



# 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

## STUDIUM ENKAPSULACE AKTIVNÍCH LÁTEK DO LIPOSOMŮ

STUDY OF ENCAPSULATION OF ACTIVE SUBSTANCES INTO LIPOSOMES

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Nikola Sloupská

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

BRNO 2025

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1995/2024 Akademický rok: 2024/25  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Nikola Sloupská**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: bez specializace  
Vedoucí práce: **prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.**

### Název bakalářské práce:

Studium enkapsulace aktivních látek do liposomů

### Zadání bakalářské práce:

- Vypracovat základní rešerši se zaměřením na enkapsulaci aktivních látek do liposomů.
- Seznámit se s technikami pro enkapsulaci aktivních látek do liposomů.
- Experimentálně ověřit enkapsulaci do liposomů.
- Stanovit vlastnosti liposomů s enkapsulovanou látkou.
- Zhodnotit rešeršní i vlastní poznatky a porovnat získané výsledky s literaturou.

### 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.

-----  
Nikola Sloupská  
studentka

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

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

V Brně dne 3.2.2025

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Liposomy jsou sférické vezikuly s hydrofilním jádrem a lipofilní membránou. Díky této struktuře je možno do jádra i membrány začlenit léčivo hydrofilního i hydrofobního charakteru a zlepšit tak jeho distribuci, toho je využíváno v medicíně a farmacii. Cílem této práce bylo připravit liposomy s enkapsulovanou biologicky aktivní látkou, analyzovat účinnost tohoto začlenění a fyzikální vlastnosti vzniklých liposomů. Vezikuly byly připraveny metodou rehydratace fosfolipidového filmu a vlastnosti vezikul byly analyzovány metodou dynamického rozptylu světla pro zjištění velikosti liposomů a jejich zeta potenciálu. Enkapsulované látky byly hydrofobní apigenin a hydrofilní kalcein. Pro separaci liposomů s enkapsulovanou látkou od volné látky byla využita dialýza (pro kalcein) a filtrační centrifugace (pro apigenin). Výsledky ukázaly, že účinnost enkapsulace u apigeninu byla vyšší, než u kalceinu a po separaci došlo ke zlepšení stability liposomů. Do budoucna by bylo možno otestovat vliv pufru na účinnost a stabilitu enkapsulace.

## **ABSTRACT**

Liposomes are spherical vesicles with a hydrophilic core and a lipophilic membrane. This structure allows for encapsulating hydrophilic and hydrophobic drugs in the core or the membrane, thereby improving their distribution, which is widely utilized in medicine and pharmacy. This thesis aimed to prepare liposomes containing biologically active substances and to analyze the efficiency of encapsulation as well as the physical properties of the resulting liposomes. The vesicles were prepared using the thin film hydration method, and their properties were analyzed using dynamic light scattering to determine liposome size and zeta potential. The encapsulated substances were the hydrophobic apigenin and the hydrophilic calcein. To separate the liposomes from the non-encapsulated substances, dialysis (for calcein) and centrifugal filtration (for apigenin) were used. The results showed that apigenin's encapsulation efficiency was higher than calcein's, and the liposome's stability improved after separation. In the future, it would be beneficial to investigate the effect of different buffer types on the efficiency and stability of encapsulation.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Liposomy, enkapsulace, kalcein, apigenin, dynamický rozptyl světla, UV-Vis spektroskopie

## **KEYWORDS**

Liposomes, encapsulation, calcein, apigenin, dynamic light scattering, UV-Vis spectroscopy

SLOUPSKÁ, Nikola. *Studium enkapsulace aktivních látek do liposomů*. Online, bakalářská práce. Miloslav PEKAŘ (vedoucí práce). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2025. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/162114>. [cit. 2025-05-18].

## 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

*Ráda bych poděkovala Ing. Adamu Juglovi Ph.D., a prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc., za jejich cenné rady a podporu během zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat všem blízkým za podporu v průběhu studia.*

## Obsah

1	Úvod .....	7
2	Teoretická část .....	8
2.1	Fosfolipidy .....	8
2.2	Liposomy.....	8
2.2.1	Druhy liposomů.....	9
2.2.1.1	Malé unilamelární vezikuly (SUV) .....	9
2.2.1.2	Velké unilamelární vezikuly (LUV).....	9
2.2.1.3	Velké multilamelární vezikuly (MLV) a oligolamelární vezikuly (OVL)....	10
2.2.1.4	Kationtové liposomy .....	10
2.2.1.5	Aniontové liposomy .....	10
2.3	Příprava .....	10
2.4	Enkapsulace.....	11
2.4.1	Metody .....	11
2.4.2	Typy enkapsulace .....	12
2.4.2.1	Pasivní zapouzdření.....	12
2.4.2.2	Aktivní zapouzdření .....	12
2.5	Metody stanovení .....	13
2.5.1	UV–Vis spektroskopie.....	13
2.5.2	Dynamický rozptyl světla (DLS) .....	14
2.5.2.1	Velikost a PDI liposomů.....	15
2.5.2.2	Zeta potenciál .....	15
2.5.3	Účinnost enkapsulace léčiva .....	16
2.6	Enkapsulované látky/léčiva.....	17
2.6.1	Kalcein .....	17
2.6.2	Apigenin .....	18
3	Současný stav řešené problematiky .....	19
4	Experimentální část .....	21
4.1	Chemikálie .....	21
4.1.1	Lipidy .....	21
4.1.2	Rozpouštědla .....	21
4.1.3	Enkapsulované látky .....	22
4.2	Příprava liposomů .....	22

4.2.1	Příprava liposomů bez aktivní látky .....	22
4.2.2	Příprava liposomů s enkapsulovaným kalceinem .....	22
4.2.3	Výroba liposomů s enkapsulovaným apigeninem.....	23
4.2.4	Měření a zpracování výsledků.....	23
5	Výsledky a diskuze .....	24
5.1	Liposomy bez enkapsulované aktivní látky .....	24
5.2	Enkapsulace kalceinu do liposomu .....	25
5.2.1	Kalibrační řada kalceinu.....	25
5.2.2	Vlastnosti liposomů před dialýzou .....	26
5.2.3	Vlastnosti liposomů po dialýze .....	27
5.2.4	Výpočet účinnosti enkapsulace kalceinu.....	28
5.3	Enkapsulace apigeninu do liposomu .....	30
5.3.1	Kalibrační řada apigeninu .....	30
5.3.2	Vlastnosti liposomů před centrifugací s enkapsulovaným apigeninem .....	30
5.3.3	Vlastnosti liposomu po centrifugaci.....	32
5.3.4	Výpočet účinnosti enkapsulace apigeninu .....	33
6	Závěr .....	36
7	Literatura.....	37
8	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	41
9	Přílohy.....	42
9.1	Kalibrační řady kalceinu .....	42
9.2	Vlastnosti liposomů před dialýzou .....	43
9.3	Vlastnosti liposomů po dialýze .....	44
9.4	Výpočet účinnosti enkapsulace kalceinu.....	45
9.5	Kalibrační křivky apigeninu.....	46
9.6	Vlastnosti liposomu před centrifugací.....	47
9.7	Vlastnosti liposomu po centrifugaci.....	48
9.8	Výpočet účinnosti enkapsulace apigeninu .....	49

# 1 ÚVOD

Liposomy jsou kulovité vezikuly, které jsou svojí strukturou podobné membráně buněk v živém organismu. V současné době jsou široce využívány v medicíně pro cílenou aplikaci léčiv, která by mohla například degradovat v prostředí organismu dříve, než by se dostala do cílené tkáně. Mnohá protirakovinná léčiva mohou být toxická a enkapsulace může výrazně omezit jejich vedlejší účinek. Díky jejich amfifilnímu charakteru je možno do nich začlenit aktivní látky lipofilního i hydrofilního charakteru.

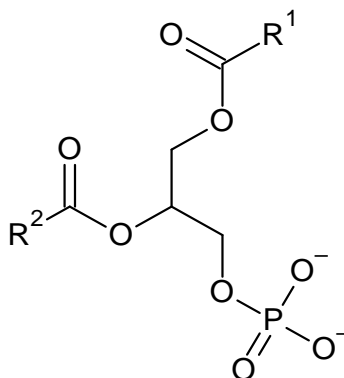
Enkapsulace do liposomů je v poslední době velmi aktuální, hlavně pro začlenění a následné doručení léčivých látek pro terapii u nemocí rakovinného typu, nebo při enkapsulaci lipofilních vitamínů. U enkapsulace samotné se výzkum zaměřuje hlavně na způsob jeho provedení. Začlenění hydrofilního nebo hydrofobního léčiva lze provést pasivně nebo aktivně. Po enkapsulaci je zapotřebí oddělit liposomy s enkapsulovanou aktivní látkou od volné, nezaenkapsulované, látky. To lze provést různými způsoby, pro tuto práci byla využita metoda dialýzy (v případě hydrofilní látky) a filtrační centrifugace (v případě lipofilní).

Cílem této práce je připravit liposomy s enkapsulovanou aktivní látkou a otestovat účinnost začlenění u dvou různých aktivních látek. U obou látek je využit stejný postup přípravy liposomů, a to rehydratace fosfolipidového filmu. Biologicky aktivní látky, které byly použity jsou lipofilní apigenin a hydrofilní kalcein. Po enkapsulaci byly vlastnosti liposomů analyzovány pomocí metody dynamického rozptylu světla, kdy byla zjišťována velikost vezikul a jejich zeta potenciál. Pro otestování účinnosti enkapsulace byla využita metoda UV–Vis spektroskopie.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Fosfolipidy

Fosfolipidy jsou zjednodušeně řečeno lipidy, které obsahují zbytek kyseliny fosforečné. Jedná se o povrchově aktivní molekuly a díky hlavní polární skupině a lipofilní vedlejší skupině vykazují amfifilní charakter. Díky tomuto charakteru mají spousty využití a mezi ně patří i tvoření liposomů. Strukturu tvoří glycerolová kostra a na ni jsou v polohách 1 a 2 navázány mastné kyseliny a v poloze 3 fosfát [1] Obrázek 1 znázorňuje jejich obecnou strukturu. Na glycerolovou kostru mohou být navázány různé zbytky mastných kyselin, včetně fosfatidylcholinu (využíván v experimentální části této práce), fosfatidylethanolaminu, fosfatidylserinu a fosfatidylinositolu [2]. Fosfolipidy se označují jako endogenní látky, jsou tedy funkční a strukturální složkou všech buněčných membrán. Asymetrie a distribuce různých typů fosfolipidů nemá zcela objasněnou funkci v živých organismech [1]. Je ale dokázáno, že počet a druh fosfolipidů v kombinaci s dalšími biologickými látkami jako například steroly a proteiny, přispívají k funkci a stabilitě membrány [2].



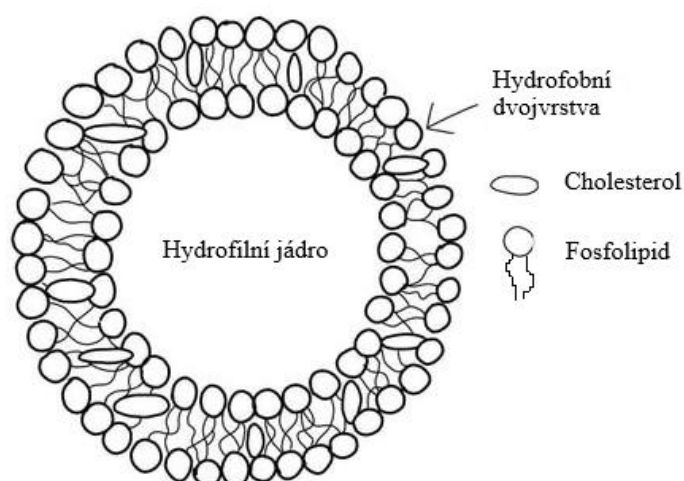
Obrázek 1: Obecná struktura fosfolipidu

### 2.2 Liposomy

Liposomy jsou sférické, umělé vezikuly, které se skládají z jedné nebo více lamel tvořených fosfolipidovou dvouvrstvou. Uspořádanost lipidové dvojvrstvy závisí na více faktorech: délka samotného acylového řetězce mastné kyseliny, stupni saturace uhlovodíkových řetězců a van der Waalsových interakcích mezi nimi. Ve struktuře liposomu mohou probíhat změny z rigidní struktury na fluidní a tato změna závisí na teplotě fázového přechodu. Obecně, dlouhé řetězce tvoří rigidnější struktury, avšak když se zvyšuje teplota, tak se struktura stává pohyblivější [3].

Podstatnou částí fosfolipidové dvojvrstvy je fosfatidylcholin (syntetický/přírodní lecitin) nebo směs s jeho různými druhy společně se zbytky mastných kyselin, které jsou různé podle nasycení a délky uhlíkového řetězce. Dále je při výrobě využíván cholesterol pro snížení fluidity membrány a zároveň permeability [4]. V některých případech se přidává navíc i PEG (polyethylenglykol) pro zvýšení steric stability [5].

Průměr liposomů se může pohybovat od 20 nm do několika  $\mu\text{m}$ . Podobně jako biologické membrány buněk, jsou membrány liposomů složeny z lipidové dvojvrstvy amfifilních lipidů orientovaných svou hydrofilní částí do prostředí a lipofilní částí jsou otočeny proti sobě a představují hydrofobní část membrány [4]. Schématické znázornění struktury liposomu je na Obrázek 2. Do hydrofilního jádra lze včlenit neboli inkorporovat látky s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Tuto schopnost lze využít například pro enkapsulaci léků pro farmaceutické účely [4].



Obrázek 2: Schématické znázornění liposomu [6]

## 2.2.1 Druhy liposomů

Obecně jsou rozeznávány čtyři základní druhy liposomů podle velikosti: malé unilamelární vezikuly, velké unilamelární vezikuly, velké multilamelární vezikuly a velké oligolamelární vezikuly. Dále mohou být liposomy rozděleny podle náboje na aniontové a kationtové.

### 2.2.1.1 Malé unilamelární vezikuly (SUV)

Jedná se o vezikuly o průměru menším než 50 nm tvořené jedinou fosfolipidovou dvojvrstvou, vyznačují se vysokým membránovým napětím zapříčiněným značným zakřivením membrány. U vezikul o velikosti  $\pm 23$  nm obsahuje vnější vrstva téměř dvakrát více fosfolipidových molekul ve srovnání s vnitřní vrstvou. V tomto případě je vnitřní vodní prostor 4krát až 5krát menší než objem fosfolipidové dvojvrstvy, což ovlivňuje enkapsulaci hydrofilních molekul léčiva. Přesto jsou ale brány jako dobrá volba pro využití jako nosiče léčiv, mohou totiž unikat z cévního řečiště extravaskulárně přes endotel kapilár do okolních tkání [3].

SUV jsou však po fyzikálně-chemické stránce vcelku nestabilní díky vysokému stupni deformace membrán, jak bylo řečeno výše. Jejich využití je tedy negativně ovlivněno zvýšenou permeabilitou a zvýšenou náchylností kontaktu s většími molekulami [3].

### 2.2.1.2 Velké unilamelární vezikuly (LUV)

LUV mají průměr většinou více jak 50 nm, tudíž oproti SUV mají nižší membránové napětí a větší stabilitu. Obsahují poměrně velké množství vody a jsou tedy dobrým nosičem hydrofilních léčiv, čehož je možno využít ve farmaceutickém průmyslu [3].

### **2.2.1.3 Velké multilamelární vezikuly (MLV) a oligolamelární vezikuly (OVL)**

MLV se připravují o velikosti 100–1000 nm. Obsahují velký počet fosfolipidových dvojvrstev, které mohou za pomalejší uvolňování hydrofilního léčiva, což zapříčiňuje výrazný depotní účinek. Poměr hydrofilního léčiva k lipidu v MLV je poměrně nevýhodný [3]. U OVL podobně jako u MLV jde o vezikuly s několikavrstevnými membránami, kde je uvolňování léčiva zpomaleno díky silné vrstvě lipidů. To umožňuje podání vyšších dávek léčiva a prodloužení léčebného efektu. Většinou vznikají jako vedlejší produkt při přípravě LUV [3].

### **2.2.1.4 Kationtové liposomy**

Jsou vhodné pro podávání negativně nabitých makromolekul, například DNA, RNA a oligomolekul, protože negativní náboj těchto molekul a jejich velikost omezují jejich pasivní difúzi do buněk. Avšak vyšší kladný náboj na povrchu liposomů může ovlivnit jejich pohyb v krevním oběhu a v důsledku elektrostatických interakcí s aniontovými druhy v krvi a zvýšit agregaci liposomů, a to snižuje jejich lokalizaci na místo působení. Při použití polyethylenglykolu (PEG) se zvyšuje účinnost léčiva zlepšením doby cirkulace a snižuje imunogenicitu [6].

### **2.2.1.5 Aniontové liposomy**

Aniontové liposomy jsou v těle méně stabilní než neutrální a kationtové liposomy. Obvykle se proto využívají pro kožní podávání léčiv, zlepšují průnikové vlastnosti přes kůži [6].

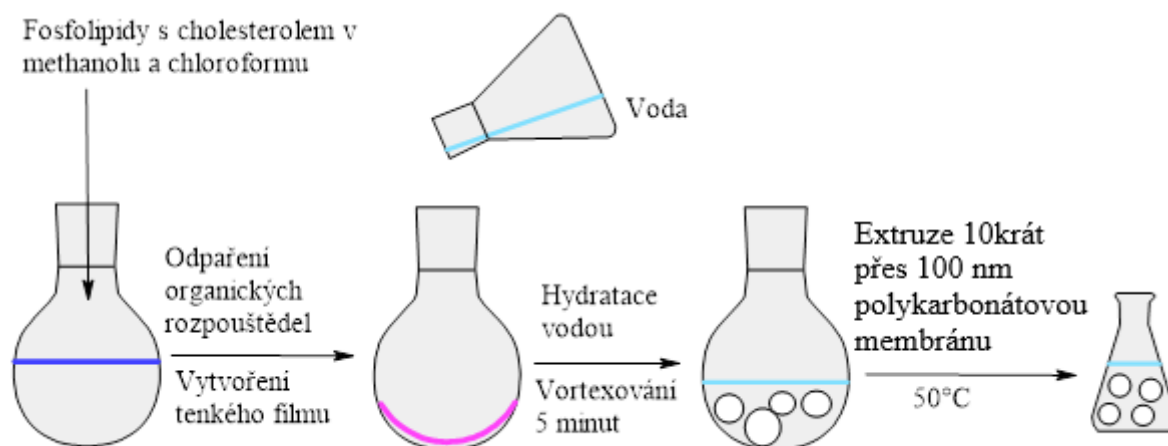
## **2.3 Příprava**

Liposomy mohou být připraveny několika způsoby, a to metodou hydratace tenkého filmu, metodou odpařování v reverzní fázi, metodou vstříkování rozpouštědla, způsobem odstranění detergentu, dehydratační-rehydratační metodou, heating metodou, metodou změny pH, metodou mikrofluidních kanálů a superkritickou fluidní metodou [6].

Při práci byla použita metoda hydratace tenkého filmu neboli Banghamova metoda. Jedná se o jednu z nejpoužívanějších a nejjednodušších technik pro tvorbu liposomů. Je však omezená kvůli obtížím při odstranění organického rozpouštědla, homogenizaci a většinou se dají při této metodě připravovat liposomy pouze v malém měřítku [7]. V tomto případě se všechny lipidové složky rozpustí v kombinaci organických rozpouštědel. Organické rozpouštědlo je následně odpařeno za vzniku tenké filmové vrstvy. Získaný film se poté hydratuje při teplotě vyšší, než je jeho teplota přechodu, obvykle 50–60°C.[6] Obrázek 3 znázorňuje schématické zakreslení postupu metody.

Po dokončení přípravy liposomů nejčastěji následuje proces zmenšování, protože při metodě tenkého filmu nejčastěji dostáváme vezikuly MLV a pro účely experimentální jsou často potřeba vezikuly velikosti SUV [8].

Pro kontrolu velikosti částic byla při práci využita metoda extruze neboli vytlačování. Té je využíváno pro průmyslové aplikace, kde je potřeba kontrolování velikosti částic [9]. Vodný roztok s liposomy je protlačován přes membránu s určitou velikostí pórů. Díky tomuto procesu se vytvoří homogenní zastoupení vezikul se středním průměrem podle velikosti pórů v membráně. Díky jednoduchosti se metoda stala velmi oblíbenou pro redukci multilamelárních vezikul na velké unilamelární vezikuly, které se dají nejlépe využívat pro výzkum membrán a podávání léků. Jiné metody zmenšování velikosti, například ultrazvuk, často způsobují degradaci lipidů, kontaminaci těžkými kovy nebo omezenou účinnost zachycování léčiva [10].



Obrázek 3: Schéma přípravy liposomů metodou hydratace tenkého filmu pomocí extruze [6]

## 2.4 Enkapsulace

Enkapsulace neboli zapouzdření je proces zachycení aktivní látky v látce jiné, která funguje jako materiál stěny při samotném procesu, v našem případě je jako stěna brán liposom. V oblasti technologií a biotechnologií je využívána pro zvýšení účinnosti a efektivnosti pro transport aktivních látek, nebo léčiv [9]. Liposomy díky svojí stavbě (hydrofobní fosfolipidová dvojrstva a hydrofilní jádro) umožňují zachycení léčiva hydrofilního i lipofilního charakteru. Aktivní látka, léčivo, je následně z liposomů do cílové buňky převáděna pomocí jednoduché difúze, usnadněné difúze nebo aktivního transportu s ohledem na typ léčiva [5].

### 2.4.1 Metody

Pro enkapsulaci látek do vezikul se využívají různé metody či techniky. Obecně jsou zahrnuty v enkapsulaci tři kroky: vytvoření stěny kolem látky, která má být enkapsulována; zabránění nežádoucímu úniku látky z kapsle, a naopak zabránění vniknutí nežádoucí látky do kapsle [11]. Při enkapsulaci je velmi důležité stanovení enkapsulační účinnosti. Pro zjištění této hodnoty je zapotřebí určit minimálně dvě z těchto tří hodnot: volné léčivo, zapouzdřené léčivo a celkové léčivo v roztoku ve kterém se vyskytují zkoumané liposomy. K tomu, aby bylo možné změřit některou z těchto hodnot je potřeba provést separaci liposomů se začleněným léčivem a volného léku. Typicky se v průmyslu a výzkumu využívají purifikační metody, ultracentrifugace, ultrafiltrace a extrakce na pevné fázi s následnou analýzou pomocí HPLC pro měření účinnosti [12]. V této práci byla využita metoda dialýzy a filtrační centrifugace.

Metoda dialýzy je využívána pro odstranění léčiva, které není enkapsulované uvnitř liposomu a je volně v okolním roztoku. Jedná se o fyzikálně-chemickou separaci molekul v roztocích přes semipermeabilní membránu, které se říká dialyzační trubice. Dialýza je založena na vlastnosti použité membrány, přes kterou jsou částice schopny nebo naopak neschopny projít. Využita je hlavně k eliminaci malých a nežádoucích molekul. Používá se ze dvou hlavních důvodů: pro zavedení nových molekul do roztoku vzorku nebo pro odstranění malých molekul z roztoku vzorku, díky jejich schopnosti hladce proudit v jakékoli směru membrány. Během procesu je dosaženo rovnováhy mezi roztoky na obou stranách membrány [13]. Této metody bylo využito při enkapsulaci hydrofilního léčiva.

Další metodou pro odstranění nezapouzdřeného léčiva, která byla využita při této bakalářské práci, je metoda filtrační centrifugace. Jedná se o klasickou centrifugaci, která pracuje na principu oddělení složek vzorku pomocí odstředivé síly, ta je vytvořena za pomoci motoru, který přivádí rotor do rotačního pohybu kolem jeho pevné osy. Jedná se o typ sedimentační metody. V tomto případě dochází k oddělování složek na základě velikosti, ale lze separovat i na základě hustoty [14]. K dokonalému oddělení liposomů od roztoku je využito filtrační zkumavky s filtrem, který zachytí liposomy ve vrchnější vrstvě a supernatant projde filtrem do spodní části zkumavky. Této metody bylo využito při enkapsulaci lipofilního léčiva.

## **2.4.2 Typy enkapsulace**

Enkapsulace se z pohledu mechanismu a způsobu kam se látka zapouzdří, rozděluje na dva typy: aktivní a pasivní loading (plnění) [15].

### **2.4.2.1 Pasivní zapouzdření**

Pasivní zapouzdření je prováděno během procesu přípravy. Nejčastějším postupem enkapsulace během přípravy je rozpuštění hydrofilního léčiva ve vodném médiu a lipofilního léčiva v organických rozpouštědlech. Účinnost plnění při pasivním loadingu je většinou velmi nízká, ale záleží hlavně i na velikosti liposomů, do kterých je enkapsulováno. Účinnost zapouzdření, ale může být kladně ovlivněna velkým rozdílem koncentrace liposomů ku koncentraci aktivní látky. Při velikosti MLV je enkapsulační účinnost dostatečně vysoká, ale většinou se pro dodávání léků upřednostňuje SUV, kde už je účinnost velmi nízká [15; 16].

### **2.4.2.2 Aktivní zapouzdření**

Aktivní plnění je většinou provedeno až po plném vytvoření prázdného liposomu. Účinnost enkapsulace ovlivňuje mnoho faktorů jako například teplota liposomů, délka inkubační doby nebo pH gradient [16]. Avšak při ideálních podmínkách může být enkapsulace extrémně účinná, což způsobuje vysoká intraliposomální koncentrace a minimální plýtvání léčivem [15]. Tvorba pH gradientu podél membrány liposomu způsobuje silnou hnací sílu pro slabě zásadité léky, které vstupují do kyselého jádra, aby vyrovnaly rovnováhu mezi vnitřním a vnějším prostředím. Vytvořit pH gradient lze vícero metodami například pomocí síranu amonného nebo ionoformové metody [16].

Síran amonný je využíván při aktivní enkapsulaci. Pomocí síranu amonného se vytváří pH gradient. Při přípravě je tedy lipidový film hydratován síranem amonným a pH gradient nastává, když amoniak prochází liposomem a síran zůstane zachycený v liposomálním jádře, vnitřní prostředí je tedy kyselé. Léčivo projde fosfolipidovou dvojvrstvou za změny náboje a je zachyceno v jádře. Tohle vše probíhá díky nízké permeabilitě sulfátové soli uvnitř liposomu, s touto solí se vytváří sraženina s daným používaným léčivem, což zvyšuje jeho enkapsulační účinnost. Tato metoda je vhodná pro amfipatická, slabě bazická nebo kyselá léčiva [16].

Dalším typem aktivní enkapsulace je tzv. ionoforová metoda. V této metodě se k vytvoření gradientu používají ionofory. Ionofor je přenašeč, který se reverzibilně váže na ionty a pomáhá jim při průchodu buněčnými bariérami. Kromě ionoforu musí být přítomný i přechodný kov, aby napomohl vytvořit iontový gradient. Přechodný kov, jeho ionty, jsou navázány v jádře, kde vytvoří kyselé prostředí a iontový gradient, pH gradient, a léčivo je se zvýšeným zájmem přenášeno do vnitřního jádra [16].

## **2.5 Metody stanovení**

Pro stanovení liposomů, jejich koncentrace a vlastností jako velikost a zeta potenciál, je potřeba využití některých přístrojových technik. Zároveň byla stanovena účinnost enkapsulace porovnáním těchto vlastností před a po enkapsulaci.

### **2.5.1 UV–Vis spektroskopie**

UV–Vis spektroskopie, má několik dalších názvů například ultrafialová viditelná spektroskopie, absorpční spektroskopie nebo také odrazová spektroskopie v ultrafialové viditelné spektrální oblasti. Všechny tyto názvy a označení, ale vyjadřují ten stejný princip [17].

Jedná se o elektronovou spektroskopii, jelikož zde probíhá elektronový přechod. Jde o nákladově efektivní, jednoduchou, všestrannou a nedestruktivní techniku, která umožňuje znovupoužití vzorku. Pro využití je to kvalitativní, kvantitativní a analytická technika, kde je porovnáván vzorek se slepým neboli referenčním vzorkem za účelem měření množství diskrétního ultrafialového a viditelného světla, které prochází nebo je absorbované vzorkem dle Beer-Lambertova zákona [17].

Vlnová délka při UV–Vis spektroskopii se pohybuje od 190 nm do 800 nm. UV oblast se nachází v rozmezí vlnových délek přibližně od 190 nm do 400 nm a viditelná od 400 nm do 800 nm. UV oblast se dá ještě rozdělit na blízkou a vzdálenou, kde blízká je od 400 nm do 190 nm a vzdálená pod cca 200 nm [17].

Při dopadu vlnové délky světla na molekulu se molekula vzruší a excituje. Excituje se ze základního energetického stavu do vyššího energetického stavu. Při tomto přechodu elektron absorbuje světelnou energii, protože elektrony v orbitalu v nižším stavu potřebují dodat energii k přesunu do vyššího energetického stavu. Energie se nevytváří ani neničí, je pohlcována [17].

Podle Beer-Lambertova zákona je absorbance přímo úměrná koncentraci látky v roztoku. Absorbance je také označována jako optická hustota, je to tedy množství světla absorbované objektem. Transmitance je definována jako poměr spektra intenzity světla procházejícího měřeným vzorkem k intenzitě světla procházejícího referenčním vzorkem [17].

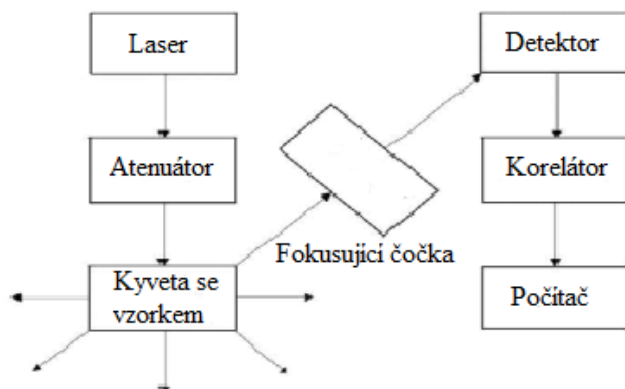
## 2.5.2 Dynamický rozptyl světla (DLS)

V metodě DLS koreluje kolísání průměrné intenzity rozptýleného světla v čase s velikostí částic v suspenzi. Hlavní veličinou, která je měřena je translační difúzní koeficient  $D$ , který je následně využit pro výpočet zdánlivého průměru částic  $d$  pomocí Stokes-Einsteinovy rovnice:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot (t) \cdot d} \quad (0.1)$$

kde  $k_B$  je Boltzmannova konstanta,  $T$  je teplota (K),  $\mu$  je viskozita (Pa·s) a  $t$  je čas (s) [18]. Tato veličina je automaticky vypočítána přístrojem, který nám rovnou poskytne výsledné velikosti částic.

Měření velikosti částic pomocí DLS je občas výzvou kvůli tomu, že je potřeba, aby roztoky byly čiré. Dále, protože funkce autokorelace softwaru DLS porovnává signál s jeho časově zpožděnou verzí, přesnost měření je tedy náchylná k sekundárnímu rozptylu. Těmto faktorům se předchází tak, že se systémy zředí na velmi nízké koncentrace [18]. Tato metoda je však dobrá při měření liposomů, lze změřit několik hlavních vlastností včetně zeta potenciálu a velikosti.



Obrázek 4: Schéma průběhu měření vzorku při DLS [19]

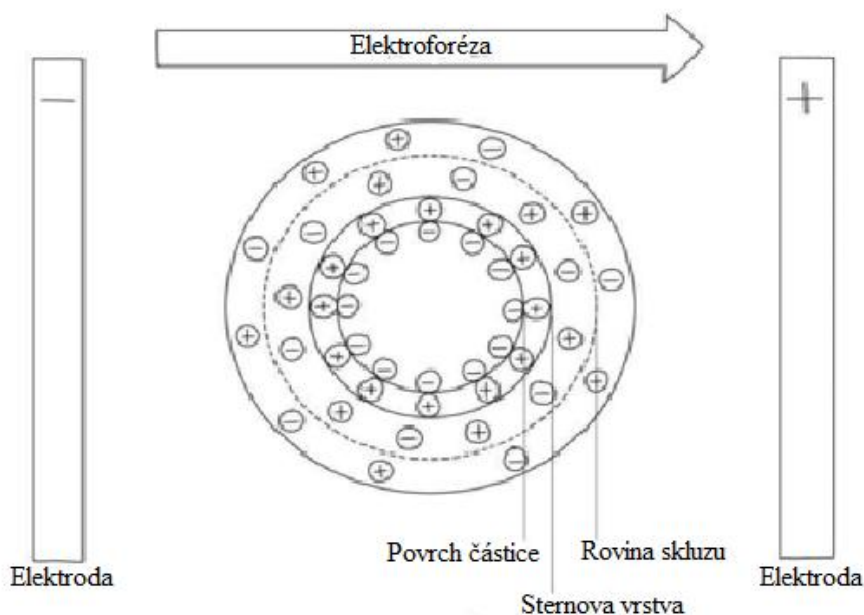
### **2.5.2.1 Velikost a PDI liposomů**

Velikost je velmi důležitý aspekt, který je potřeba sledovat, protože při uvolňování léčiv ovlivňuje farmakokinetiku a tkáňovou distribuci. Liposomy o průměru 100–150 nm cirkulují v krevních cévách, které prokrvují tkáň jako jsou ledviny, plíce a srdce, a nesnadno opouštějí kapiláry. Liposomy menšího průměru kolem 20–100 nm se mohou distribuovat až do kostní dřeně, sleziny a jaterní sinusoidy, do jisté míry tedy mohou opustit krevní řečiště a projít netěsnými kapilárami těchto orgánů. Pokud jsou menší než 10 nm procházejí přes stěnu glomerulární kapiláry, nejsou tedy reabsorbovány. Velikost liposomů je tedy zásadně ovlivněna, cílovým místem jejich působení, to je důvodem, proč některé liposomy o velikosti 50–200 nm nejsou schopny uniknout z krevních cév [20]. Jak již bylo zmíněno výše podle velikosti se liposomy rozdělují do skupin: SUV s průměrem pod 50 nm, LUV s průměrem větším jak 50 nm, MLV a OVL, které se většinou pohybují od 100 nm do 1000 nm [3].

PDI, tzv. index polydisperzity definuje rozsah velikostí lipidických nosičů (liposomů) v roztoku. Polydisperzita se tedy používá jako popis stupně nerovnoměrnosti distribuce velikosti částic. Jedná se o bezrozměrný index uzpůsobený tak že, hodnoty menší než 0,05 jsou k nalezení u vysoce monodisperzních vzorků nebo standardů. Naopak pokud jsou hodnoty vyšší než 0,7 tento vzorek má velmi širokou distribuci velikosti částic a pravděpodobně není vhodný pro další analýzu. Ideálem je tedy, když se hodnota PDI pohybuje mezi těmito dvěma extrémy, ale stále platí čím menší hodnota PDI tím lépe. Pro využití u liposomů jako nosičů léčiv jsou hodnoty PDI 0,3 a nižší přijatelné pro použití a poukazuje na homogenní zastoupení liposomů [20]. Musí být vyjádřeno jako  $\pm$  směrodatná odchylka ze tří experimentálních měření [21].

### **2.5.2.2 Zeta potenciál**

Zeta potenciál je elektrický potenciál, který se vyskytuje na tzv. pomyslném povrchu, který se nazývá smyková rovina částice. Tento povrch odděluje tenkou kapalnou vrstvou (obsahující protiionty) spojenou s pevným povrchem částic v pohybu. Tento náboj, který je tvořený zmíněnou vrstvou protiiontů, působí jako elektrická bariéra stabilizující suspenzi. Při tomto pochopení je zeta potenciál tedy veličinou, ze které lze určit elektrostatickou stabilizaci, tedy nepřímé měřítko fyzikální stability. Obecně dobrou fyzikální stabilitu mají disperze se zeta potenciálem  $\pm 30$  mV. Mezi některé faktory, které ovlivňují hodnotu zeta potenciálu patří iontová síla, pH roztoku a koncentrace přísad, například povrchově aktivní látky [22]. Obrázek 5 znázorňuje schéma elektrické dvojvrstvy důležité pro určení zeta potenciálu.



Obrázek 5: Schéma elektrické dvojvrstvy [19]

### 2.5.3 Účinnost enkapsulace léčiva

Pro stanovení účinnosti enkapsulace daného léčiva v liposomu může být použita například spektroskopie, popsána v kapitole 2.5.1. Je tedy změřena absorbance roztoku s liposomy a zapouzdřeným léčivem před a po dialýze či filtrační centrifugaci, a z těchto absorbancí jsou vypočítány koncentrace. Musí být vidět rozdíl mezi těmito koncentracemi, protože enkapsulace nikdy není 100 % [23]. Následně se uvolňování léčiva vypočítalo podle rovnice:

$$EE\% = \frac{c_{\text{původní}} - c_{\text{uvolněná}}}{c_{\text{původní}}} \times 100, \quad (0.2)$$

kde EE% je procentuální účinnost enkapsulace,  $c_{\text{původní}}$  je koncentrace enkapsulovaného léčiva před separační metodou a  $c_{\text{uvolněná}}$  je koncentrace léčiva volně v roztoku a byla odstraněna pomocí dialýzy nebo filtrační centrifugace [23]. Je potřeba brát v potaz, i pokud byly liposomy s aktivní látkou zředěny:

$$[x_t] = \frac{[x_t]_0}{\beta}, \quad (0.3)$$

kde  $[x_t]_0$  je koncentrace celkového léčiva v původních liposomech;  $\beta$  je ředění [23].

Při začlenění hydrofilního léčiva do liposomu byla účinnost zjištěna z původní koncentrace léčiva v roztoku s liposomy a koncentrace enkapsulovaného léčiva. Při začleňování lipofilního léčiva do fosfolipidové membrány byla použita koncentrace volného léčiva a koncentrace léčiva v původním roztoku. Volné léčivo v roztoku muselo být použito kvůli rozptylu světla liposomy v UV oblasti spektra, což zapříčiňuje nemožnost využití koncentrace léčiva v liposomu [12].

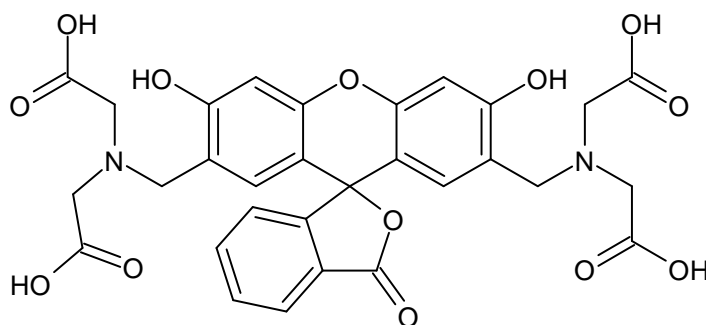
## 2.6 Enkapsulované látky/léčiva

Do liposomů mohou být enkapsulována léčiva, která jsou ve vodě rozpustná i nerozpustná. Hydrofilní molekuly jsou zapouzdřeny do vnitřního vodního jádra a lipofilní molekuly léčiva se mohou inkorporovat do fosfolipidové dvojvrstvy tvořící stěny liposomů (amfifilní molekuly a molekuly s nábojem se mohou adsorbovat na povrch membrány liposomů) [4].

Množství léčiva v liposomu a rychlost jeho uvolňování je řízeno lipofilitou léčiva a velikostí jeho molekuly. Z pohledu liposomálního nosiče neboli liposomu samotného, jsou tyto procesy dány hlavně tloušťkou jeho membrány, výběrem membránových lipidů, které tvoří samotnou membránu a počtem lamel liposomu [4].

### 2.6.1 Kalcein

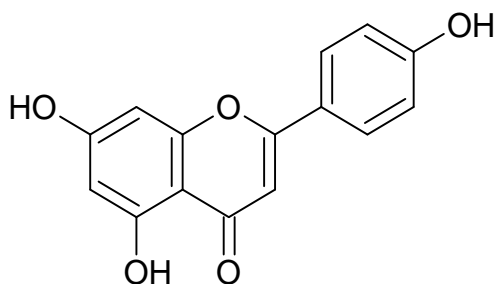
Jedná se o žlutooranžovou pevnou látku rozpustnou ve vodě s maximální absorbcí při 494-517 nm a molární hmotností 622,53 g/mol [24]. V praxi je využíván acetoxymethylkalcein (Calcein – AM), který je přeměněn na kalcein vlivem sterické aktivity. Jedná se tedy o substrát, procházející pasivně buněčnou membránou a v cytosolu je hydrolyzován esterázou na produkt Kalcein, který je dále zadržován v buňkách s neporušenou membránou. Je využíván pro analýzu integrity buněčných membrán a esterázovou aktivitu. Samotný kalcein má velmi nízkou citlivost na pH [25].



Obrázek 6: Struktura Kalceinu [26]

## 2.6.2 Apigenin

Jedná se o jeden z nejrozšířenějších flavonoidů v rostlinách a patří formálně do podtřídy flavonů. Nedávný výzkum ukázal několik biologicky významných účinků jako například cytostatické a cytotoxické účinky vůči různým rakovinným buňkám. Dosud nebyli prokázány žádné negativní účinky na organismus. Po požití prochází mnoha metabolickými cestami a jeho farmakologické chování ovlivňuje následnou distribuci do tkání a biologickou aktivitu. Může napomáhat při překonávání různých onemocnění jako například zánět, autoimunitní onemocnění, a dokonce i několik typů rakoviny. Má velmi nízkou rozpustnost ve vodě (1,35 µg/ml) a vysokou permeabilitu [27].



Obrázek 7: Struktura Apigeninu [27]

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Tato bakalářská práce studuje enkapsulaci biologicky aktivních látek za cílem možné enkapsulace protirakoviných léčiv. Tato aplikace liposomálních systémů je v současné době široce studovaná hlavně kvůli šíři úmrtí v důsledku rakoviny různého druhu [28]. Liposomální enkapsulace je velmi široce prozkoumaná problematika, s vysokým počtem článků a dalších publikací. Avšak pro účely této bakalářské práce byl využit jen omezený počet těchto publikací, které jsou přímo důležité pro potřeby bakalářské práce. Články a publikace, které se zabývají enkapsulací jakožto procesem, jsou však většinou zaměřeny na studium enkapsulace biologicky aktivních látek v potravinářství či kosmetice a kosmetologii. Enkapsulace se tedy ve většině případech testuje na vitamínech či podobných biologických substancích.

Jak bylo řečeno výše většina publikací se zabývá enkapsulací pro potřeby kosmetiky a potravinářství. V potřebách pro potravinářství se hlavně soustředí na přepravu vitamínů pomocí liposomů. Vitamíny jsou látky, které si lidský organismus není schopen tvořit sám a je potřeba je dodávat. V přírodě jsou přítomny vitamíny různého druhu, některé hydrofilní (vitamín K, vitamíny skupiny B a vitamín C) a jiné lipofilní (vitamín A, vitamíny skupiny D a vitamín E). Liposomální přeprava pomocí enkapsulace se tak jeví jako dobrý způsob dodávání těchto látek organismu díky jejich povaze a vlastnostem. Toho lze využít při léčbě, kdy je potřeba organismu dodávat tyto látky v závislosti na diagnóze nebo jako doplňky stravy [8].

S ohledem na enkapsulaci léku, či pro využití v medicíně, jsou nejvíce testovány liposomální enkapsulace léku a zobrazovacího činidla. Takto obohacené liposomy dokážou zhodnotit účinky terapie rakoviny. Díky společnému začlenění léčiva a zobrazovacího činidla je možné sledovat uvolňování léčiva a jeho účinnost pomocí zobrazovacích technik [29]. Dalším důvodem, proč se začala využívat liposomální enkapsulace je, toxicita protirakovinových léčiv a krátké poločasy *in vivo* cytotoxických chemoterapeutik, protože mají vysoce lipofilní charakter. Tato vlastnost vede k vedlejším účinkům užívání, následné nedodržování předpisů, a to vytváří obtíže pro pacienty užívající tyto léčiva. Začlenění chemoterapeutických látek do liposomů může zlepšit jejich cílení na rakovinné buňky a nádorové tkáně, což zvyšuje účinnost a minimalizuje negativní dopad léku [28].

Dalším typem využití vedle zobrazovacího činidla je úprava liposomů pomocí specifických ligandů, a tak lze detekovat chemické a biologické molekuly s poměrně vysokou specifitou. Tento mechanismus funguje, tak že vazba obsažená v cílové molekule způsobí prasknutí fosfolipidové dvojvrstvy, což umožní uvolnění enkapsulované látky, kterou je možné následně schopni detekovat. Nedávné práce ukázaly, že takto lze detekovat biomolekuly, mezi které patří hlavně proteiny, DNA molekuly a malé organické molekuly [29].

Některé články se zaměřují i na začlenění látek hydrofilních a lipofilních zároveň, což se nazývá dvojitě plnění. Z nejnovějšího pohledu se hledá hlavně způsob, jak začlenit dvě biologicky aktivní látky s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a zároveň dokázat co nejpřesněji určit účinnost enkapsulace u obou látek [30]. V článku zabývajícím se touto problematikou byly prozkoumány různé metody plnění liposomů, ty zahrnovaly centrifugaci, dialýzu, ultrafiltraci, mikrokolonovou centrifugaci, nanočásticovou vylučovací chromatografii a indukovanou sedimentaci polyethylenglykolem. Tyto metody byly ozkoušeny a autoři článku došli k výsledkům, že centrifugace na mikrokolonách, nanočásticová vylučovací chromatografie a sedimentační metody dosáhly více jak 90% účinnosti při použití PEGylovaných liposomů [30]. Toto duální plnění liposomů může být zacíleno na rakovinu při správném začlenění, účinnosti a uvolňování léčiva do cílené tkáně.

V posledních letech byly objeveny i nejrůznější variace liposomů, jako například takzvané niosomy. Niosomy jsou velmi podobné liposomům jejich rozdíl je v té skutečnosti, že namísto fosfolipidů, ze kterých se tvoří liposom jsou v niosomech obsaženy tzv. neiontové povrchově aktivní látky. Výroba těchto vezikul je mnohem levnější a jako nanonosiče jsou stabilnější. Poprvé byly využívány v kosmetice, ale v posledních letech se zkoumá jejich využití pro dodávání léčiv. Při léčbě rakoviny se zjistilo, že stejně jako liposomy mohou i niosomy překonat potřebu nutných procedur pro léčbu jako chirurgický zákrok, chemoterapie a ozařování nebo imunoterapie [31]. Ohledně niosomů byla už předvedena spousta patentů a článků. Byla zkoumána lokální aplikace niosomů, mohou zvyšovat penetraci přes kůži a spouštějí imunitní odpověď, když je ve vodném prostředí zapouzdřen antigen. Jelikož mají niosomy nízkou toxicitu uvažuje se i o aplikaci pro oční terapeutika. V oblasti rakoviny jsou stejně jako liposomy schopny snižovat toxicitu protirakovinného činidla a tím sníží i možnost vedlejších účinků. Pomocí nebulizátoru mohou být vezikuly i ukládány hluboko do plic čímž se zlepšuje terapeutická odpověď [32].

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Chemikálie

#### 4.1.1 Lipidy

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

Avanti Polar Lipids, Inc.

CAS: 63-89-8

Číslo šarže: 850355P-G-G-328

Molární hmotnost: 734,039 g/mol

Čistota:  $\geq 99\%$

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

Avanti Polar Lipids, Inc.

CAS:108321-06-8

Číslo šarže: 840635P-200MG-A-025

Molární hmotnost: 558,661 g/mol

##### **1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolamin-N-[methoxy(polyethylenglycol)-5000] (amonná sůl) 16:0 PEG5000 PE**

Avanti Polar Lipids, Inc.

CAS: 474922-84-4

Číslo šarže: 880200P-200MG-A-062

Molární hmotnost: 5 744,965 g/mol

##### **Cholesterol**

Sigma/Aldrich

CAS: 57-88-5

Číslo šarže: 26732-25G-F

Molární hmotnost: 386,65 g/mol

Čistota:  $\geq 99\%$

#### 4.1.2 Rozpouštědla

##### **Chloroform stabilizovaný ethanolem**

Penta s.r.o.

CAS: 67-66-3

Molární hmotnost: 119,38 g/mol

##### **Methanol**

Penta s.r.o.

CAS: 67-56-1

Molární hmotnost: 32,04 g/mol

## **Ethanol absolutní**

Penta s.r.o.

CAS: 64-17-5

Molární hmotnost: 46,07 g/mol

### **4.1.3 Enkapsulované látky**

#### **Kalcein**

CAS: 154071-48-4

Číslo šarže: C0875-5G

Molární hmotnost: 622,53 g/mol

#### **Apigenin**

Biosynth s.r.o.

CAS: 520-36-5

Molární hmotnost: 270,0528 g/mol

## **4.2 Příprava liposomů**

### **4.2.1 Příprava liposomů bez aktivní látky**

Pro přípravu byla použita metoda rehydratace fosfolipidového filmu, která je blíže popsána v kapitole 2.3, díky jejímu vysokému využití ve vědě [6]. Liposomy byly připravovány z 0,011 g DPPC (dipalmitoylfosfatidylcholin) a dalších složek jako kyselina fosfatidová (PA), polyethylenglykol (PEG) a cholesterol v kombinaci, kdy PA byla v 30 mol.%, PEG v 6 mol.% a 30 % cholesterolu. Následně byly tyto složky rozpuštěny v poměru 4:1 chloroformu a methanolu a tato rozpouštědla byla odpařena. Fosfolipidový film byl dále rehydratován 3 ml deionizované vody a vortexován 5 minut. Pro dispergaci a kontrolu velikosti vezikul byla využita extruze přes mini extrudér výrobce Avanti Polar Lipids s polykarbonátovou membránou 0,1  $\mu\text{m}$  o šířce 19 mm. Následně byly změřeny vlastnosti (velikost a zeta potenciál) a jejich absorbance.

### **4.2.2 Příprava liposomů s enkapsulovaným kalceinem**

Pro přípravu byla opět využita metoda rehydratace fosfolipidového filmu, totožná s přípravou v kapitole 4.2.1. Liposomy byly připraveny i ze stejných poměrových množství složek (DPPC, PA, PEG a cholesterol) jako u liposomů bez enkapsulované látky. Složky byly rozpuštěny v kombinaci organických rozpouštědel, která byla odpařena a lipidový film byl rehydratován 3 ml deionizované vody s rozpuštěnou aktivní látkou (Kalcein) o koncentraci 0,15 g/l. Výsledný roztok byl vortexován 5 minut. Pro dispergaci liposomů a kontrolu velikosti vytvořených vezikul byla využita extruze přes mini extrudér výrobce Avanti Polar Lipids s polykarbonátovou membránou 0,1  $\mu\text{m}$  se šířkou 19 mm. Poté byly změřeny vlastnosti vytvořených liposomů a absorbance roztoku s enkapsulovanou i volnou látkou. Pro zjištění účinnosti enkapsulace byla využita metoda dialýzy přes dialyzační střívkno od výrobce Repligen o velikosti pórů 50 kD na objem 5 ml po dobu 72 hodin. Po uplynutí této doby byla změřena absorbance roztoku liposomů, naředěných na 25 ml, a vlastnosti těchto liposomů.

### 4.2.3 Výroba liposomů s enkapsulovaným apigeninem

Pro přípravu liposomů za účelem enkapsulace hydrofobní látky byla využita, stejně jako v případě s hydrofilní látkou, metoda rehydratace fosfolipidového filmu, blíže popsána v kapitole 2.3. Poměrové složení všech složek (DPPC, PA, PEG a cholesterol), ze kterých byly připraveny liposomy je také stejný jako při přípravě liposomů bez aktivní látky, popsáno v kapitole 4.2.1. Pro enkapsulaci byl připraven roztok aktivní látky (Apigenin) rozpuštěné v chloroformu o koncentraci 0,04 g/l. Pro rozpuštění chemikálií organickými rozpouštědly tedy bylo použito 100  $\mu$ l methanolu a 400  $\mu$ l chloroformu s rozpuštěným apigeninem o koncentraci 0,04 g/l. Poté byla organická rozpouštědla odpařena a vzniklý film byl rehydratován 3 ml deionizované vody. Výsledný roztok byl 5 minut vortexován. Pro dispergaci a kontrolu velikosti liposomů byla opět využita extruze přes mini extrudér od výrobce Avanti Polar Lipids s polykarbonátovou membránou 0,1  $\mu$ m se šířkou 19 mm. Pro zjištění účinnosti enkapsulace byla využita filtrační centrifugace. Byla použita centrifuga Rotofix 32 od výrobce Hettich Zentrifugen při 2500 ot/min po dobu 30 minut a filtrační zkumavka od výrobce Pall Corporation s membránou cut-off 30 K, kdy za této centrifugace membránou prošla pouze voda a hydrofobní apigenin zůstal s liposomy na membráně. Aby bylo možno zjistit, jaká je koncentrace volného apigeninu, byl supernatant (voda) vylit a k liposomům byly přidány 2 ml 10 % ethanolu. Tento roztok byl znovu zcentrifugován při 3000 ot/min po dobu 15 minut. Následně byla změřena absorbance supernatantu (apigenin rozpuštěný zředěným ethanolem). Tento supernatant byl naředěn absolutním ethanolem na 10 ml. A také byly zanalyzovány vlastnosti liposomů, které neprošly membránou a byly zadrženy.

### 4.2.4 Měření a zpracování výsledků

Velikost vezikul a jejich zeta potenciál byl změřen před dialýzou a po dialýze pro zjištění vlastností vezikul s enkapsulovanou látkou. Tyto vlastnosti byly měřeny na přístroji Zetasizer Nano ZS výrobce Malvern Instruments.

Velikost částic a jejich distribuce byla určena pomocí dynamického rozptylu světla (2.5.2) ve skleněných kyvetách při teplotě 25 °C. Liposomy každého opakování byly změřeny třikrát, přičemž experiment jako takový byl opakován třikrát. Výsledky jsou tedy celkem průměrem 9 hodnot.

Zeta potenciál byl měřen pomocí ponorné elektrody při 25 °C. Každý ze vzorků byl proměřen pětkrát, výsledná hodnota zeta potenciálu je tedy průměrem 15 hodnot.

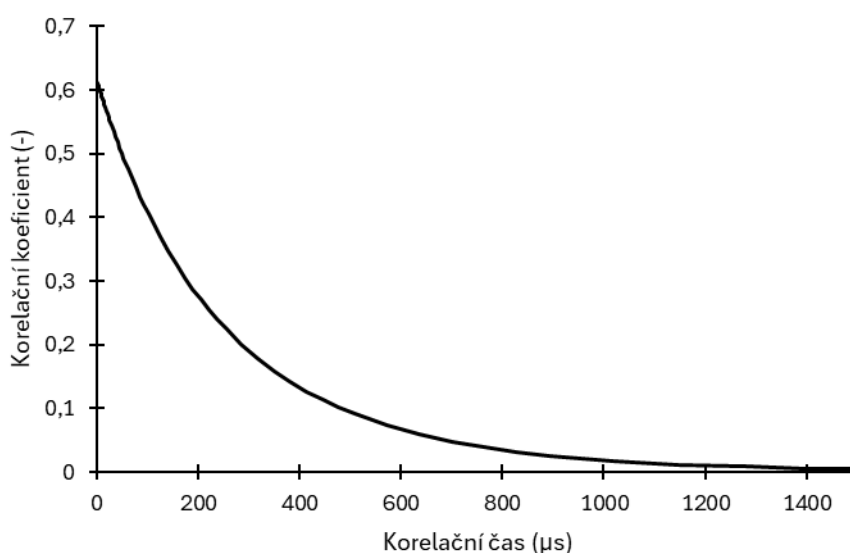
Koncentrace aktivní látky byla v obou případech stanovena na UV–Vis spektrometru Hitachi pomocí UV–Vis spektroskopie (2.5.1), absorbance byla změřena před a po dialýze. Výsledné hodnoty jsou vždy průměrem 3 hodnot. Z koncentrací byla následně vypočtena účinnost enkapsulace v procentech.

V moment, kdy byla absorbance měřena v roztoku s liposomy, bylo zjištěno, že samotné liposomy absorbují určitým způsobem v celé šíři spektra. Proto byly připraveny i liposomy, které neměly žádnou absorbovanou látku, tudíž byly použity jako univerzální blank, kdy byla odečítána data liposomů s aktivní látkou od dat liposomů bez aktivní látky, aby bylo dosaženo pouze absorbance aktivní látky a mohla být určena její koncentrace a následně účinnost enkapsulace.

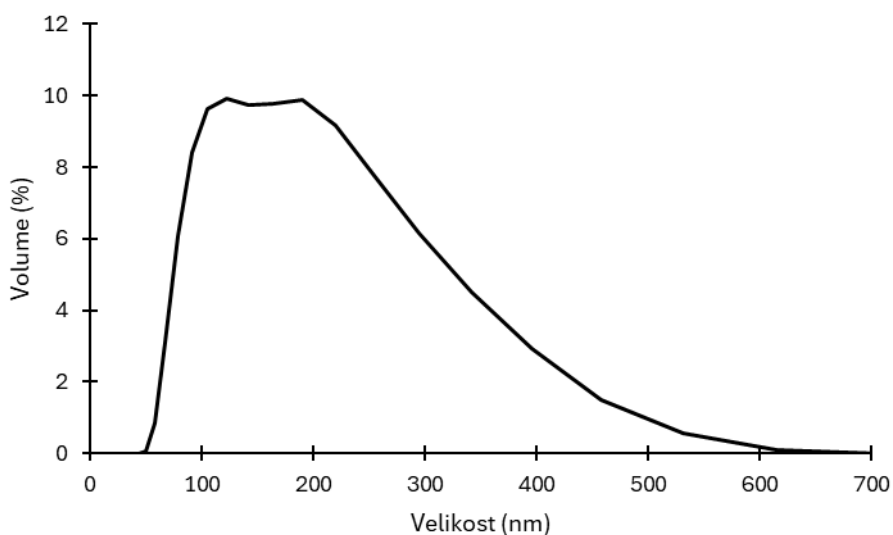
## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Liposomy bez enkapsulované aktivní látky

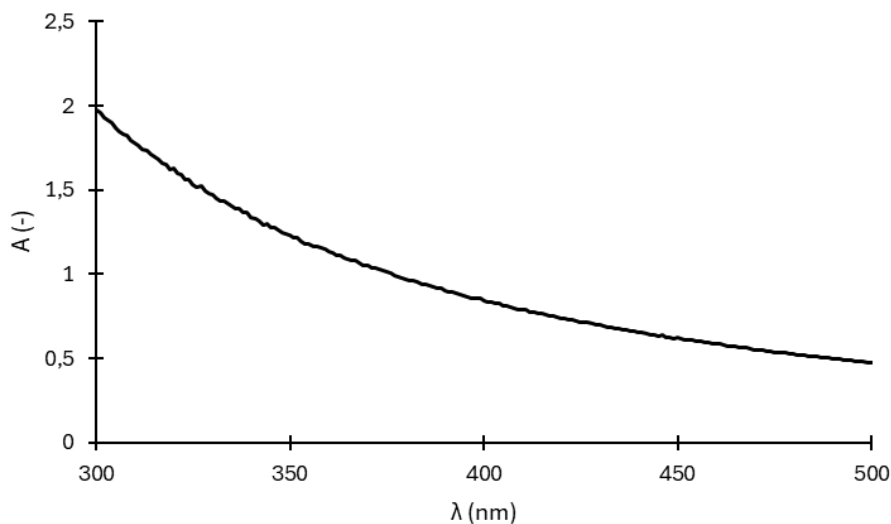
Byly připraveny liposomy bez enkapsulovaného léčiva s velikostí  $164,20 \pm 2,59$  nm. Kdy PDI bylo  $0,1717 \pm 0,0118$ . Při měření velikosti byla zjištěna i frekvenční distribuce vezikul a korelogram. Všechna tato získaná data jsou průměrem tří měření. Následně byla změřena absorbance liposomů v rozmezí 300–500 nm.



Obrázek 8: Korelogram pro měření velikosti v závislosti na čase



Obrázek 9: Frekvenční distribuce velikosti liposomu

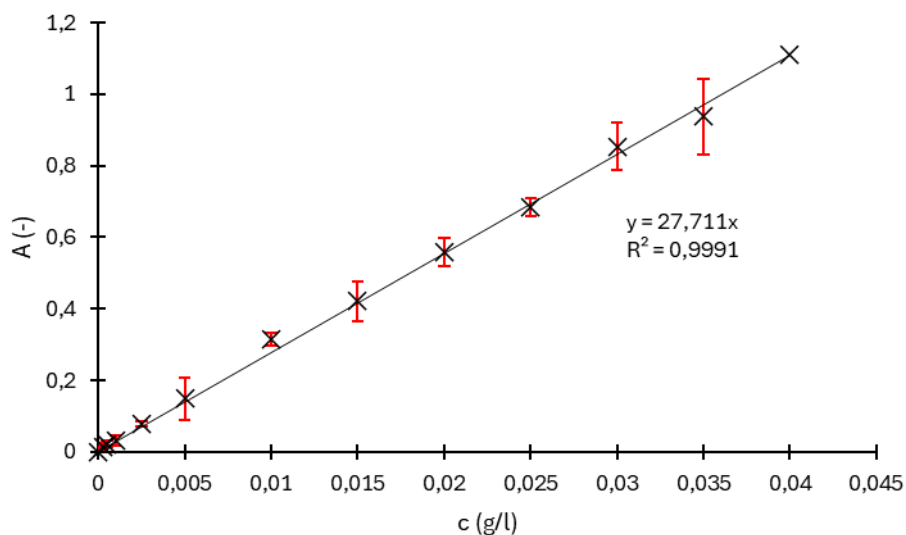


Obrázek 10: Závislost absorbance na vlnové délce pro liposomy bez enkapsulované aktivní látky

## 5.2 Enkapsulace kalceinu do liposomu

### 5.2.1 Kalibrační řada kalceinu

Před samotnou enkapsulací hydrofilního léčiva do liposomu byla připravena kalibrační řada závislosti absorbance na koncentraci pro kalcein se začínající koncentrací 0,00025 g/l a konečnou koncentrací 0,04 g/l. Tato kalibrační řada byla provedena třikrát, jednotlivé kalibrační křivky jsou uvedeny v poslední kapitole (Přílohy).

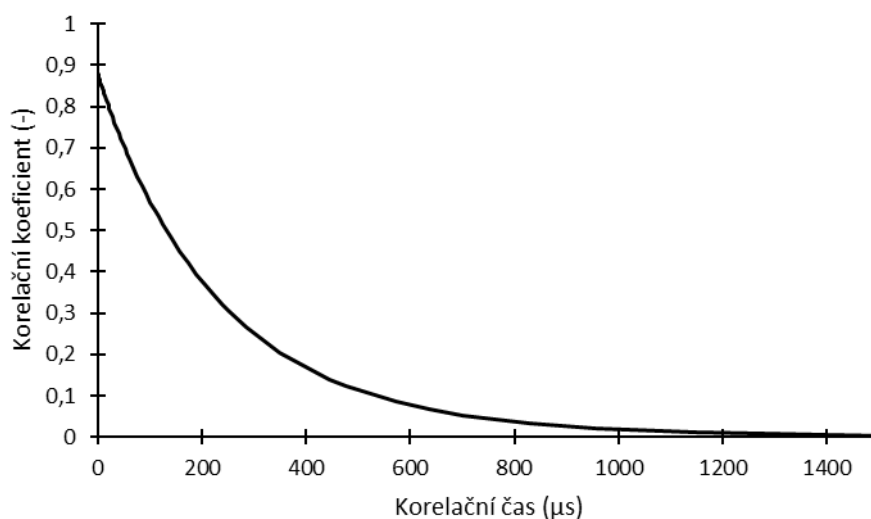


Obrázek 11: Kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci pro kalcein

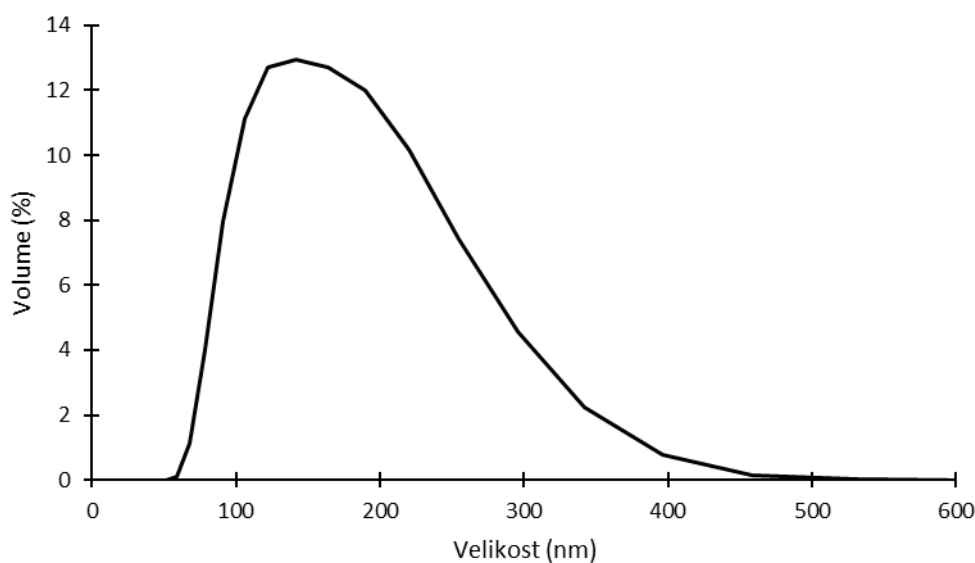
### 5.2.2 Vlastnosti liposomů před dialýzou

Vlastnosti liposomů, které byly sledovány, jsou velikost vezikul a zeta potenciál. Velikost byla kontrolována pomocí mini extrudéru s membránou pro vezikuly o velikosti 0,1  $\mu\text{m}$ . Membránou prošly liposomy o větším průměru, protože to jsou částice, které jsou elastické a dokážou se do určitého bodu deformačně přizpůsobit.

Velikost liposomů byla měřena při každém opakování třikrát, tzn. že konečná hodnota je průměr devíti měření. Tato hodnota byla stanovena na  $156,68 \pm 3,28$  nm. PDI bylo stanoveno stejným způsobem na hodnotu  $0,1134 \pm 0,0232$ . Při měření byl získán korelogram a graf frekvenční distribuce. Obrázek 12 a Obrázek 13 ukazují zptůměřovaná data. Pro jednotlivá opakování byly vytvořeny grafy se třemi opakujícími měření, tyto grafy jsou uvedeny v poslední kapitole (Přílohy).



Obrázek 12: Korelogram pro měření velikosti v čase před dialýzou



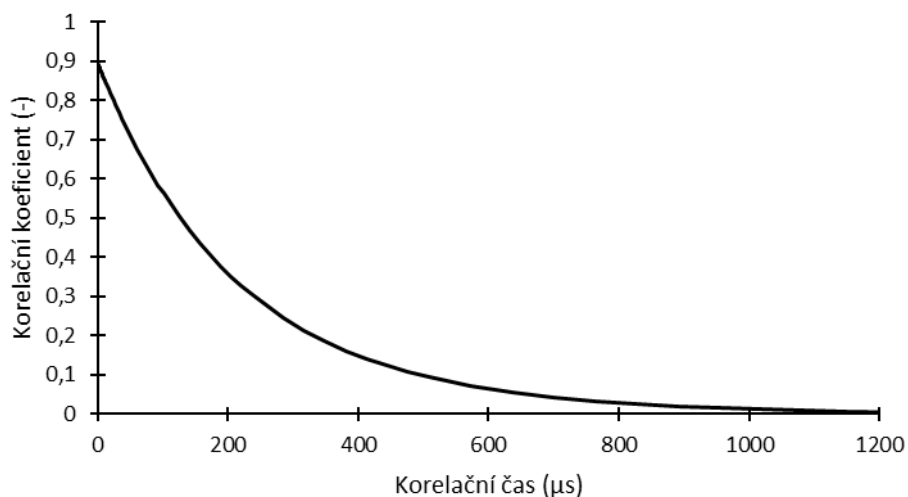
Obrázek 13: Frekvenční distribuce velikosti liposomů před dialýzou

Zeta potenciál byl změřen při každém opakování pětkrát, konečná hodnota je tedy průměrem patnácti hodnot. Tato hodnota byla stanovena na  $-25,17 \pm 1,88$  mV. Což značí, že připravené liposomy mají dobrou stabilitu.

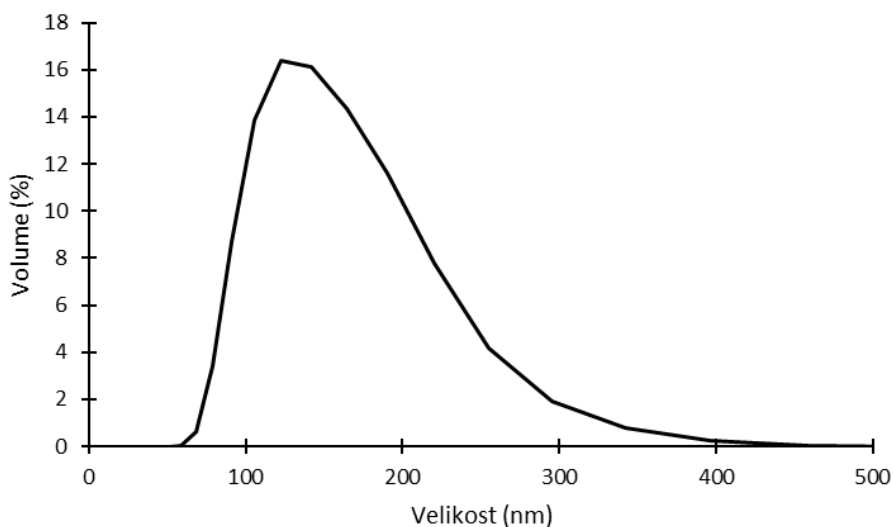
### 5.2.3 Vlastnosti liposomů po dialýze

Po dobu 72 hodin byl roztok s liposomy ve střívku 50 kD, kdy ve vnějším okolí byla přítomna deionizovaná voda, která byla použita při přípravě liposomů. Poté co byla dialýza ukončena byly liposomy znovu za stejných podmínek změřeny pro velikost a zeta potenciál.

Změřená průměrná velikost byla změřena na  $147,78 \pm 10,87$  nm, což je menší hodnota než před dialýzou. To je způsobeno pórovitostí membrány dialyzačního střívka, kdy dialýza ovlivnila i PDI, které bylo stanoveno na  $0,0663 \pm 0,0337$ . Obrázek 14 a Obrázek 15 ukazují zprůměrovaná data pro korelogram a graf frekvenční distribuce. Grafy s viditelnými jednotlivými opakování jsou uvedeny v poslední kapitole (Přílohy).



Obrázek 14: Korelogram pro měření velikosti v čase po dialýze



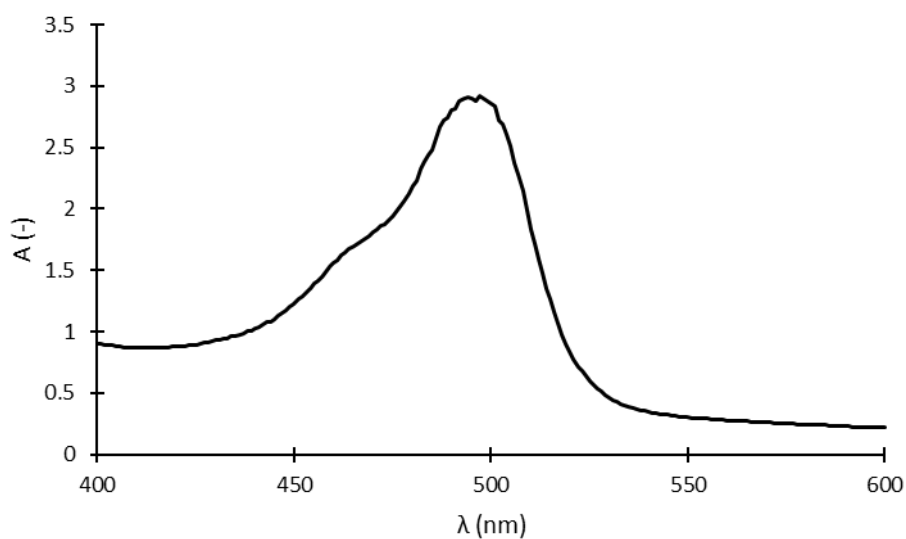
Obrázek 15: Frekvenční distribuce velikosti liposomů po dialýze

Zeta potenciál byl změřen též stejným způsobem jako před dialýzou a byl určen na  $-15,91 \pm 3,34$  mV. Což je poměrně méně než před dialýzou, to poukazuje na nižší stabilitu.

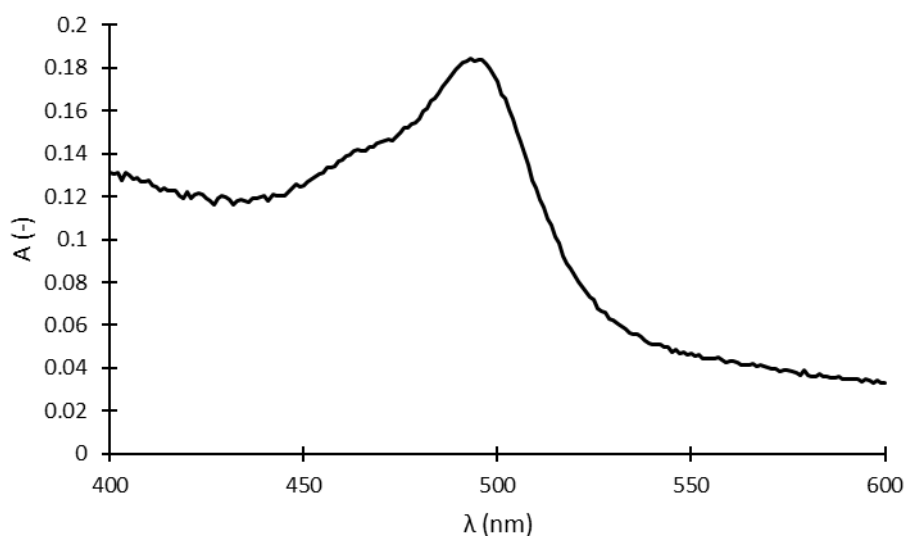
#### 5.2.4 Výpočet účinnosti enkapsulace kalceinu

Aby bylo možno vypočítat účinnost enkapsulace byla změřena absorbance liposomů s kalceinem před dialýzou a po dialýze. Z těchto dat byla vypočítána účinnost z Lambertova-Beerova zákona.

Absorbance kalceinu v závislosti na vlnové délce byla před dialýzou změřena třikrát a za stejných podmínek byla stanovena i po dialýze. Grafy znázorňují průměry těchto tří hodnot. V poslední kapitole (Přílohy) jsou uvedeny grafy na kterých lze vidět všechna opakování.



Obrázek 16: Závislost absorbance na vlnové délce pro koncentraci celkového kalceinu v roztoku před dialýzou



Obrázek 17: Závislost absorbance na vlnové délce pro koncentraci enkapsulovaného kalceinu po dialýze

Koncentrace kalceinu před a po dialýze se změnila, protože během dialýzy kalcein, který byl přítomen v okolním roztoku (volný), byl póry převeden do roztoku deionizované vody přes póry střívka pro vyrovnání koncentrací. Voda byla pravidelně vyměňována pro co nejúčinnější odstranění volné látky.

Účinnost enkapsulace byla vypočítána pro každé opakování zvlášť. Nejprve bylo potřeba zjistit koncentraci kalceinu, který je enkapsulovaný v liposomech. Ta byla vypočtena z Laamber-Beerova zákona. Pro tento výpočet je ale potřeba zjistit molární absorpční konstantu  $\varepsilon$ , ta byla vypočtena s využitím maximální absorbance kalceinu před dialýzou, protože zde je kalcein o známé koncentraci, a molární absorpční konstanta byla neznámou. Využitou rovnicí je,

$$\varepsilon = \frac{A}{l \cdot c} \quad (0.4)$$

Pomocí této konstanty a maximální absorbance kalceinu po dialýze byla vypočtena výsledná koncentrace kalceinu, za využití klasického znění Laamber-Beerova zákona.

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot l} \quad (0.5)$$

Následná výsledná koncentrace byla vynásobena číslem 8, protože původní roztok liposomů byl v objemu 3 ml a ta byla po dialýze naředěna do 25 ml odměrné baňky. S tímto ředěním se musí počítat. Výsledná koncentrace musí být vždy nižší než koncentrace původní, což bylo splněno u všech tří opakování. Následně bylo s koncentracemi počítáno pro zjištění účinnosti enkapsulace podle rovnice (0.2). Všechny tři hodnoty účinností byly zprůměrovány do jedné hodnoty s odchylkou. Účinnost enkapsulace tedy vyšla  $\eta = 50,21 \pm 6,47 \%$ . Tabulka 1 uvádí konkrétní výsledky jednotlivých opakování.

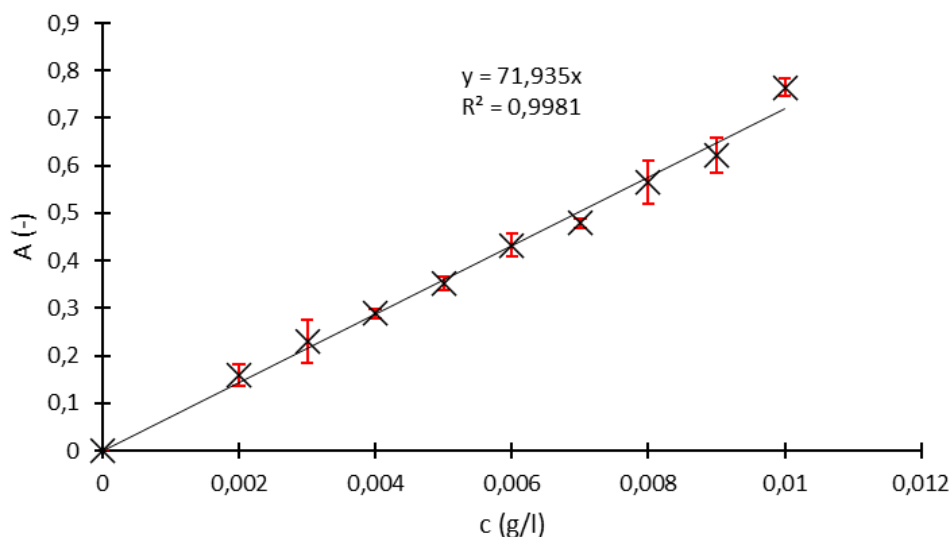
*Tabulka 1: Hodnoty potřebné k výpočtu účinnosti a samotné vypočtené účinnosti pro tři opakování*

Opakování	$\varepsilon$ (dm <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> )	c (g/l)	$\eta$ (%)
1	20.2533	0.0656	43.71
2	20.7133	0.0784	52.26
3	16.7930	0.0824	54.67

## 5.3 Enkapsulace apigeninu do liposomu

### 5.3.1 Kalibrační řada apigeninu

Před samotnou enkapsulací byla vytvořena kalibrační řada apigeninu rozpuštěného v absolutním ethanolu. Tato kalibrační řada byla vytvořena v rozsahu 0,002 g/l až po 0,01 g/l. Tato řada byla připravena a změřena třikrát. Všechna tři měření jsou uvedena v poslední kapitole (Přílohy).

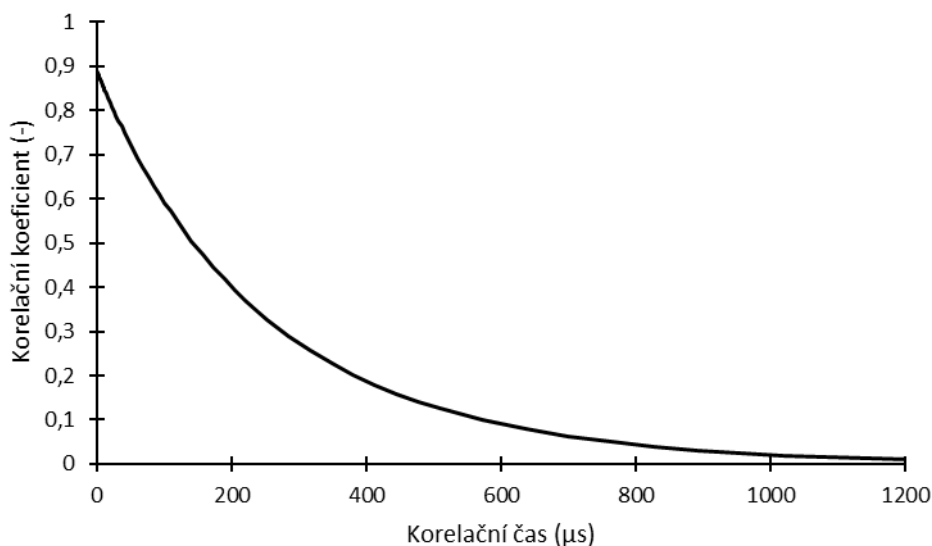


Obrázek 18: Kalibrační křivka závislosti absorpance na koncentraci apigeninu

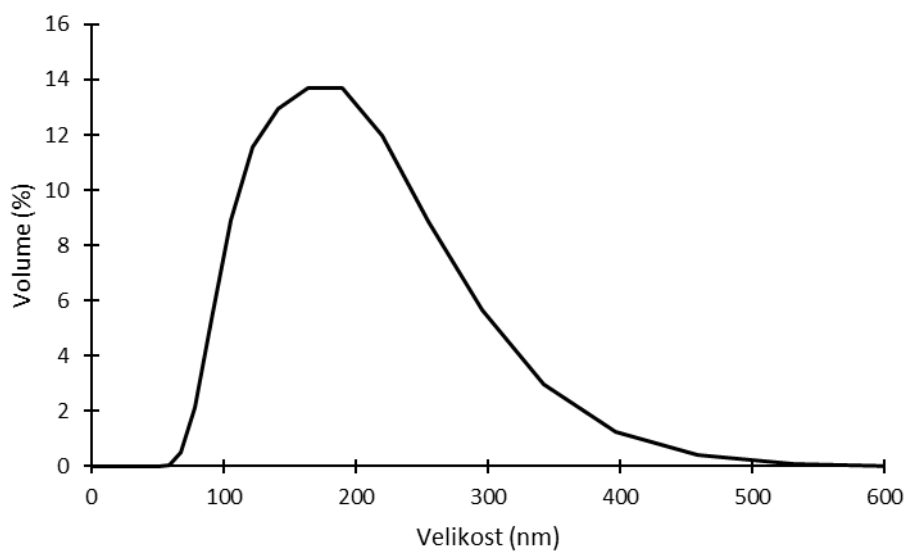
### 5.3.2 Vlastnosti liposomů před centrifugací s enkapsulovaným apigeninem

Vlastnosti, které byly sledovány byla velikost a zeta potenciál, stejně jako v případě s hydrofilní látkou. Velikost a frekvenční distribuce byla kontrolována už dříve zmíněným mini extrudérem s membránou na 0,1  $\mu\text{m}$  o šířce 19 mm. Membránou byly schopny projít i liposomy o větším průměru díky schopnosti liposomů se do určité míry deformačně přizpůsobit.

Celý experiment byl proveden třikrát a při každém jednotlivém měření přístroj poskytl tři hodnoty. Konečný výsledek je tedy průměrem devíti hodnot. Velikost vezikul byla tedy stanovena na  $167,00 \pm 1,26$  nm. Stejným způsobem byla stanovena i hodnota PDI na  $0,1087 \pm 0,0303$ . Obrázek 19 a Obrázek 20 ukazují zprůměrovaná data pro korelogram a pro graf frekvenční distribuce. Hodnoty z každého opakování jsou uvedeny v poslední kapitole (Přílohy).



Obrázek 19: Korelogram pro měření velikosti v čase před centrifugací



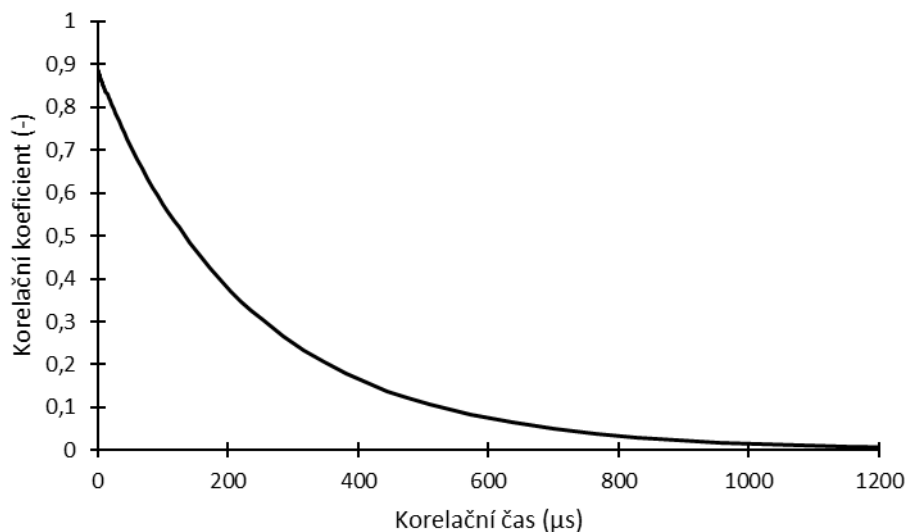
Obrázek 20: Graf frekvenční distribuce pro měření velikosti před centrifugací

Zeta potenciál byl při každém opakování změřen pětkrát což znamená, že konečná hodnota je průměrem z patnácti hodnot. Tímto způsobem byl zeta potenciál stanoven na  $-28,267 \pm 0,945$  mV. Tato hodnota značí, že připravené liposomy jsou dobré stability.

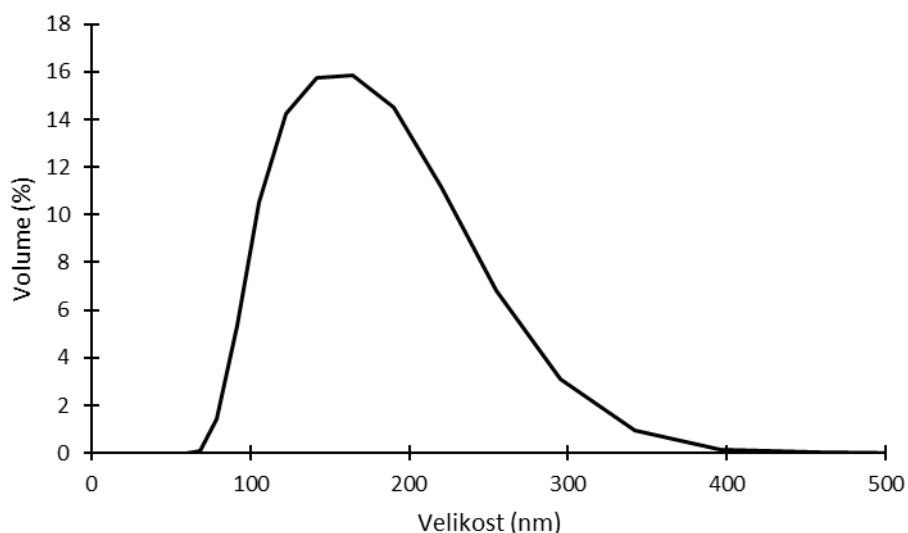
### 5.3.3 Vlastnosti liposomu po centrifugaci

Po změření vlastností vezikul s enkapsulovaným apigeninem byl roztok s liposomy vlit do filtrační zkumavky s membránou cut-off 30 K a byl zcentrifugován při 2500 ot/min po dobu 30 minut. Po této fázi prošla voda přítomná v roztoku membránou do spodní části zkumavky, avšak hydrofobní apigenin nemohl projít společně s vodou a zachytil se na membránách filtrační zkumavky nebo byl adsorbován na povrchu liposomů. Z toho důvodu byl připraven 10 % ethanol, ten byl přidán ve 2 ml k roztoku liposomu a tento roztok byl znovu zcentrifugován při 3000 ot/min po dobu 15 minut. Výsledný supernatant, který obsahoval 10 % ethanol s rozpuštěným apigeninem byl naředěn na 10 ml absolutním ethanolem. Liposomy stále neprošly membránou a byly nepoškozené, bylo možno změřit jejich vlastnosti stejným způsobem jako před centrifugací.

Vlastnosti byly změřeny za stejných podmínek jako v kapitole 5.3.2, tzn. že konečná hodnota je opět průměrem devíti hodnot. Velikost byla liposomu stanovena na  $157,44 \pm 6,66$  nm. Velikost je tedy nižší než před centrifugací. To je pravděpodobně způsobeno tím, že byl apigenin navázán i membráně liposomu a tím zvětšoval jejich velikost, ale po následném omytí 10 % ethanolem se apigenin na membráně rozpustil. Stejným způsobem byla stanovena hodnota PDI na  $0,0826 \pm 0,0150$ . Obrázek 21 a Obrázek 22 znázorňují zprůměrovaná data pro korelogram a pro graf frekvenční distribuce získaná přístrojem Zetasizer. Jednotlivé grafy z každého opakování jsou uvedeny v poslední kapitole (Přílohy).



Obrázek 21: Korelogram pro měření velikosti v čase po centrifugaci

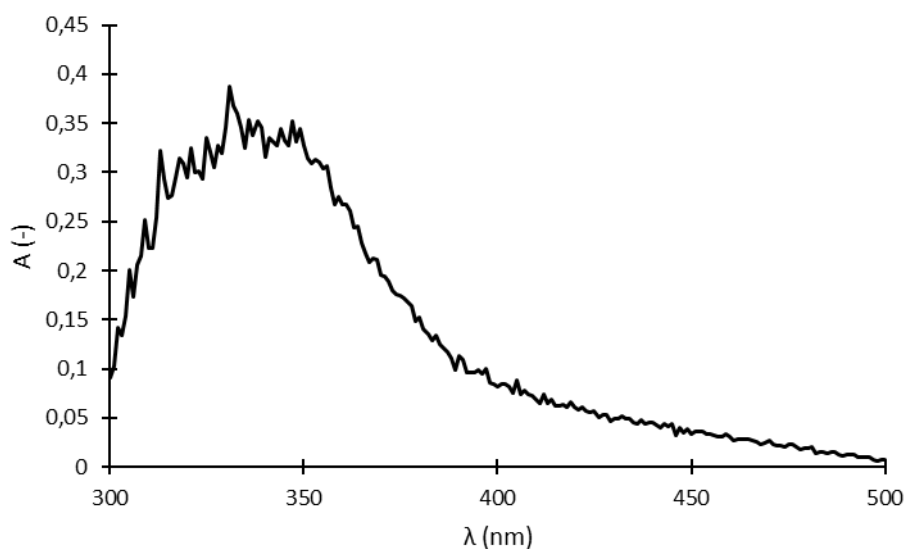


Obrázek 22: Frekvenční distribuce pro měření velikosti po centrifugaci

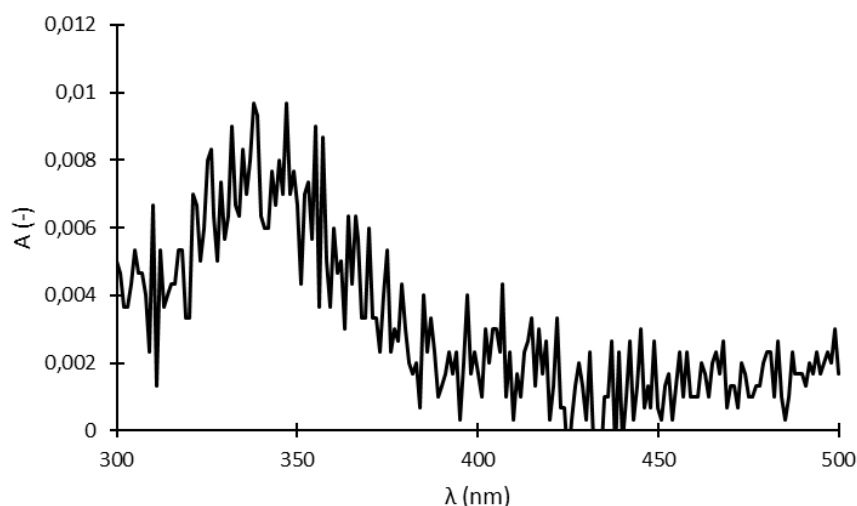
Zeta potenciál byl stanoven stejným postupem jako před centrifugací, tudíž je konečný výsledek průměrem patnácti hodnot. Zeta potenciál byl tedy stanoven na  $-29,89 \pm 2,14$  mV. Což značí že centrifugace ani omytí liposomů 10 % ethanolem neovlivnilo negativně stabilitu.

### 5.3.4 Výpočet účinnosti enkapsulace apigeninu

Aby bylo možno vypočítat účinnost enkapsulace, byly měřeny absorbance apigeninu před a následně po centrifugaci. Z těchto grafů byla následně vypočtena koncentrace apigeninu v roztoku a následně volného podle Lambert-Beerova zákonu. Obrázek 23 a Obrázek 24 jsou grafy průměrných hodnot ze tří opakování. Jednotlivé grafy opakování jsou uvedeny v poslední kapitole (Přílohy).



Obrázek 23: Závislost absorbance na vlnové délce pro koncentraci celkového apigeninu v roztoku před centrifugací



Obrázek 24: Závislost absorpce na vlnové délce pro koncentraci volného apigeninu po centrifugaci

Absorbance apigeninu v měřeném roztoku před a po centrifugaci se změnila z toho důvodu, že první změřená absorbance je pro celkovou koncentraci apigeninu v roztoku. Zatím co druhá je pouze volný apigenin. Pro každé opakování byla účinnost vypočítána jednotlivě.

V prvním kroku bylo potřeba zjistit koncentraci volného apigeninu, k tomu byl využit Lambert-Beerův zákon. Zde jsou, ale dvě neznámé tudíž bylo potřeba zjistit hodnotu molární absorpční konstanty  $\epsilon$ , k tomu byla použita maximální absorbance před dialýzou, protože zde je apigenin stále ještě o známé koncentraci. Využitou rovnicí byla,

$$\epsilon = \frac{A}{l \cdot c} \quad (0.6)$$

Poté co byla získána potřebná konstanta byla dosazena do původního znění Lambert-Beerova zákona společně s maximální absorpční apigeninu po centrifugaci, kdy neznámou byla koncentrace.

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot l} \quad (0.7)$$

Následná koncentrace byla vynásobena číslem 3,33 což je vypočtený poměr ředění. Po centrifugaci byl totiž roztok naředěn na 10 ml ze 3 ml, tak aby se koncentrace určila v původních 3 ml. Výsledná koncentrace musí být vždy nižší než původní koncentrace, což bylo splněno u všech tří opakování. Účinnost enkapsulace byla následně vypočítána pomocí rovnice (0.2). Konečná hodnota je tedy průměrem tří výsledků se směrodatnou odchylkou. Tato hodnota byla stanovena na  $\eta = 88,93 \pm 0,59 \%$ . Tabulka 2 znázorňuje výsledky jednotlivých opakování.

Tabulka 2: Tabulka hodnot potřebných pro výpočet účinnosti enkapsulace a samotné výsledky účinnosti

Opakování	$\varepsilon$ ( $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )	$c$ (g/l)	$\eta$ (%)
1	7,28	0,0046	88,58
2	7,33	0,0045	88,63
3	10,38	0,0042	89,58

Takto vysoké výsledky jsou možné při správné přípravě a enkapsulaci aktivní látky, ale hlavně pokud je splněna podmínka, kde koncentrace aktivní látky v roztoku je mnohem menší než koncentrace liposomu. Koncentrace použité látky byla 0,04 g/l a koncentrace liposomu byla 5 mM.

## 6 ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce byly připraveny liposomy metodou rehydratace fosfolipidového filmu. Pasivní enkapsulací byly do liposomů začleněny dvě biologicky aktivní látky: hydrofilní kalcein a hydrofobní apigenin. K dispergaci připravených vezikul a kontrole jejich velikosti byl využit extrudér. Jako separační metody pro volnou látku byla zvolena dialýza (pro kalcein) a filtrační centrifugace (pro apigenin). U obou látek byla následně vypočtena účinnost jejich enkapsulace a zanalyzovány vlastnosti liposomů s touto enkapsulovanou aktivní látkou.

Bylo zjištěno, že při začlenění apigeninu do membrány liposomů bylo docíleno mnohem vyšší účinnosti enkapsulace než u kalceinu enkapsulovaného do liposomálního jádra. Toho bylo pravděpodobně dosaženo v důsledku nižší koncentrace apigeninu v počátečním roztoku, což umožnilo jeho skoro úplné začlenění. Naopak u kalceinu nebyl tento rozdíl koncentrací tak výrazný, což vedlo k nižší účinnosti enkapsulace.

Při sledování vlastností vždy před a po separačních metodách bylo zjištěno, že při metodě dialýzy se snížila stabilita připravených liposomů, avšak hodnota PDI se zlepšila. Při metodě filtrační centrifugace se zmenšila velikost vezikul, což značilo, že před centrifugací byl na vnější straně membrány nejspíše zachycen apigenin, který byl během separace odstraněn. Hodnota PDI se výrazněji nezměnila a stabilita připravených liposomů se malinko zlepšila. Metoda filtrační centrifugace se tedy jeví jako lepší volba pro separaci volné aktivní látky. V budoucnu by bylo vhodné otestovat vliv typů pufrů na stabilitu a účinnost enkapsulace.

## 7 LITERATURA

- [1] VAN HOOGEVEST, Peter a WENDEL, Armin. The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. Online. *European Journal of lipid Science and Technology*. 2014. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ejlt.201400219>. [cit. 2024-10-23].
- [2] MANNING, Schonna R. Microalgal lipids: biochemistry and biotechnology. Online. *Current Opinion in Biotechnology*. 2022, s. 1-7. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166921002056>. [cit. 2024-12-04].
- [3] VOCETKOVÁ, Karolína. Lipozomy, jejich charakterizace, příprava a inkorporace do nanovláken. Online. 2014, s. 11-17. Dostupné z: <https://ojs.cvut.cz/ojs/index.php/CTJ/article/view/4350/4210>. [cit. 2024-10-23].
- [4] HADAŠOVÁ, Eva. Lipozomální lékové formy. Online. *Remedia*. 2009. Dostupné z: <https://www.remedia.cz/rubriky/klinicka-farmakologie-a-farmacie/lipozomalni-lekove-formy-1030/>. [cit. 2024-10-23].
- [5] BHAGYA, N. a CHANDRASHEKAR, K.R. Liposome encapsulated anticancer drugs on autophagy in cancer cells - Current and future perspective. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2023, roč. 642. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517323005252>. [cit. 2024-12-21].
- [6] NSAIRAT, Hamdi; KHATER, Dima; SAYED, Usama; ODEH, Fadwa; AL BAWAB, Abeer et al. Liposomes: struktura, kompozice, typy, a klinické aplikace. Online. *Heliyon*. 2022. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S240584402200682X>. [cit. 2024-10-23].
- [7] MEURE, Louise A.; FOSTER, Neil R. a DEHGHANI, Fariba. Conventional and Dense Gas Techniques for the Production of Liposomes: A Review. Online. *AAPS PharmSciTech*. 2008, roč. 9, č. 3. ISSN 1530-9932. Dostupné z: <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9097-x>. [cit. 2024-12-21].
- [8] CHAVES, Matheus Andrade; FERREIRA, Letícia S.; BALDINO, L.; PINHO, Samantha a REVERCHON, E. Current Applications of Liposomes for the Delivery of Bioactives: A Review on the Encapsulation of Vitamins. Online. 2023. Dostupné z: <https://doi.org/10.20944/preprints202304.0229.v1>. [cit. 2025-02-25].
- [9] NEDOVIC, Viktor; KALUSEVIC, Ana; MANOJLOVIC, Verica; LEVIC, Steva a BUGARSKI, Branko. An overview of encapsulation technologies for food applications. Online. *Procedia Food Science*. 2011, s. 1806-1815. Dostupné z:

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211601X11002665>. [cit. 2024-10-23].
- [10] MUI, Barbara; CHOW, Laurie a HOPE, Michael J. Extrusion Technique to Generate Liposomes of Defined Size. Online. *Liposomes, Part A. Methods in Enzymology*. 2003, roč. 367, s. 3-14. ISBN 9780121822705. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)67001-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)67001-1). [cit. 2024-12-21].
- [11] FANG, Zhongxiang a BHANDARI, Bhesh. Encapsulation of polyphenols – a review. Online. *Trends in Food Science and Technology*. 2010, s. 510-523. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224410001925>. [cit. 2024-10-23].
- [12] BIAN, Juan; GIROTTI, James; FAN, Yuchen; LEVY, Elizabeth S.; ZANG, Nanzhi et al. Fast and versatile analysis of liposome encapsulation efficiency by nanoParticle exclusion chromatography. Online. *Journal of Chromatography A*. 2022, roč. 1662. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462688>. [cit. 2025-03-24].
- [13] SINGLA, Ritika. Dialysis. Online. In: *Vedantu*. 2024. Dostupné z: <https://www.vedantu.com/chemistry/dialysis>. [cit. 2024-10-23].
- [14] *Basic in Centrifugation*. Online. Eppendorf. 2019. Dostupné z: <https://www.eppendorf.com/us-en/lab-academy/life-science/cell-biology/basics-in-centrifugation/>. [cit. 2025-03-04].
- [15] SUR, Surojit; FRIES, Anja C.; KINZLER, Kenneth W.; ZHOU, Shibin a VOGELSTEIN, Bert. Remote loading of preencapsulated drugs into stealth liposomes. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014, roč. 111, č. 6, s. 2283-2288. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.1324135111>. [cit. 2024-12-25].
- [16] MANNA, Dina. *Active Encapsulation of Imiquimod in Liposomes with Dendrimers*. Diplomová práce. Hradec Králové: Karlova univerzita, lékařská fakulta Hradec králové, 2022.
- [17] SHERESTHA, Prativa. UV-Vis Spectroscopy: Principle, Parts, Uses, Limitations. Online. In: *Microbe Notes*. 2023. Dostupné z: <https://microbenotes.com/uv-vis-spectroscopy/>. [cit. 2024-10-23].
- [18] BELICIUM, C.M. a MORARU, C.I. Effect of solvent and temperature on the size distribution of casein micelles measured by dynamic light scattering. Online. *Journal of Dairy Science*. 2009, s. 1826-1839. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030209704977>. [cit. 2024-10-23].

- [19] BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? Online. *Journal of Controlled Release*. 2016, roč. 235, s. 337-351. Dostupné z: <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>. [cit. 2025-03-29].
- [20] DANAELI, M.; DEGHANKHOLD, M.; ATAELI, S.; HASANZADEH DAVARANI, F.; JAVANMARD, R. et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. Online. *Lipid-Based Dosage Form*. 2018. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1999-4923/10/2/57>. [cit. 2024-10-23].
- [21] PITTU, Alessio; PANNUZZO, Martina; CASULA, Luca; PIREDDU, Rosa; VALENTI, Donatella et al. Production of liposomes by microfluidics: The impact of post-manufacturing dilution on drug encapsulation and lipid loss. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2024, roč. 664. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124641>. [cit. 2024-12-22].
- [22] MANSUR, Claudia R.E. Lipid nanoparticles containing coenzyme Q10 for topical applications: An overview of their characterization. Online. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2023, roč. 230. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113491>. [cit. 2024-10-24].
- [23] KOZIK, Violetta; PENTAK, Danuta; PAŹDZIOR, Marlena; ZIEBA, Andrzej a BAK, Andrzej. From Design to Study of Liposome-Driven Drug Release Part 1: Impact of Temperature and pH on Environment. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms241411686>. [cit. 2024-10-23].
- [24] *Bezpečnostní list: Kalcein*. 3.1 cs. 2024.
- [25] GUTIÉRREZ, L.; STEPIEN, G.; GUTIÉRREZ, L.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, M.; PARDO, J. et al. Nanotechnology in Drug Discovery and Development. Online. *Comprehensive Medicinal Chemistry III*. 2017, s. 264-295. ISBN 9780128032015. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12292-9>. [cit. 2024-12-23].
- [26] ÖZKIR, Demet; EMEL, Bayol; GÜRTEN, A. Ali a SÜRME, Yavuz. Thermodynamic study and electrochemical investigation of calcein as corrosion inhibitor for Mild steel in Hydrochloric acid solution. Online. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 2013. ISSN 0717-9707. Dostupné z: [https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-97072013000400056](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-97072013000400056). [cit. 2024-10-27].
- [27] SALEHI, Bahare; VENDITTI, Alessandro; SHARIFI-RAD, Mehdi; KRĘGIEL, Dorota; SHARIFI-RAD, Javad et al. The Therapeutic Potential of Apigenin. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, roč. 20, č. 6. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms20061305>. [cit. 2024-12-23].

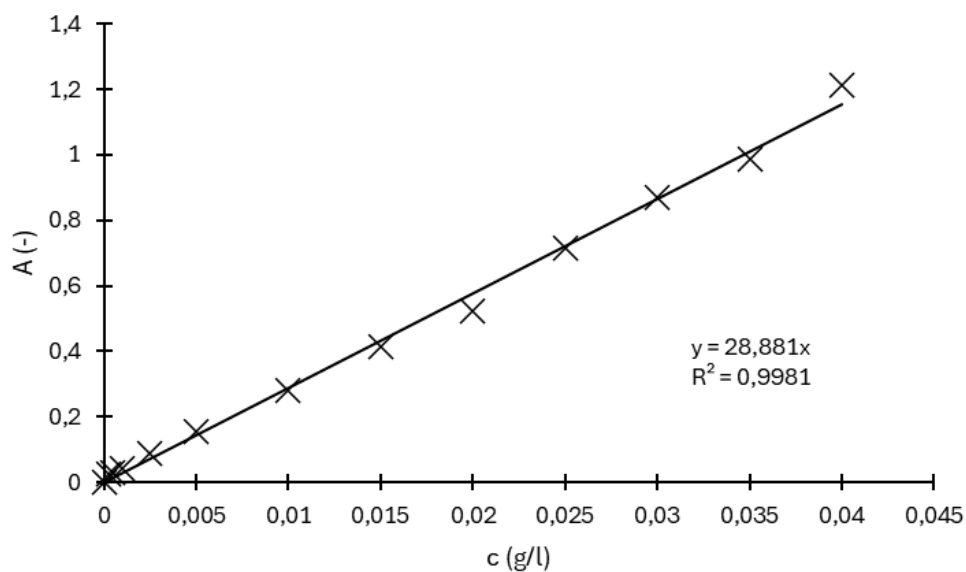
- [28] KIM, Eun-Mi a JEONG, Hwan-Jeong. Liposomes: Biomedical Applications. Online. *Chonnam Medical Journal*. 2021, roč. 57, č. 1. ISSN 2233-7385. Dostupné z: <https://doi.org/10.4068/cmj.2021.57.1.27>. [cit. 2024-12-25].
- [29] XING, Hang; HWANG, Kevin a LU, Yi. Recent Developments of Liposomes as Nanocarriers for Theranostic Applications. Online. *Theranostics*. 2016, roč. 6, č. 9, s. 1336-1352. ISSN 1838-7640. Dostupné z: <https://doi.org/10.7150/thno.15464>. [cit. 2024-12-26].
- [30] TONG, Fulin; YUQI, Zhu; YAQI, Dai; FULIN, Bi; YAN, Lin et al. Research on an effective, accurate, and universally applicable method for dual-loaded liposomes encapsulation efficiency. Online. *Journal of Phamaceutical Sciences*. 2025. Dostupné z: <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.xphs.2025.01.026>. [cit. 2025-02-22].
- [31] DE AC KODEL, Helena; ALIZADEH, Paria; EBRAHIMI, Samad N.; OX MACHADO, Tatiane; PP OLIVEIRA, M. Beatriz et al. Liposomes and Niosomes: New trends and applications in the delivery of bioactive agents for cancer therapy. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2025, roč. 668. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124994>. [cit. 2025-03-15].
- [32] MOAMMERI, Ali; MIRZAEI CHEGENI, Masoumeh; SAHRAYI, Hamidreza; GHAFELEHBASHI, Robabehbeygom; MEMARZADEH, Farkhondeh et al. Current advances in niosomes applications for drug delivery and cancer treatment. Online. *Materials Today Bio*. 2023, roč. 23. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100837>. [cit. 2025-03-15].

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

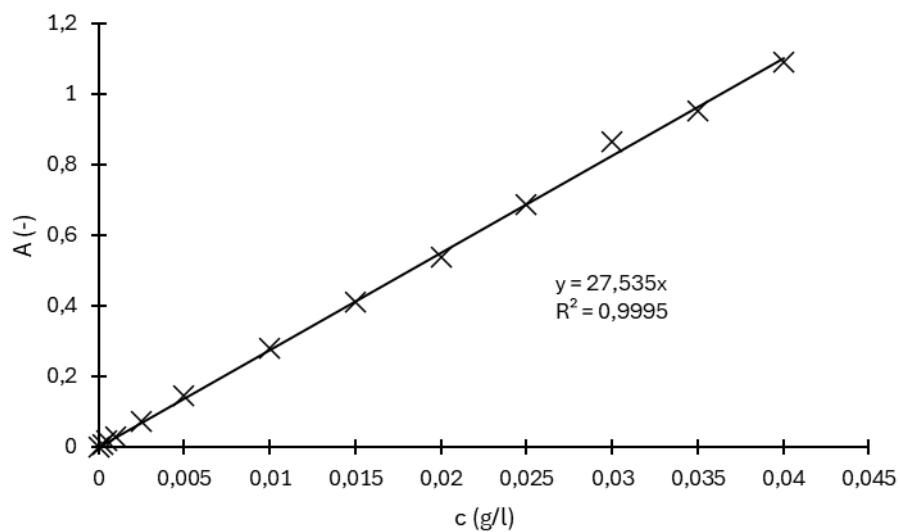
PEG	polyethylenglykol
DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfocholin
PA	kyselina fosfatidová
SUV	malé unilamelární liposomy
MLV	multilamelární liposomy
OVL	oligolamelární liposomy
LUV	multilamelární liposomy
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialové záření
Vis	viditelné záření
DLS	dynamický rozptyl světla
$k_B$	Boltzmannova konstanta
T	teplota
$\mu$	viskozita
t	čas
PDI	Polydisperzní index
EE%	procentuální účinnost enkapsulace
ot/min	otáčky za minutu

## 9 PŘÍLOHY

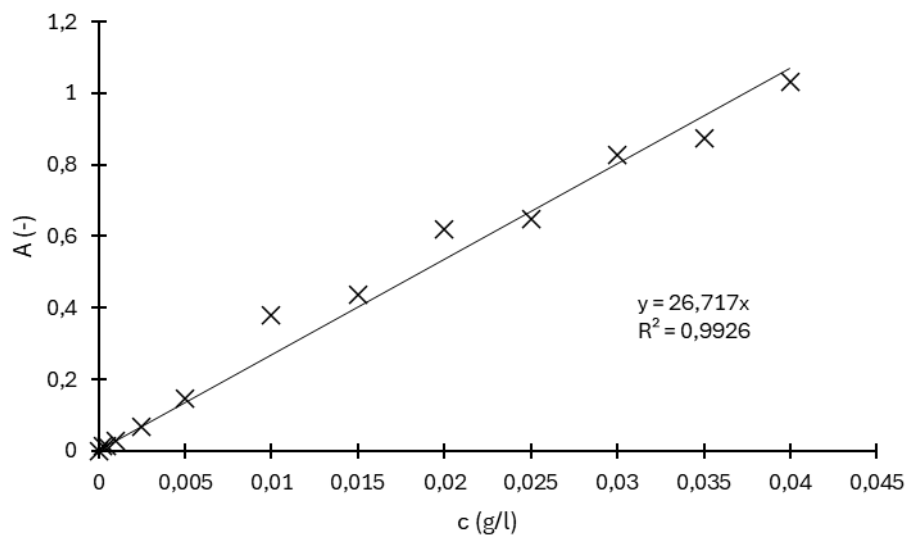
### 9.1 Kalibrační řady kalceinu



Obrázek 25: První měření kalibrační křivky závislosti absorbance na koncentraci pro kalcein



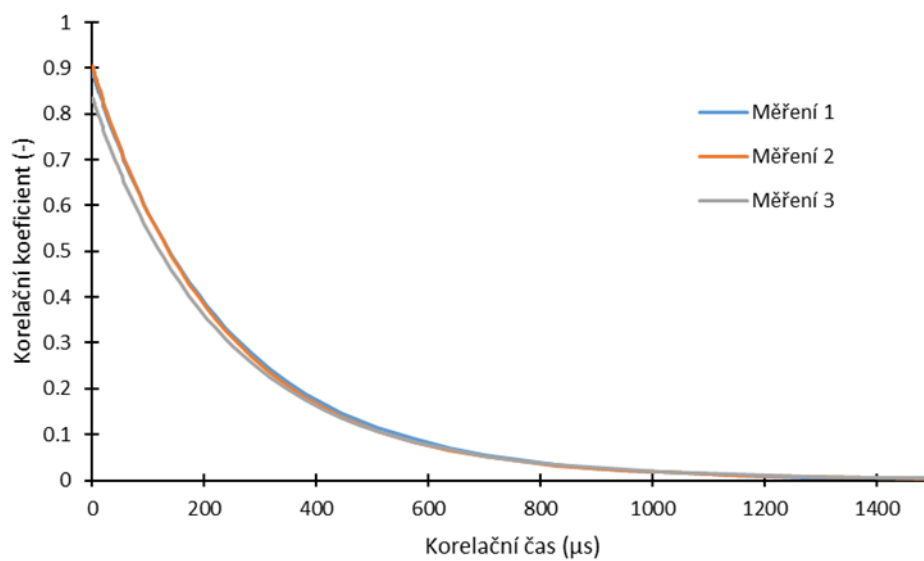
Obrázek 26: Druhé měření kalibrační křivky závislosti absorbance na koncentraci pro kalcein



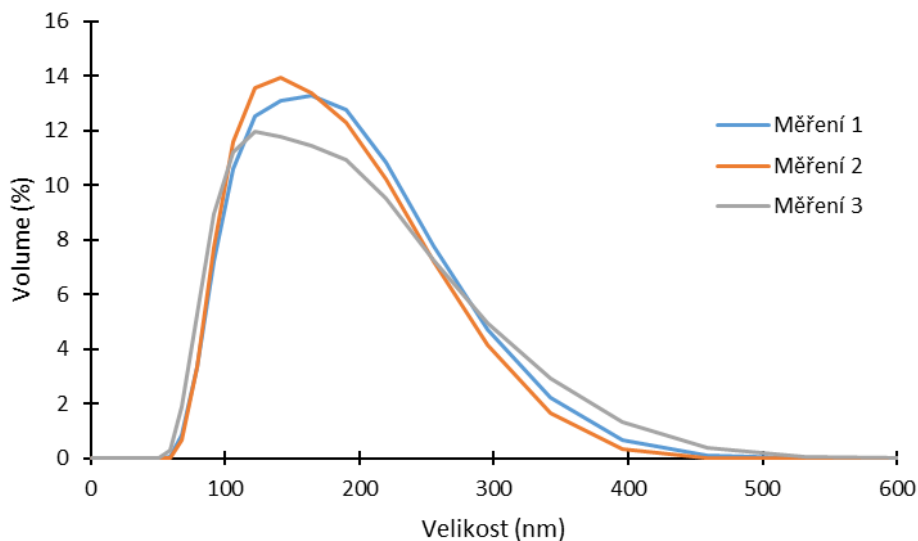
Obrázek 27: Třetí měření kalibrační křivky závislosti absorbance na koncentraci pro kalcein

## 9.2 Vlastnosti liposmů před dialýzou

Při každém opakování byla všechna data změřena třikrát a zprůměrována, následující grafy znázorňují tyto zprůměrovaná data pro všechna tři opakování.



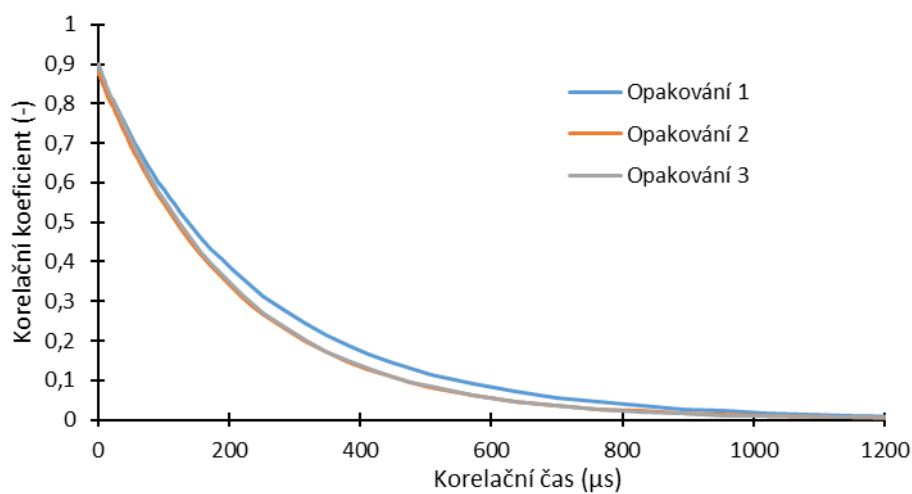
Obrázek 28: Korelogram pro měření velikosti v čase



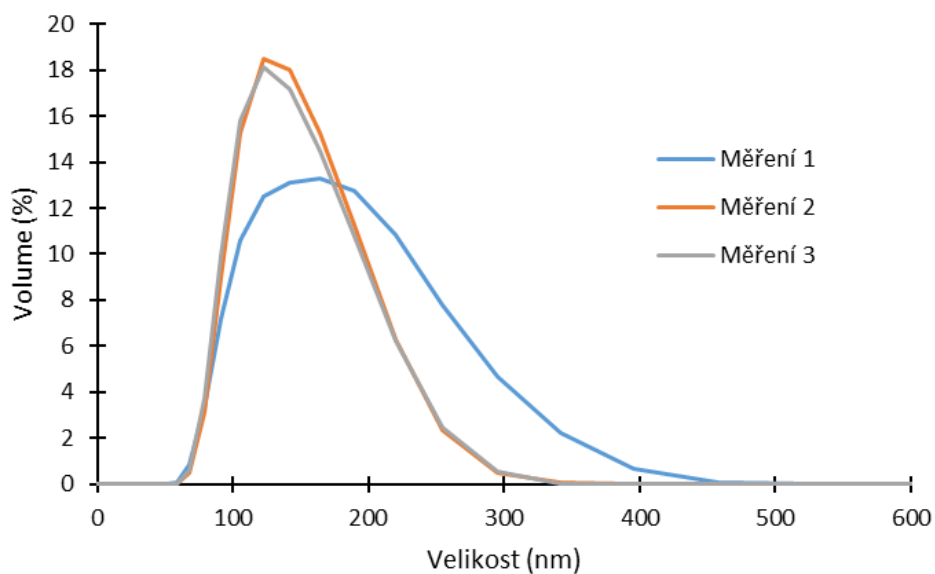
Obrázek 29: Frekvenční distribuce velikosti liposomů před dialýzou

### 9.3 Vlastnosti liposomů po dialýze

Při každém opakování byla všechna data změřena třikrát a zprůměrována, následující grafy znázorňují tyto zprůměrovaná data pro všechna tři opakování.



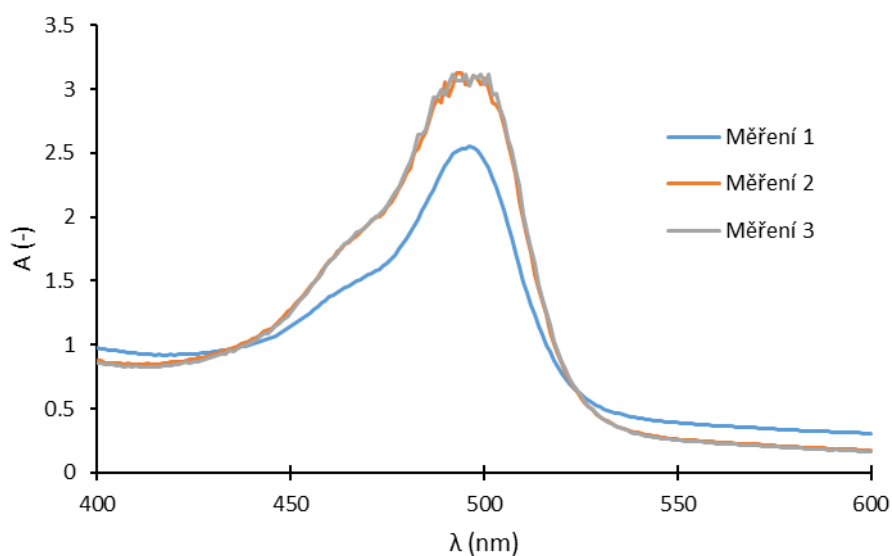
Obrázek 30: Korelogram pro velikost v závislosti na čase po dialýze pro všechna tři opakování



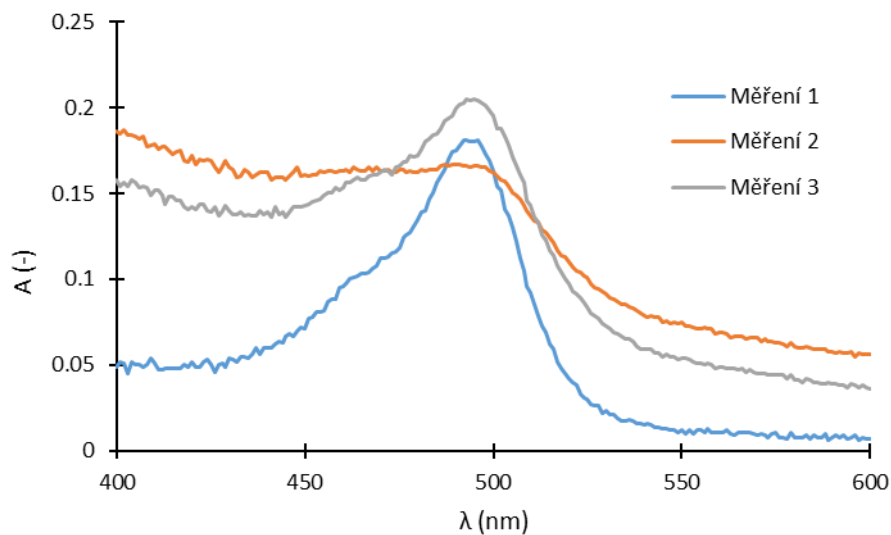
Obrázek 31: Frekvenční distribuce velikostí po dialýze pro všechna tři měření

#### 9.4 Výpočet účinnosti enkapsulace kalceinu

Pro výpočet účinnosti byla využita metoda měření absorpance na vlnové délce, pro každé opakování byla zjištěna absorpance kalceinu před i po dialýze.

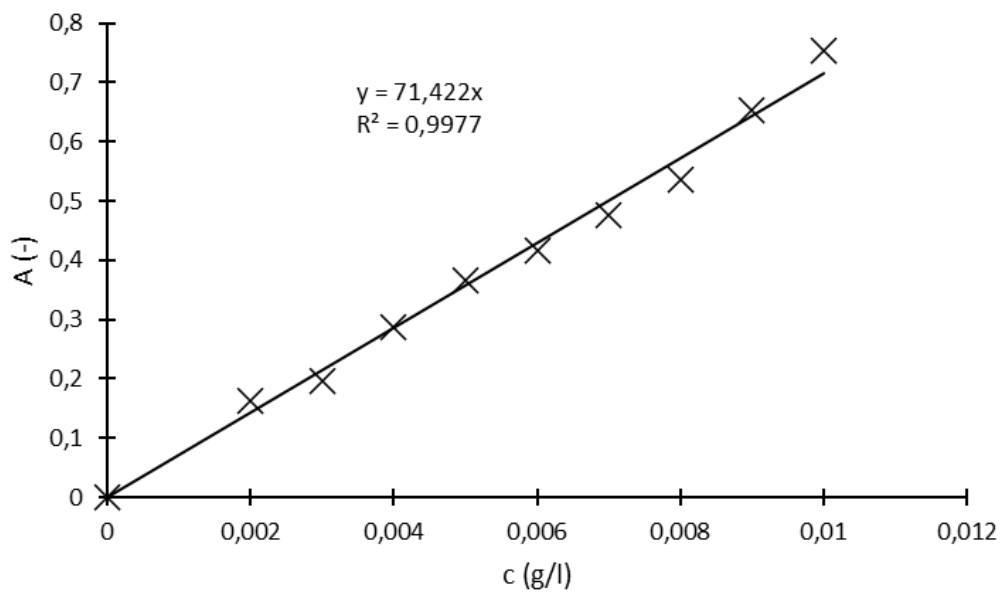


Obrázek 32: Závislost absorpance na vlnové délce pro celkovou koncentraci Kalceinu před dialýzou pro všechna tři opakování

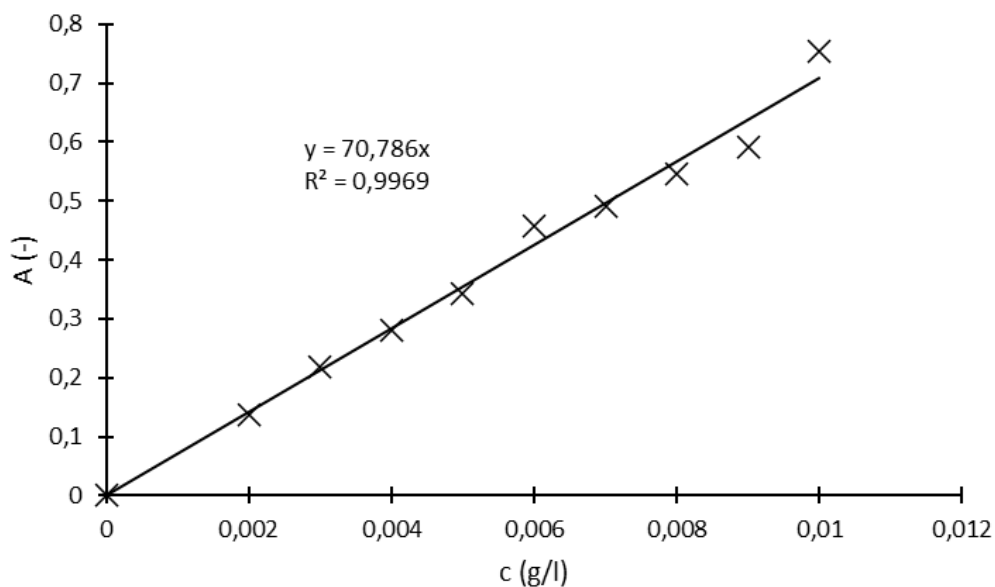


Obrázek 33: Závislost absorpance na vlnové délce pro koncentraci enkapsulovaného kalceinu po dialýze pro všechna tři opakování

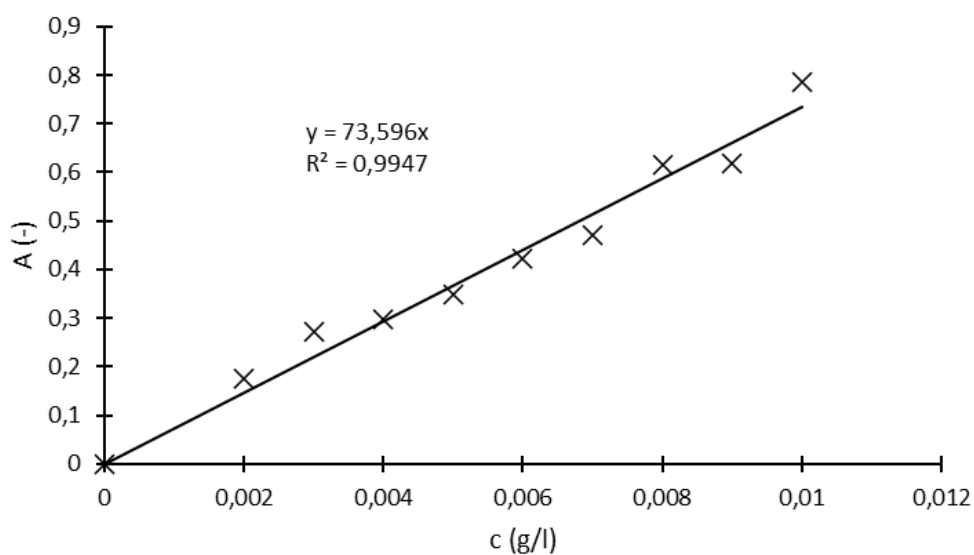
### 9.5 Kalibrační křivky apigeninu



Obrázek 34: Kalibrační křivka závislosti absorpance na koncentraci apigeninu pro první měření



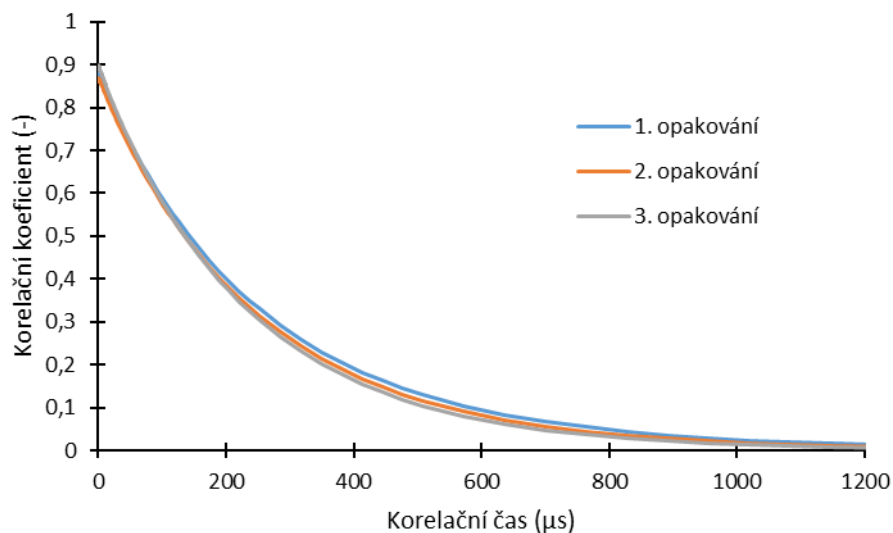
Obrázek 35: Kalibrační křivka závislosti absorpance na koncentraci apigeninu pro druhé měření



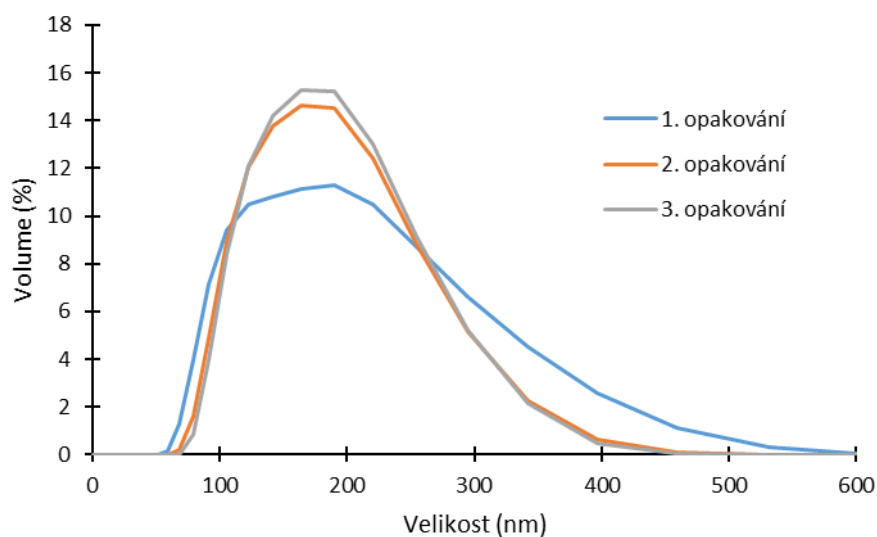
Obrázek 36: Kalibrační křivka pro závislost absorpance na koncentraci apigeninu pro třetí měření

## 9.6 Vlastnosti liposomu před centrifugací

Jednotlivá opakování jsou zakreslena v jednom grafu. Kdy jedno opakování je průměrem tří hodnot, která změřil přístroj Zetasizer v jednom měření.



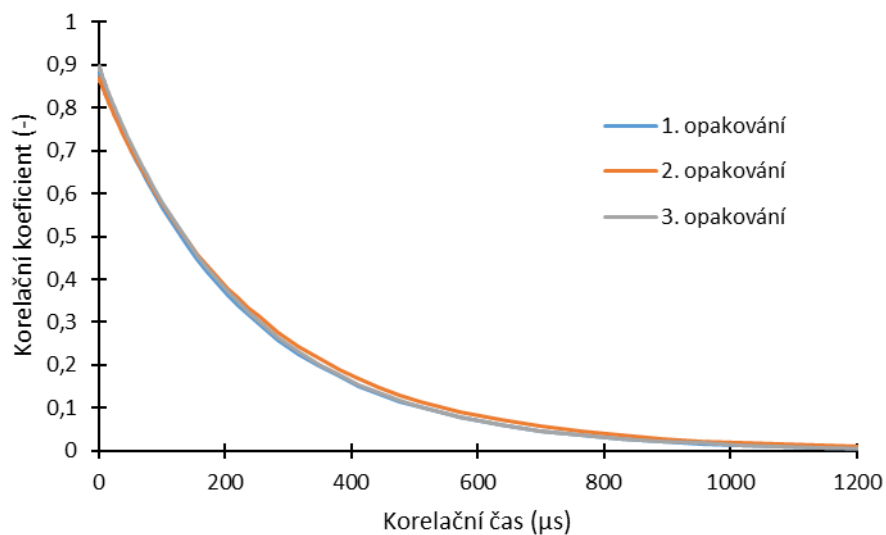
Obrázek 37: Korelogram pro měření velikosti všech tří opakování před centrifugací



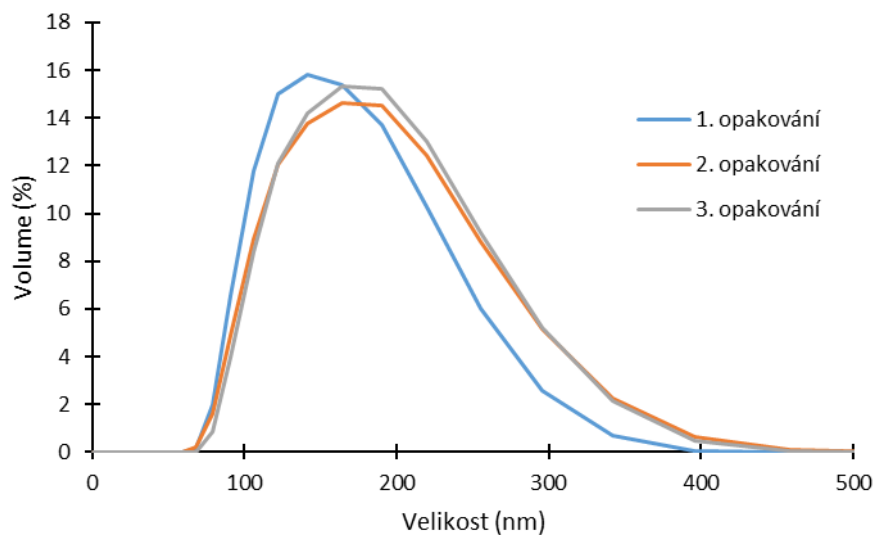
Obrázek 38: Graf frekvenční distribuce pro měření velikosti všech tří měření před dialýzou

## 9.7 Vlastnosti liposomu po centrifugaci

Následující grafy znázorňují všechna tři opakování, každé opakování je samo o sobě tvořeno z průměrných hodnot ze tří měření.



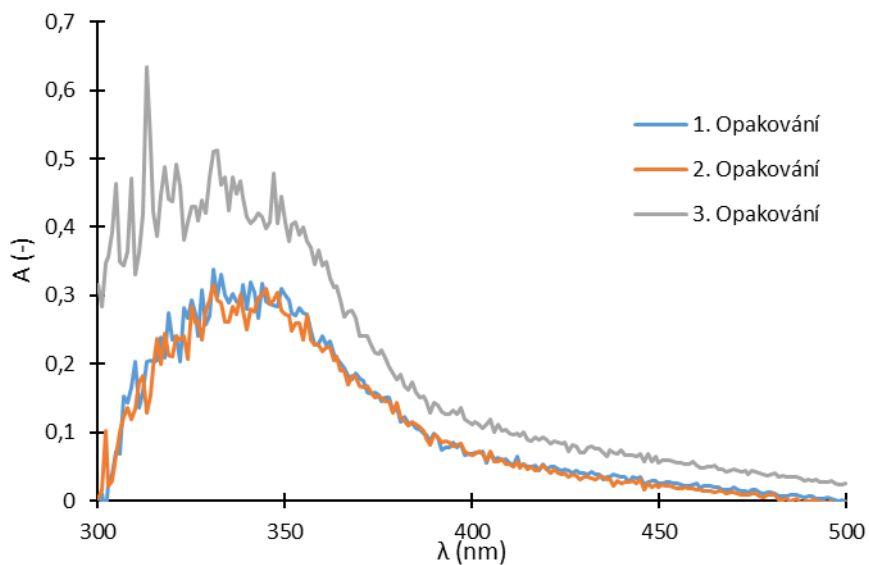
Obrázek 39: Korelogram pro měření velikosti pro všechna tři měření po centrifugaci



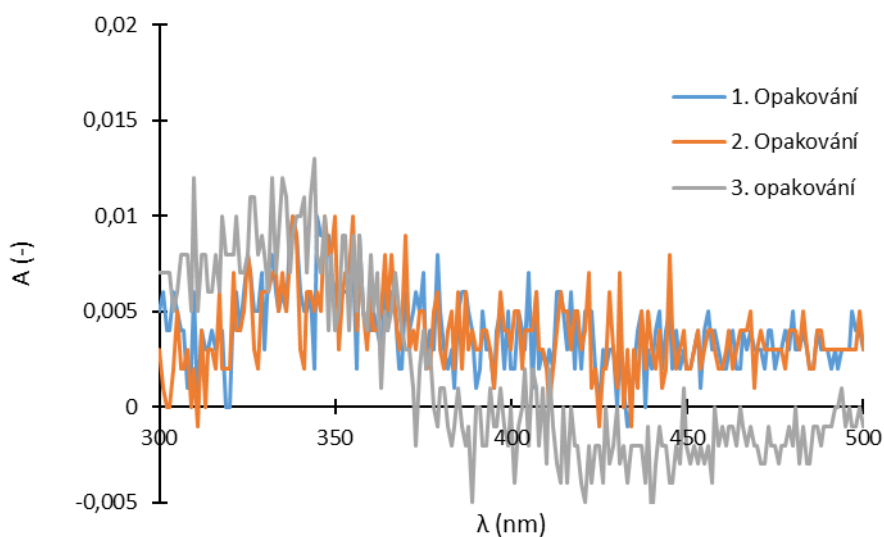
Obrázek 40: Graf frekvenční distribuce pro měření velikosti pro všechna tři opakování po centrifugaci

### 9.8 Výpočet účinnosti enkapsulace apigeninu

Pro výpočet účinnosti byla využita metoda měření absorbance na vlnové délce, pro každé opakování byla zjištěna absorbance apigeninu před i po filtrační centrifugaci.



Obrázek 41: Závislost absorbance na vlnové délce pro celkovou koncentraci apigeninu před filtrační centrifugací pro všechna tři opakování



Obrázek 42: Závislost absorbance na vlnové délce pro koncentraci enkapsulovaného apigeninu po filtrační centrifugaci pro všechna tři opakování