinu 18,0 mg, 9,0 mg, 4,5 mg a 1,8 mg při zachovaném molárním poměru lecitin:cholesterol 9:1, u nichž byla sledována velikost a polydisperzita vytvořených částic. Během procesu optimalizace byla na základě enkapsulační účinnosti vybrána vhodná koncentrace nukleových kyselin a nejvhodnější směs lipidových složek s navážkou lecitinu 18,0 mg a cholesterolu 2,0 mg (molární poměr 9:1), která byla následně použita pro enkapsulaci syntetických oligonukleotidů. U těchto vzorků byla dále sledována stabilita i v delším časovém období.

5.1 Optimalizace složení lipidové směsi

Vzhledem k omezenému množství dostupného enkapsulovaného materiálu a současné nutnosti pracovat v minimálních objemech bylo přistoupeno k optimalizaci složení lipidové směsi. Optimalizace byla provedena za účelem dosažení dostatečné stability liposomů, vhodné velikosti částic a optimálních fyzikálně-chemických vlastností pro následnou enkapsulaci plazmidové DNA. Zároveň bylo třeba ověřit, jak budou liposomální systémy reagovat na experimentální podmínky v prostředí s redukováným objemem a při použití zúžené sonikační sondy MS 72. Snížené pracovní objemy a limitované množství biologického materiálu neumožňovaly využití dříve zavedených protokolů, a proto byla úprava složení a koncentrace lipidových složek nezbytná.

Pro tento účel byly připraveny liposomy ve čtyřech variantách s různými navážkami lecitinu (18,0 mg, 9,0 mg, 4,5 mg a 1,8 mg) při zachovaném molárním poměru lecitin:cholesterol 9:1, jak je uvedeno v tabulce 2. Následně byly u všech vzorků analyzovány velikost částic, polydisperzita (PDI) a zeta potenciál pomocí metody dynamického rozptylu světla (DLS), jak je popsáno v kapitole 4.7.

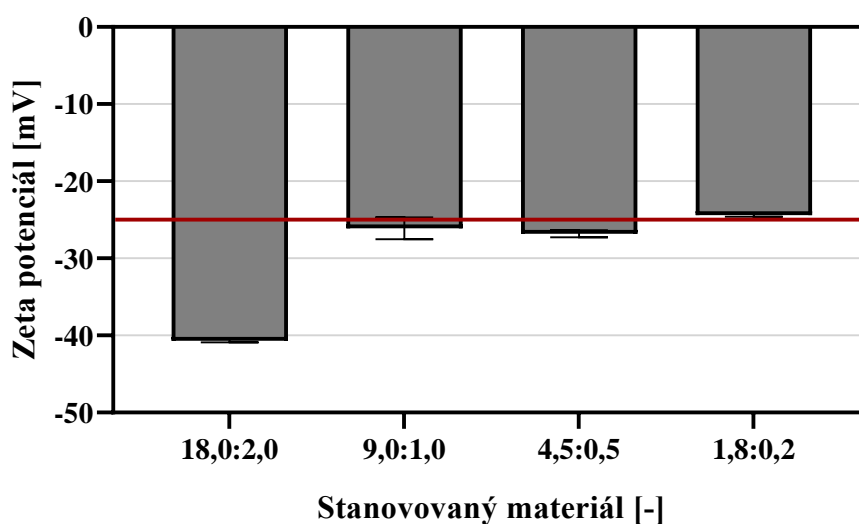
Výsledky těchto měření jsou shrnuty v tabulce 3 a zobrazeny na obrázku 7. Na základě získaných dat bylo zjištěno, že vzorky připravené s navážkami lecitinu 18,0 mg, 9,0 mg a 4,5 mg při zachovaném molárním poměru lecitin:cholesterol 9:1 vykazovaly nízkou hodnotu polydisperzity ($\text{PDI} < 0,4$) a dostatečně záporný zeta potenciál v rozmezí $-26,8 \pm 0,45$ až $-40,7 \pm 0,21$ mV, což svědčí o vyšší stabilitě liposomálních částic [63, 65]. Naproti tomu vzorek připravený s navážkou lecitinu 1,8 mg dosahoval méně negativní hodnoty zeta potenciálu ($-24,4 \pm 0,21$ mV), což může signalizovat nižší stabilitu suspenze za daných podmínek. Velikost částic se pohybovala v rozmezí $138,5 \pm 3,7$ až $244,2 \pm 4,1$ nm, přičemž s klesající koncentrací lipidových složek docházelo k mírnému zmenšení průměrné velikosti částic.

Na základě těchto parametrů byly jako nejvhodnější pro následnou enkapsulaci plazmidové DNA vybrány vzorky připravené s navážkami lecitinu 18,0 mg, 9,0 mg a 4,5 mg. Tyto vzorky vykazovaly kombinaci nízké polydisperzity, dostatečně záporného zeta potenciálu a velikosti

částic. Přestože některé velikosti mírně přesahují literaturou doporučenou hranici 200 nm, hodnoty zeta potenciálu u všech vybraných vzorků byly nižší než -25 mV, což podle literárních údajů zajišťuje elektrostatickou stabilitu koloidního systému. Z těchto důvodů lze uzavřít, že vybrané formulace svými vlastnostmi obecně odpovídají požadavkům pro genové doručování [48].

Tabulka 3: Průměrná velikost, polydisperzita a stabilita liposomů.

Směs lecitin:cholesterol [mg]	Velikost [nm]	Polydisperzita [-]	Zeta potenciál [mV]
18,0:2,0	244,2 ± 4,1	0,399 ± 0,004	-40,7 ± 0,21
9,0:1,0	235,4 ± 3,2	0,338 ± 0,001	-26,1 ± 1,41
4,5:0,5	138,5 ± 3,7	0,233 ± 0,001	-26,8 ± 0,45
1,8:0,2	227,2 ± 1,5	0,286 ± 0,002	-24,4 ± 0,21



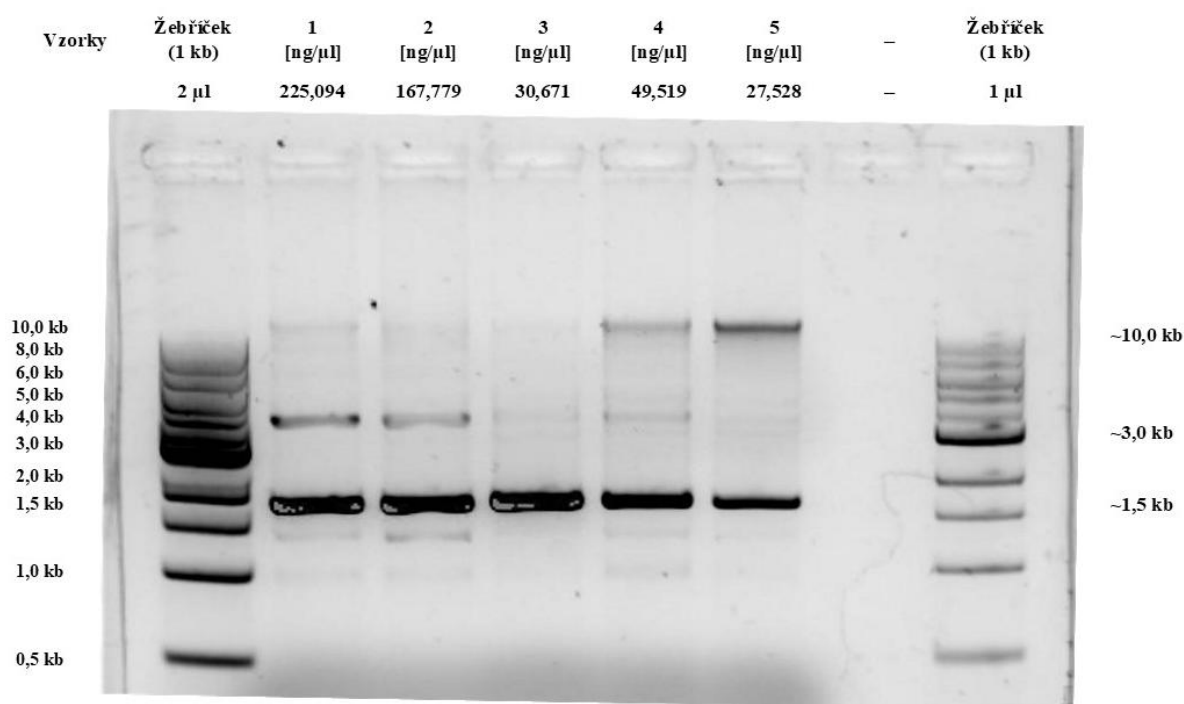
Obrázek 7: Vliv navážek lecitinu a cholesterolu (v mg, při zachovaném molárním poměru 9:1) na hodnotu zeta potenciálu připravených liposomálních částic. Červená čára znázorňuje hraniční hodnotu -25 mV, pod kterou jsou systémy považovány za elektrostaticky stabilní.

5.2 Optimalizace přípravy částic s pDNA

Vzhledem k omezené dostupnosti syntetických oligonukleotidů byl jako modelový systém pro počáteční experimenty zvolen plazmidový DNA vektor pBluescript, jenž umožnil ověření a optimalizaci metodiky enkapsulace bez rizika spotřeby syntetických vzorků. Plazmidová DNA byla izolována z bakteriální kultury *E. coli TOP10* pBluescript za použití komerčně dostupné izolační sady, a to podle postupu popsaného v kapitole 4.2

Po izolaci byla integrita a čistota pDNA ověřena horizontální elektroforézou v 1 % agarózovém gelu, jak je uvedeno v kapitole 4.3. Elektroforéza umožnila vizualizaci jednotlivých forem DNA a zároveň posouzení úspěšnosti izolačního postupu (viz Obrázek 8). Celkem bylo analyzováno pět vzorků s následujícími koncentracemi – vzorek 1: 225,094 ng/μl, vzorek 2: 167,779 ng/μl, vzorek 3: 30,671 ng/μl, vzorek 4: 49,519 ng/μl, vzorek 5: 27,528 ng/μl. Pro orientační

stanovení velikosti fragmentů byl jako referenční standard použit 1 000 bp DNA žebříček, jehož velikostní rozsah byl 500–10 000 bp. Všechny referenční hodnoty uvedené po levé a pravé straně elektroforetického obrazu odpovídají jednotlivým hmotnostním standardům tohoto žebříčku (viz Obrázek 8). Výsledky elektroforézy potvrdily přítomnost tří forem pDNA – nadšroubovicové, lineární a otevřeného kruhu (tzv. *relaxed circle*). Nadšroubovicová forma o velikosti přibližně 1 500 bp dominovala ve všech vzorcích a odpovídala očekávané kompaktní struktuře pBluescript [82]. Ve vzorcích 1 a 2 byla dále identifikována lineární forma (~3 000 bp) což odpovídá předpokládané velikosti plazmidu pBluescript II SK (-) [83], zatímco vzorky 4 a 5 obsahovaly převážně relaxovanou formu s odhadovanou velikostí kolem 10 000 bp. Na základě elektroforetické analýzy bylo potvrzeno, že izolace proběhla úspěšně a že výsledné vzorky vykazují dostatečnou čistotu i strukturální integritu pro následné experimenty.



Obrázek 8: Analýza plazmidové DNA izolované z *E. coli* TOP10 pBluescript pomocí agarózové gelové elektroforézy (1 % agaróza). Bylo analyzováno pět vzorků pDNA o různých koncentracích: vzorek 1: 225,094 ng/μl, vzorek 2: 167,779 ng/μl, vzorek 3: 30,67 ng/μl, vzorek 4: 49,519 ng/μl, vzorek 5: 27,528 ng/μl. Jako referenční standard byl použit 1 000bp DNA žebříček (okrajové starty gelů vlevo i vpravo), jehož velikosti jsou uvedeny po stranách gelu (rozsah 0,5–10,0 kb). Elektroforéza prokázala přítomnost tří forem plazmidové DNA: nadšroubovicové (~1 500 bp), lineární (~3 000 bp) a relaxované (~10 000 bp) – odpovídající velikosti znázorněny vpravo.

5.3 Testování vhodných metod pro stanovení enkapsulační účinnosti

V rámci této fáze experimentu byly testovány různé varianty vzorků připravených s navážkami lecitinu 18,0 mg, 9,0 mg a 4,5 mg, při zachovaném molárním poměru lecitin:cholesterol 9:1 (viz kapitola 4.6). Cílem bylo ověřit vliv množství lipidové fáze na stabilitu připravených částic a schopnost enkapsulace plazmidové DNA (pDNA). Za účelem stanovení enkapsulační účinnosti bylo provedeno několik experimentů.

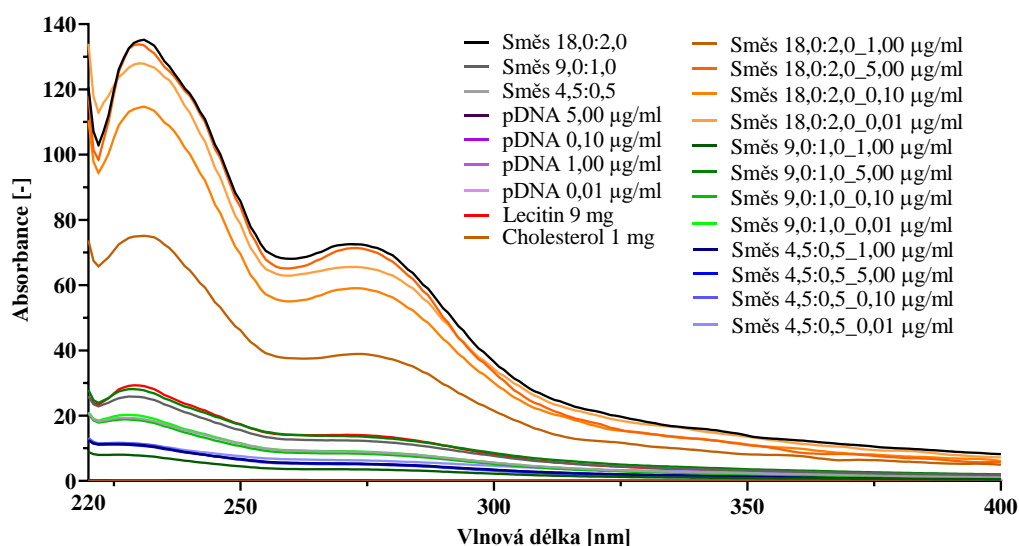
Stanovení enkapsulační účinnosti bylo provedeno ze supernatantu po centrifugaci vzorků při 14 000 ot/min po dobu 60 minut. Současně byly testovány různé koncentrace pDNA (1,00, 5,00, 0,10 a 0,01 µg/ml) (viz kapitola 4.6.1). Tyto koncentrace byly zvoleny s cílem optimalizovat podmínky enkapsulace pro nízké množství nukleových kyselin v malých objemech a zároveň zohlednit omezené množství RNA použitelných v dalších experimentech.

Přímé stanovení koncentrace nukleových kyselin ve vzorcích je běžně prováděno pomocí UV/VIS spektrofotometrie, která umožňuje kvantifikaci na základě absorbance při 260 nm [84]. Z tohoto důvodu byly vzorky supernatantu získané po přípravě liposomálních částic, obsahující potenciálně neenkapsulovanou pDNA, nejprve analyzovány pomocí kompaktního UV/VIS spektrofotometru určeného pro práci s malými (nano) objemy.

Výsledky spektrofotometrického měření (viz Obrázek 9) ukázaly, že samotný cholesterol vykazuje v rozsahu 220–400 nm velmi nízkou absorbanci, zatímco lecitin vykazuje výraznou absorpci v oblasti 220 až 300 nm [85], s maximem v blízkosti 260 nm. Tato skutečnost znemožnila přesné stanovení koncentrace pDNA ve vzorcích supernatantu, neboť maximum pDNA se nachází rovněž při této vlnové délce. Přítomnost lecitinu byla potvrzena i ve spektrech všech vzorků obsahujících enkapsulovanou pDNA [65, 86]

Za účelem odstranění interferující absorpce způsobené lecitinem byly testovány dvě metody purifikace: extrakce ethanolem (viz kapitola 4.5.1) a použití kolonek z komerční izolační sady pro pDNA podle kapitoly 4.5.2. Ani jedna z metod však neposkytla uspokojivé výsledky. Spektra po ethanolové extrakci nadále vykazovala absorpční pásy odpovídající lecitinu nebo ethanolu. U kolonkami purifikovaných vzorků byl navíc zaznamenán nízký výtěžek pDNA (pouze 9,1 %), což naznačuje výrazné ztráty během procesu [87].

Z těchto důvodů byla jako hlavní metoda pro kvantitativní stanovení volné (neenkapsulované) pDNA zvolena horizontální agarózová elektroforéza, jejíž výsledky byly následně vyhodnoceny pomocí denzitometrické analýzy (ImageJ). Tento přístup umožnil zohlednit vliv přítomných lipidů a zároveň poskytl dostatečnou citlivost pro měření nízkých koncentrací nukleových kyselin.



Obrázek 9: Absorpční spektra vzorků liposomálních částic s enkapsulovanou pDNA, samotné pDNA a jednotlivých komponent (lecitin, cholesterol) v rozsahu 220–400 nm. Označení vzorků ve formátu „směs X:Y_Z“ v legendě odpovídá navážce lecitinu (X mg) a cholesterolu (Y mg) při zachovaném molárním poměru 9:1, kde „Z“ představuje koncentraci enkapsulované pDNA ve vzorku (v µg/ml). Například „Směs 18,0:2,0_1,00“ označuje vzorek připravený s 18,0 mg lecitinu, 2,0 mg cholesterolu a 1,00 µg/ml pDNA.

5.4 Velikost a stabilita liposomů s plazmidovou DNA

Liposomy s plazmidovou DNA byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 4.6.1. U připravených vzorků byla provedena charakterizace velikosti částic podle kapitoly 4.7, dále byly stanoveny hodnoty polydisperzního indexu (PDI) a zeta potenciálu (ZP) (viz kapitola 4.7), přičemž hodnota ZP byla použita jako ukazatel koloidní stability částic. Získané hodnoty byly následně porovnány mezi jednotlivými vzorky s cílem vyhodnotit vliv množství lipidové fáze a koncentrace enkapsulované DNA na fyzikálně-chemické vlastnosti systému.

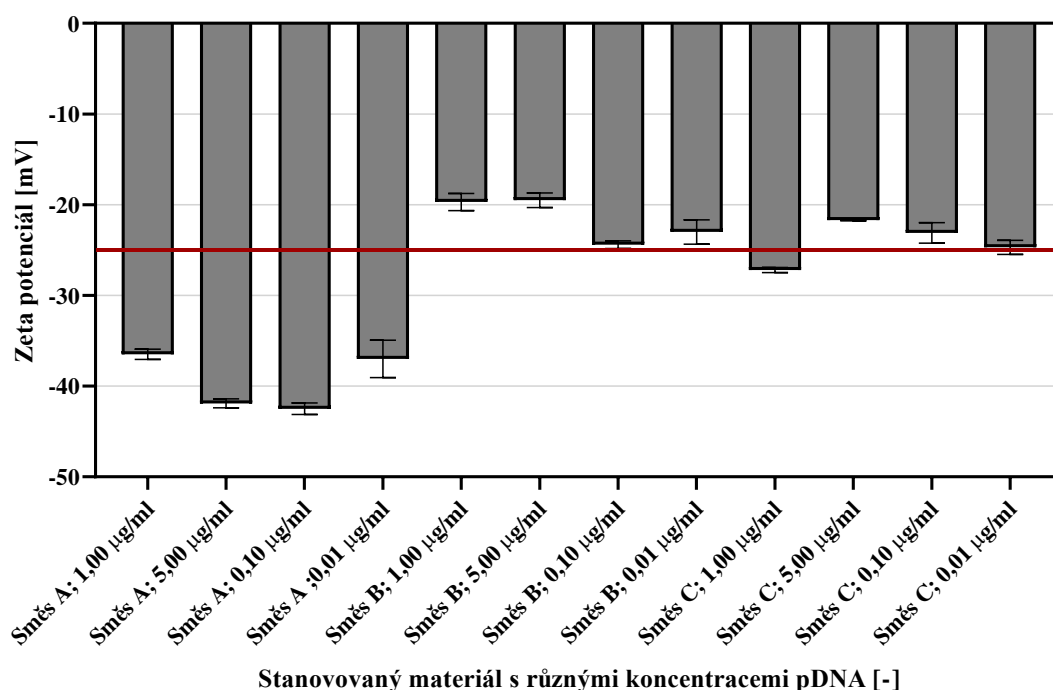
Bylo připraveno celkem 15 vzorků, které zahrnovaly jak referenční kontrolní vzorky bez přídavku plazmidové DNA, tak vzorky s různými koncentracemi plazmidové DNA a rozdílným složením lipidové směsi. Navážky lecitinu a cholesterolu v jednotlivých směsích byly zvoleny tak, aby odpovídaly hmotnostním kombinacím 18,0 mg:2,0 mg, 9,0 mg:1,0 mg a 4,5 mg:0,5 mg (lecitin:cholesterol), přičemž ve všech případech byl zachován molární poměr 9:1. Tyto varianty byly dále označeny jako směs A (18,0:2,0 mg), směs B (9,0:1,0 mg) a směs C (4,5:0,5 mg); jejich konkrétní složení je uvedeno v tabulce 2. Přehled připravených vzorků zahrnoval referenční kontrolní vzorky, tedy liposomy připravené ze Směsi A, Směsi B a Směsi C bez přídavku plazmidové DNA, a dále vzorky s enkapsulovanou plazmidovou DNA v koncentracích 1,00, 5,00, 0,10 a 0,01 µg/ml, připravené ze Směsi A, Směsi B a Směsi C.

Na základě výsledků uvedených v tabulce 4 bylo zjištěno, že vzorky připravené ze směsi A vykazovaly nejnižší hodnoty průměrné velikosti částic ($224,0 \pm 1,1$ až $250,7 \pm 2,5$ nm), nízké hodnoty PDI ($0,392 \pm 0,001$ až $0,434 \pm 0,012$) a výrazně záporné hodnoty zeta potenciálu ($-36,5 \pm 0,6$ až $-42,5 \pm 0,6$ mV), což naznačuje vyšší koloidní stabilitu těchto liposomálních systémů (viz Obrázek 10).

U vzorků připravených ze směsi B a směsi C byly naopak naměřeny vyšší hodnoty průměrné velikosti částic (až $370,9 \pm 30,1$ nm), vyšší hodnoty PDI (až $0,744 \pm 0,012$) a méně negativní hodnoty zeta potenciálu ($-19,5 \pm 0,8$ až $-27,2 \pm 0,3$ mV). Tyto výsledky poukazují na nižší koloidní stabilitu a vyšší heterogenitu velikostního rozložení částic [65].

Tabulka 4: Průměrné hodnoty velikosti částic, polydisperzního indexu (PDI) a zeta potenciálu (ZP) liposomů připravených ze Směsí A, B a C po enkapsulaci plazmidové DNA v různých koncentracích. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm směrodatná odchylka

Směs	Koncentrace pDNA ve vzorku [$\mu\text{g/ml}$]	Velikost [nm]	Polydisperzita [-]	Zeta potenciál [mV]
A (18,0:2,0)	1,00	$245,5 \pm 9,7$	$0,434 \pm 0,012$	$-36,5 \pm 0,6$
	5,00	$224,0 \pm 1,1$	$0,392 \pm 0,001$	$-41,9 \pm 0,5$
	0,10	$248,9 \pm 3,6$	$0,433 \pm 0,002$	$-42,5 \pm 0,6$
	0,01	$250,7 \pm 2,5$	$0,414 \pm 0,001$	$-37,0 \pm 2,1$
B (9,0:1,0)	1,00	$370,9 \pm 30,1$	$0,744 \pm 0,012$	$-19,7 \pm 0,9$
	5,00	$279,4 \pm 17,9$	$0,548 \pm 0,006$	$-19,5 \pm 0,8$
	0,10	$214,5 \pm 3,5$	$0,438 \pm 0,003$	$-24,4 \pm 0,4$
	0,01	$232,3 \pm 5,6$	$0,417 \pm 0,005$	$-23,0 \pm 1,3$
C (4,5:0,5)	1,00	$169,0 \pm 4,5$	$0,448 \pm 0,007$	$-27,2 \pm 0,3$
	5,00	$227,5 \pm 10,7$	$0,399 \pm 0,001$	$-21,7 \pm 0,7$
	0,10	$245,0 \pm 9,4$	$0,456 \pm 0,008$	$-23,1 \pm 1,1$
	0,01	$193,8 \pm 7,8$	$0,490 \pm 0,003$	$-24,7 \pm 0,8$



Obrázek 10: Zeta potenciál liposomálních částic připravených z lipidových směsí A (18,0 mg:2,0 mg), B (9,0 mg:1,0 mg) a C (4,5 mg:0,5 mg) při různých koncentracích enkapsulované plazmidové DNA (1,00; 5,00; 0,10 a 0,01 $\mu\text{g/ml}$). Osa X označuje konkrétní kombinaci lipidové směsi a koncentrace pDNA použité ve vzorku. Červená čára znázorňuje hodnotu -25 mV, která představuje hraniční mez pro elektrostatickou stabilitu koloidního systému – hodnoty pod touto hranicí jsou obecně považovány za stabilní.

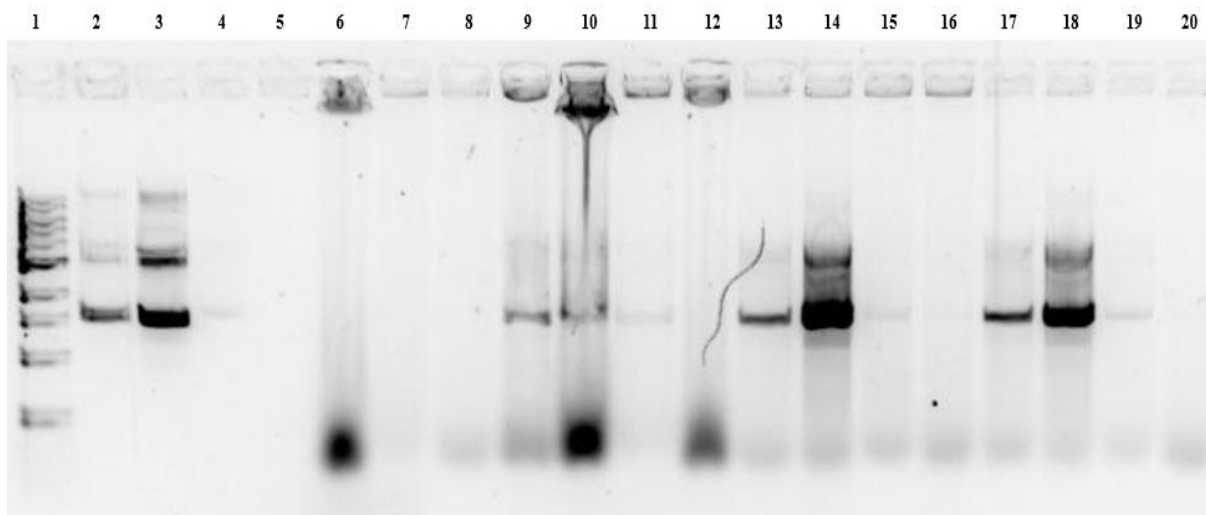
5.5 Stanovení enkapsulační účinnosti horizontální elektroforézou

Za účelem stanovení enkapsulační účinnosti byla provedena horizontální agarózová elektroforéza (viz kapitola 4.3), jejíž výsledky jsou uvedeny na obrázku 11. V rámci této fáze experimentu byly testovány různé varianty liposomálních vzorků připravených s navážkami lecitinu 18,0 mg, 9,0 mg a 4,5 mg (směsi A, B a C), přičemž ve všech případech byl zachován molární poměr lecitin:cholesterol 9:1. Současně byly pro každou variantu testovány čtyři koncentrace plazmidové DNA: 1,00; 5,00; 0,10 a 0,01 $\mu\text{g/ml}$. Na gel byly naneseny vzorky samotné pDNA, kontrolní vzorky liposomálních částic bez pDNA a vzorky obsahující enkapsulovanou pDNA. Ve všech případech byl zachován konstantní objem naneseného vzorku, aby bylo možné porovnávat intenzitu elektroforetických pruhů. U některých vzorků byla zaznamenána retence materiálu v jamkách gelu, která byla přičítána přítomnosti neenkapsulovaných lipidových složek, zejména lecitinu a cholesterolu, jež se vyskytovaly jak ve vzorcích s pDNA, tak i v kontrolních vzorcích bez pDNA.

Enkapsulační účinnost byla úspěšně stanovena u vzorků připravených s navážkou lecitinu 18,0 mg a cholesterolu 2,0 mg při zachovaném molárním poměru lecitin:cholesterol 9:1. U vzorku obsahujícího liposomy a pDNA v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ činila enkapsulační účinnost $8,7 \% \pm 0,35 \%$. U vzorku s koncentrací pDNA 5 $\mu\text{g/ml}$ byla stanovena enkapsulační účinnost $34,6 \% \pm 1,38 \%$. U ostatních vzorků nebyly získány definovatelné hodnoty z důvodu vysokého pozadí způsobeného přítomností lipidových složek [65, 86].

Výsledky byly porovnány s dostupnou literaturou – např. se studií *Bailey a Sullivan et al. (2000)* [88], v níž byly plazmidové DNA enkapsulovány do liposomů pomocí sonifikace. Ve zmíněné práci byly připraveny stabilní liposomy o velikosti přibližně 150–200 nm se záporným zeta potenciálem okolo -40 mV a s vysokou enkapsulační účinností dosahující až 80 %. V porovnání s touto studií byly v prezentovaném experimentu získány liposomy s obdobnými hodnotami ZP, avšak vyššími velikostmi částic a nižší enkapsulační účinností, což může být způsobeno rozdílnými poměry lipid/DNA, odlišnými parametry sonifikace či složením lipidových složek.

Na základě těchto výsledků byla pro další enkapsulační experimenty s oligonukleotidy zvolena lipidová směs připravená s navážkou lecitinu 18,0 mg a cholesterolu 2,0 mg při zachovaném molárním poměru lecitin:cholesterol 9:1 a koncentrací oligonukleotidů 5 $\mu\text{g/ml}$, která se v předchozích experimentech ukázala jako nejvhodnější z hlediska stability systému a měřitelnosti enkapsulační účinnosti.



Obrázek 11: Horizontální agarózová elektroforéza vzorků pDNA a liposomů s různými poměry lecitin:cholesterol (18:2; 9:1; 4,5:0,5) a koncentracemi pDNA (1,00; 5,00; 0,10; 0,01 µg/ml). Dráhy 2–5: samotná pDNA (1,00; 5,00; 0,10; 0,01 µg/ml); dráhy 6–8: prázdné liposomy (18:2; 9:1; 4,5:0,5); dráhy 9–12: liposomy 18:2 s pDNA (1,00; 5,00; 0,10; 0,01 µg/ml); dráhy 13–16: liposomy 9:1 s pDNA (1,00; 5,00; 0,10; 0,01 µg/ml); dráhy 17–20: liposomy 4,5:0,5 s pDNA (1,00; 5,00; 0,10; 0,01 µg/ml). Intenzita pruhů odpovídá množství volné pDNA v supernatantu po centrifugaci.

5.6 Analýza stability a velikosti částic oligonukleotidů

Nanočástice se syntetickými oligonukleotidy byly připraveny podle postupu popsánoho v kapitole 4.6.2. Na základě optimalizačních experimentů s plazmidovou DNA (viz kapitola 5.5) byla pro další práci zvolena lipidová směs připravená s navázkou lecitinu 18,0 mg a cholesterolu 2,0 mg (označovaná jako směs A), která vykazovala nejvyšší enkapsulační účinnost. Pro enkapsulaci syntetických oligonukleotidů byla použita koncentrace 5 µg/ml, a to v souladu s výsledky optimalizace diskutovanými v kapitole 5.5. Následně byla provedena analýza velikosti a stability těchto částic metodou dynamického rozptylu světla (DLS), jak je uvedeno v kapitole 4.7. Výsledky měření jsou shrnuty v tabulce 5.

Z výsledků vyplývá, že průměrná velikost částic se pohybovala v rozmezí $188,6 \pm 2,2$ nm až $209,2 \pm 1,3$ nm. Největší průměrná velikost byla zaznamenána u vzorku DNA-RAN ($209,2 \pm 1,3$ nm), zatímco nejmenší u vzorku DNA-MS3 ($188,6 \pm 2,2$ nm). Vzorky s RNA vykazovaly střední hodnoty ($189,0 \pm 2,2$ nm a $198,3 \pm 2,2$ nm), přičemž rozdíly mezi nimi byly minimální. Polydisperzní index (PDI), indikující homogenitu velikosti částic v suspenzi, byl u všech vzorků pod hodnotou 0,400 (0,355–0,368), což poukazuje na dobrou uniformitu a potenciální stabilitu připravených nanočástic [89]. Tyto výsledky jsou v souladu s literaturou, která uvádí, že pro efektivní genové doručování jsou optimální částice o velikosti pod 200 nm s nízkou hodnotou PDI. Například *Danaei et al. (2018)* zdůrazňují význam těchto parametrů při návrhu lipidických nanonosičů pro farmaceutické aplikace [89]. Podobně *Bailey a Sullivan et al. (2000)* uvádějí, že částice o velikosti kolem 200 nm s nízkým PDI jsou vhodné pro doručování plazmidové DNA [88].

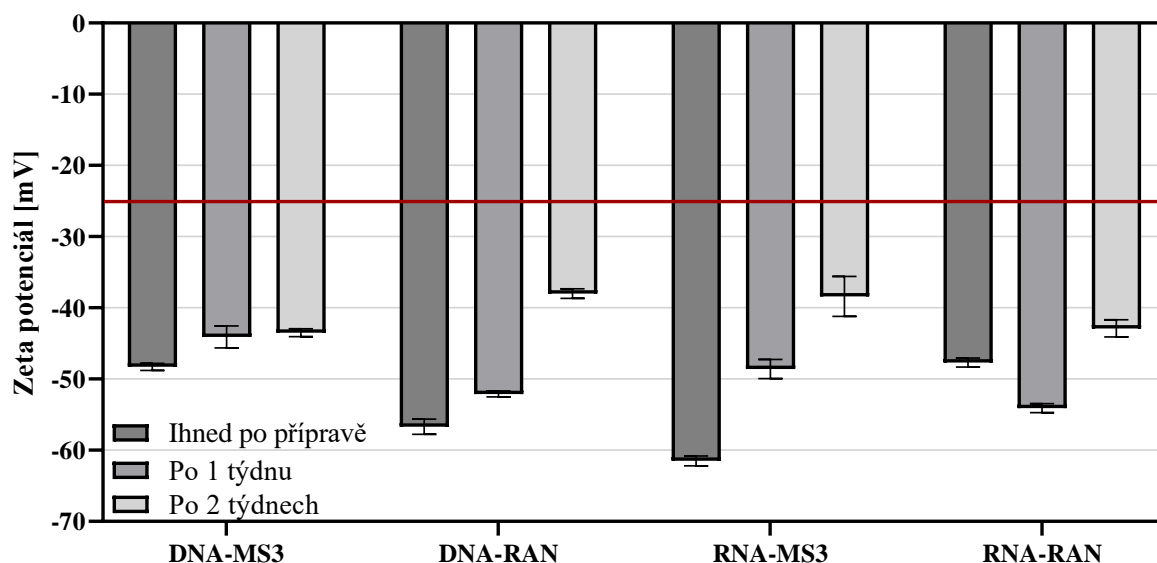
Tabulka 5: Výsledky měření velikosti nanočástic s enkapsulovanými oligonukleotidy (DNA a RNA) v liposomech, stanovené metodou dynamického rozptylu světla (DLS). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří nezávislých měření (triplikátů) ± směrodatná odchylka.

Označení vzorku	Velikost částic [nm]	Polydisperzita [-]
DNA-MS3	188,6 ± 2,2	0,366 ± 0,026
DNA-RAN	209,2 ± 1,3	0,359 ± 0,012
RNA-MS3	189,0 ± 2,2	0,355 ± 0,006
RNA-RAN	198,3 ± 2,2	0,368 ± 0,023

Stabilita liposomálních nanočástic enkapsulujících různé typy nukleových kyselin byla hodnocena na základě změn zeta potenciálu v čase. Měření byla prováděna v PBS pufru při 37 °C a za současné mechanické zátěže simulované pomocí třepačky (110–130 rpm), které bylo zvoleno jako modelové *in vitro* prostředí pro hodnocení stability nanočástic. Tímto způsobem byly napodobeny fyziologické podmínky včetně dynamického prostředí organismu. Krátkodobá stabilita byla hodnocena bezprostředně po přípravě vzorku, zatímco dlouhodobá stabilita byla sledována po jednom a dvou týdnech inkubace. Výsledky jsou uvedeny na obrázku 12.

Pro porovnání byly výsledky stability nanočástic s enkapsulovanými syntetickými oligonukleotidy doplněny o hodnotu zeta potenciálu získanou u částic s plazmidovou DNA (pDNA) připravených za identických podmínek – tedy se směsí A a koncentrací 5 µg/ml pDNA, jak je uvedeno v kapitole 5.4. Tato hodnota činila $-41,9 \pm 0,5$ mV. Získané výsledky ukázaly, že částice s enkapsulovanými syntetickými oligonukleotidy měly bezprostředně po přípravě výrazně nižší (tedy stabilnější) hodnoty zeta potenciálu než částice s pDNA – například vzorek RNA-MS3 dosáhl hodnoty až $-61,5 \pm 0,7$ mV. Tento rozdíl lze vysvětlit rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi obou typů nukleových kyselin. I když plazmidová DNA obsahuje více záporně nabitých fosfátových skupin díky své délce kolem 5 000 až 10 000 párů bází (bp), její prostorové uspořádání a větší velikost mohou ovlivňovat distribuci náboje na povrchu liposomálního systému [88]. Syntetické oligonukleotidy o délce 17 nukleotidů, použité v této práci, mohou být vzhledem ke své menší velikosti efektivněji zabudovány do liposomální struktury, což může vést k vyššímu výslednému zápornému povrchovému náboji a tím i vyšší elektrostatické stabilitě systému [88, 89].

Z naměřených hodnot vyplývá, že hodnota zeta potenciálu u všech vzorků v průběhu inkubace klesala. Tento pokles může být způsoben degradací lipidového obalu a postupným uvolňováním enkapsulovaného materiálu vlivem zvýšené teploty a mechanického stresu [89, 90]. Nejvyšší elektrostatická stabilita byla pozorována u vzorku RNA-MS3 ihned po přípravě ($-61,5 \pm 0,7$ mV). Po dvou týdnech však došlo ke zřetelnému poklesu (např. RNA-MS3: $-38,4 \pm 0,8$ mV), což potvrzuje částečnou destabilizaci systému. I přesto zůstávaly všechny vzorky v průběhu celého experimentu pod hranicí -25 mV, což je obecně považováno za mez elektrostatické stability koloidních systémů [65]. Hodnoty zeta potenciálu vyšší než ± 25 mV zpravidla indikují dobrou elektrostatickou stabilitu [89], protože silné odpuzivé síly mezi nabitými částicemi zabraňují jejich agregaci. Na základě těchto kritérií lze tedy konstatovat, že připravené liposomální nanočástice si i přes částečný pokles zeta potenciálu zachovaly dostatečnou stabilitu během celé sledované doby.



Obrázek 12: Změny zeta potenciálu liposomálních částic s různými oligonukleotidy (DNA, RNA) v čase. Stabilita byla sledována ihned po přípravě, po 1 týdnu a po 2 týdnech inkubace při 37 °C.

5.7 Enkapsulační účinnost oligonukleotidů

Na předchozí kapitole hodnotící velikost a stabilitu částic metodou DLS (viz kapitola 5.6) navazuje analýza enkapsulační účinnosti syntetických oligonukleotidů, která byla provedena pomocí vertikální polyakrylamidové gelové elektroforézy (PAGE) podle kapitoly 4.4. Tento přístup umožňuje detailní separaci krátkých nukleových kyselin a zhodnocení množství volného oligonukleotidu přítomného v supernatantu po centrifugaci.

Vzorky testované v této části zahrnovaly oligonukleotidy RNA-RAN, RNA-MS3, DNA-RAN a DNA-MS3, přičemž byly na gel nanášeny jak kontrolní čisté vzorky obsahující nukleové kyseliny před enkapsulací, tak vzorky po enkapsulaci. Elektroforetické pruhy získané po PAGE byly podrobeny denzitometrické analýze v softwaru ImageJ.

Výsledky ukázaly vysokou enkapsulační účinnost pro všechny testované oligonukleotidy, přičemž většina materiálu zůstala v peletu po centrifugaci (tedy byla enkapsulována do liposomálních částic). U vzorku DNA-MS3 nebyly získány definovatelné hodnoty kvůli nízké intenzitě signálu. Konkrétní hodnoty jsou ukázány v tabulce 6.

Tabulka 6: Porovnání enkapsulační účinnosti syntetických oligonukleotidů (RNA, DNA) a plasmidové DNA (pDNA) v liposomálních částicích připravených se směsí A (lecitinu 18 mg a cholesterolu 2 mg). Vzorky RNA/DNA byly enkapsulovány při koncentraci 5 µg/ml. Hodnoty byly vypočteny pomocí denzitometrické analýzy elektroforetických pruhů v programu ImageJ.

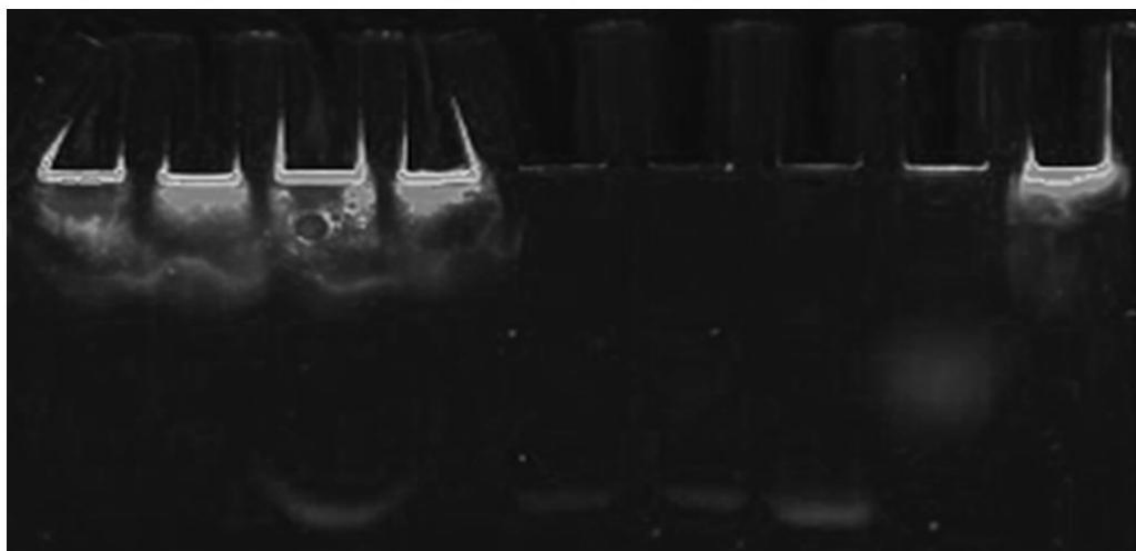
Vzorový typ	Enkapsulační účinnost [%]
RNA-RAN (5 µg/ml)	98,44 ± 3,94
RNA-MS3 (5 µg/ml)	95,38 ± 3,82
DNA-RAN (5 µg/ml)	98,16 ± 3,93
DNA-MS3 (5 µg/ml)	nedefinováno
pDNA (1 µg/ml)	8,70 ± 0,35
pDNA (5 µg/ml)	34,60 ± 1,38

Obrázek 13 elektroforetického gelu jasně ukazuje výrazné snížení intenzity pruhů u enkapsulovaných vzorků ve srovnání s odpovídajícími vzorky nukleových kyselin před enkapsulací, což potvrzuje úspěšnou enkapsulaci.

Při srovnání s výsledky získanými pro plazmidovou DNA (pDNA) bylo z elektroforetických měření stanoveno, že enkapsulační účinnost činila $8,7 \% \pm 0,35 \%$ při koncentraci $1 \mu\text{g/ml}$ a $34,6 \% \pm 1,38 \%$ při koncentraci $5 \mu\text{g/ml}$. Tyto výsledky naznačují, že i dlouhé molekuly pDNA mohou být účinně enkapsulovány, zejména při nižší koncentraci, a potvrzují, že volba vhodného lipidového systému a optimalizace poměru lipid/DNA hraje klíčovou roli. Podobné trendy byly popsány i v literatuře – např. *Bailey a Sullivan (2000)* uvádějí enkapsulační účinnost pDNA v rozsahu 60–80 % při použití malých neutrálních liposomů připravených metodou s využitím ethanolu a vápenatých iontů [88].

V porovnání s oligonukleotidy, jejichž enkapsulační účinnost ve většině případů přesahovala 95 %, jsou hodnoty u pDNA výrazně nižší. Tento rozdíl lze přičíst větší velikosti, vyšší molekulové hmotnosti a složitější terciární struktuře pDNA, která může snižovat účinnost jejího zabudování do vnitřního objemu liposomů. *Danaei et al. (2018)* dále uvádějí, že velikost nukleové kyseliny je jedním z klíčových faktorů ovlivňujících efektivitu enkapsulace, přičemž kratší řetězce jako oligonukleotidy mají vyšší afinitu k lipidovým membránám a lepší difuzní vlastnosti [89].

Vzorky	RNA-RAN	RNA-MS3	DNA-RAN	DNA-MS3	RNA-RAN	RNA-MS3	DNA-RAN	DNA-MS3	18:2 směs bez nukleových kyselin
	po	po	po	po	bez	bez	bez	bez	
	enkapsulaci	enkapsulaci	enkapsulaci	enkapsulaci	enkapsulace	enkapsulace	enkapsulace	enkapsulace	



Obrázek 13: Výsledky vertikální polyakrylamidové elektroforézy vzorků oligonukleotidů (RNA-RAN, RNA-MS3, DNA-RAN, DNA-MS3) ve formě čistých (bez přítomnosti lipidů, před enkapsulací) a enkapsulovaných vzorků (v liposomálních částicích, po enkapsulaci). Vzorky označené jako „bez enkapsulace“ obsahují pouze volné oligonukleotidy bez přítomnosti lipidů, zatímco vzorky „po enkapsulaci“ představují supernatanty získané po centrifugaci liposomálních částic s enkapsulovanými oligonukleotidy. Intenzita elektroforetických pruhů byla analyzována pomocí softwaru ImageJ za účelem stanovení podílu volných oligonukleotidů v supernatantu. Snížená intenzita pruhů u enkapsulovaných vzorků dokládá vysokou enkapsulační účinnost.

6 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byla optimalizována metoda enkapsulace nukleových kyselin do liposomálních částic pomocí ultrazvukové sonifikace. Cílem bylo posoudit vliv délky a typu nukleových kyselin na jejich enkapsulační účinnost a stabilitu připravených nanočástic.

Nejprve byla optimalizována směs lipidových složek, přičemž nejvhodnějších výsledků bylo dosaženo u směsi připravené s navázkou lecitinu 18,0 mg a cholesterolu 2,0 mg při zachovaném molárním poměru lecitin:cholesterol 9:1. Tyto vzorky vykazovaly průměrnou velikost částic $244,2 \pm 4,1$ nm, polydisperzní index (PDI) v rozmezí 0,355–0,368 a zeta potenciál -48,3 až -61,5 mV, což jsou hodnoty obecně považované za příznivé pro stabilní a homogenní nanonosiče vhodné pro genové doručování [63, 65].

Na základě výsledků gelové elektroforézy a následné denzitometrické analýzy byla stanovena enkapsulační účinnost, na jejímž základě byly pro další experimenty zvoleny optimalizované podmínky přípravy liposomálních nanočástic, konkrétně koncentrace oligonukleotidů 5 $\mu\text{g/ml}$ a lipidová směs s navázkou lecitinu 18,0 mg a cholesterolu 2,0 mg při zachovaném molárním poměru lecitin:cholesterol 9:1. Tyto oligonukleotidy zahrnovaly jak sekvence s potenciálem tvorby nekanonických G-kvadruplexových struktur, tak i sekvence bez tvorby sekundárních struktur. Pro plazmidovou DNA (pDNA) bylo stanoveno, že při koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ činila enkapsulační účinnost $8,7 \% \pm 0,35 \%$, zatímco při 5 $\mu\text{g/ml}$ dosahovala $34,6 \% \pm 1,38 \%$. Vysoká enkapsulační účinnost byla překvapivě zjištěna i u syntetických oligonukleotidů (RNA-RAN, RNA-MS3, DNA-RAN), kde hodnoty přesahovaly $95,38 \% \pm 3,82 \%$, a v některých případech dosahovaly až $98,44 \% \pm 3,94 \%$. U některých vzorků, včetně DNA-MS3, nebylo možné enkapsulační účinnost spolehlivě stanovit, pravděpodobně kvůli velmi nízkému množství volné frakce v supernatantu, které neumožnilo detekci elektroforézou. Tyto výsledky potvrzují, že i krátké molekuly RNA a DNA lze efektivně enkapsulovat do liposomálních nosičů.

Velikost a stabilita částic byla sledována metodou dynamického rozptylu světla (DLS) a měřením zeta potenciálu, přičemž byla hodnocena krátkodobá i dlouhodobá stabilita. U optimalizovaných vzorků byla zaznamenána průměrná velikost částic $244,2 \pm 4,1$ nm a zeta potenciál v rozmezí -48,3 až -61,5 mV. Po dvoutýdenní inkubaci při 37 °C a mírném mechanickém zatížení zůstávaly hodnoty zeta potenciálu všech vzorků pod -25 mV, což dokládá zachování elektrostatické stability systému. Tyto podmínky inkubace (teplota 37 °C a mechanická stimulace na třepačce) byly zvoleny jako simulace fyziologického prostředí člověka. Srovnání jednotlivých vzorků ukázalo, že částice obsahující syntetické oligonukleotidy (RNA-RAN, RNA-MS3, DNA-RAN, DNA-MS3) vykazovaly po přípravě výrazně vyšší (více záporné) hodnoty zeta potenciálu než referenční vzorek s plazmidovou DNA (pDNA: $-41,9 \pm 0,5$ mV), což může souviset s efektivnější distribucí náboje u kratších molekul. Nejvyšší hodnoty stability byly zaznamenány u vzorků RNA-MS3 a RNA-RAN, jejichž zeta potenciály bezprostředně po přípravě dosahovaly až $-61,5 \pm 0,7$ mV, resp. $-54,1 \pm 1,0$ mV po týdnu. Ve srovnání se vzorky obsahující DNA oligonukleotidy byla stabilita RNA vzorků vyšší i po dvoutýdenní inkubaci, což může souviset s rozdíly v délce, sekvenci a konformaci jednotlivých řetězců. Tato pozorování potvrzují, že délka a struktura nukleové kyseliny významně ovlivňují elektrostatickou stabilitu systému [88, 89].

Tato práce tak přispívá k pochopení vztahu mezi typem nukleové kyseliny a efektivitou její enkapsulace a poskytuje praktické poznatky využitelné pro další výzkum a vývoj liposomálních systémů pro cílené doručování genetického materiálu v biomedicínských aplikacích.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] NSAIRAT, Hamdi, Dima KHATER, Usama SAYED, Fadwa ODEH, Abeer AL BAWAB a Walhan ALSHAER. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon* [online]. 2022, **8**(5), e09394. ISSN 2405-8440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2022.e09394
- [2] BANGHAM, A. D. a R. W. HORNE. NEGATIVE STAINING OF PHOSPHOLIPIDS AND THEIR STRUCTURAL MODIFICATION BY SURFACE-ACTIVE AGENTS AS OBSERVED IN THE ELECTRON MICROSCOPE. *Journal of Molecular Biology* [online]. 1964, **8**, 660–668. ISSN 0022-2836. Dostupné z: doi:10.1016/s0022-2836(64)80115-7
- [3] ELDAR-BOOCK, Anat, Dina POLYAK, Anna SCOMPARIN a Ronit SATCHI-FAINARO. Nano-sized polymers and liposomes designed to deliver combination therapy for cancer. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2013, **24**(4), 682–689. ISSN 1879-0429. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2013.04.014
- [4] WANG, Yu-Shiuan, Monika KUMARI, Guan-Hong CHEN, Ming-Hsiang HONG, Joyce Pei-Yi YUAN, Jui-Ling TSAI a Han-Chung WU. mRNA-based vaccines and therapeutics: an in-depth survey of current and upcoming clinical applications. *Journal of Biomedical Science* [online]. 2023, **30**(1), 84. ISSN 1423-0127. Dostupné z: doi:10.1186/s12929-023-00977-5
- [5] RICCARDI, Claudia, Federica D'ARIA, Filomena Anna DIGILIO, Maria Rosaria CARILLO, Jussara AMATO, Dominga FASANO, Laura DE ROSA, Simona PALADINO, Mariarosa Anna Beatrice MELONE, Daniela MONTESARCHIO a Concetta GIANCOLA. Fighting the Huntington's Disease with a G-Quadruplex-Forming Aptamer Specifically Binding to Mutant Huntingtin Protein: Biophysical Characterization, In Vitro and In Vivo Studies. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, **23**(9), 4804. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23094804
- [6] NEČAS, Oldřich. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3. přepracované vydání. Jinočany: H + H, 2000. ISBN 80-86022-46-3.
- [7] BLACKBURN, Michael, Martin EGLI a Jonathan WATTS. *Nucleic acids in chemistry and biology*. 4th edition. London: Royal Society of Chemistry, 2022. ISBN 978-1-78801-904-0.
- [8] BERG, Jeremy, John TYMOCZKO a Lubert STRYER. *Biochemistry* [online]. 8. vydání. New York: W.H. Freeman and Company, 2015. ISBN 978-1-4641-2610-9. Dostupné z: <https://biokamikazi.wordpress.com/wp-content/uploads/2013/10/biochemistry-stryer-5th-ed.pdf>
- [9] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie. [Kniha první]*. 2., opravené vydání, dotisk. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-0600-1.
- [10] BRIERLEY, Ian, Simon PENNELL a Robert J. C. GILBERT. Viral RNA pseudoknots: versatile motifs in gene expression and replication. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2007, **5**(8), 598–610. ISSN 1740-1534. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro1704

- [11] *Biochemie - vzdělávací portál, NA* [online]. [vid. 2025-02-16]. Dostupné z: <http://www.studiumbiochemie.cz/na.html>
- [12] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [13] ROSYPAL, Stanislav, Jiří DOŠKAŘ, Karel PWETRZIK a Vladislava RŮŽIČKOVÁ. *Úvod do molekulární biologie*. Brno: Stanislav Rosypal vl. n, 2002. ISBN 80-902562-4-4.
- [14] LEE, Juyong, Yang-Gyun KIM, Kyeong Kyu KIM a Chaok SEOK. Transition between B-DNA and Z-DNA: free energy landscape for the B-Z junction propagation. *The Journal of Physical Chemistry. B* [online]. 2010, **114**(30), 9872–9881. ISSN 1520-5207. Dostupné z: [doi:10.1021/jp103419t](https://doi.org/10.1021/jp103419t)
- [15] BURGE, Sarah, Gary N. PARKINSON, Pascale HAZEL, Alan K. TODD a Stephen NEIDLE. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Research* [online]. 2006, **34**(19), 5402–5415. ISSN 1362-4962. Dostupné z: [doi:10.1093/nar/gkl655](https://doi.org/10.1093/nar/gkl655)
- [16] LIMONGELLI, Vittorio, Stefano DE TITO, Linda CEROFOLINI, Marco FRAGAI, Bruno PAGANO, Roberta TROTTA, Sandro COSCONATI, Luciana MARINELLI, Ettore NOVELLINO, Ivano BERTINI, Antonio RANDAZZO, Claudio LUCHINAT a Michele PARRINELLO. The G-triplex DNA. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* [online]. 2013, **52**(8), 2269–2273. ISSN 1521-3773. Dostupné z: [doi:10.1002/anie.201206522](https://doi.org/10.1002/anie.201206522)
- [17] CHAO, C. C., W. C. YAM a S. LIN-CHAO. Coordinated induction of two unrelated glucose-regulated protein genes by a calcium ionophore: human BiP/GRP78 and GAPDH. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 1990, **171**(1), 431–438. ISSN 0006-291X. Dostupné z: [doi:10.1016/0006-291x\(90\)91411-k](https://doi.org/10.1016/0006-291x(90)91411-k)
- [18] DILÃO, Rui. The regulation of gene expression in eukaryotes: bistability and oscillations in repressilator models. *Journal of Theoretical Biology* [online]. 2014, **340**, 199–208. ISSN 1095-8541. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jtbi.2013.09.010](https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2013.09.010)
- [19] BANNISTER, Andrew J. a Tony KOUZARIDES. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research* [online]. 2011, **21**(3), 381–395. ISSN 1748-7838. Dostupné z: [doi:10.1038/cr.2011.22](https://doi.org/10.1038/cr.2011.22)
- [20] CRAMER, Patrick. Organization and regulation of gene transcription. *Nature* [online]. 2019, **573**(7772), 45–54. ISSN 1476-4687. Dostupné z: [doi:10.1038/s41586-019-1517-4](https://doi.org/10.1038/s41586-019-1517-4)
- [21] SEIMIYA, Hiroyuki, Kazuo NAGASAWA a Kazuo SHIN-YA. Chemical targeting of G-quadruplexes in telomeres and beyond for molecular cancer therapeutics. *The Journal of Antibiotics* [online]. 2021, **74**(10), 617–628. ISSN 1881-1469. Dostupné z: [doi:10.1038/s41429-021-00454-x](https://doi.org/10.1038/s41429-021-00454-x)
- [22] AUBERT, Geraldine a Peter M. LANSDORP. Telomeres and aging. *Physiological Reviews* [online]. 2008, **88**(2), 557–579. ISSN 0031-9333. Dostupné z: [doi:10.1152/physrev.00026.2007](https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2007)

- [23] ATDBIO. ATDBio - Nucleic Acids Book - Chapter 1: Nucleic acid structure. *ATDBio - Nucleic Acids Book* [online]. [vid. 2025-02-16]. Dostupné z: <https://atdbio.com/nucleic-acids-book/Nucleic-acid-structure>
- [24] HOWE, C. J. Plastid origin of an extrachromosomal DNA molecule from Plasmodium, the causative agent of malaria. *Journal of Theoretical Biology* [online]. 1992, **158**(2), 199–205. ISSN 0022-5193. Dostupné z: doi:10.1016/s0022-5193(05)80718-0
- [25] KLABAN, Vladimír. *Ekologie mikroorganismů: ilustrovaný lexikon biologie, ekologie a patogenity mikroorganismů*. Praha: Galén, 2011. ISBN 978-80-7262-770-7.
- [26] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3., opravené a doplněné, v Nakladatelství Academia 1. vydání (jako opravený a doplněný reprint 2. vydání). Praha: Academia, 2008.
- [27] GHANEM, Ashraf, Robert HEALEY a Frady G. ADLY. Current trends in separation of plasmid DNA vaccines: a review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2013, **760**, 1–15. ISSN 1873-4324. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2012.11.006
- [28] CHRISTIANSON, T. W. a D. A. CLAYTON. In vitro transcription of human mitochondrial DNA: accurate termination requires a region of DNA sequence that can function bidirectionally. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 1986, **83**(17), 6277–6281. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.83.17.6277
- [29] SUISSA, Sarit, Zhibo WANG, Jason POOLE, Sharine WITTKOPP, Jeanette FEDER, Timothy E. SHUTT, Douglas C. WALLACE, Gerald S. SHADEL a Dan MISHMAR. Ancient mtDNA genetic variants modulate mtDNA transcription and replication. *PLoS genetics* [online]. 2009, **5**(5), e1000474. ISSN 1553-7404. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.1000474
- [30] ZHANG, Yi, Yong-Lan CUI, Xiao-Lei ZHANG, Qing-Bo YU, Xi WANG, Xin-Bo YUAN, Xue-Mei QIN, Xiao-Fang HE, Chao HUANG a Zhong-Nan YANG. A nuclear-encoded protein, mTERF6, mediates transcription termination of rpoA polycistron for plastid-encoded RNA polymerase-dependent chloroplast gene expression and chloroplast development. *Scientific Reports* [online]. 2018, **8**(1), 11929. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-30166-6
- [31] ROXO, Carolina, Weronika KOTKOWIAK a Anna PASTERNAK. G-Quadruplex-Forming Aptamers—Characteristics, Applications, and Perspectives. *Molecules* [online]. 2019, **24**(20), 3781. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24203781
- [32] BERNER, Andreas, Rabindra Nath DAS, Naresh BHUMA, Justyna GOLEBIEWSKA, Alva ABRAHAMSSON, Måns ANDRÉASSON, Namrata CHAUDHARI, Mara DOIMO, Partha Pratim BOSE, Karam CHAND, Roger STRÖMBERG, Sjoerd WANROOIJ a Erik CHORELL. G4-Ligand-Conjugated Oligonucleotides Mediate Selective Binding and Stabilization of Individual G4 DNA Structures. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2024, **146**(10), 6926–6935. ISSN 1520-5126. Dostupné z: doi:10.1021/jacs.3c14408
- [33] CHEN, Xiuhui, Lingegowda S. MANGALA, Cristian RODRIGUEZ-AGUAYO, Xianchao KONG, Gabriel LOPEZ-BERESTEIN a Anil K. SOOD. RNA interference-

- based therapy and its delivery systems. *Cancer Metastasis Reviews* [online]. 2018, **37**(1), 107–124. ISSN 1573-7233. Dostupné z: doi:10.1007/s10555-017-9717-6
- [34] COSTA, Fabrício F. Non-coding RNAs: lost in translation? *Gene* [online]. 2007, **386**(1–2), 1–10. ISSN 0378-1119. Dostupné z: doi:10.1016/j.gene.2006.09.028
- [35] IQBAL, Zoya, Khurram REHMAN, Ayesha MAHMOOD, Maryam SHABBIR, Yujie LIANG, Li DUAN a Hui ZENG. Exosome for mRNA delivery: strategies and therapeutic applications. *Journal of Nanobiotechnology* [online]. 2024, **22**(1), 395. ISSN 1477-3155. Dostupné z: doi:10.1186/s12951-024-02634-x
- [36] PLATELLA, Chiara, Claudia RICCARDI, Daniela MONTESARCHIO, Giovanni N. ROVIELLO a Domenica MUSUMECI. G-quadruplex-based aptamers against protein targets in therapy and diagnostics. *Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects* [online]. 2017, **1861**(5 Pt B), 1429–1447. ISSN 0304-4165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2016.11.027
- [37] RICCARDI, Claudia, Federica D'ARIA, Dominga FASANO, Filomena Anna DIGILIO, Maria Rosaria CARILLO, Jussara AMATO, Laura DE ROSA, Simona PALADINO, Mariarosa Anna Beatrice MELONE, Daniela MONTESARCHIO a Concetta GIANCOLA. Truncated Analogues of a G-Quadruplex-Forming Aptamer Targeting Mutant Huntingtin: Shorter Is Better! *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, **23**(20), 12412. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms232012412
- [38] WWW.BENES-MICHL.CZ, Beneš & Michl. *Lipozomální léčivé formy | Remedia* [online]. [vid. 2025-02-16]. Dostupné z: <https://www.remédia.cz/rubriky/klinicka-farmakologie-a-farmacie/lipozomalni-lekove-formy-1030/>
- [39] YOKOYAMA, Shoko, Akiko INAGAKI, Tomohiro IMURA, Takahiro OHKUBO, Nobuyuki TSUBAKI, Hideki SAKAI a Masahiko ABE. Membrane properties of cationic liposomes composed of dipalmitoylphosphatidylcholine and dipalmitoyldimethylammonium bromide. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* [online]. 2005, **44**(4), 204–210. ISSN 0927-7765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2005.01.005
- [40] SENTJURC, M., K. VRHOVNIK a J. KRISTL. Liposomes as a topical delivery system: the role of size on transport studied by the EPR imaging method. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* [online]. 1999, **59**(1), 87–97. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/s0168-3659(98)00181-3
- [41] HOUGEIR, Firas G. a Leon KIRCIK. A review of delivery systems in cosmetics. *Dermatologic Therapy* [online]. 2012, **25**(3), 234–237. ISSN 1529-8019. Dostupné z: doi:10.1111/j.1529-8019.2012.01501.x
- [42] FOND, G., A. MACGREGOR a S. MIOT. Nanopsychiatry--the potential role of nanotechnologies in the future of psychiatry: a systematic review. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* [online]. 2013, **23**(9), 1067–1071. ISSN 1873-7862. Dostupné z: doi:10.1016/j.euroneuro.2012.10.016
- [43] EMAMI, Shiva, Sodeif AZADMARD-DAMIRCHI, Seyed Hadi PEIGHAMBARDoust, Hadi VALIZADEH a Javad HESARI. Liposomes as carrier vehicles for functional compounds in food sector. *Journal of Experimental Nanoscience*

[online]. 2016, **11**(9), 737–759. ISSN 1745-8080. Dostupné z: doi:10.1080/17458080.2016.1148273

- [44] LASIC, Danilo. *Liposomes in Gene Delivery*. 1st Edition. B.m.: CRC Press, 1997. ISBN 978-0-13-874880-7.
- [45] SIMÕES, S., V. SLEPUSHKIN, R. GASPAR, M. C. DE LIMA a N. DÜZGÜNEŞ. Gene delivery by negatively charged ternary complexes of DNA, cationic liposomes and transferrin or fusigenic peptides. *Gene Therapy* [online]. 1998, **5**(7), 955–964. ISSN 0969-7128. Dostupné z: doi:10.1038/sj.gt.3300674
- [46] MILLER, Andrew D. Cationic Liposomes for Gene Therapy. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 1998, **37**(13–14), 1768–1785. ISSN 1521-3773. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1521-3773(19980803)37:13/14<1768::AID-ANIE1768>3.0.CO;2-4
- [47] DAEMEN, T., M. VELINOVA, J. REGTS, M. DE JAGER, R. KALICHARAN, J. DONGA, J. J. VAN DER WANT a G. L. SCHERPHOF. Different intrahepatic distribution of phosphatidylglycerol and phosphatidylserine liposomes in the rat. *Hepatology (Baltimore, Md.)* [online]. 1997, **26**(2), 416–423. ISSN 0270-9139. Dostupné z: doi:10.1002/hep.510260223
- [48] AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN, Sang Woo JOO, Nosratollah ZARGHAMI, Younes HANIFEHPOUR, Mohammad SAMIEI, Mohammad KOUHI a Kazem NEJATI-KOSHKI. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2013, **8**(1), 102. ISSN 1931-7573. Dostupné z: doi:10.1186/1556-276X-8-102
- [49] BATZRI, S. a E. D. KORN. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochimica Et Biophysica Acta* [online]. 1973, **298**(4), 1015–1019. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/0005-2736(73)90408-2
- [50] SZOKA, F. a D. PAPAHAJIOPOULOS. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 1978, **75**(9), 4194–4198. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.75.9.4194
- [51] MAYER, L. D., M. B. BALLY a P. R. CULLIS. Uptake of adriamycin into large unilamellar vesicles in response to a pH gradient. *Biochimica Et Biophysica Acta* [online]. 1986, **857**(1), 123–126. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/0005-2736(86)90105-7
- [52] SILVA, Raquel, Collin LITTLE, Helena FERREIRA a Artur CAVACO-PAULO. Incorporation of peptides in phospholipid aggregates using ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry* [online]. 2008, **15**(6), 1026–1032. ISSN 1350-4177. Dostupné z: doi:10.1016/j.ultsonch.2008.03.010
- [53] RICHARDSON, Eric S., William G. PITT a Dixon J. WOODBURY. The role of cavitation in liposome formation. *Biophysical Journal* [online]. 2007, **93**(12), 4100–4107. ISSN 1542-0086. Dostupné z: doi:10.1529/biophysj.107.104042

- [54] WOODBURY, Dixon J., Eric S. RICHARDSON, Aaron W. GRIGG, Rodney D. WELLING a Brian H. KNUDSON. Reducing liposome size with ultrasound: bimodal size distributions. *Journal of Liposome Research* [online]. 2006, **16**(1), 57–80. ISSN 0898-2104. Dostupné z: doi:10.1080/08982100500528842
- [55] LAPINSKI, Monique M., Angelines CASTRO-FORERO, Aaron J. GREINER, Robert Y. OFOLI a Gary J. BLANCHARD. Comparison of liposomes formed by sonication and extrusion: rotational and translational diffusion of an embedded chromophore. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* [online]. 2007, **23**(23), 11677–11683. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la7020963
- [56] MAULUCCI, Giuseppe, Marco DE SPIRITO, Giuseppe ARCOVITO, Federico BOFFI, Agostina Congiu CASTELLANO a Giuseppe BRIGANTI. Particle size distribution in DMPC vesicles solutions undergoing different sonication times. *Biophysical Journal* [online]. 2005, **88**(5), 3545–3550. ISSN 0006-3495. Dostupné z: doi:10.1529/biophysj.104.048876
- [57] ZASADZINSKI, Joseph A., Benjamin WONG, Natalie FORBES, Gary BRAUN a Guohui WU. Novel Methods of Enhanced Retention in and Rapid, Targeted Release from Liposomes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. 2011, **16**(3), 203–214. ISSN 1359-0294. Dostupné z: doi:10.1016/j.cocis.2010.12.004
- [58] THABET, Yasmeena, Mahmoud ELSABAHY a Noura G. EISSA. Methods for preparation of niosomes: A focus on thin-film hydration method. *Methods (San Diego, Calif.)* [online]. 2022, **199**, 9–15. ISSN 1095-9130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2021.05.004
- [59] NÉMETH, Zsófia, Ildikó CSÓKA, Reza SEMNANI JAZANI, Bence SIPOS, Henrik HASPEL, Gábor KOZMA, Zoltán KÓNYA a Dorina Gabriella DOBÓ. Quality by Design-Driven Zeta Potential Optimisation Study of Liposomes with Charge Imparting Membrane Additives. *Pharmaceutics* [online]. 2022, **14**(9), 1798. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics14091798
- [60] LYU, Tae Seong, Yoojin AHN, Young-Jun IM, Seong-Soo KIM, Ki-Heon LEE, Jinyoung KIM, Yujin CHOI, Dongwoo LEE, EunSeok KANG, Gayeon JIN, Jiwon HWANG, Sang-Im LEE a Jung-Ah CHO. The characterization of exosomes from fibrosarcoma cell and the useful usage of Dynamic Light Scattering (DLS) for their evaluation. *PloS One* [online]. 2021, **16**(1), e0231994. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0231994
- [61] The principles of dynamic light scattering | Anton Paar Wiki. *Anton Paar* [online]. [vid. 2025-02-16]. Dostupné z: <https://wiki.anton-paar.com/cz-cs/principy-dynamickeho-rozptylu-svetla/>
- [62] SOBARWIKI. *English: Simplified diagram of dynamic light scattering setup*Čeština: *Schéma měření dynamického rozptylu světla* [online]. 6. března 2014 [vid. 2025-02-16]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schematic_of_DLS.png
- [63] TAKAGI, T. Electrophoretic light scattering. *Electrophoresis* [online]. 1993, **14**(12), 1255–1256. ISSN 0173-0835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.11501401190

- [64] VARENNE, F., E. RUSTIQUE, J. BOTTON, J.-B. COTY, G. LANUSSE, M. AIT LAHCEN, L. RIO, C. ZANDANEL, C. LEMARCHAND, M. GERMAIN, L. NEGRI, A.-C. COUFFIN, G. BARRATT a C. VAUTHIER. Towards quality assessed characterization of nanomaterial: Transfer of validated protocols for size measurement by dynamic light scattering and evaluation of zeta potential by electrophoretic light scattering. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2017, **528**(1–2), 299–311. ISSN 1873-3476. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2017.06.006
- [65] ÖZTÜRK, KİVİLCİM, Meryem KAPLAN a Sema ÇALIŞ. Effects of nanoparticle size, shape, and zeta potential on drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2024, **666**, 124799. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2024.124799
- [66] ZUIDAM, N. J. a D. J. CROMMELIN. Chemical hydrolysis of phospholipids. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 1995, **84**(9), 1113–1119. ISSN 0022-3549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.2600840915
- [67] CROMMELIN, D. J. a E. M. VAN BOMMEL. Stability of liposomes on storage: freeze dried, frozen or as an aqueous dispersion. *Pharmaceutical Research* [online]. 1984, **1**(4), 159–163. ISSN 0724-8741. Dostupné z: doi:10.1023/A:1016344523988
- [68] LASIC, D. D., F. J. MARTIN, A. GABIZON, S. K. HUANG a D. PAPAHAJIOPOULOS. Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. *Biochimica Et Biophysica Acta* [online]. 1991, **1070**(1), 187–192. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/0005-2736(91)90162-2
- [69] VAN WINDEN, E. C., W. ZHANG a D. J. CROMMELIN. Effect of freezing rate on the stability of liposomes during freeze-drying and rehydration. *Pharmaceutical Research* [online]. 1997, **14**(9), 1151–1160. ISSN 0724-8741. Dostupné z: doi:10.1023/a:1012142520912
- [70] HERNÁNDEZ-CASELLES, T., J. VILLALAIN a J. C. GÓMEZ-FERNÁNDEZ. Influence of liposome charge and composition on their interaction with human blood serum proteins. *Molecular and Cellular Biochemistry* [online]. 1993, **120**(2), 119–126. ISSN 0300-8177. Dostupné z: doi:10.1007/BF00926084
- [71] MOHAMMED, Afzal R., Vincent W. BRAMWELL, Allan G. A. COOMBES a Yvonne PERRIE. Lyophilisation and sterilisation of liposomal vaccines to produce stable and sterile products. *Methods (San Diego, Calif.)* [online]. 2006, **40**(1), 30–38. ISSN 1046-2023. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2006.05.025
- [72] HINRICHS, W. L. J., F. A. MANCENÍDO, N. N. SANDERS, K. BRAECKMANS, S. C. DE SMEDT, J. DEMEESTER a H. W. FRIJLINK. The choice of a suitable oligosaccharide to prevent aggregation of PEGylated nanoparticles during freeze thawing and freeze drying. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2006, **311**(1–2), 237–244. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2005.12.032
- [73] CROMMELIN, D. J. a E. M. VAN BOMMEL. Stability of liposomes on storage: freeze dried, frozen or as an aqueous dispersion. *Pharmaceutical Research* [online]. 1984, **1**(4), 159–163. ISSN 0724-8741. Dostupné z: doi:10.1023/A:1016344523988

- [74] BERGER, Adam G., Charles DELORENZO, Chau VO, Justin A. KASKOW, Namita NABAR a Paula T. HAMMOND. Poly(β -aminoester) Physicochemical Properties Govern the Delivery of siRNA from Electrostatically Assembled Coatings. *Biomacromolecules* [online]. 2024, **25**(5), 2934–2952. ISSN 1526-4602. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.4c00062
- [75] LI, Bin, Lianghu QU a Jianhua YANG. RNA-Guided RNA Modifications: Biogenesis, Functions, and Applications. *Accounts of Chemical Research* [online]. 2023, **56**(22), 3198–3210. ISSN 1520-4898. Dostupné z: doi:10.1021/acs.accounts.3c00474
- [76] GRUENKE, Paige R., Khalid K. ALAM, Kamal SINGH a Donald H. BURKE. 2'-fluoro-modified pyrimidines enhance affinity of RNA oligonucleotides to HIV-1 reverse transcriptase. *RNA (New York, N.Y.)* [online]. 2020, **26**(11), 1667–1679. ISSN 1469-9001. Dostupné z: doi:10.1261/rna.077008.120
- [77] KIBLER-HERZOG, L., G. ZON, B. UZNANSKI, G. WHITTIER a W. D. WILSON. Duplex stabilities of phosphorothioate, methylphosphonate, and RNA analogs of two DNA 14-mers. *Nucleic Acids Research* [online]. 1991, **19**(11), 2979–2986. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/19.11.2979
- [78] MAZE, Delphine, Chantal PICHON a Patrick MIDOUX. Reversible stabilization of DNA/PEI complexes by reducible click-linkage between DNA and polymer. A new polyplex concept for lowering polymer quantity. *Gene Therapy* [online]. 2023, **30**(12), 783–791. ISSN 1476-5462. Dostupné z: doi:10.1038/s41434-023-00386-1
- [79] KULIKOVA, Tatjana, Rezeda SHAMAGSUMOVA, Alexey ROGOV, Ivan STOIKOV, Pavel PADNYA, Igor SHIABIEV a Gennady EVTUGYN. Electrochemical DNA-Sensor Based on Macrocyclic Dendrimers with Terminal Amino Groups and Carbon Nanomaterials. *Sensors (Basel, Switzerland)* [online]. 2023, **23**(10), 4761. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s23104761
- [80] RICHARD, Isabelle, Marc THIBAUT, Gregory DE CRESCENZO, Michael D. BUSCHMANN a Marc LAVERTU. Ionization behavior of chitosan and chitosan-DNA polyplexes indicate that chitosan has a similar capability to induce a proton-sponge effect as PEI. *Biomacromolecules* [online]. 2013, **14**(6), 1732–1740. ISSN 1526-4602. Dostupné z: doi:10.1021/bm4000713
- [81] MOTOMURA, Tadahiro a Yasuhiro AOYAMA. Multiple Electrostatic Interaction of Polycationic Chitosan Oligomers with Nucleic Acids: Polyamine Promoted Stabilization of the A-Form of RNA and DNA in Aqueous Solutions. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* [online]. 1992, **65**(7), 1755–1760. ISSN 0009-2673. Dostupné z: doi:10.1246/bcsj.65.1755
- [82] KATHLEEF. Chapter 6: Plasmids and Cloning Basics [online]. nedatováno [vid. 2025-05-01]. Dostupné z: <https://pressbooks.bccampus.ca/kathleef/chapter/chapter-6-plasmids-and-cloning-basics/>
- [83] *Addgene: Vector Database - pBluescript II SK (-)* [online]. [vid. 2025-05-01]. Dostupné z: <https://www.addgene.org/vector-database/1947/>
- [84] BHAT, Somanath, Natalie CURACH, Thomas MOSTYN, Gursharan Singh BAINS, Kate R. GRIFFITHS a Kerry R. EMSLIE. Comparison of methods for accurate quantification

- of DNA mass concentration with traceability to the international system of units. *Analytical Chemistry* [online]. 2010, **82**(17), 7185–7192. ISSN 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/ac100845m
- [85] Figure 3: UV spectra of Iraqi wet egg yolk Lecithin. *ResearchGate* [online]. [vid. 2025-05-16]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/UV-spectra-of-Iraqi-wet-egg-yolk-Lecithin_fig1_313355249
- [86] WASZKOWSKA, Ewa, Zofia ZAREBSKA, Jarosław POZNAŃSKI a Igor ZHUKOV. Spectroscopic detection of photoproducts in lecithin model system after 8-methoxypsoralen plus UV-A treatment. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. 2000, **55**(2), 145–154. ISSN 1011-1344. Dostupné z: doi:10.1016/S1011-1344(00)00037-3
- [87] (PDF) Guidance on the selection and use of DNA extraction methods. *ResearchGate* [online]. [vid. 2025-05-17]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/377815681_Guidance_on_the_selection_and_use_of_DNA_extraction_methods
- [88] BAILEY, Austin L a Sean M SULLIVAN. Efficient encapsulation of DNA plasmids in small neutral liposomes induced by ethanol and calcium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2000, **1468**(1), 239–252. ISSN 0005-2736. Dostupné z: doi:10.1016/S0005-2736(00)00264-9
- [89] DANAEI, M., M. DEGHANKHOLD, S. ATAIEI, F. HASANZADEH DAVARANI, R. JAVANMARD, A. DOKHANI, S. KHORASANI a M. R. MOZAFARI. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* [online]. 2018, **10**(2), 57. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics10020057
- [90] ALKILANY, Alaaldin M., Lucas B. THOMPSON, Stefano P. BOULOS, Patrick N. SISCO a Catherine J. MURPHY. Gold nanorods: Their potential for photothermal therapeutics and drug delivery, tempered by the complexity of their biological interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2012, **64**(2), Biological Interactions of Nanoparticles, 190–199. ISSN 0169-409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2011.03.005

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	adenin
C	cytosin
DLS	dynamický rozptyl světla (z angl. dynamic light scattering)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-trimethylamonium-propan, kationický lipid používaný k tvorbě liposomů
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELS	elektroforetický rozptyl světla (z angl. electrophoretic light scattering)
	<i>E. coli Escherichia coli</i>
G	guanin
GUV	unilamelární vezikuly (z angl. giant unilamellar vesicles)
G4-ASO	G-kvadruplexové <i>antisense</i> oligonukleotidy
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LUV	velké unilamelární vezikuly (z angl. large unilamellar vesicles)
mikroRNA	krátké nekódující RNA regulující genovou expresi
MLV	multilamelární vezikuly (z angl. multilamellar vesicles)
mtDNA	mitochondriální DNA
MVV	multivezikulární vezikuly (z angl. multivesicular vesicles)
PEG	polyethylenglykol
PEI	polyethylenimin, kationický polymer využívaný při stabilizaci RNA
PG	fosfatidylglycerol (z angl. phosphatidylglycerol)
PI	fosfatidylinositol (z angl. phosphatidylinositol)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PBS	fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza (z angl. polyacrylamide gel electrophoresis)
ptDNA	plastidová DNA
pDNA	plazmidová DNA (z angl. plasmid DNA)
RES	retikuloendotelový systém

rRNA	ribozomální RNA (z angl. ribosomal RNA)
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
RNAi	RNA interference, mechanismus regulace genové exprese prostřednictvím siRNA nebo mikroRNA
RISC	molekulární komplex podílející se na RNA interferenci (z angl. RNA-induced silencing complex)
ROS	reaktivní kyslíkové druhy (z angl. reactive oxygen species)
rpm	otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
siRNA	malé interferující RNA (z angl. small interfering RNA)
SUV	malé unilamelární vezikuly (z angl. small unilamellar vesicles)
SELEX	metoda pro výběr specifických ligandů pomocí cyklů selekce (z angl.: systematic evolution of ligands by exponential enrichment)
TFH	metoda hydratace tenké vrstvy (z angl. thin-film hydration)
T	thymin
TLC	tenkovrstvá chromatografie (z angl. thin layer chromatography)
TAE	Tris-acetát-EDTA pufr používaný v elektroforéze (z angl. Tris-acetate-EDTA)
TBE	Tris-boritan-EDTA pufr používaný v elektroforéze (z angl. Tris-borate EDTA)
tRNA	transferová RNA (z angl. transfer RNA)
ULV	unilamelární vezikuly (z angl. unilamellar vesicles)
U	uracil