Příprava a charakterizace liposomů s obsahem bioaktivních látek

Bc. Tereza Štenclová

Diplomová práce
2019

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Bc. Tereza Štenclová**
Osobní číslo:	**T17387**
Studijní program:	**N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia:	**kombinovaná**
Téma práce:	**Příprava a charakterizace liposomů s obsahem bioaktivních látek**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část
Zpracujte literární rešerši na zadané téma. Věnujte se liposomům, jejich složení, vlastnostem a metodám přípravy. Dále studujte problematiku transdermální penetrace liposomů a představte metody jejího stanovení.
II. Praktická část
V praktické části práce připravte liposomy s obsahem bioaktivních látek a vhodnými technikami stanovte jejich fyzikálně-chemické charakteristiky. Sledujte transdermální penetraci připravených formulací. Získané výsledky zpracujte a formulujte závěry práce.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] Marsh D. *Handbook of Lipid Bilayers* **, 2nd Edition. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2013. ISBN 13: 978-1-4200-8833-5**

[2] Bolzinger, M. A. et al. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **(2012) 17 (3), 156-165**

[3] Bartošová, L. Bajgar J. Transdermal Drug Delivery *In Vitro* **Using Diffusion Cells.** *Current Medicinal Chemistry* **(2012), 19 (27), 4671-4677**

[4] El Maghraby, G. M.; Barry, B. W.; Williams, A. C. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **(2008), 34 (4-5), 203-222**

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2019**

Termín odevzdání diplomové práce: **20. května 2019**

Ve Zlíně dne 12. března 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Štenclová Tereza Obor: Technologie tuků, detergentů a kosmetiky

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby [1)];
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 [2)];
- beru na vědomí, že podle § 60 [3)] odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 [3)] odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 20.5.2019 .....

.....

[1)] zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

[2)] zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

[3)] zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá přípravou a charakterizací liposomů s obsahem bioaktivních látek, konkrétně esenciálních olejů. Teoretická část se věnuje liposomům a jsou popsány metody jejich přípravy, klasifikace a praktické využití. Práce představuje i mechanismy cytotoxicity esenciálních olejů v prokaryotických i eukaryotických buňkách a stanovení transdermální penetrace. Praktická část je věnována přípravě čtyř formulací liposomů s obsahem skořicového esenciálního oleje a jejich fyzikálně-chemické charakterizaci. Dále jsou tyto liposomy použity pro stanovení transdermální absorpce metodou *in vitro*. Je rovněž hodnocena antimikrobní aktivita a cytotoxicita liposomů na myších fibroblastech a leukemických buňkách s ohledem na aktivitu sodno-draselné pumpy.

Klíčová slova: liposomy, esenciální olej, transdermální absorpce, cytotoxicita

ABSTRACT

Diploma thesis is dealing with preparation and characterization of liposomes containing biologically active compounds, namely essential oils. Theoretical part of the thesis contains insight into problematic of liposomes. Firstly, methods for liposome preparation are shown, followed by liposome classification and practical utilization. Second part describes cytotoxicity of essential oils in both prokaryotic and eukaryotic cells and gives information on transdermal penetration. Experimental part is focused on preparation of four liposomal formulations containing cinnamon essential oil, and on characterization of their chemical and physical properties. The prepared liposomes were used for determination of transdermal absorption *in vitro*. Antimicrobial activity and cytotoxicity on mouse fibroblasts and leukemia cells with respect to activity of sodium-potassium pump were also determined.

Keywords: liposomes, essential oil, transdermal absorption, cytotoxicity

Chtěla bych velmi poděkovat doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc. za výborné vedení při psaní diplomové práce, odbornou pomoc při řešení experimentální části, cenné rady a připomínky. Dále děkuji Ing. Lucii Pinďákové za ochotu a pomoc při experimentech. Velké díky patří Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky a Centru polymerních materiálů Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně a Katedře biofyziky Univerzity Palackého v Olomouci za poskytnutí prostor a přístrojů pro realizaci diplomové práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD **10**
TEORETICKÁ ČÁST 11
1 LIPOSOMY **12**
1.1 KLASIFIKACE 13
1.2 PŘÍPRAVA 14
1.2.1 Mechanická dispergace 14
1.2.2 Metody rozpouštění v organickém rozpouštědle 16
1.2.3 Metody solubilizace detergentem 17
1.3 ENKAPSULACE LÁTEK A TRANSPORT 18
1.4 LIPOSOMY V MEDICÍNĚ A FARMAKOLOGII 19
1.4.1 Stealth, fuzogenní a konvenční liposomy 19
1.4.2 Aplikace ve farmakologii 20
1.4.3 Použití v medicíně 22
1.5 STABILITA LIPOSOMŮ 23
1.5.1 Fyzikální stabilita 23
1.5.2 Chemická stabilita 24
2 ESENCIÁLNÍ OLEJE **26**
2.1 MECHANISMY CYTOTOXICITY ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ 26
2.2 MOLEKULÁRNÍ A BIOCHEMICKÉ CÍLE V PROKARYOTICKÝCH BUŇKÁCH 27
2.3 MOLEKULÁRNÍ A BIOCHEMICKÉ CÍLE V EUKARYOTICKÝCH BUŇKÁCH 28
2.3.1 Protinádorová aktivita 28
2.3.2 Antifungální aktivita 29
2.3.3 Antiparazitická aktivita 30
3 TRANSDERMÁLNÍ PENETRACE **32**
3.1 KŮŽE 32
3.2 PERMEACE A PENETRACE 33
3.3 MODELY KŮŽE 34
3.4 VYUŽITÍ LIPOSOMŮ V TRANSDERMÁLNÍCH APLIKACÍCH 35
3.5 ÚČINEK NOSIČE NA PENETRACI KŮŽE 36
4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY **38**
5 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE **39**
PRAKTICKÁ ČÁST 40
6 POUŽITÝ MATERIÁL **41**

6.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY 41
6.2 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY 42
6.3 BUNĚČNÉ LINIE 43
6.4 BAKTERIÁLNÍ KULTURY 43
6.5 BIOLOGICKÝ MATERIÁL 43
7 METODIKA 44
7.1 SPEKTRÁLNÍ CHARAKTERISTIKY VYBRANÝCH BIOAKTIVNÍCH LÁTEK 44
7.2 PŘÍPRAVA LIPOSOMŮ S ENKAPSULOVANÝM ESENCIÁLNÍM OLEJEM 44
7.3 STANOVENÍ VELIKOSTI LIPOSOMŮ A ZETA POTENCIÁLU 45
7.4 STANOVENÍ MORFOLOGIE – TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE 46
7.5 ENKAPSULAČNÍ ÚČINNOST 46
7.6 ANTIMIKROBNÍ AKTIVITA LIPOSOMŮ 47
7.7 STANOVENÍ TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE *IN VITRO* 47
7.7.1 Biologický materiál 47
7.7.2 Transdermální absorpce pomocí Franzových difuzních komůrek 49
7.7.3 Zpracování vzorků 50
7.7.4 Analýza kožních vzorků 50
7.7.5 Transdermální absorpce pomocí fluorescenční detekce 50
7.8 CYTOTOXICITA 51
7.8.1 Cytotoxicita na myších fibroblastech 51
7.8.2 Cytotoxicita na lidských leukemických buňkách 51
7.9 INHIBICE Na^{*}, K^{+}- ATPASY 52
7.9.1 Biologický materiál 52
7.9.2 Baginsky assay 53
7.10 STABILITA LIPOSOMŮ 54
8 VÝSLEDKY 55
8.1 SPEKTRÁLNÍ CHARAKTERISTIKY 55
8.2 PŘÍPRAVA LIPOSOMŮ 58
8.3 VELIKOST ČÁSTIC A ZETA POTENCIÁL 58
8.4 ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE 63
8.5 ENKAPSULAČNÍ ÚČINNOST 64
8.6 ANTIMIKROBNÍ AKTIVITA 67
8.7 STANOVENÍ TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE *IN VITRO* 68
8.8 HODNOCENÍ CYTOTOXICITY 72
8.8.1 Myší fibroblasty 72
8.8.2 U937 72
8.9 VLIV NA Na^{+}, K^{+}-ATPASU 73
8.10 STABILITA LIPOSOMŮ 74
9 DISKUZE 78

10 ZÁVĚR 83
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 84
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 96
SEZNAM OBRÁZKŮ 98
SEZNAM TABULEK 100

ÚVOD

Liposomy jsou mikrostruktury složené z dvojvrstev přírodních nebo syntetických lipidů, jenž jsou díky uspořádání polárních hlav a dlouhých hydrofobních řetězců amfipatické. Jelikož se liposomy, díky této amfipatické struktuře lipidů, balí soustředně, vzniká uvnitř prostor, který může sloužit pro uložení aktivní látky. Přítomnost této jedinečné struktury je vhodná pro enkapsulaci, a proto byly liposomy rozsáhle zkoumány jako nosiče pro dodávání léčiv a jejich řízené uvolňování, tyto vlastnosti jsou však ovlivňovány jejich fyzikální a chemickou stabilitou.

Kůže je největším orgánem lidského těla a představuje bariéru pro exogenní látky, tj. plní ochrannou funkci. Skládá se ze tří základních částí – *epidermis, dermis, hypodermis*. Kůže neprezentuje zcela nepropustnou vrstvu, je schopna také propouštět látky různého původu (chemické látky, farmaceutické či kosmetické přípravky a jiné). Tyto látky se dostávají do kůže transcelulárně či intercelulárně, vlasovými folikuly, mazovými žlázami a kanálky potních žláz. Následný průchod samotnou kůží se nazývá transdermální absorpce, která sestává z penetrace znamenající vstup látky do určité vrstvy kůže, permeace, při které látka prostupuje z jedné vrstvy kůže do druhé, a resorpce, kdy se látka dostává až do cévního systému.

Esenciální oleje jsou těkavé látky tekutého charakteru, které jsou produkovány rostlinami jako součást sekundárních metabolitů, jejich jednoznačný význam pro rostliny však není doposud objasněný. Majoritně jsou složeny z terpenických sloučenin, dále jsou přítomny i neterpenické, fenolické etery, estery, alkoholy, aldehydy, ketony a uhlovodíky. S vodou jsou nemísitelné, dobře se rozpouštějí v organických rozpouštědlech. Zvláštní význam mají pro své antibakteriální, antivirové a antioxidační účinky, díky čemuž mohou být chápány jako vhodná fytofarmaka, která mohou odolávat vzrůstající míře rezistence proti konvenčním léčivým přípravkům. Některé z nich mohou sloužit i jako akceleranty transdermální penetrace.

Liposomy se jeví jako vhodné transportéry látek při perkutánním podání díky jejich mechanismu pronikání kůží, tudíž by v kombinaci s vlastnostmi esenciálních olejů mohly představovat zcela nové a unikátní možnosti pro léčebné či kosmetické aplikace. Postup přípravy a charakterizace liposomů s obsahem esenciálních olejů budou proto podrobně zkoumány v praktické části práce a dále diskutovány z hlediska možnosti jejich praktického využití.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 LIPOSOMY

Vezikuly jsou uzavřená membránová pouzdra složená z dvojvrstev. Tyto vezikuly mohou být složené z fosfolipidů a bývají označovány jako liposomy, v případě povrchově aktivních látek hovoříme o surfaktantních vezikulách [1]. Liposomy jsou tedy malé vezikuly sférického tvaru, které mohou být vytvořeny z netoxických fosfolipidů a cholesterolu. Vzhledem k jejich velikosti, charakteru a biokompatibilitě jsou liposomy slibné nosiče léčiv. Vlastnosti liposomů se značně liší dle složení lipidů, povrchového náboje, velikosti a způsobu jejich přípravy. Kromě toho výběr složek určuje "tuhost" nebo "tekutost" a náboj dvojvrstvy, například nenasycené deriváty fosfatidylcholinu z přírodních zdrojů (vejce nebo sojový fosfatidylcholin) tvoří mnohem propustnější a méně stabilní dvojvrstvu, zatímco nasycené fosfolipidy s dlouhými acylovými řetězci tvoří tuhou, málo propustnou dvojvrstvou strukturu [2].

V případě hydratace ve vodných disperzích jsou fosfolipidy schopny tvořit uzavřené struktury. Takové vezikuly, které mají jednu nebo více dvojvrstevných membrán fosfolipidů, mohou být použity jako transportní systémy pro enkapsulované látky. Obecně jsou liposomy definovány jako sférické vezikuly s velikostí částic v rozmezí od 30 nm do několika mikrometrů. Vzhledem k tomu, že fosfolipidy jsou ve vodném prostředí amfipatické (hydrofobní/hydrofilní), tvoří jednu nebo více lipidových dvojvrstev obklopující vodné rozpouštědlo, přičemž polární skupiny jsou orientovány k tomuto rozpouštědlu. Tyto vrstvy jsou označovány jako lamely [3]. Agregace polárních lipidů však není omezena na konvenční dvouvrstvé struktury, které se opírají o molekulární tvar, teplotu, podmínky prostředí a přípravy, ale mohou se samy sestavit do různých typů koloidních částic [4].
Jak již bylo uvedeno, liposomy jsou široce používány jako nosiče pro mnohé molekuly v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Pro použití v potravinářském průmyslu a zemědělství byla rozsáhle zkoumána enkapsulace aktivních látek do liposomů, které by mohly zachycovat nestabilní sloučeniny (například antimikrobiální činidla, antioxidanty, příchutě a bioaktivní prvky) a chránit jejich funkčnost [5]. Liposomy mohou zachycovat hydrofobní i hydrofilní sloučeniny, zabraňovat jejich rozkladu a později je opět uvolňovat [6]. Vzhledem k jejich biokompatibilitě, biologické rozložitelnosti, nízké toxicitě a schopnosti enkapsulace látek, které mohou transportovat do specifických tkání (např. nádorové tkáně), se liposomy hojně využívají jako zkušební systémy za účelem snížení toxicity léčiva nebo lepší tkáňové specifity [7].

1.1 Klasifikace

Velikost liposomů se může pohybovat od velmi malých (0,025 μm) až po velké (2,5 μm) vezikuly. Kromě toho mohou liposomy obsahovat jedno- nebo vícevrstvé dvojvrstvy (lamely) [8].

Na základě velikosti a počtu dvojvrstev mohou být liposomy zařazeny do kategorií:

1. Multilamelární vezikuly (MLV, multilamellar large vesicles)

Tyto vezikuly nabývají velikosti 0,1-1 μm a skládají se z velkého počtu dvojvrstev. Jsou nejsnazší pro přípravu a mechanicky stabilní dlouhou dobu. Velký počet vrstev způsobuje pomalé uvolňování enkapsulovaných látek [9].

2. Velké oligolamelární vezikuly (OLV, oligolamellar large vesicles)

Membrány těchto vezikul o velikosti 0,1-1 μm obsahují větší množství lipidů, proto pomaleji uvolňují svůj obsah, což je výhodou v klinické praxi, kdy je prodlužován jejich terapeutický efekt.

3. Unilamelární vezikuly (UV, unilamellar vesicles)

Tyto lze rozčlenit do tří kategorií:

a) Velké unilamelární vezikuly (LUV, large unilamellar vesicles)

Jsou to vezikuly o velikosti větší než 100 nm, které mají nižší membránové napětí a větší stabilitu a jsou hojně užívané jako nosiče pro hydrofilní látky.

b) Malé unilamelární vezikuly (SUV, small unilamellar vesicles)

Jedná se o nejmenší vezikuly (20-100 nm), které vykazují přebytek lipidu ve vnější vrstvě a vysoké membránové napětí, jsou termodynamicky nestabilní s tendencí se shlukovat a splývat ve větší celky. Díky jejich velikosti jsou však vhodné pro transport léčiv do tkání, jelikož mohou pronikat cévními stěnami [10].

c) Obří unilamelární vezikuly (GUV, giant unilamellar vesicles)

GUV jsou vezikuly dosahující velikosti okolo 1 μm s nízkou mechanickou stabilitou, tzn. jsou nevhodné pro transport látek [9].

4. Multivezikulární vezikuly (MVV, multivesicular vesicles)

Jde o zvláštní typ vezikul, kdy je v jedné větší vezikule (velikost více než 1 μm) enkapsulováno větší množství malých vezikul. Vznikají při výrobě MLV [20].

1.2 Příprava

Všechny metody přípravy liposomů zahrnují čtyři základní fáze:

1. Vysoušení lipidů z organického rozpouštědla
2. Dispergace lipidů ve vodném prostředí
3. Purifikace výsledného liposomu
4. Analýza konečného produktu

Pro přípravu liposomů se používají následující metody:

1. Aktivní enkapsulace
2. Pasivní enkapsulace

Techniky pasivní enkapsulace zahrnují:

a) Metody mechanické dispergace

b) Metody rozpouštění v organickém rozpouštědle

c) Metody solubilizace detergentem (odstranění neenskapsulovaného materiálu) [11]

1.2.1 Mechanická dispergace

Mezi typy mechanických dispergačních metod lze řadit následující:

1. Sonikace
2. French press
3. Extruze
4. Zmrazování a rozmrazování
5. Hydratace lipidového filmu třepáním nebo sušení vymrazením
6. Mikroemulgace
7. Membránové vytlačování
8. Sušené rekonstituované vezikuly [8]

Sonikace

Sonikace je nejrozšířeněji používaná metoda pro přípravu SUV. V tomto případě jsou hydratované lipidy sonikovány v lázni nebo pomocí sonikační sondy. Hlavní nevýhody této metody jsou velmi nízká enkapsulační účinnost, možná degradace fosfolipidů a enkapsulovaných sloučenin, eliminace velkých molekul či znečištění liposomů kovy ze špičky sondy a přítomnost multilamelárních vezikul spolu s SUV [11]. Při sonikaci sondou je její hrot přímo ponořen do disperze liposomů. Při sonikaci dochází k velké spotřebě energie, která má vliv na zahřívání disperze v místě ponoření sondy, což je důvodem pro nezbytné chlazení v průběhu sonikace. Během sonikace v ultrazvukové lázni je liposomová disperze v nádobě (sklo, plast) nebo pod inertní atmosférou umístěna do ultrazvukového sonikátoru. Výhodou této metody je velmi snadné řízení teploty pomocí kapaliny, kterou je sonikační vana naplněna [12].

Frech press

French press zahrnuje vytlačování MLV malým otvorem za použití tlaku dosahujícího až 13000 N/m^2, což vede k jejich mechanickému narušení [11]. Takto narušené vezikuly interagují díky hydrofobním interakcím a spontánně tvoří homogenní středně velké vezikuly. Touto metodou lze připravovat i vzorky s vysokou koncentrací lipidů [13]. Nevýhodou metody však je, že jsou pracovní objemy poměrně malé (maximálně 50 ml) a v průběhu dochází k zahřívání vzorku [8].

Extruze

Při extruzi jsou MLV o koncentraci lipidů až 400 mg/ml za tlaku 260 N/m^2 protlačovány přes soustavu filtrů (cut off 0,1 μm) za vzniku LUV přibližné velikosti 90 nm. Při použití filtrů s větší velikostí pórů vznikají větší (často multilamelární) vezikuly, které jsou schopny enkapsulace dalších látek [13].

Zmrazování a rozmrazování liposomů

SUV se rychle zmrazí a pomalu rozmrazí. Krátkodobá sonikace rozptýlí agregované materiály na LUV. Vytvoření unilamelárních vezikulů je výsledkem fúze SUV během procesů zmrazování a rozmrazování. Tento typ syntézy je silně inhibován zvýšenou koncentrací fosfolipidů a zvýšením iontové síly rozpouštědla. Při této metodě se zvyšuje enkapsulační účinnost z 20 na 30 % [14].

1.2.2 Metody rozpouštění v organickém rozpouštědle

Vstřikování pomocí éteru (odpařování rozpouštědla)

Roztok lipidů rozpuštěných v diethyletheru nebo směsi etheru a methanolu se postupně vstřikuje do vodného roztoku materiálu, který má být zapouzdřen při teplotě 55 až 65 °C nebo za sníženého tlaku. Následné odstranění etheru ve vakuu vede k vytvoření liposomů [15]. Hlavní nevýhodou této techniky je, že populace je heterogenní (70 až 200 nm) a expozice sloučenin, které mají být zapouzdřeny, nemusí odolat organickým rozpouštědlům při vysoké teplotě [16].

Vstřikování ethanolu

Lipidový roztok ethanolu se rychle vstřikuje do velkého přebytku pufru. Nevýhoda metody spočívá v tom, že vytvořené liposomy jsou heterogenní (30 až 110 nm), velmi zředěné a odstranění veškerého etanolu je obtížné, protože se vytváří azeotropní směs s vodou. Další nevýhodou je to, že některé biologicky aktivní molekuly mohou být v přítomnosti nízkého množství ethanolu deaktivovány [17].

Metoda odpařování reverzní fáze

Tento postup zajistil pokrok v technologii liposomů, neboť poprvé umožnil přípravu liposomů s vysokým poměrem místa pro enkapsulaci vodných roztoků aktivních látek ku lipidům. Zpětné odpařování fází je založeno na vytvoření obrácených micel. Tyto inverzní micely vznikají při sonikaci směsi pufrované vodné fáze obsahující aktivní molekuly, které mají být zapouzdřeny do liposomů, a organické fáze, ve které jsou solubilizovány fosfolipidy. Následné pomalé odstranění organického rozpouštědla vede k přeměně těchto inverzních micel na viskózní a gelovou formu. V kritickém bodě tohoto procesu se stav gelu zhroutí a některé inverzní micely jsou narušeny. Přebytek fosfolipidů v prostředí přispívá k tvorbě úplné dvojvrstvy kolem zbytkových micel, což vede k tvorbě liposomů. Liposomy získané metodou odpařování reverzní fáze mohou být vyrobeny z mnoha lipidů a prostor pro enkapsulovanou látku je až čtyřnásobně větší než u liposomů vyrobených protřepáním nebo u multilamelárních liposomů [12].

Tímto způsobem lze dosáhnout vysoké účinnosti zapouzdření - až do 65% v prostředí s nízkou iontovou silou (např. 0,01 M NaCl). Metoda bývá použita pro zapouzdření malých i velkých molekul a makromolekul. Hlavní nevýhodou této techniky je kontakt materiálů, které mají být zapouzdřeny, s organickými rozpouštědly a krátká doba sonikace. Tyto

podmínky mohou případně vést k přerušení řetězců DNA nebo k denaturaci některých proteinů [18]. Byla také popsána modifikovaná metoda odpařování reverzní fáze, při které lze dosáhnout velmi vysoké enkapsulační účinnosti - 80% [19].

1.2.3 Metody solubilizace detergentem

Dialýza

Detergenty mohou být při své kritické micelární koncentraci (CMC) používány k rozpouštění lipidů. Po odstranění detergentu dialýzou micely ve fosfolipidu stále více agregují, nakonec se spojují a vytvářejí LUV [44]. Dialýza bývá běžně prováděna v dialyzačních střívkách (se specifikovanou velikostí pórů) ve velkém nadbytku pufru, který neobsahuje detergent. Pro dialýzu může být použita i komerční pomůcka nazvaná LipoPrep (Diachema AG, Švýcarsko), která je přístrojovou verzí dialyzačního systému [16].

Odstranění detergentu ze smíšených micel (adsorpce)

Odstranění detergentu adsorpcí (cholát, alkylglykosid, Triton X-100) se dosahuje protřepáváním směsi micel s adsorbenty z organického polystyrenu, jako jsou perličky XAD-2 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo) a Bio-beads SM2 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA). Velkým přínosem použití těchto adsorbentů je to, že mohou odstraňovat detergenty i s velmi nízkým CMC.

Gelová permeační chromatografie

Při této metodě je detergent odstraněn chromatografickou separací. Pro gelovou filtraci mohou být použity kolony s náplní Sephadex G-50, Sephadex G-l00 (Sigma-Aldrich, MO, USA), Sepharose 2B-6B a Sephacryl S200-S1000 (General Electric Company, Tehran, Írán). Při pomalém průtoku kolonou je separace liposomů od detergentních monomerů velmi dobrá.

Ředění

Po zředění vodného micelárního roztoku detergentu a fosfolipidů pufrem dochází ke změně velikosti micel a jejich polydisperzity. Protože je systém zředěn za hranici smíšené micelární fáze, dojde k spontánnímu přechodu z dispergovaných micel do vezikul.

1.3 Enkapsulace látek a transport

Zavedení aktivních látek do liposomů může být dosaženo buď pasivně (k zapouzdření dochází současně s tvorbou liposomů) nebo aktivně (až po vytvoření liposomu). V principu je u liposomů možné dosáhnout vysoké enkapsulační účinnosti, která však závisí na rozpustnosti daných látek v membráně liposomu. Pasivní zapouzdření ve vodě rozpustných látek závisí na schopnosti liposomů zachytit vodný pufr obsahující rozpuštěnou látku během tvorby vezikul. Účinnost zachycení (obecně < 30 %) je omezena zachyceným objemem vymezeným v liposomech a rozpustností látek. Naopak existují i látky ve vodě rozpustné, které mají protonizovatelné aminové skupiny aktivně zachycené použitím gradientu pH [21], což může mít za následek účinnost enkapsulace blížící se 100 % [22].

Před dodáním do cílového místa mohou být přírodní látky degradovány oxidací a účinkem jiných chemických látek. Sušení mrazem je standardní praxe používaná při výrobě mnoha nejen farmaceutických produktů. Převážná většina těchto produktů je lyofilizována z jednoduchých vodných roztoků [23]. Sušení vymrazováním (lyofilizace) zahrnuje odstranění vody (nebo organického rozpouštědla) z produktů ve zmrazeném stavu při velmi nízkém tlaku. Proces se běžně používá k sušení výrobků, které jsou tepelně labilní. Tato technika má velký potenciál jako způsob řešení dlouhodobých potíží se stabilitou enkapsulovaných látek i na liposomální stabilitu. Studie prokázaly, že při procesu lyofilizace a rekonstituci může však také docházet k úniku zachycených materiálů. Liposomy, které byly lyofilizovány za přítomnosti odpovídajícího množství trehalózy (sacharid běžně se vyskytující v organismu), uchovávaly až 100% svých původních látek. Ukázalo se tedy, že pro liposomy je trehalóza vynikajícím kryoprotektantem [24].

Omezení a výhody liposomálních nosičů spočívají v interakci liposomů s buňkami. *In vivo* a *in vitro* studie ukázaly, že hlavní interakce liposomů s buňkami je buď jednoduchá adsorpce (specifické interakce s komponenty na povrchu buňky, elektrostatické síly nebo nespecifické slabé hydrofobní síly) nebo endocytóza (prostřednictvím fagocytárních buněk endotelového systému, například makrofágy a neutrofily). Další možnost, tedy fúze s membránou plazmatických buněk vložením lipidové dvojvrstvy liposomu do plazmatické membrány se současným uvolňováním liposomálního obsahu do cytoplazmy je velmi vzácná. Čtvrtou možnou interakcí je výměna dvouvrstvých složek, například cholesterolu, lipidů a membránou vázaných molekul, se složkami buněčných membrán. Často je obtížné určit, který mechanismus funguje nebo zda jich může fungovat více současně [25, 26].

1.4 Liposomy v medicíně a farmakologii

V klinické medicíně je v současné době používána enormně široká škála léčivých látek a každý rok jsou evidovány nové. Jedním z hlavních cílů jakékoliv léčby je zvýšení terapeutického indexu léčiva při současné minimalizaci jeho vedlejších účinků. Klinická užitečnost většiny konzervativních chemoterapeutik je omezena buď neschopností poskytnout nezbytné koncentrace léčiva cílovým tkáním, nebo vedlejšími účinky na ostatní orgány a tkáně. Ideálním řešením je tedy zaměření samotného léčiva na ty buňky, tkáně a orgány, které jsou postižené chorobou. Vybrané nosiče, například koloidní částice a molekulární konjugáty, mohou být vhodné jako transportéry léčiv. Koloidní částice jsou výsledkem fyzikálního zabudování léčiva do částicového koloidního systému, například reverzních micel, polymerů a liposomů. Mezi těmito nosiči byly nejvíce studovány právě liposomy. Jejich výhoda spočívá v jejich složení, které je činí biologicky odbouratelnými a biokompatibilními. Jsou složeny z přírodních fosfolipidů, které jsou biologicky inertní a slabě imunogenní a mají nízkou toxicitu. Do liposomů mohou být zapouzdřena i léčiva s různými lipofilními vlastnostmi - silně lipofilní léčiva jsou zachycena téměř úplně v lipidové dvojvrstvě, hydrofilní léčiva jsou umístěna zcela ve vodném prostředí. V případě amfipatických struktur jsou molekuly rozdělovány mezi lipidovou a vodnou fázi [27].

Technologie enkapsulace aktivních látek liposomy je technikou, kterou používají lékaři k přenosu léků, které působí jako léčivé promotory na tělní orgány. Tato metoda spočívá v generování submikroskopických pěn na bázi liposomů, které zapouzdřují četné materiály. Liposomy tedy tvoří bariéru kolem látky, jimiž obsažené, ta může být tudíž více odolná vůči enzymům v ústech a žaludku, alkalickým roztokům, žaludečním šťávám, žlučovým solím a střevní flóře, také však proti volným radikálům, které jsou generovány v lidském těle. Obsah liposomů je tedy chráněn před oxidací a degradací. Tato ochranná fosfolipidová bariéra zůstává nepoškozena, dokud není liposom transportován až do určité cílové žlázy, orgánu nebo systému, kde má enkapsulovaná látka své specifické využití [23].

1.4.1 Stealth, fuzogenní a konvenční liposomy

Přestože se liposomy chovají jako biomembrány, jsou stále pro lidský organismus vnímány jako cizí prvek, což je důvodem, proč je mononukleární fagocytový systém (MPS) může detekovat. Tyto problémy jsou řešeny použitím syntetických fosfolipidů, povrchovou modifikací vnější membrány klasických liposomů amfipatickým polyethylenglykolem

(PEG) nebo deriváty chitinu, lyofilizací, polymerací či mikroenkapsulací gangliosidů [20]. Modifikace liposomů pomocí PEG snižuje množství, v němž jsou vychytávány makrofágy a vede k jejich prodloužené přítomnosti v krevním oběhu a průchodu endotelem. Tyto liposomy jsou známy pod názvem „stealth liposomy“ [28] a jsou např. použity v úspěšném produktu na bázi liposomů s obsahem cytostatika doxorubicinu, který je v současné době prodáván jako Doxil (Janssen Biotech, Inc., Horsham, USA) nebo Caelyx (Schering-Plough Corporation, Kenilworth, USA). Terapeutické zlepšení bylo popsáno i při použití stealth liposomů s kortikosteroidy v experimentálních artritických modelech. Dlouho cirkulující liposom může také působit jako zásobník pro prodloužené uvolňování terapeutického činidla (farmakologický účinek např. vazopresinu) [29].

Již mnoho let je znám fakt, že silné protinádorové léčivo, zvláště takové, které cílí na cytoplazmu nebo buněčné jádro, nefunguje kvůli nízké propustnosti plazmatické membrány a degradaci lyzozomálními enzymy. Z tohoto důvodu byl vyvinut pokročilý model terapie rakoviny za použití nového systému pro podání léčiva - fuzogenního liposomu. Fuzogenní liposomy jsou připraveny z UV-inaktivovaného Sendai viru a konvenčních liposomů. Účinně a přímo přivádějí svůj enkapsulovaný obsah do cytoplazmy pomocí fúzního mechanismu Sendai viru, zatímco konvenční liposomy jsou do buňky přijímány endocytózou, fagocytárními buňkami retikuloendotelového systému. Fuzogenní liposom je tedy vhodným nosičem léčiv do cytoplazmy, který nepodléhá endocytóze [30]. Tyto transportéry však nejsou přímo zaměřeny na nádorové buňky. Modifikace, které chrání liposomy před nežádoucími interakcemi s plazmatickými proteiny a buněčnými membránami, mohou také zabraňovat interakcím s nádorovými buňkami. Liposomy nakonec podléhají enzymatické degradaci a/nebo fagocytóze, což vede k uvolnění léku pro následnou difúzi do nádorových buněk. Další generace léčivých nosičů směřují k molekulárnímu cílení rakovinných buněk prostřednictvím interakcí zprostředkovaných protilátkami nebo jinými ligandy [20].

1.4.2 Aplikace ve farmakologii

Použití liposomů lze rozdělit na diagnostické a terapeutické dle liposomů obsahujících buď různé markery, nebo léčiva [25]. Bohužel má mnoho léků velmi úzké terapeutické působení, což znamená, že jejich terapeutická koncentrace není o mnoho nižší než koncentrace toxická. Někdy může být toxicita snížena (nebo účinnost zvýšena) použitím vhodného léčiva s lepší biodistribucí a farmakokinetikou. V současnosti je vyvíjeno mnoho

nových biotechnologických produktů (například antisense oligonukleotidy, klonované geny a rekombinantní proteiny), přičemž byla současně prokázána lepší využitelnost široké škály konzervativních léčiv, pokud byly enkapsulovány v liposomech, což vedlo ke zlepšení terapeutické aktivity a/nebo ke snížení jejich toxicity. Celková změna farmakokinetiky pro liposomální léčiva může vést ke zlepšení biologické dostupnosti léčiva pro určité cílové buňky, které se nachází v krevním oběhu, nebo do míst extravaskulárního onemocnění. Mezi známé aplikace patří např. liposomální formulace kyseliny trans-retinoové [31] a daunorubicinu [32], který byl schválen jako první léčivo pokročilého Kaposiho sarkomu souvisejícího s AIDS. Významnými příklady látek, jejichž enkapsulace do liposomů vede k lepším produktům, jsou vinkristin, doxorubicin a amfotericin B [29].

Léky obsažené v liposomech se mohou aplikovat různými způsoby, a to ve formě koloidního roztoku, aerosolu nebo v částečně pevných formách. Jejich hlavní výhody mohou být klasifikovány do sedmi následujících kategorií:

1. Zlepšení rozpustnosti lipofilních a amfifilních léčiv (amfotericin B, porfyriny, minoxidil, některé peptidy a antracykliny, hydrofilní léčiva - doxorubicin nebo acyklovir)
2. Pasivní cílení na buňky imunitního systému, zejména buňky mononukleárního fagocytárního systému (antimoniální látky, amfotericin B, porfyriny, vakcíny, imunomodulátory)
3. Systémy pro trvalé uvolňování komplexně nebo lokálně podávaných liposomů (doxorubicin, cytosin arabinosid, kortizony, biologické proteiny nebo peptidy jako vazopresin)
4. Mechanismus vyhýbání se určitým tkáním (doxorubicin, andamphotericin B)
5. Transport do specifické tkáně (protizánětlivé léky, protirakovinné, protiinfekční)
6. Zlepšený přenos hydrofilních a nabitých molekul (antibiotika, chelatační činidla, plazmidy)
7. Zlepšená penetrace do tkání (kortikosteroidy, anestetika a inzulín) [26]

1.4.3 Použití v medicíně

Tím, že jsou konvenční liposomy vychytávány fagocytickými buňkami v těle po intravenózním podání, jsou ideálními prostředky pro cílení molekul léčiv právě do makrofágů. Nejznámějšími případy tohoto mechanismu "trojského koně" je léčba několika parazitických onemocnění, která normálně existují v buňkách mononukleárního fagocytujícího systému. Například leishmanióza je parazitická infekce makrofágů, která postihuje více než 100 milionů lidí v tropických oblastech a je často smrtelná. Účinná dávka léků, většinou antimoniálních látek, není o mnoho nižší než dávka toxická. Po enkapsulaci této látky se liposomy s jejím obsahem shromažďují v buněčné populaci, která je infikována, a jsou proto slibnými terapeutiky tohoto onemocnění [33]. Existují i další studie, které se věnují přípravkům obsahujícím různé antiparazitické liposomy. V antimykotických terapiích byly úspěšně použity liposomy jako nosiče foramphotericinu B. Samotný lék je velmi toxický a účinná dávka je omezena kvůli jeho ionosféře a neurotoxicitě. Liposomové formy tohoto léčiva však inhibují jeho akumulaci a radikálně snižují toxicitu [34]. Mykotická onemocnění se často také soustřeďují na buňky mononukleárního fagocytárního systému, enkapsulace proto vede ke snížení toxicity a pasivnímu cílení. Tyto přínosy však mohou být spojeny s jakýmkoliv koloidním nosičem léků. Určité zlepšení léčby bylo pozorováno u stabilních smíšených micelárních formulací a mikroemulzí [35]. Mnoho pacientů bylo dále velmi účinně léčeno různými formami amphotericinu B [34]. Srovnatelné metody lze aplikovat u antivirových a antibakteriálních terapií. Většina antibiotik je užívána orálně, k enkapsulaci do liposomů lze tedy přistupovat, pouze pokud jsou antibiotika velmi silná či toxická a jsou podávána parenterálně. Příprava liposomů naplněných antibiotiky (při poměrně vysokých poměrech léků k lipidům) nemusí být snadná vzhledem k interakcím těchto molekul s lipidovou dvojvrstvou a vysokou hustotou jejich vodných roztoků, která často mění liposomy v krémovitou strukturu, která se shlukuje na povrchu. Byly zkoumány také další způsoby přenosu účinných látek do organismu k cílovým tkáním - například topické nebo inhalační. Antivirotika enkapsulovaná liposomy (ribavirin, azidotymidin nebo acyklovir) mají taktéž sníženou toxicitu, která však negativně koreluje s jejich účinností [36].

Jak již bylo uvedeno výše, řada liposomálních přípravků obsahujících protirakovinné látky je méně toxická než volná léčiva [37]. Anthracykliny jsou léky, které zastavují růst dělících se buněk interkalováním do DNA a tak destruují především rychle se dělící buňky. Tyto buňky nejsou pouze v nádorech, ale jsou také ve vlasech, ve sliznici gastrointestinál-

ního traktu a v krevních buňkách, proto je tato třída léků velmi toxická [38]. Nejvíce používaný a studovaný je adriamycin (komerční název pro cytostatikum doxorubicin HCl, Ben Venue Laboratories, Bedford, Ohio). Kromě výše uvedených akutních toxicit je jeho dávka omezena jeho rostoucí kardiotoxicitou. Pro snížení této toxicity byla testována řada různých formulací, včetně enkapsulace do liposomů. Ve většině případů byla toxicita snížena na přibližně 50 % [39]. Ze stejného důvodu byla účinnost v mnoha případech omezena z důvodu snížené biologické dostupnosti léčiva, zvláště pokud nádor nebyl fagocytární nebo se nacházel v orgánech mononukleárního fagocytárního systému [40]. V některých případech, jako je systémový lymfom, účinek zapouzdření liposomů vykazoval zvýšenou účinnost v důsledku pokračujícího účinku během uvolňování, tj. delší přítomnost terapeutických koncentrací v tělním oběhu [41], zatímco v několika dalších případech sekvestrace léku do tkání mononukleárního fagocytárního systému jeho účinnost snížila [42]. Aplikace těchto systémů u člověka obecně ukázaly sníženou toxicitu a lepší snášenlivost, avšak s omezenou účinností [43].

1.5 Stabilita liposomů

Fyzikální a chemická stabilita liposomů je, z hlediska distribuce velikosti, účinnosti enkapsulace a degradace liposomálních vezikul, hlavním omezujícím krokem pro dodávání látek pomocí tohoto systému. Lipidy mohou degradovat během procesů oxidace a hydrolýzy, u samotných liposomů pak může docházet k agregaci/flokulaci a fúzi/koalescenci, což může nakonec změnit velikost vezikuly a vést k významné ztrátě enkapsulované látky [45]. Vodné disperze liposomů vykazují nestabilitu v důsledku úniku enkapsulované látky z fosfolipidových dvojvrstev. Při dlouhodobém skladování byla rovněž zaznamenána agregace liposomů [46]. Proto je vhodnější uchovávat liposomální přípravky v pevné formě. K dispozici je několik technik pro stabilizaci liposomálních formulací, a to lyofilizace, sušení rozprašováním [47] a sušení pomocí superkritické kapaliny [48].

1.5.1 Fyzikální stabilita

Stabilita liposomů je ovlivněna jejich složením. Má na ni vliv např. přítomnost fosfolipidů s vysokými teplotami fázového přechodu nebo řetězce mastných kyselin (jejich polarita, délka a stupeň nenasycení), které za vhodných podmínek udržují rigiditu liposomů. Nelze pominout ani molární poměr fosfolipid:cholesterol, který rovněž rozhoduje o stabilitě

liposomů a kinetice uvolňování léčiva [49]. Molární poměr fosfolipidů:cholesterol 7:3 zajišťuje formulaci stabilitu a kontrolu nad uvolňováním enkapsulovaných látek [45] a povrchovým potenciálem. Vysoký povrchový potenciál přímo souvisí s fyzikální stabilitou liposomů, jelikož pomáhá snižovat rychlost fúze a agregace [50].

Jedním z důvodů liposomální agregace je vliv elektrostatických sil mezi vezikulami. Repulzivní interakce, které jsou přinejmenším rovné van der Waalsovým sílám, jsou základním požadavkem stabilní liposomální formulace [51]. Fyzikální stabilita liposomů se zlepšuje zvýšením hustoty povrchového náboje a snížením iontové síly prostředí (zvyšuje elektrostatické odpudivé síly), zejména při použití fosfatidylcholinu a fosfatidylserinu [50].

Elektrostatická stabilizace je velmi citlivá na povrchový náboj, pH a koncentraci solí a může být dále zlepšena kombinací se sterickou stabilizací (tzv. elektro-sterická stabilizace). K tomuto typu stabilizace dochází pokrytím povrchu liposomů vrstvou adsorbovaných dlouhých, objemných makromolekul, které udržují dostatečnou vzdálenost mezi vezikulami [51]. Pokrytí vezikul polymerem se často používá k přípravě stericky stabilizovaných liposomů, které mohou být vyrobeny dvěma různými způsoby, a to roubováním nebo adsorpcí polymeru na povrch liposomů. Metoda roubování je nejběžněji používaná a stabilizace se dosahuje inkorporací tzv. PEG-lipidů - poly(ethylenglykol)fosfolipidů [52].

1.5.2 Chemická stabilita

Chemická degradace liposomů se vyskytuje hlavně na úrovni fosfolipidových dvojvrstev. První z nich je hydrolýza esterových vazeb mezi mastnými kyselinami a glycerolovým řetězcem a druhou peroxidace jakéhokoliv dostupného nenasyceného acylového řetězce. Tyto dvě reakce mohou vést ke vzniku lipidů s krátkým řetězcem, následně se v membráně objeví rozpustné deriváty, které významně snižují kvalitu a stabilitu liposomálního systému [38]. V případě fosfatidylcholinů podléhají oxidaci uhlovodíkové řetězce a zejména jejich nenasycené části. Nasycené řetězce pak mohou být oxidovány při vysokých teplotách [53]. Oxidace je radikálová reakce, která má za následek štěpení uhlovodíkových řetězců nebo v případě dvou sousedních dvojných vazeb tvorbu cyklických peroxidů. Iniciační krok, odštěpení atomu vodíku z lipidového řetězce, se nejčastěji odehrává v důsledku působení světla nebo kontaminace stopovým množstvím iontů kovu. Nejcitlivějšími lipidy pro iniciační krok jsou právě lipidy obsahující dvojné vazby. Použití lipidů s vysokou čistotou může oxidaci lipidů v liposomech minimalizovat, stejně jako skladování při nízkých teplotách či

ochrana před světlem a kyslíkem. K dalšímu zvýšení ochrany mohou být jako přísady použity antioxidanty a látky tvořící komplexy s ionty kovů [54].

Esterové vazby přítomné ve fosfolipidech mohou být podrobeny hydrolýze ve vodném prostředí, přičemž karboxylové estery jsou hydrolyzovány rychleji než fosfátové estery [55]. V průběhu hydrolýzy se uhlovodíkové řetězce štěpí, produkují mastné kyseliny a lysofosfolipidy. Lysofosfolipid může být dále hydrolyzován a konečným produktem hydrolýzy je kyselina glycerofosforečná. Rychlost hydrolýzy fosfolipidů závisí jak na pH, tak na teplotě. Obecně má rychlost hydrolýzy závislost na pH ve tvaru „V“, s minimem při pH 6,5, a tedy se zvýšenou rychlostí při vyšším i nižším pH. Podle očekávání je hydrolýza esteru katalyzována kyselinou i bází. Vliv teploty na degradaci fosfolipidů lze popsat pomocí Arrheniovy rovnice [56].

K hydrolýze i oxidaci liposomů může docházet současně v podmínkách *in vivo*. Hydrolýza fosfolipidů může být také katalyzována enzymy fosfolipázami.[57].

2 ESENCIÁLNÍ OLEJE

Dlouhodobou diskusí v rostlinné fyziologii je to, zda jsou tzv. sekundární metabolity (secondary metabolites, SM) jen odpadní produkty nebo mají roli při zvyšování kondice rostlin. Koevoluční hypotéza, jak ji prezentovali Fraenkel, Erlich a další od šedesátých let, říká, že vztah mezi rostlinami a zvířaty je základním faktorem pro zvyšování biologické rozmanitosti u hmyzu i rostlin a že SM jsou součástí chemického obranného systému, který rostlinám umožňuje bránit se proti predátorům, což je nutí, aby se těmto látkám přizpůsobily a staly se konkurenty v dlouhodobém chemicko-evolučním soupeření [58]. Tato hypotéza není v této rané formulaci udržitelná, protože je v rozporu se skutečností, že mezi SM existuje neočekávaně velký počet blízce příbuzných molekul nebo analogů s velmi nízkou biologickou molekulární aktivitou [59]. Rostlinné metabolity vyšší chemické různorodosti vykazují lepší obranu než ty s omezenější rozmanitostí [60]. Jednou konkrétní skupinou SM jsou těkavé látky, obsahující hlavně terpenoidy, ale také fenylpropanoidy, polyketidy a sloučeniny obsahující dusík a síru. Právě tato heterogenní skupina sloučenin je označována termínem „esenciální oleje“ nebo „silice“, což ve skutečnosti definuje molekuly extrahované z rostlin, zatímco pro těkavé SM obsažené v živých organismech je preferován termín těkavé látky rostlin (plant volatiles) [61].

Esenciální oleje jsou komplexní směsí uhlovodíků a jejich kyslíkatých derivátů vznikající ze dvou izoprenoidních drah převážně v monoterpenech a seskviterpenech. Jsou produkovány a vylučovány glandulárními trichomy a dalšími sekrečními strukturami, tyto specializované sekreční tkáně se převážně vyskytují na površích rostlinných orgánů, zejména květů a listů a mají v rostlině klíčovou ekologickou roli. Éterické oleje byly, díky své biologické aktivitě, používány od starověku v mnoha tradičních léčebných přístupech po celém světě. Mnoho preklinických studií dokumentovalo antimikrobiální, antioxidační, protizánětlivé a protinádorové účinky silic na řadě buněčných a zvířecích modelů a rovněž objasnilo jejich mechanismus účinku a farmakologické cíle. Nedostatek studií na lidských buňkách omezuje potenciál esenciálních olejů jako účinných a bezpečných fytoterapeutik [62].

2.1 Mechanismy cytotoxicity esenciálních olejů

Esenciální oleje jsou komplexní směsí molekul, která obecně obsahuje více než 20 různých složek s nízkou molekulovou hmotností a velmi variabilními koncentracemi. Obecně jsou hlavními složkami éterických olejů monoterpeny a seskviterpeny, v různém

množství mohou být přítomny i diterpeny a fenylpropanoidy. Mnohé z těchto molekul se nacházejí v nízkých koncentracích, jen málo z nich tvoří hlavní složky, které mohou představovat až 70 % z celkového objemu silice a jsou zodpovědné za její biologické účinky [63]. Dosud bylo popsáno více než 3000 éterických olejů, z nichž je přibližně jedna desetina relevantní pro farmaceutický, nutriční nebo kosmetický průmysl. U řady éterických olejů byla zkoumána jejich cytotoxicita a velké úsilí je věnováno výzkumu potenciálních terapeutických účinků olejů zejména proti chorobám, které jsou charakterizovány nadměrným růstem buněk a proliferací, tzn. rakovina nebo bakteriální infekce. Mezi hlavní mechanismy, které zprostředkovávají cytotoxické účinky esenciálních olejů, patří indukce buněčné smrti aktivací apoptických nebo nekrotických procesů, zastavení buněčného cyklu a ztráta funkce základních organel. Některé z těchto účinků jsou způsobeny lipofilní povahou a nízkou molekulovou hmotností hlavních složek esenciálních olejů, které jim umožňují narušení buněčné membrány, mění membránové složení a zvyšují její fluiditu, což vede k úniku iontů a cytoplasmatických molekul. Změněné membrány vedou ke snížené produkci ATP, změně gradientu pH a ztrátě mitochondriálního potenciálu, který může mít za následek smrt buněk. Některé esenciální oleje mohou také působit jako prooxidační prvky, které mohou měnit buněčný redoxní stav a také ohrožovat přežití buněk [64].

Cytotoxické vlastnosti éterických olejů vyplývají z komplexní interakce mezi různými třídami sloučenin, jako jsou fenoly, aldehydy, ketony, alkoholy, estery, ethery nebo uhlovodíky. V některých případech cytotoxická aktivita úzce souvisí s několika hlavními složkami olejů, a některé z těchto izolovaných sloučenin vykazují při individuálním testování značnou cytotoxicitu. Široká variabilita v chemickém složení esenciálních olejů však znamená velkou rozmanitost mechanismů působení a molekulárních cílů, každá sloučenina může také modulovat nebo měnit účinky jiných [65].

2.2 Molekulární a biochemické cíle v prokaryotických buňkách

Vzhledem ke stále častějšímu výskytu bakterií rezistentních na mnoho antibiotik je použití esenciálních olejů zkoumáno jako jedna z potenciálních alternativ potlačení bakteriálního růstu. Složky silic s fenolovými strukturami nebo aldehydy (thymol, karvarol, eugenol, cinnamaldehyd a citral) jsou velmi účinné proti mikroorganismům. Tyto sloučeniny jsou aktivní i přes svou relativně nízkou schopnost rozpouštět se ve vodě. Přítomnost hydroxylové skupiny ve fenolové struktuře zvyšuje antimikrobiální aktivitu, což bylo zjištěno při srovnávání karvarolu a eugenolu s jejich příslušným methyletherem [66]. Většina studií však

byla zaměřena spíše na zkoumání antibakteriálních aktivit éterických olejů či některých jejich hlavních složek, než na výzkum mechanismů působení a bioaktivity.

Cytotoxické účinky esenciálních olejů spočívají primárně v narušení struktury membrán, což vede k permeabilizaci bakteriálních buněk. V důsledku membránové permeability jsou také ohroženy všechny ostatní buněčné funkce včetně membránového potenciálu, aktivity efluxní pumpy nebo respirační aktivity [67]. Při experimentech založených na průtokové cytometrii bylo zjištěno, že způsob účinku zprostředkovaný permeabilizací bakteriálních buněk je podobný u grampozitivních i gramnegativních bakterií [68]. Schopnost udržet membránový potenciál a gradient pH je nezbytné pro přežití buněk a pokles těchto parametrů svědčí o významném poškození buněčné membrány [69]. Únik buněčných složek do extracelulárního prostoru (draslík, ATP nebo DNA) je také indikátorem zvýšení permeability membrány a ztráty životaschopnosti buněk. Absorpce látek, jako je propidium jodid nebo *N*-fenyl-l-naftylamin, indikuje tvorbu neregulovaných pórů v membráně a zvýšenou pravděpodobnost smrti buněk [70].

2.3 Molekulární a biochemické cíle v eukaryotických buňkách

2.3.1 Protinádorová aktivita

Zpočátku byla většina esenciálních olejů zkoumána pro své antioxidační a protizánětlivé vlastnosti a následně také potenciální využití při léčbě zánětlivých onemocnění. Nyní se předpokládá, že by esenciální oleje mohly mít i protirakovinné účinky, protože existuje přímý vztah mezi produkcí reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species, ROS) a oxidačními a zánětlivými stavy, které mohou vést k rakovinnému bujení [71]. Nadměrná produkce ROS je na jedné straně spojena s chronickým zánětem a může také vyvolat poškození DNA zvýšením rychlosti mutace a pravděpodobnosti, že buňky podstoupí onkogenní transformaci [72]. Na druhé straně je známo, že ROS jsou schopny modulovat redoxně zprostředkované signální dráhy, které mohou vést k rozvoji nádoru. V literatuře je publikováno již více než pět set článků zaměřených na protinádorovou aktivitu éterických olejů [65]. Léky používané v léčbě rakoviny mají jako primární cíl indukci apoptózy nebo změnu buněčného cyklu v rakovinných buňkách. Esenciální oleje, které jsou schopny vyvolat v rakovinných buňkách apoptózu, mohou být potenciálními nástroji pro léčbu rakoviny. Kromě indukce apoptózy existují i další mechanismy, které při léčbě rakoviny pomáhají; jsou to např. aktivace systémů detoxikace a opravy DNA a inhibice metastáz a angiogeneze [73].

Apoptóza je dobře definovaná forma programované buněčné smrti pro zajištění homeostázy, která může být spouštěna endogenními nebo exogenními signály. Abnormality v procesu apoptózy mohou pocházet z různých typů onemocnění (rakovina nebo autoimunitní onemocnění). Vzhledem k vysokému heterogennímu složení éterických olejů a mnoha typům rakoviny je poměrně těžké jednoznačně definovat mechanismus jejich účinku. Důkladněji byla studována protinádorová aktivita esenciálních olejů a některých jejich izolovaných složek proti několika typům rakoviny (glioblastom, melanom, leukemie, kostní, prsní, plicní, vaječníkové, slinivkové a prostatické rakoviny) v publikaci [65]. Ve většině studií byly popsány apoptotické markery, včetně cytoskeletálních změn, poškození plazmatické membrány, mitochondriální disfunkce, fragmentace DNA, aktivace kaspázy-3 a štěpení proteinů [74].

Jedním z mechanismů, kterými mohou esenciální oleje vyvolat apoptózu, je zvýšená tvorba ROS. Esenciální olej z jedle balzámové (*Abies balsamea*) byl testován proti buněčným liniím pevných nádorů (MCF-7, PC-3, A-549, DLD-1, M4BEU a CT-26) a na všech těchto buněčných liniích vykazoval významnou cytotoxicitu [75]. Léčba esenciálním olejem snížila obsah buněčného redukovaného glutathionu (GSH) a zvýšila produkci ROS způsobem závislým na dávce oleje a čase působení. Těkavý extrakt ze sušeného oplodí *Zanthoxylum schinifolium* také indukoval apoptotickou smrt v buňkách lidského hepatomu HepG2 a významně zvýšil produkci ROS [76]. Dalším cílem pro esenciální oleje je protein kináza B, známá také jako Akt, která reguluje p53. Akt cesta je aktivována v časných stádiích různých typů rakoviny a aktivace Akt signalizace chrání rakovinné buňky před apoptózou indukovanou tamoxifenem [77]. Esenciální oleje mohou vyvolat apoptózu přes fosforylované MAPK (mitogen-activated protein kinases), což je proces, který může být zvýhodněn produkcí ROS [78].

2.3.2 Antifungální aktivita

Přírodní produkty s antifungálními vlastnostmi jsou také zajímavou novou terapeutickou alternativou syntetických léčiv. V současnosti nabývají tyto produkty na významu, jelikož (podobně jako u bakterií) dochází k vývoji kmenů rezistentních vůči antifungálním přípravkům [79]. Mnoho studií prokázalo účinnost éterických olejů proti plísním, jen málo z nich však zkoumalo základní mechanismy jejich účinku [80].

Při testování éterických olejů z oregana, tymiánu, levandule, rozmarýnu, fenyklu a vavřínu proti plísňovému onemocnění způsobeného *Botrytis cinerea* bylo zjištěno, že ošetření esenciálními oleji vyvolalo ztrátu integrity buněčné stěny plísní a změnu membránové permeability s významnými morfologickými změnami v hyfách [81, 82]. Antifungální účinek esenciálního oleje *Lavandula multifida* bohatého na fenoly byl prokázán proti *Candida albicans* [83]. Indukce apoptózy buněk plísní byla prokázána inhibicí filamentace a narušením cytoplazmatické membrány [84]. Olej z *Curcuma longa* je cytotoxický pro *Aspergillus flavus* a inhibuje produkci aflatoxinů. Analýza pomocí rastrovací elektronové mikroskopie ukázala významné poškození membrán hyf a konidioforů této plísně vystavené kurkumovému esenciálnímu oleji. Antifungální účinky esenciálních olejů *Thymus eriocalyx* a *Thymus x-porlock* proti plísni *Aspergillus niger* byly studovány pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Bylo zjištěno, že u *A. niger* vystavenému esenciálním olejům dochází k nevratnému poškození buněčné stěny, buněčné membrány a různých buněčných organel. Rovněž esenciální olej *Matricaria chamomilla* byl testován proti růstu *A. niger*. Výsledky ukázaly zjevné narušení cytoplazmatických membrán a intracelulárních organel, oddělení plazmatické membrány od buněčné stěny a úplnou reorganizaci prostorů hyf [85].

2.3.3 Antiparazitická aktivita

Rostlinné esenciální oleje mohou být použity jako alternativy proti endo- a ektoparazitům, ti se totiž stále vyvíjí a vzniká u nich insekticidní rezistence [86]. Někteří autoři zkoumali potenciální antiparazitické účinky silic proti různým druhům parazitů (prvoci, hlísty a členovci), soustředili se však spíše na výsledek než molekulární zmapování mechanismu účinku.

Antiparazitická aktivita esenciálních olejů z *Lavandula angustifolia* a *Lavandula x intermedia* byla testována proti lidským protozoálním patogenům *Giardia duodenalis* a *Trichomonas vaginalis* a také proti patogenům ryb *Hexamita inflata*. Oba esenciální oleje zcela odstranily všechna tři protozoa v testu *in vitro* [87]. Antileishmaniální aktivita esenciálního oleje z *Dysphania ambrosioides* prokázala významné cytotoxické účinky proti intracelulární formě amastigotu [88]. Esenciální olej získaný z *Piper cubeba* byl účinný proti *Schistosoma mansoni* [89]. Esenciální oleje čtyř druhů *Cymbopogon* byly cytotoxické v případě testování proti *Trypanosoma brucei brucei* a *Plasmodium falciparum* [90]. Stejní autoři také popsali antitrypanozomální a antiplasmodiální aktivity esenciálních olejů z *Ocimum gratissimum*

[91]. V dalším *in vitro* testu vykazoval olej z *Artemisia indica* antimalaritický efekt s ohledem na profylaktický účinek malárie [92]. Esenciální olej získaný z *Artemisia absinthium* vykazoval toxickou aktivitu na dvou parazitických prvocích *Trypanosoma cruzi* a *Trichomonas vaginalis* [93]. Snížení počtu vyprodukovaných vyvinutých vajíček hlístů snižují esenciální oleje získané z listů *Tetradenia riparia* a *Foeniculum vulgare* [94].

Molekulární mechanismy spojené s antiparazitickými účinky silic byly rovněž zkoumány s použitím esenciálního oleje *Artemisia annua* proti viscerální leishmanióze způsobené *Leishmania donovani* [95]. Cytotoxická aktivita byla zprostředkována apoptózou, protože byla potvrzena externalizací fosfatidylserinu, fragmentací DNA, dyskinetoplastidií, zastavením buněčného cyklu, ztrátou potenciálu mitochondriální membrány a tvorbou ROS v promastigotech. Stejní autoři uváděli podobné výsledky při testování oleje bohatého na eugenol z rostliny *Syzygium aromaticum* proti promastigotům a intracelulárním amastigotům. V obou studiích nebyly pozorovány žádné nepříznivé cytotoxické účinky proti myším makrofágům [96].

3 TRANSDERMÁLNÍ PENETRACE

3.1 Kůže

Kůže představuje největší orgán těla, u zdravých dospělých jedinců má plochu přibližně 2 m^2. Jedná se o heterogenní vícevrstvou tkáň s primární funkcí chránit tělo před vnějším prostředím tím, že bude fungovat jako účinná překážka absorpce exogenních molekul [97]. Její struktura je rozdělena do tří samostatných vrstev: *epidermis, dermis* a *hypodermis*. Je přibližně 75–150 μm tlustá, výrazně silnější na dlaních a na chodidlech. Umožňuje transport plynů i tekutin a udržuje vnitřní tělesnou homeostázu prostřednictvím potních žláz a krevních cév. Mezi další funkce patří ochrana tkání a orgánů, vylučování, imunita a syntéza vitamínu D [98].

Epidermis, vyjma *stratum corneum*, což je její nejsvrchnější vrstva, je životaschopná tkáň. Není vaskularizována, vyživována je difuzí. Skládá se z pěti vrstev, které představují různé etapy vývoje korneocytů. Sekvence vrstev z vnitřní k vnější straně je zárodečná vrstva (*stratum basale*), vrstva ostnitá (*stratum spinosum*), vrstva zrnitá (*stratum granulosum*), vrstva jasná (*stratum lucidum*) a vrstva rohová (*stratum corneum*). Buňky *stratum corneum* jsou nazývány korneocyty. Tyto buňky jsou husté, funkčně mrtvé, bez jádra a plněné keratinem. Uspořádání *stratum corneum* je obdobou "cihel a malty", v němž korneocyty představují cihly, které obklopují mezibuněčné lipidy ve formě dvouvrstev představující maltu. Intercelulární lipidy sestávají ze směsi ceramidů, cholesterolu, esterů cholesterolu, mastných kyselin a malá část je cholesterol sulfátů [99]. *Stratum corneum* obsahuje 15 až 20 vrstev korneocytů a ve svém suchém stavu má tloušťku od 10 do 15 μm. Po hydrataci značně nabobtná, její tloušťka může dosahovat až 40 μm a vykazuje zvýšenou propustnost. Vzhledem ke své bariérové funkci a odolnosti proti vodě, je právě rohová vrstva tou částí pokožky, která omezuje absorpci léku přes kůži [100]. Při experimentech na kůži, ze které byla odstraněna rohová vrstva, byla enormně navýšena propustnost, při odstranění celé epidermis se propustnost zvýšila o 1-2 řády [101].

Dermis (škára) má šířku od 3 do 5 mm a sestává ze směsi fibroblastů, vláknitých bílkovin (kolagen a elastin) a interfibrilového gelu z glykosaminoglykanů, soli a vody. Kolagen I a II tvoří přibližně 75 % sušiny dermis. Krevní a lymfatické cévy, volná nervová zakončení, vlasové folikuly a mazové a potní žlázy jsou umístěny taktéž v dermis. Vývody vlasových folikulů a potních žláz ústí přímo na povrchu kůže [102].

Subkutánní tkáň, podkožní vazivo neboli *hypodermis*, je inervovaná vazivová vrstva s vysokou koncentrací tukových buněk volně připojená k *dermis*. Mění se s anatomickým místem, věkem, genetickou výbavou, rasou, endokrinním a nutričním stavem jedince. Pod touto vrstvou může být svalová vrstva, která překrývá buď kostnaté výběžky, nebo vnitřní tkáně a orgány. Má velký význam pro termoregulaci [98].

3.2 Permeace a penetrace

Systémy topického a transdermálního podávání léčiv a aktivních látek mají mnoho výhod v klinické praxi při cílení léčiva na určité místo v těle za souběžného snížení vedlejších systémových účinků. Podávání léků přes kůži slouží také k dosažení řízeného či prodlouženého podávání léku, tudíž jako alternativa k orálnímu požití (výhodné pro léky s nepravidelnou absorpcí v gastrointestinálním traktu, nízkou biologickou dostupností aj.). Mnoho léčivých přípravků se nanáší na povrch kůže, ale pronikají do jejích vrstev jen do určité míry právě tam, kde se jejich účinky očekávají. Tento případ je běžně užíván pro léčbu kožních poruch (akné a kožní zánětlivá onemocnění - dermatitida, erytematózní lupus a psoriáza). Část formulací však obsahuje látky, které pronikají skrze kůži a vstupují až do oběhového systému. Transdermální terapie musí zajistit absorbování takové koncentrace léčiva, aby bylo dosaženo účinných plazmatických koncentrací. Permeace léčiv jsou v některých případech zaměřeny na oblasti těla, kde je očekáván jejich lokální účinek - např. ve svalech, cévách a kloubech. Proto je v tomto případě používán termín "kožní absorpce", který charakterizuje množství léku, který penetruje a proniká do kůže [103].

Hlavními cestami pronikání látek kůží je průchod skrz intaktní epidermis a dále mezibuněčnou cestou přes lipidy ze *stratum corneum* nebo transcelulární cestou přes korneocyty

V obou případech musí být látka rozptýlena do mezibuněčné lipidové matrice, která je považována za hlavní determinant absorpce léčiva kůží [104].

Transport kůží je proces zahrnující několik kroků:

1. Rozpuštění a uvolňování látky z formulace.
2. Rozložení látky do *stratum corneum.*
3. Difúze přes *stratum corneum* především přes intercelulární lipidy.
4. Rozvolnění ze *stratum corneum* do životaschopných vrstev *epidermis.*
5. Difúze přes životaschopnou *epidermis* do *dermis.*
6. Absorpce do kapilár a následný transport do systémového oběhu.

Použití formulací a látek v nich obsažených závisí na několika faktorech, a to na fyzikálně-chemických vlastnostech, interakcích látky s membránou a farmakokinetice léčiv. Ideální fyzikálně-chemické vlastnosti pro dermální aplikaci mají nízkomolekulární látky (< 600 Da), protože mají vysoký difúzní koeficient, dobrou rozpustnost ve vodě a olejích pro dosažení vysokého koncentračního gradientu a tudíž i pro zvýšení difúzního toku přes kůži, dále vykazují vyvážený rozdělovací koeficient (velmi vysoké rozdělovací koeficienty mohou inhibovat léčbu a zvýšení retence léku) a mají i nízký bod tání (< 200 ° C) [105].

3.3 Modely kůže

Lidská kůže (*ex vivo*) je považována za zlatý standard pro *in vitro* permeační experimenty. Hlavním problémem při použití lidské kůže k hodnocení perkutánní léčby jsou však etické aspekty. Mezi lidskými kožními vzorky rovněž existují velké diference v důsledku rozdílného věku, rasy a anatomického umístění [106]. Změna v prostupnosti lidské kůže je rozdílná nejen napříč dárci (inter-individuální variace), ale i u vzorků z jediného individuálního dárce (intra-individuální variace). Jako alternativa k lidské kůži se proto používají (ve studiích perkutánní absorpce, při vývoji transdermálních formulací a k zajištění bezpečnosti dermální expozice chemikáliím) kožní vzorky prasete, králíka, morčete, krys, myší, hadů, *in vitro* kultivovaný model lidské kůže a syntetické membrány [107]. Pro porozumění mezidruhovým rozdílům v permeaci pokožky je potřebná znalost rozdílů prokrvení mezi lidskou a zvířecí kůží a dále je potřeba brát v úvahu odlišné metabolické enzymy uvolňované do kůže, které mohou průchodnost kůží také ovlivňovat [108].

Vzhledem k nedávným regulačním změnám týkajícím se testování na zvířatech v oblasti kosmetiky dostávají *in vitro* modely více pozornosti jako důležité nástroje při studiích penetrace, permeace a dráždivosti kůže. Obtížně napodobitelný je při modelování *in vitro*

metabolismus, který se projevuje u živých částí epidermis a významně snižuje biologickou dostupnost molekul podávaných kůží [109]. Při testování dráždivosti byl původní přístup založen na použití běžných lidských keratinocytů (NHK, normal human keratinocytes) proliferujících a diferencovaných na deepidermizované dermis (ekvivalent živé kůže) [110]. Tento model byl vylepšen pomocí membrán podporujících růst NHK, čímž vznikla tzv rekonstruovaná epidermis. Takto tvořené modely jsou již komerčně k dispozici a představují lidskou epidermis (EpiSkin, EpiDerm, SkinEthic) nebo pokožku v plné tloušťce (Phenion) [111]. Dále existují modely představující taktéž celou kůži avšak na bázi fibroblastů zasazených do matrice kolagenu (ekvivalent dermis) a epidermální vrstvu reprezentují opět NHK [112]. Ačkoli tyto kožní modely často vykazují mnohem vyšší propustnost než lidská a zvířecí kůže [113], lze je použít pro účely screeningu při počátečních fázích vývoje léčiv a léků [114]. Pro zjednodušení bylo navrženo několik *in vitro* modelů, jimiž jsou např. silikonové membrány [115], deriváty ceramidů pro testy membránové permeability (PAMPA, parallel artificial membrane permeability assay) [116] a test propustnosti založený na fosfolipidových vezikulách (PVPA, phospholipid vesicle-based permeation assay) [117].

Mezi modely na bázi lipidů jsou řazeny:

1. Modifikace PAMPA schopné napodobovat pokožku [116]
2. Model PVPA, který napodobuje SC kůže [117]
3. Substituce SC se syntetickými SC lipidy [128]
4. Membrány navržené ke studiu účinků derivátů ceramidu na difúzi a permeaci léčiva [129]

3.4 Využití liposomů v transdermálních aplikacích

V posledních desetiletích byly do liposomů úspěšně zapouzdřeny různé aktivní farmaceutické složky (active pharmaceutical ingredients, API) - termolabilní proteiny, látky labilní vůči kyselinám, vnímavé enzymy, vysoce lipofilní, hydrofilní i fotosenzitivní látky a molekuly s vysokou molekulovou hmotností [118]. Pro vývoj liposomů bylo použito široké spektrum dostupných lipidů, povrchově aktivních činidel (aktivátorů) a dalších složek (např. alkoholů ve stopových množstvích), což činí tyto systémy vhodné pro široké spektrum aplikací [119].

Poměrně nedávno by zjištěno, že konvenční liposomy mají jako nosiče pro transdermální transport látek menší využitelnost. Obvykle se hromadí ve *stratum corneum* s minimálním pronikáním do hlubších oblastí kůže nebo do systémového oběhu [120]. Je však zajímavé, že pokud jsou do vezikul přidány surfaktanty, vede to k jejich vyšší deformovatelnosti a snadnějšímu pronikání přes hustou rohovou vrstvu, která obsahuje velmi malé "póry" ve vztahu k průměru vezikuly. *Stratum corneum* tedy slouží jako bariéra, která limituje transdermální prostup. Největší póry na povrchu kůže navíc souvisí s přítomností vlasových folikulů a potních kanálů, které hrají v liposomální transdermální penetraci léčiv pouze malou roli. Velikost získaná z elektronové mikroskopie naznačuje, že liposomy do průměru až 600 nm mohou proniknout skrz kůži, zatímco liposomy s velikostí 1 000 nm zůstávají v SC [104]. Výhodný rozsah velikostí vezikul pro lokální / transdermální transport by měl tedy ležet v rozmezí 100 až 1000 nm [121].

Jako alternativa ke konvenčním liposomům mohou proto sloužit elastické liposomy (ELs), které byly popsány v roce 1992 a které díky svému složení usnadňují průchod léčiv přes *stratum corneum* [122, 123]. ELs se skládají z fosfolipidů, surfaktantů a vnitřního vodného prostředí v lipidové dvojvrstvě a jsou schopné zapouzdřit hydrofilní (ve vodné komoře) a lipofilní (v lipidové dvojvrstvě) molekuly. Kromě toho mohou být na jejich přípravu použity materiály jako lipidy (kationtové a aniontové), polyethylenglykol (PEG), ethanol, cyklodextrinové komplexy a/nebo gely [124]. Složení ELs proto významně ovlivňuje jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a následně i penetraci do kůže. Je však třeba poznamenat, že *in vivo* účinnost je zcela odlišná od chování v *in vitro* podmínkách a nemůže být zcela nahrazena experimenty a změřenými daty při *in vitro* penetraci [125]. Tyto nosiče, pro které je typická vysoká schopnost deformovat svůj tvar a vysoká elasticita po stlačení (ca 1/10 z původního průměru vezikuly) při průchodu mezi keratinocyty, byly již úspěšně použity v praxi. Procházejí totiž neporušenou vrstvou pokožky a v přítomnosti vhodné aktivní látky mohou zvyšovat hydrataci pokožky a snižovat transepidermální ztrátu vody (TEWL) [126]. V současné době je oceňována zvýšená schopnost ELs pronikat kůží díky synergickým účinkům ELs působících jako nosič i jako penetrant. Tyto vezikuly navíc pronikají do kůže bez toho, aby došlo k jejich rozpadu [127].

3.5 Účinek nosiče na penetraci kůže

Propustnost kůže může být chápána jako pronikání přes jednu vrstvu do druhé. Následný příjem penetrující látky do cévního systému je označován jako dermální absorpce

[130]. Transportéry látek mohou měnit fyzický stav a propustnost pokožky, např. díky hydratačnímu účinku nebo změnou teploty pokožky. Okluzivní a lipofilní vehikuly (jako je parafin, tuky a oleje) snižují ztrátu vody a zvyšují obsah vlhkosti v kůži, což má za následek efektivnější pronikání látek. Emulze voda v oleji (V/O) jsou méně okluzivní než lipidové materiály, ale více okluzivní než emulze oleje ve vodě (O/V). Naopak hydrogely nemají okluzivní účinek, ale kvůli vysokému obsahu vody zlepšují úroveň hydratace pokožky. V praxi byl tento efekt zaznamenán například v případě ibuprofenu, kdy dochází k rychlému nárůstu propustnosti ibuprofenu z gelové formulace během prvních 4 hodin, po níž následuje pronikání drogy uvnitř kůže. Emulze V/O sice vykazují delší čas prodlevy v nástupu průniku látky než hydrogel, obě však umožňují transdermální dodávky ibuprofenu [131].

Zesilovače (akcelerátory) penetrace, jako je např. ethanol a propylenglykol a kyselina olejová, které se běžně používají jako součásti olejové nebo vodné fáze formulace, mohou urychlit pronikání mnoha látek do kůže i skrz ni. Pronikání aktivních látek do kůže lze dále ovlivňovat složením nosičů a látky podobné fosfolipidům, terpeny či neionické povrchově aktivní látky se používají jako významné složky různých vezikulárních systémů pro podávání léků se zvýšenou schopností transportu léčiva do kůže, jmenovat lze například liposomy, etosomy, propylenglykolové liposomy, invazomy, niosomy nebo mikroemulze [132]. Perkutánní absorpci léku mohou rovněž zvýšit nanočástice schopné procházet vlasovými folikuly [133]. V případě nano-systémů založených na vesikulách bylo prokázáno, že snížení velikosti systému zlepšuje dodávku léku do kůže [120]. Naopak mikročástice a velké vesikuly obvykle zůstávají na povrchu kůže a působí jako rezervoáry léčiv, poskytují tedy prodloužení doby uvolňování léčiva. Negativní náboj na povrchu liposomů zvyšuje penetraci léku do kůže ve větší míře než pozitivně nabité a neutrální liposomy [134]. Kromě toho také tuhost či elasticita membrán vezikul ovlivňuje ukládání léčiva na kůži a jeho případný další průnik. Konvenční liposomy a zejména liposomy zapouzdřené v PEG s tuhými membránami se akumulují uvnitř SC [135]. Deformovatelné (elastické) liposomy byly navrženy jako systém (NSD, nanosized delivery system), který je schopen se stlačit mezi úzkými póry a dopravit zapouzdřené látky hlouběji do kůže [136]. Většina farmaceutických a kosmetických nosičů je komplexní směs obsahující více než jen jednu složku, a proto může mít kombinace jednotlivých přítomných složek kumulativní charakter nebo synergické účinky na penetraci do kůže [137].

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Použití esenciálních olejů je v běžné praxi omezeno jejich těkavostí, špatnou rozpustností ve vodě a nestabilitou v přítomnosti tepla, světla a kyslíku [138]. Tyto nevýhody mohou být eliminovány, při zachování aktivity olejů, jejich zapouzdřením do různých nosných systémů, včetně liposomů, cyklodextrinů, nanočástic pevných lipidů, micel a nanočástic na bázi polymerů [139]. Inkorporace esenciálních olejů do liposomů tak vede ke zlepšení jejich rozpustnosti a zvýšení chemické stability [140].

Liposomy složené z esenciálních olejů byly testovány a charakterizovány v řadě publikací, a to z hlediska velikosti, účinnosti enkapsulace, kinetiky uvolňování, stability při skladování a biologických aktivit [139, 143, 144]. Ze všech těchto studií vyplývá, že vlastnosti liposomů jsou výrazně ovlivněny vlastnostmi enkapsulované aktivní látky. Například u liposomů z vaječného sfingomyelinu a cholesterolu obsahujících tři strukturně příbuzné alkaloidy (vincristin, vinorelbin a vinblastin) rozhoduje lipofilita léčiva o jeho kinetice uvolňování z liposomů [145]. Interakce vybraných složek esenciálních olejů s membránou tvořenou dipalmitoylfosfatidylcholinem pak byla studována pomocí Ramanovy spektroskopie, diferenciální skenovací kalorimetrie a anizotropie fluorescence [141, 142]. Výsledky ukázaly, že olejové složky způsobují vyšší fluiditu fosfolipidové membrány. Kromě toho inkorporace většiny testovaných esenciálních olejů snížila hodnotu přechodové entalpie a zvýšila pravděpodobnost narušení lipidových dvouvrstev.

Jsou dokumentovány i přípravy liposomů za účelem inkorporace složek esenciálních olejů [6]. Při přípravě takových liposomů musí být zohledňováno více parametrů, a to např. koncentrace fosfolipidů, koncentrace cholesterolu a způsob jejich přípravy [146]. U liposomů s enkapsulovaným olejem bývá hodnocena i případná rychlost inkorporace cholesterolu a stabilita lipozomálních suspenzí po více měsících. Předmětem diskuse však stále zůstávají účinky fyzikálně-chemických vlastností složek esenciálního oleje (rozpustnost, přítomnosti hydroxylových skupin ve struktuře a konečných lipozomálních kompozic, molární poměr fosfolipid:cholesterol:aktivní látka) na liposomy [147].

5 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo zpracování literární rešerše věnující se liposomům, jejich složení, vlastnostem a metodám přípravy. Podrobněji se tato část práce zaměřila i na praktické využití a aplikace těchto nosičů v průmyslu. Dále byla teoretická část věnována problematice esenciálních olejů, které jsou studovány pro své antimikrobní účinky, protinádorovou, antifungální a antiparazitickou aktivitu, což z nich činí vhodná fytofarmaka. Teoretická část je uzavřena kapitolou o transdermální penetraci, kde jsou přiblíženy mechanismy permeace a penetrace látek kůží, jakož i systémy testování transdermální absorpce.

V praktické části bylo úkolem připravit liposomy různých formulací s obsahem bioaktivních látek, konkrétně zvoleného esenciálního oleje. U těchto liposomů byly dále vhodnými technikami stanoveny základní fyzikálně-chemické charakteristiky, jako jejich morfologie, velikost a zeta potenciál. V dalším kroku bylo sledováno chování připravených liposomů při *in vitro* transdermální penetraci ve Franzových komůrkách, které bylo srovnáno s průběhem penetrace stanoveným pomocí fluorescenční detekce v reálném čase. V poslední části práce byly studovány biologické vlastnosti liposomů, konkrétně jejich antibakteriální aktivita, cytotoxicita a schopnost inhibovat Na^+/ K^+-ATPasu.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 POUŽITÝ MATERIÁL

6.1 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy (Sartorius)
- Spektrofluorometr (Horiba)
- Spektrofotometr (Specord)
- Multidetekční reader (Tecan)
- Multidetekční reader (Synergy)
- Vakuová odparka (Heidolph)
- Sonikátor (Hielscher)
- Dialyzační střívka cut off 14 kDa (Sigma Aldrich)
- Analyzátor velikosti částic Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern)
- Skalpel
- Systém pro detekci transdermální difuze (SES GmbH Analysesysteme)
- Stanice MPA5 se sondou pro stanovení Transepidermální ztáty vody (TEWL)
- Mikrometr (Somet)
- Transparentní lepicí páska
- Holicí strojek (Wilkinson)
- Automatické pipety (Eppendorf)
- Magnetická míchačka s ohřevem (IKA)
- Stříkačkové filtry s membránou 0,45 μm (VWR)
- Flow box (Alpina)
- Termostat (Thermo scientific)
- Pipetor (Thermo scientific)
- Centrifuga (Eppendorf)
- Světelný mikroskop (Olympus)
- Disky pro difuzní metodu (Himedia)
- Pipetovací stanice (Tecan)
- Vrtačka (Bosch)
- Elektronový mikroskop (Jeol)
- Aparatura generující doutnavý výboj ((Pelco)
- Měďěná síťka s tenkým uhlíkatým filmem (Electron Microscopy Sciences)
- Ultracentrifuga (Hitachi)

- Homogenizátor Potterova typu
- Cell counter (Bio-rad)
- Automatické pipety (Eppendorf)
- Plastové mikrozkumavky (Eppendorf)
- Běžné laboratorní sklo

6.2 Chemikálie a roztoky

- Cholesterol (CH) (Avanti polar lipids)
- 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin (DPPC) (Avanti polar lipids)
- 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-fosfo-L-serin (DPPS) (Avanti polar lipids)
- Chloroform (VWR)
- Skořicový esenciální olej (Saloos)
- Destilovaná voda
- Metanol HPLC grade (Chem-Lab)
- Receptorová kapalina o složení:
  - Fosfátem pufrovaný fyziologický roztok (Biosera)
  - Polyoxyethylen (20) oleyl ether 1,5 % (Brij 98, Sigma Aldrich)
  - Gentamycin sulfát 0,05 % (HiMedia Laboratories)
- Muller-Hintonův agar
- Trypsin-EDTA (Biosera)
- Fosfátový pufr
  - Dulbeccův fosfátový pufr (Biosera)
  - Hydrogenuhličitan sodný (Biosera)
- MTT thiazolová modř (Duchefa Biochemie)
- Uranyl acetát (Electron Microscopy Sciences)
- Činidlo Bradfordové (Sigma Aldrich)
- Hovězí sérový albumin (Sigma Aldrich)
- Amonium molybdát (Sigma Aldrich)
- Kyselina L-askorbová (Sigma Aldrich)
- Dodecylsulfát sodný (Sigma Aldrich)
- Kyselina chlorovodíková (Sigma Aldrich)
- Bismut citrátu (Sigma Aldrich)
- Citrát sodný (Sigma Aldrich)

- L-histidin (Sigma Aldrich)
- Sacharóza (Sigma Aldrich)
- Imidazol (Sigma Aldrich)
- Kyselina etylendiamintetraoctová (Sigma Aldrich)
- Adenosintrifosfát (Sigma Aldrich)
- Kultivační médium RPMI 1640 (Biosera)
- Trypanová modř (Sigma Aldrich)
- Clorid vápenatý (Sigma Aldrich)

6.3 Buněčné linie

- Myší embryonální fibroblasty (ATCC CRL – 1658 NIH-3T3)
- U937 buněčná linie odvozená z lidského histiocytického lymfomu (ATCC CRL - 1593.2)

6.4 Bakteriální kultury

- Tekutá kultura *Escherichia coli* (CCM 3954)
- Tekutá kultura *Staphylococcus aureus* (CCM 3953)

6.5 Biologický materiál

- Nespařené prasečí uši
- Prasečí ledviny

7 METODIKA

7.1 Spektrální charakteristiky vybraných bioaktivních látek

Vybrané bioaktivní látky byly rozpuštěny v methanolu a na spektrofotometru SPECORD 250 Basic byla proměřena jejich absorpční spektra proti čistému rozpouštědlu. Následně byla u vhodných látek s významnými hodnotami absorbance proměřena emisní spektra při excitačních vlnových délkách rovných absorpčním maximům pomocí spektrofluorometru Fluorolog. Z těchto látek byla dále vybrána jedna reprezentativní látka pro nadcházející experimenty.

7.2 Příprava liposomů s enkapsulovaným esenciálním olejem

Liposomy se běžně připravují rozpuštěním lipidových látek v organickém rozpouštědle a následným vysušením za tvorby lipidového filmu, který je dále hydratován vodným roztokem. Takto vytvořené liposomy bývají purifikovány a poté analyzovány [11].

Pro přípravu liposomů byly použity 2 různé fosfolipidy a cholesterol ve 4 různých poměrech. První formulace se skládala pouze z DPPC, druhá z DPPC a cholesterolu v poměru 7:3, ve třetí formulaci bylo přítomno DPPC a DPPS taktéž v poměru 7:3, poslední formulace (pro kontrolu vlivu množství cholesterolu) byla tvořena DPPC a cholesterolem v poměru 5:1.

Lipidy byly naváženy pro výslednou koncentraci 5 mg/ml, skořicový esenciální olej pro koncentraci 15 mg/ml. Množství jednotlivých složek pro přípravu 5 ml liposomální disperze je uvedeno v Tab. 1. Po rozpuštění lipofilních látek v chloroformu byla směs odpařována na vakuové odparce při 50 °C a 60 rpm až do tvorby suchého filmu na stěnách baňky. Ten byl následně hydratován demineralizovanou vodou za stejných podmínek. Vzniklá liposomová disperze byla sonikována pomocí sonikátoru Hielscher třemi pulzy (20 s, 30% výkon) za stálého chlazení na ledu. U čerstvě připravených liposomů byla stanovena jejich velikost, zeta potenciál a poté byly přes noc dialyzovány při 4 °C 5 litry destilované vody za použití dialyzační membrány s cut off 14 kDa.

Tab. 1: Množství fosfolipidů a cholesterolu pro přípravu liposomů (na 5 ml liposomální disperze)

Formulace	DPPC	DPPS	CH
DPPC	25 mg	x	x
DPPC-DPPS	17,5 mg	7,5 mg	x
DPPC-CH 7/3	17,5 mg	x	7,5 mg
DPPC-CH 5/1	20,8 mg	x	4,2 mg

7.3 Stanovení velikosti liposomů a zeta potenciálu

Dynamický rozptyl světla (DLS), někdy označovaný jako fotonová korelační spektroskopie nebo kvazi-elastický světelný rozptyl, je technika umožňující měření velikosti částic v sub-mikrometrovém rozmezí. Pro DLS analýzu se částice resuspendují v roztoku, osvětlují laserovým svazkem. Částice rozptylují světlo odlišně od částic rozpouštědla [148]. Liposomy byly měřeny v nativním stavu, bez nutnosti dehydratace nebo barvení. Zeta potenciál se používá k měření intenzity odpudivé elektrostatické interakce mezi přirozeně nabitými koloidními částicemi [149]. Měření zeta potenciálu se běžně používá k hodnocení stability koloidních systémů. Pokud mají všechny částice v suspenzi značný negativní nebo pozitivní zeta potenciál, budou mít tendenci se navzájem odpuzovat, proto nebudou agregovat. Typicky jsou stabilní částice se zeta potenciály pozitivnější než 30 mV nebo více negativní než −30 mV [150].

Samotné měření distribuce velikostí liposomů probíhalo v plastových kyvetách s optickou délkou 1 cm a pro měření byly použity cca 100 × ředěné sonikované disperze liposomů. Při zjišťování zeta potenciálu byly 200 × ředěné liposomy aplikovány stříkačkou do speciálních kyvet firmy Malvern. Měření velikosti liposomů i jejich zeta potenciálu probíhalo na přístroji Zetasizer Nano ve třech opakováních, přičemž každé opakování měření velikosti se skládalo z 12-16 cyklů (dle heterogenity distribuce částic), pro zeta potenciál z max. 100 cyklů, které sloužily jako základ pro výpočet. Výsledky velikosti byly vyjádřeny jako z-average – intenzitně vážený průměr velikostí všech liposomů v disperzi. Zeta potenciál byl stanoven pomocí Smoluchowskeho rovnice.

7.4 Stanovení morfologie – transmisní elektronová mikroskopie

Mikroskopické techniky, jako je mikroskopie atomové síly (AFM), environmentální rastrovací elektronová mikroskopie (ESEM), transmisní elektronová mikroskopie (TEM) a konfokální laser-scanningová mikroskopie (CLSM) mohou poskytovat řadu informací o struktuře liposomů. TEM poskytuje informace týkající se jejich tvaru, morfologie a rozměrů. Díky elektronové mikroskopii mohou být pořízeny fotografie, které pak slouží k dalšímu zpracování a statistickému vyhodnocení [150].

Pro transmisní elektronovou mikroskopii byly použity vzorky připravených liposomů uskladněné při 4 °C. Nejprve byly měděné síťky s tenkým uhlíkatým filmem vloženy do aparatury generující doutnavý výboj, aby došlo k jejich hydrofilizaci. Poté bylo na každou síťku pipetováno 5 µl liposomů a ponecháno 60 sekund interagovat. Poté byl přebytek liposomů odstraněn a na síťku bylo přidáno 5 µl 2% uranyl acetátu, který slouží jako kontrastní látka. Přebytek této kontrastní látky byl po jedné minutě opět odpipetován, síťka byla vložena do mikroskopu a byl pořízen a uložen mikroskopický obraz liposomů.

7.5 Enkapsulační účinnost

Enkapsulační účinnost byla měřena z důvodu zjištění, jaké množství esenciálního oleje je daná formulace schopna enkapsulovat. Tento poznatek je důležitý při přípravě dalších formulací či při jejich samotném praktickém využití.

I při zjišťování enkapsulační účinnosti nebylo snadné jednoznačně zvolit metodu, kterou bude množství oleje ve vzorku stanoveno. Po řadě předběžných testů se nakonec jako nejúčinnější ukázal způsob spektroskopického stanovení, pro které byla sestavena kalibrační řada z roztoků esenciálního oleje rozpuštěného v methanolu. Roztoky byly připraveny v koncentračním rozmezí 0-15 mg/mL, jelikož při přípravě liposomů byla výchozí koncentrace oleje 15 mg/ml. Koncentrační řadou byly pokryty možné koncentrace oleje v liposomech od minimálního až po maximální množství. Takto připravené standardy kalibrační řady byly 1000 × zředěny a byla proměřena jejich absorpční spektra. Stejným způsobem byly proměřeny i jednotlivé formulace. Esenciální olej byl z liposomů uvolněn jejich rozpuštěním v methanolu a hodinovou sonikací v lázni. Z kalibrační přímky pak byla stanovena koncentrace esenciálního oleje v liposomech.

7.6 Antimikrobní aktivita liposomů

Disková difuzní metoda je kvalitativním testem pro stanovení inhibice bakteriálních kmenů látkami různého původu, které se obvykle aplikují na sterilní papírové disky a nechávají s bakteriálními kulturami inkubovat. Tyto látky z disků difundují a postupně se uvolňují do živné půdy kontaminované bakteriemi. Rezistence či citlivost daného bakteriálního kmene se hodnotí dle případného vzniku a velikosti inhibiční zóny na agarové kultivační půdě (v této oblasti nedochází k množení bakterií) [151].

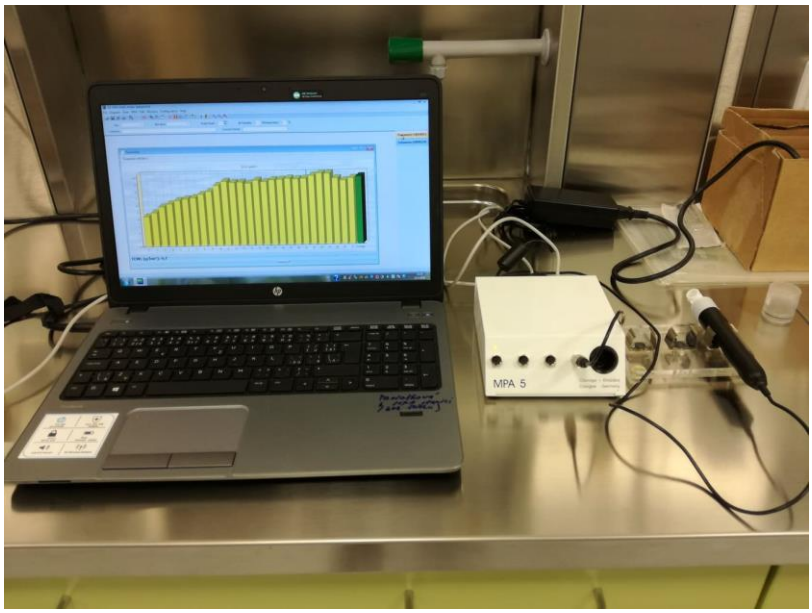
Na Petriho misky s Muller-Hintonovým agarem bylo naneseno a kličkou rozetřeno 100 µl suspenze kultury *Escherichia coli* nebo *Staphylococcus aureus*. Bakteriální suspenze byly naředěny na 0,5 CFU/ml dle McFarlandovy stupnice. Poté bylo na každou misku umístěno 6 sterilních papírových disků, na které bylo vždy pipetováno 10 µl připravených liposomů o různém ředění (koncentrovaný, 2 ×, 4 ×, 8 × a 16 × ředěný) a 10 µl demineralizované vody, která sloužila jako reference. Misky byly ponechány 24 hodin v termostatu při 37 °C a následně byl vyhodnocen bakteriální růst na jejich povrchu.

7.7 Stanovení transdermální absorpce *in vitro*

7.7.1 Biologický materiál

Pro stanovení transdermální absorpce byla použita kůže z vnitřní strany ucha prasete domácího. Tato kůže nesměla být narušena či spařena, jelikož by porušení kožní bariéry mohlo znamenat zkreslení výsledků. Ušní boltce byly uchovávány při – 20 °C a před samotným experimentem byly z mrazničky vytaženy a šetrně rozmrazeny. Vnitřní část boltce byla poté oholena pomocí jednorázové holicího strojku a kůže byla skalpelem opatrně odřezána od ušní chrupavky (Obr. 1). Takto získaná kůže (obsahovala všechny vrstvy *epidermis* a *dermis*) byla dále rozdělena na vzorky o velikosti 2,2 × 2 cm. Homogenita a propustnost jednotlivých kožních vzorků byla stanovena pomocí měření transepidermální ztráty vody (TEWL) a byla rovněž změřena tloušťka kůže pomocí mikrometru (Obr. 2). Pro test byly vybrány jen ty vzorky kůže, jejichž hodnota TEWL nepřesáhla 15 g/m^2 h, což svědčilo o dobré bariérové funkci použité kůže. Vzorky tak byly připraveny pro okamžité testování.

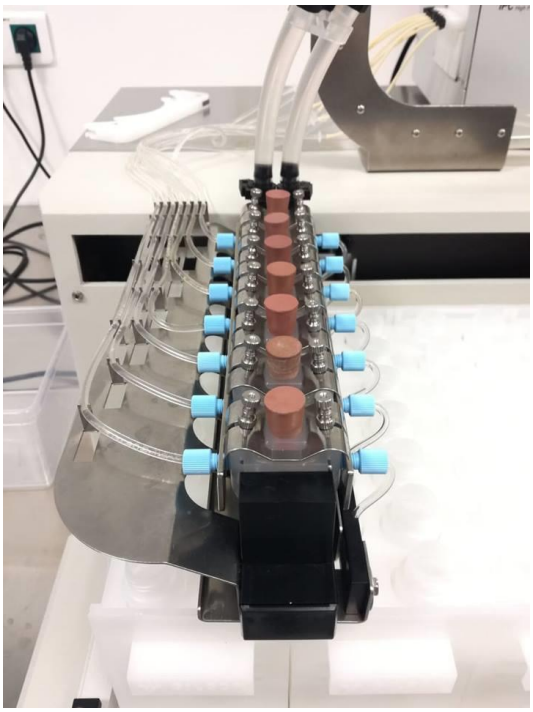
Obr. 1: Preparace kůže od chrupavky



Obr. 2: Aparatura pro stanovení TEWL použité kůže

7.7.2 Transdermální absorpce pomocí Franzových difuzních komůrek

Aparatura se skládala ze sedmi Franzových komůrek, každá s přívodnou a odvodnou hadičkou na receptorovou kapalinu, a vodního čerpadla, které zajišťovalo v celém měřícím systému konstantní teplotu 32 °C po celou dobu experimentu (Obr. 3). Akceptorová část Franzových komůrek byla naplněna receptorovou kapalinou a na ni byl přiložen vzorek kůže rohovou vrstvou směrem vzhůru tak, aby se v systému nenacházely žádné vzduchové bubliny a kůže byla celou spodní plochou v kontaktu s kapalinou. Kůže byla ponechána 30 minut ke kondicionaci, následně na ni byla položena krycí část komůrky, do jejíhož otvoru bylo rovnoměrně automatickou pipetou naneseno 60 µl připravené suspenze liposomů. Vzorky byly pipetovány v dupletu, pouze doplňkové liposomy DPPC s cholesterolem (5/1) pouze jednou. Po uzavření komůrek trval experiment 24 hodin ve stacionární fázi (receptorová kapalina nebyla v průběhu měněna za novou).



Obr. 3: Aparatura pro transdermální absorpci – Franzovy komůrky

7.7.3 Zpracování vzorků

Po uplynutí časového intervalu byly Franzovy komůrky otevřeny a vrchní část komůrky, která byla ve styku s kůží, byla opláchnuta a ponechána pro další analýzu (vzorek 1). Ze vzorku kůže byl odpipetován či seškrábnut zbytek nanášené látky (vzorek 2) a vystřihnut terčík, kam byla aplikována látka. Zbytek kůže v okolí terčíku byl rozstříhán na malé kousky (vzorek 6). Z terčíku bylo pomocí lepicí pásky opětovným (4x) strháváním odstraněny jednotlivé vrstvy *stratum corneum* (vzorek 3). Terčík zbavený rohové vrstvy byl svojí svrchní stranou přitlačen na míchadlo se zapnutým ohřevem až do vzniku puchýře *epidermis*. Ten byl pinzetou stržen (vzorek 4) a zbylá dermis byla rozstříhána na malé kousky (vzorek 5). Takto připravené vzorky byly uskladněny pro další analýzu v 1 ml methanolu při – 20 °C. Receptorová kapalina, která se nacházela ve Franzových komůrkách pod kůží, v tzv. akceptorové části, byla naředěna 300 µl čisté receptorové kapaliny (vzorek 7) a taktéž uskladněna při −20 °C v plastových mikrozkumavkách k další analýze.

7.7.4 Analýza kožních vzorků

V liposomech byl enkapsulován esenciální olej, tudíž by bylo obtížné využít pro detekci kapalinové chromatografie, jelikož se jedná o látku s heterogenním složením a zpracování i interpretace výsledků by byly časově náročné. Z toho důvodu bylo pro detekci esenciálního oleje v jednotlivých vrstvách kůže využito jeho spektrálních vlastností. Jednotlivé extrakty byly měřeny proti blanku (methanol či receptorová kapalina) na spektrofluorometru za excitačních a emisních vlnových délek typických pro samotný olej. Při tomto měření bylo možné sledovat hladiny fluorescence při určitých vlnových délkách a porovnávat je mezi sebou.

7.7.5 Transdermální absorpce pomocí fluorescenční detekce

Biologický materiál byl zpracován stejným způsobem jako v kap. 7.7.1. Kůže byla rozdělena na vzorky velikosti 1 × 1 cm. Jamky mikrotitrační destičky byly naplněny až po okraj receptorovou kapalinou a byl na ně umístěn vzorek kůže a ponechán 30 minut pro dostatečnou hydrataci a vyrovnání povrchu. Systém byl překontrolován kvůli nežádoucímu výskytu vzduchových bublin. Destička i s kůží byla přikryta víčkem, ve kterém byly vyvrtány otvory přesně o velikosti jamek v destičce. Toto víčko bylo zafixováno po krajích pro lepší přilnavost ke kůži a dostatečné utěsnění okolí terčíků. Na vzorky kůže bylo pipetováno

30 µl liposomů. Takto připravená destička byla vložena do spektrofluorometru vytemperovaného na 32 °C a průchod liposomů s esenciálním olejem kožními vzorky byl snímán po 24 hodin.

7.8 Cytotoxicita

7.8.1 Cytotoxicita na myších fibroblastech

Vybraná buněčná linie myších fibroblastů uchovávána při 37 °C byla vizuálně zkontrolována pod mikroskopem (viabilita buněk) a poté bylo z kultivační nádoby odsáto přebytečné médium. Nádoba byla vypláchnuta 10 ml PBS a kapalina byla poté opětovně odsáta. Pro uvolnění přisedlých buněk byly pipetou přidány 4 ml trypsinu a celá nádoba byla umístěna na 15 minut do termostatu při 37 °C, uvolnění buněk bylo ověřeno vizualizací mikroskopem. Po přidání média byly buňky centrifugovány 3 minuty při 1100 rpm za teploty 37 °C. Přebytečné médium bylo odpipetováno a zbylé buňky naředěny na počet 10^6 v 1 ml. Do mikrotitračních destiček bylo pipetováno 100 µl suspenze buněk, které byly ponechány 24 hodin v termostatu při 37 °C. Následujícího dne bylo přebytečné médium odsáto, do jamek bylo napipetováno 100 µl liposomů ředěných na 50, 40, 30, 20, 10 a 5% koncentraci původní liposomální disperze. K referenčním vzorkům pak bylo přidáno pouze 100 µl kultivačního média. Takto připravené vzorky byly kultivovány 24 hodin v termostatu při 37 °C. Poté bylo přebytečné médium i extrakt odsáty, do jamek bylo přidáno 100 µl nového média a 10 µl MTT (5 mg/ml) a byla provedena následná inkubace (4 hodiny). Z misek bylo poté odstraněno přebytečné médium a bylo přidáno 80 µl DMSO, které se nechalo 15 minut působit. Pro hodnocení výsledku byla měřena absorbance při 570 nm. Jelikož živé buňky mění žluté MTT na modrý formazan, byla životaschopnost buněk v přítomnosti liposomů hodnocena pomocí této barevné změny. U kontroly se při dané vlnové délce očekávala vyšší absorbance.

7.8.2 Cytotoxicita na lidských leukemických buňkách

Pro experiment byla použita buněčná linie U937 (pro-monocytová lidská myeloidní leukemická buněčná linie) v kultivačním médiu RPMI 1640 při 37 °C. Ve vzorku buněčné disperze byl pomocí přístroje „cell counter“ změřen obsah buněk a jejich příslušná viabilita pomocí vizualizace buněk 4% trypanovou modří použité v poměru se vzorkem 1:1. Poté

bylo do jamek mikrotitrační destičky pipetováno 50 µl suspenze buněk a k nim přidáno 50 µl liposomů o koncentracích 100, 80, 60, 40 a 20 % vzhledem ke koncentraci původní. Ředění bylo provedeno kultivačním médiem. Buňky spolu s liposomy (potenciálními inhibitory buněčného růstu) byly kultivovány 24 hodin při 37 °C a poté byl stanoven počet a viabilita buněk. Jako reference bylo k buněčné linii přidáno samotné kultivační médium.

7.9 Inhibice Na^*, K^+- ATPasy

Sodno-draselná pumpa (Na^+/K^+-ATPasa, E.C. 3.6.3.9, NKA) je enzym zásadního významu pro všechny živočišné buňky. Je to hlavní determinant cytoplazmatických koncentrací sodných a draselných iontů a potenciálu plazmatické membrány. Gradient Na^+ na plazmatické membráně je nezbytný pro řadu sekundárních aktivních transportérů (např. Na^+/Ca^{2+} a Na^+/H^+) nebo Na^+-dependentní transportér glukózy, a proto NKA nepřímo reguluje také koncentrace dalších fyziologicky významných rozpustných látek. Nekontrolovaná inhibice NKA tak může mít za následek závažná onemocnění, jako jsou selhání ledvin, hypertenze nebo diabetické neuropatie [152] nebo v limitním případě dokonce smrt. Hlavní specifický inhibitor NKA kardioglykosid ouabain byl původně používán jako šípový jed [153].

7.9.1 Biologický materiál

Čerstvé prasečí ledviny byly zpracovávány při 4 °C. Nejdříve byly nakrájeny na plátky o šířce 0,5 – 1 cm. Z nich byla poté vyřezána tmavá tkáň, ze které byl odstraněn přebytečný tuk. Zbylá tkáň byla zhomogenizována a chlazena v pufru (30 mM L-histidin, 250 mM- sacharóza, pH 7,3). Poté byl přebytečný pufr odlit a tkáň byla smíchána s druhým pufrem (25 mM imidazol, 250 mM sacharóza, 1 mM EDTA, pH 7,4) a ledovými kostkami připravenými z tohoto pufru. Tato směs byla krátkými pulzy rozmixována a zhomogenizována homogenizátorem Potterova typu. Následovala centrifugace 3700 g po dobu 20 minut při 4 °C. Supernatant S1 byl uchován na ledu, pelet byl rozpuštěn v druhém pufru a opět homogenizován. Centrifugace se opakovala za stejných podmínek a získaný supernatant S2 byl přidán k S1. Spojené supernatanty S1 a S2 byly centrifugovány při 7400 g po dobu 20 minut při 4 °C. Vzniklý supernatant byl použit na ultracentrifugaci 38000g (14600 rpm) po dobu 40 minut při 4 °C. Vzniklý pelet se resuspendoval v druhém pufru a homogenizován.

Takto vzniklé mikrosomy NKA interagovaly 24 hodin s roztoky SDS, poté byly ultracentrifugovány při 127000 g (31 800 rpm) po dobu 50 minut při 4 °C. Pelet byl resuspendován v pufru (20 mM L-histidin, 250 mM sacharóza a 0,9 mM EDTA, pH7) a ultracentrifugován za stejných podmínek. Resuspendace a ultracentrifugace byly opakovány čtyřikrát. Výsledný pelet resuspendovaný v pufru obsahoval čistou NKA beze zbytků plasmatické membrány. U NKA byla stanovena koncentrace metodou Bradfordové (jako standart byl použit bovinní sérový albumin) [154] a dále byl uskladněn při –80 °C.

7.9.2 Baginsky assay

Měření aktivity NKA bylo provedeno pomocí Baginsky assay [155]. Test byl proveden v mikrotitračních destičkách a automatizován v pipetovací stanici. Reakční pufr byl složen z 325 mM NaCl, 50 mM KCl, 7,5 mM $MgCl_2$ a 75 mM imidazolu, pH 7,2. NKA izolovaná z prasečích ledvin byla smíchána s reakčním pufrem bez ATP. Všechny liposomy (testované jako inhibitory) byly naředěny vodou bezprostředně před měřením a pak byly předem smíchány s reakčním pufrem na požadovanou koncentraci. Následně bylo do 20 µl roztoku NKA přidáno 10 µl roztoku inhibitoru (liposomů) a inkubováno po dobu 5 minut. Ke referenčnímu vzorku bylo přidáno pouze 10 µl vody. Reakce byla zahájena přidáním roztoku ATP (20 µl, 7,5 mM). Reakce probíhala 6 minut při pokojové teplotě a pak byla zastavena přidáním 75 µl barvícího roztoku, který byl tvořen 160 mM kyselinou askorbovou, 3,7% kyselinou octovou, 3% SDS a 0,5% molybdenanem amonným. Barvící reakce byla zastavena po dalších 8 minutách přidáním 125 µl roztoku složeného z 0,9% citrátu bismutu, 0,9% citrátu sodného a 3,7% HCl. Metoda Baginsky detekuje produkt hydrolýzy ATP, anorganický fosfát, který interaguje s molybdenanem amonným. Reakce má za následek změnu barvy, která může být sledována jako změna absorbance při 710 nm. Kalibrační přímka byla stanovena pomocí roztoku KH_2PO_4. Aktivita NKA se standardně odhaduje za použití ouabainu, který slouží jako specifický inhibitor NKA. Aktivita ATPasy klesá na méně než 10% v přítomnosti 10 mM ouabainu. Tato reziduální aktivita v přítomnosti ouabainu byla odečtena od celkové odhadované ATPasove aktivity v neošetřených vzorcích ouabainu a všechna data jsou prezentována jako aktivita ATPasy citlivá na ouabain.

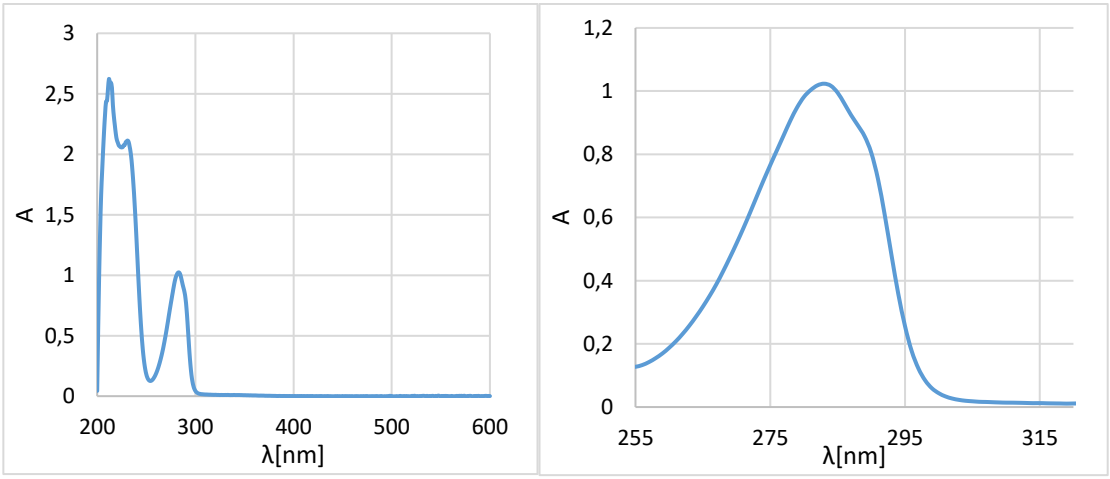
7.10 Stabilita liposomů

Stabilita liposomů byla hodnocena na základě změny distribuce částic a měření zeta potenciálu v týdenních intervalech dle postupu v kap. 7.3. Dále byly změny na liposomech sledovány pomocí mikroskopického pozorování. Liposomy byly snímkovány po 15 dnech transmisním elektronovým mikroskopem viz kap. 7.4. V posledním testu byl pak stanoven vliv solí na stabilitu liposomů. Liposomy byly inkubovány s $CaCl_2$ po dobu 24 hodin. Množství solí bylo voleno tak, aby výsledná koncentrace soli v roztoku byla v rozmezí 0,001 až 1 M. Poté byla změřena velikost částic a zeta potenciál viz kap. 7.3.

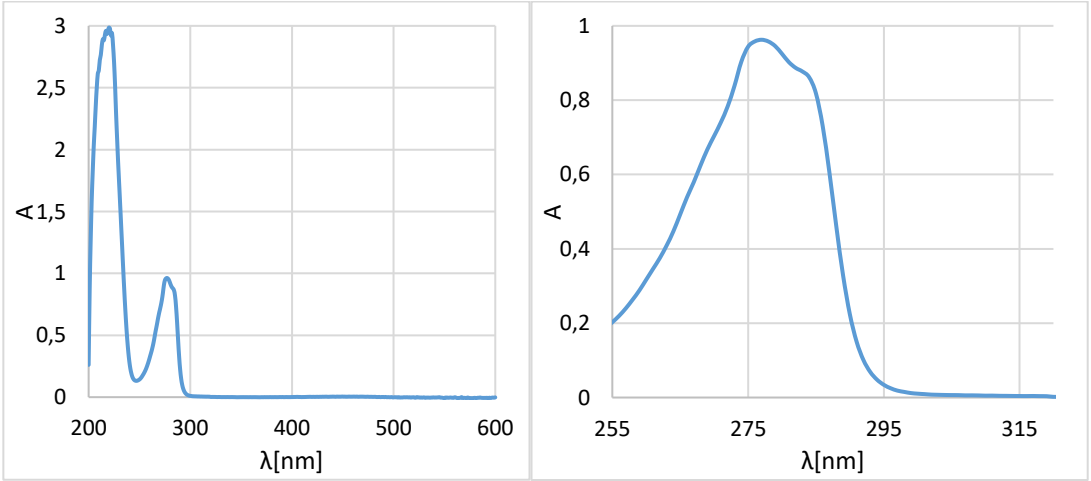
8 VÝSLEDKY

8.1 Spektrální charakteristiky

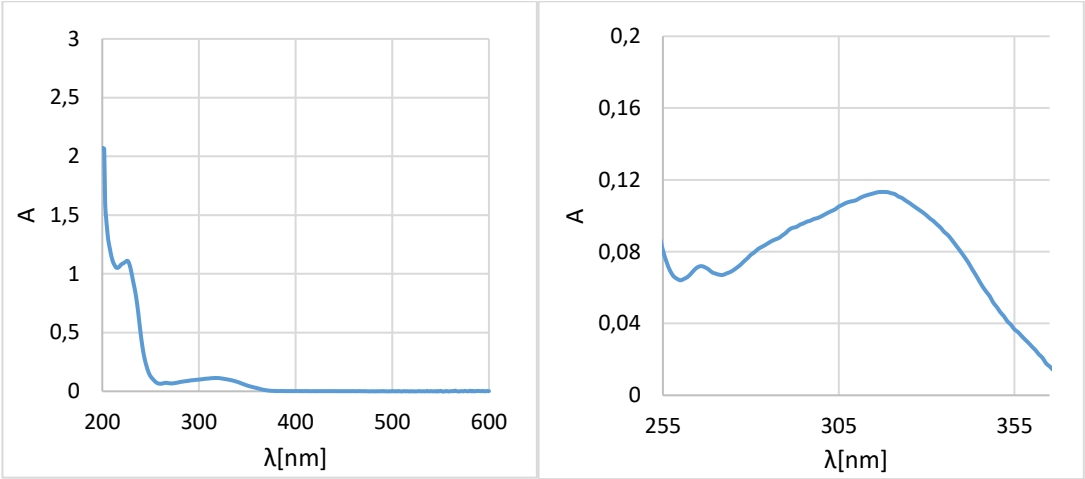
V prvním kroku byl proveden screening různých olejů vhledem k jejich spektrálním charakteristikám. Test byl proveden za účelem volby oleje vhodného pro enkapsulaci. Jako vhodný poměr disperze liposomů a rozpouštědla pro měření absorbance byly použity 2 µl zředěného esenciálního oleje rozpuštěného v 2 ml čistého methanolu. Spektra byla proměřována od 200 do 600 nm (Obr. 4-7). Měření jsou použitelná pro absorbanci v intervalu 0,005-1, mimo tento rozsah jsou zatížena chybou.



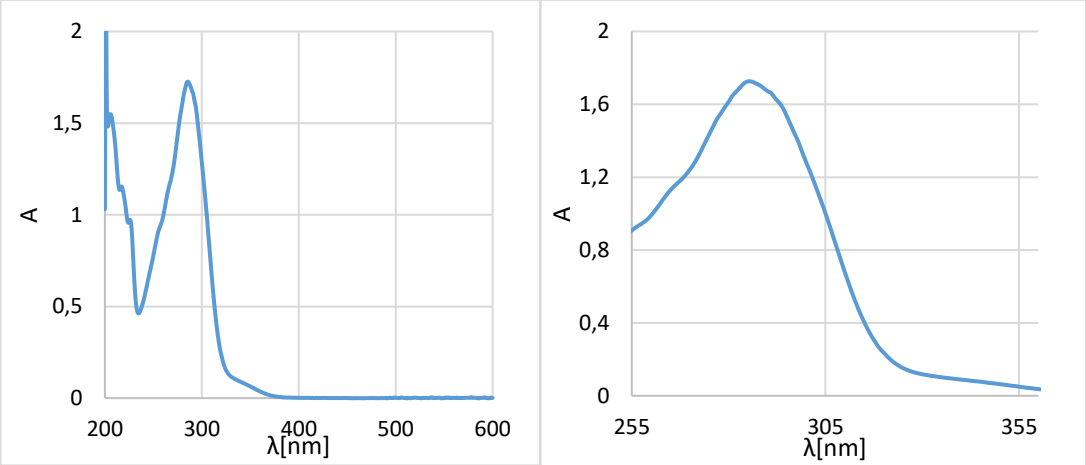
Obr. 4: Absorpční spektrum hřebíčkového esenciálního oleje (10× zředěný)



Obr. 5: Absorpční spektrum tymiánového esenciálního oleje (10× zředěný)

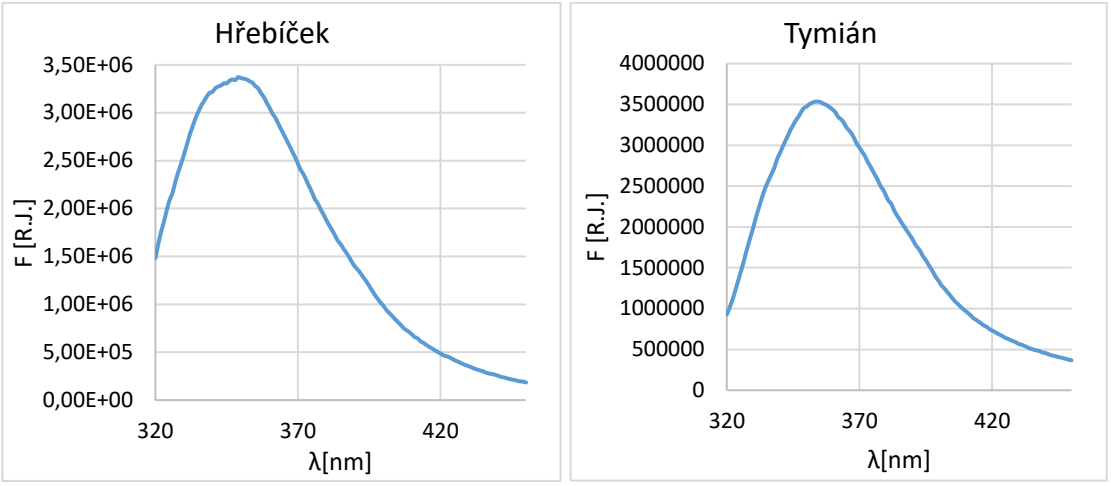


Obr. 6: Absorpční spektrum esenciálního oleje z heřmánku (40× zředěný)

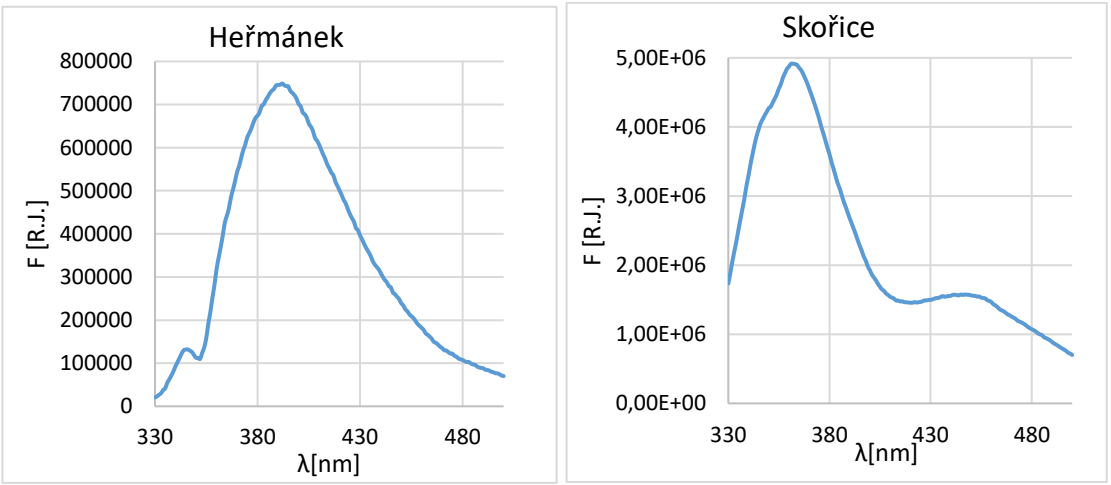


Obr. 7: Absorpční spektrum skořicového esenciálního oleje (80× zředěný)

Při měření emisních spekter byly jako excitační hodnoty vlnových délek použity maxima ze spekter absorpčních. Oleje byly rozpouštěny v methanolu ve stejném poměru jako u absorpčních měření, před samotným měřením byly však ředěny – hřebíčkový 10×, tymiánový 5 ×, heřmánkový a skořicový 20 ×. Spektra jsou uvedena na Obr. 8 a 9.



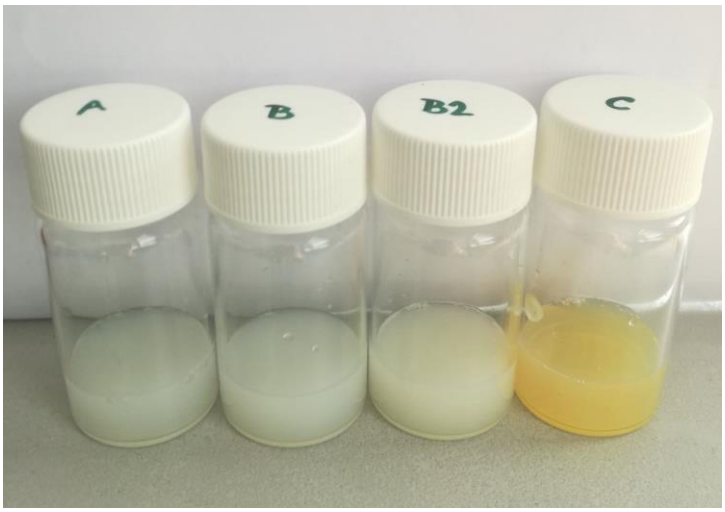
Obr. 8: Emisní spektra esenciálních olejů z hřebíčku a tymiánu



Obr. 9: Emisní spektra esenciálních olejů z heřmánku a skořice

8.2 Příprava liposomů

Liposomy byly připraveny dle postupu uvedeného v kap. 7.2. Dialýza probíhala v celulosových střívkách s cut-off 14 kDa. Vzhled liposomů je ilustrován na Obr. 10.



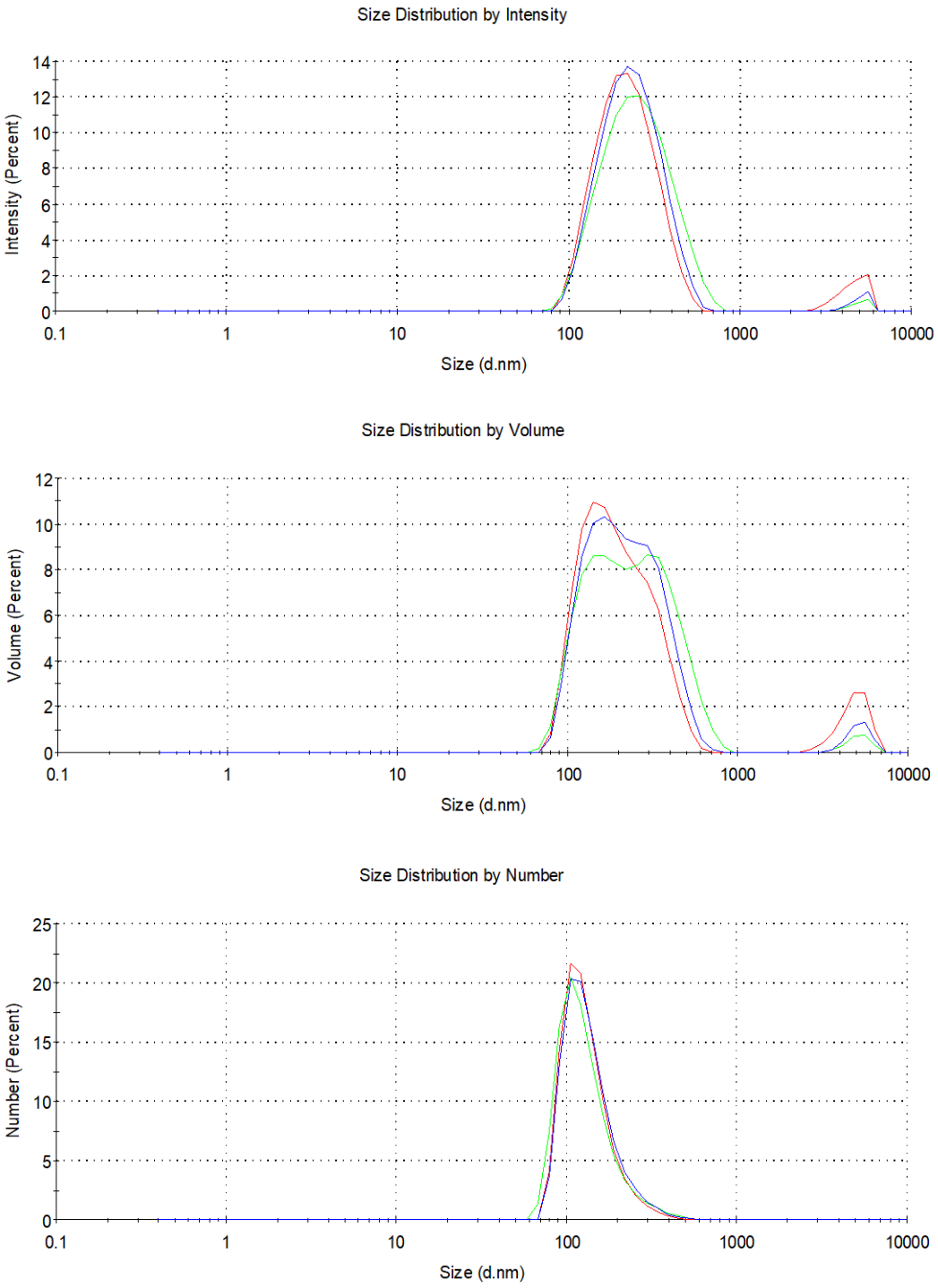
Obr. 10: Liposomy po dialýze; A) DPPC, B) DPPC-CH 7/3, B2) DPPC-CH 5/1, C) DPPC-DPPS 7/3

8.3 Velikost částic a zeta potenciál

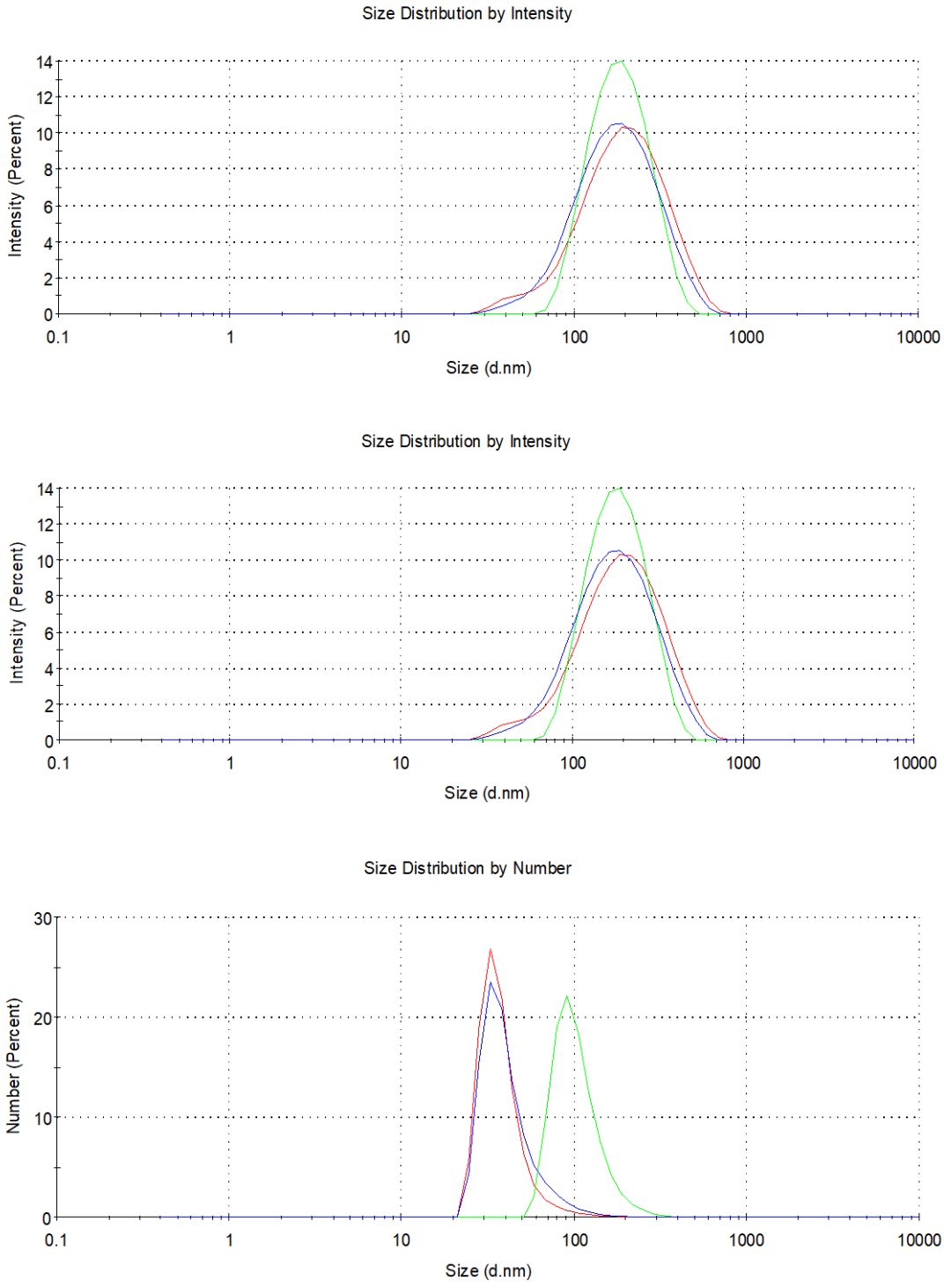
Velikost částic byla počítána průměrem z 12-16 naměřených cyklů (dle heterogenity vzorku) vždy ve třech opakováních. Zeta potenciál byl také měřen ve třech opakováních, při každém byl vzorek proměřen max 100 cykly a hodnoty zprůměrovány (Tab. 2). Distribuce velikostí studovaných liposomů stanovené na základě intenzity, objemu a počtu jsou pak uvedeny na Obr. 11 až 14.

Tab. 2: Velikost částic a zeta potenciál vytvořených liposomů vyjádřené jako průměr ± směrodatná odchylka

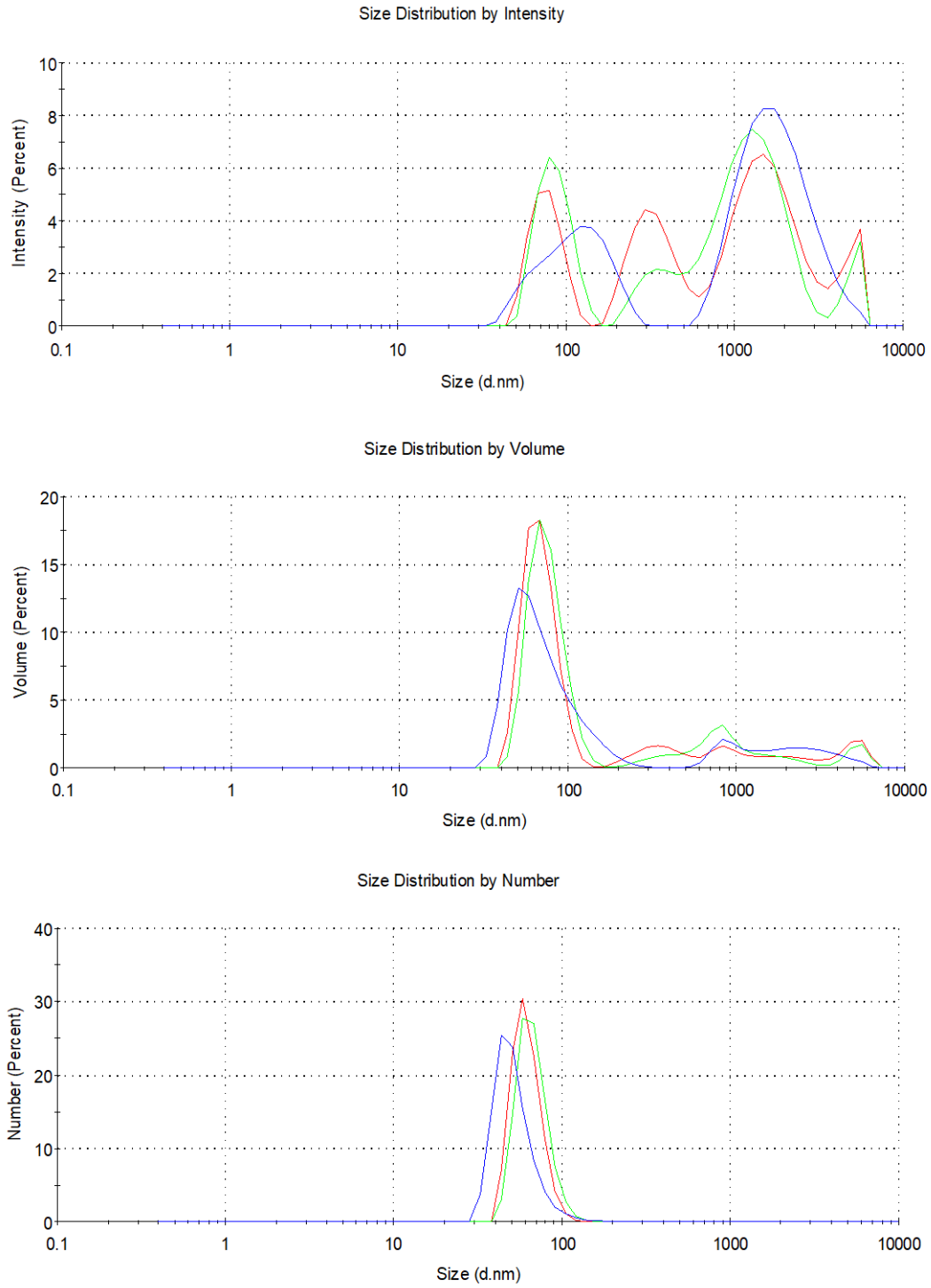
Vzorek	Průměrná velikost [nm]	Zeta potenciál [mV]
DPPC	210 ± 3	1,1 ± 0,8
DPPC-DPPS	157 ± 5	-25,5 ± 0,8
DPPC-CH 7/3	222 ± 20	-18,4 ± 1,1
DPPC-CH 5/1	526 ± 31	-7,5 ± 1,0



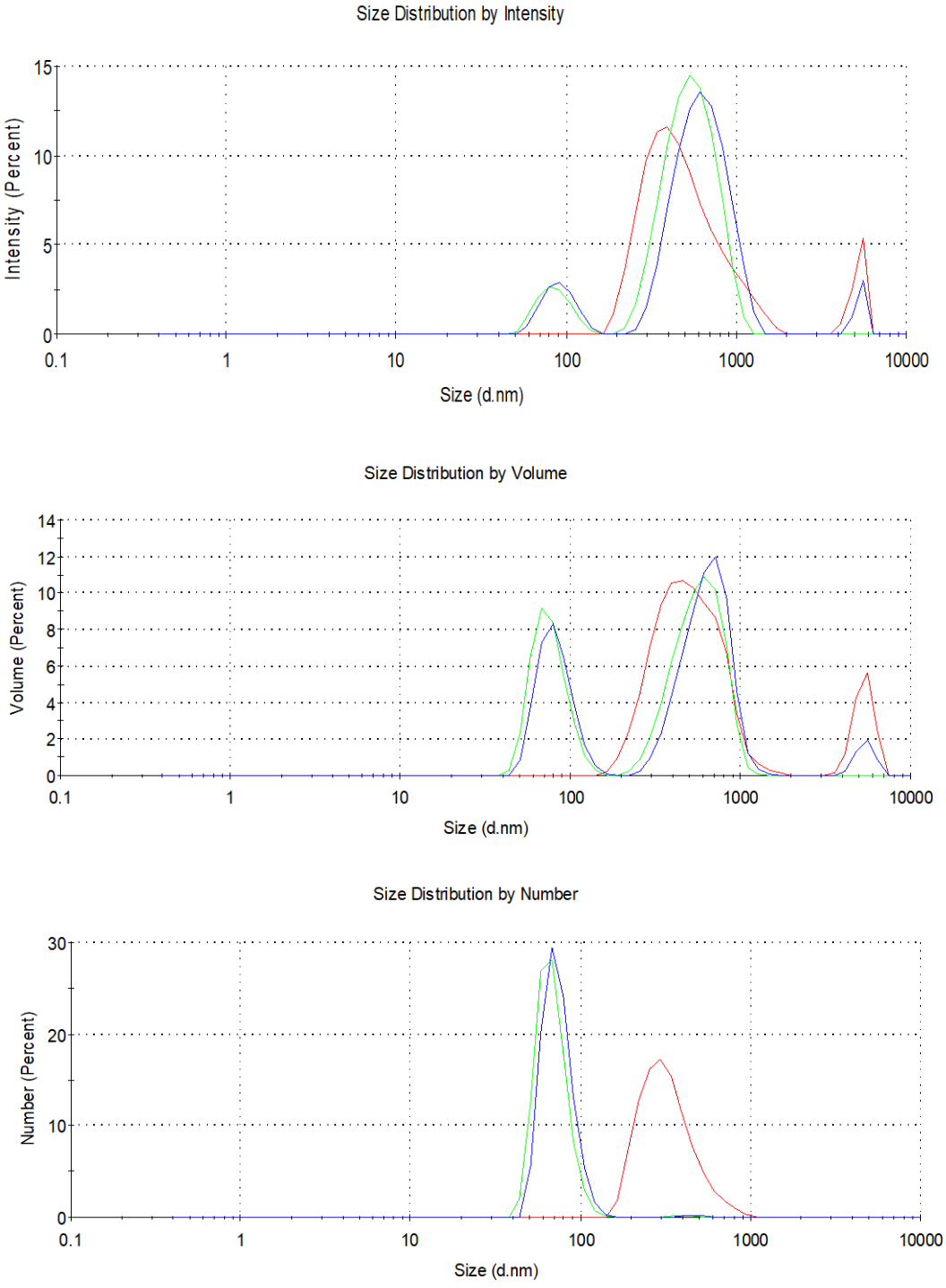
Obr. 11: Distribuce velikostí liposomů z DPPC dle intenzity, objemu a počtu částic



Obr. 12: Distribuce velikostí liposomů z DPPC-DPPS (7/3) dle intenzity, objemu a počtu částic



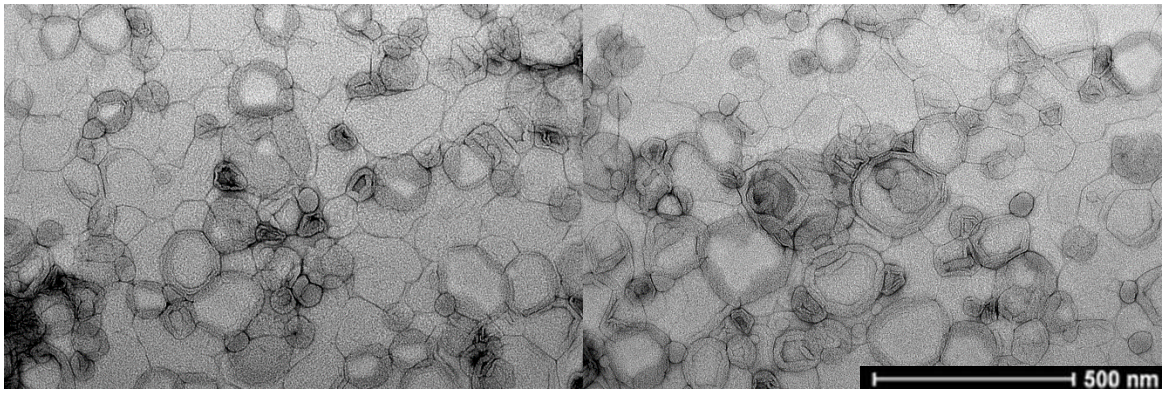
Obr. 13: Distribuce velikostí liposomů z DPPC-CH (7/3) dle intenzity, objemu a počtu částic



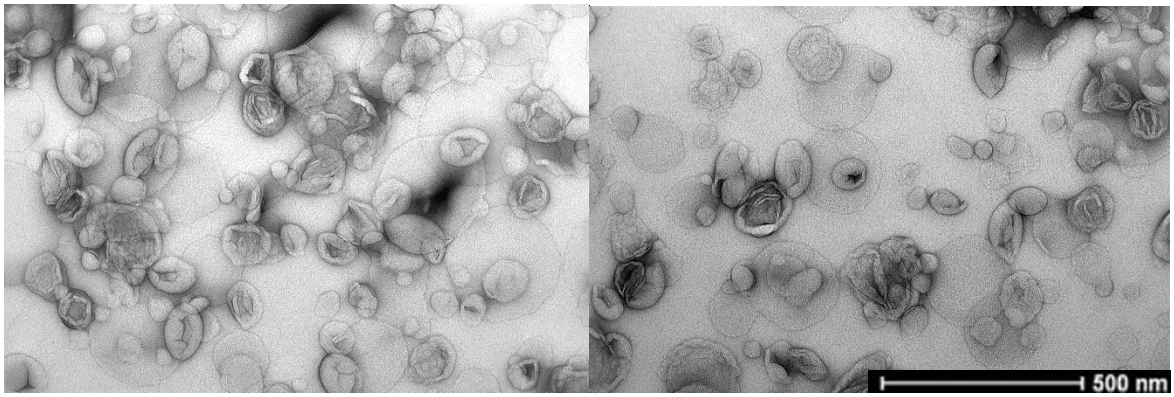
Obr. 14: Distribuce velikostí liposomů z DPPC-CH (5/1) dle intenzity, objemu a počtu částic

8.4 Elektronová mikroskopie

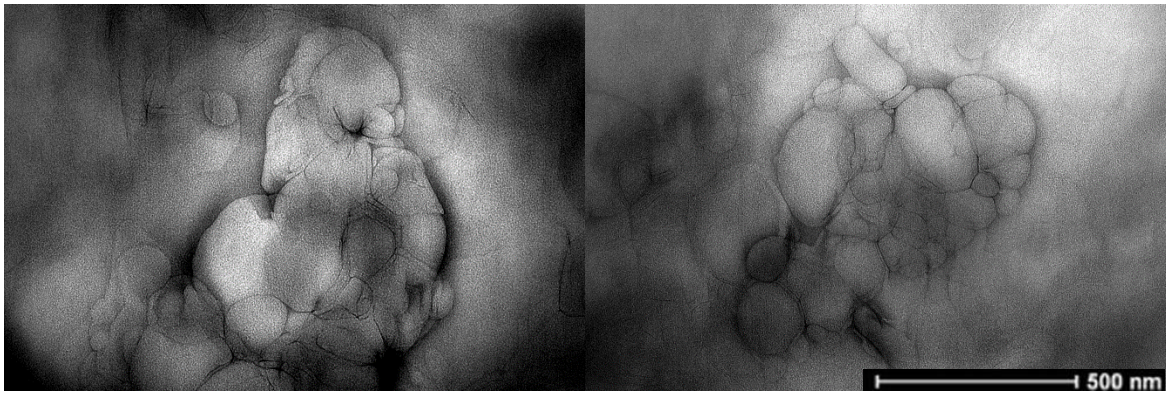
U vzorků liposomů byla pomocí transmisní elektronové mikroskopie sledována jak morfologie, tak i velikost. Hodnoty velikostí liposomů byly porovnány s výsledky naměřenými pomocí DLS. Předmětem zájmu byl i tvar liposomů, jejich lamelarita a homogenita suspenze. Jelikož byly zkoumány čtyři formulace s různým složením i nábojem membrány, bylo očekáváno jejich rozdílné chování v prostředí vakua i interakce s kontrastní látkou. Pro snímkování bylo u všech vzorků použito zvětšení 40 000×. Výsledky jsou uvedeny na Obr. 15 až 18.



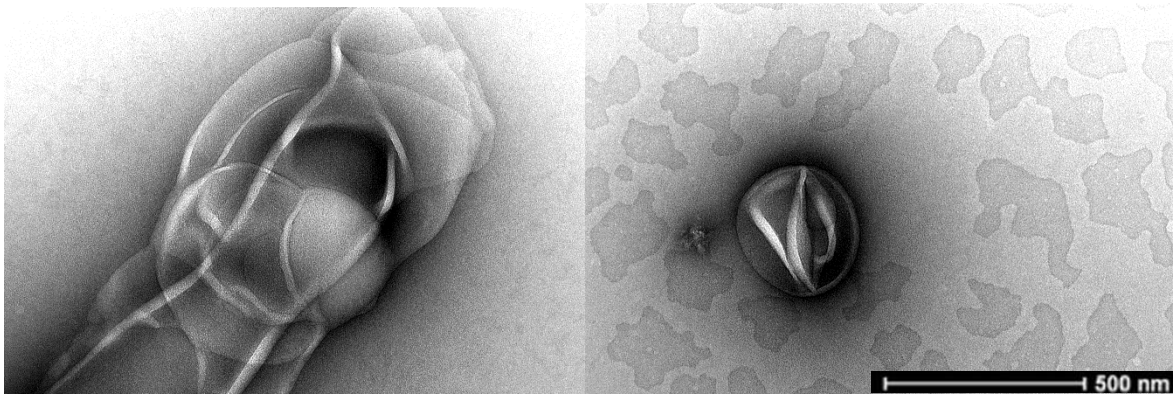
Obr. 15: Liposomy připravené z DPPC (velikost částic 100-200 nm)



Obr. 16: Značně popraskaná populace liposomů z DPPC-DPPS (velikost 100 nm)



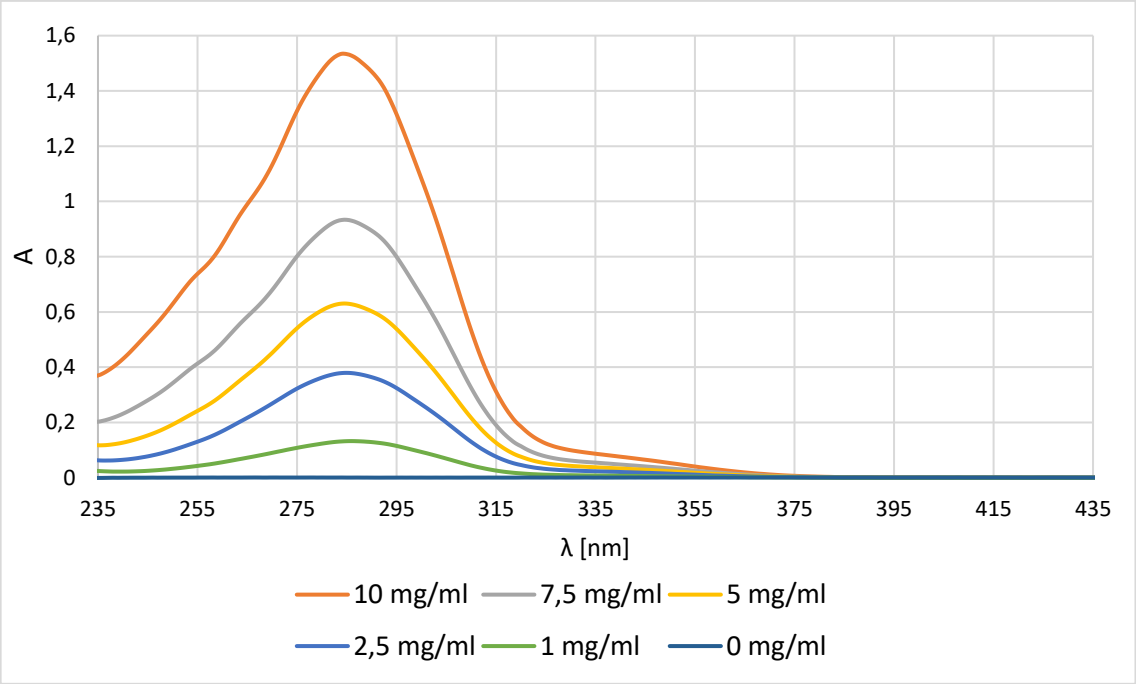
Obr. 17: Agregované liposomy z DPPC-CH v poměru 7/3



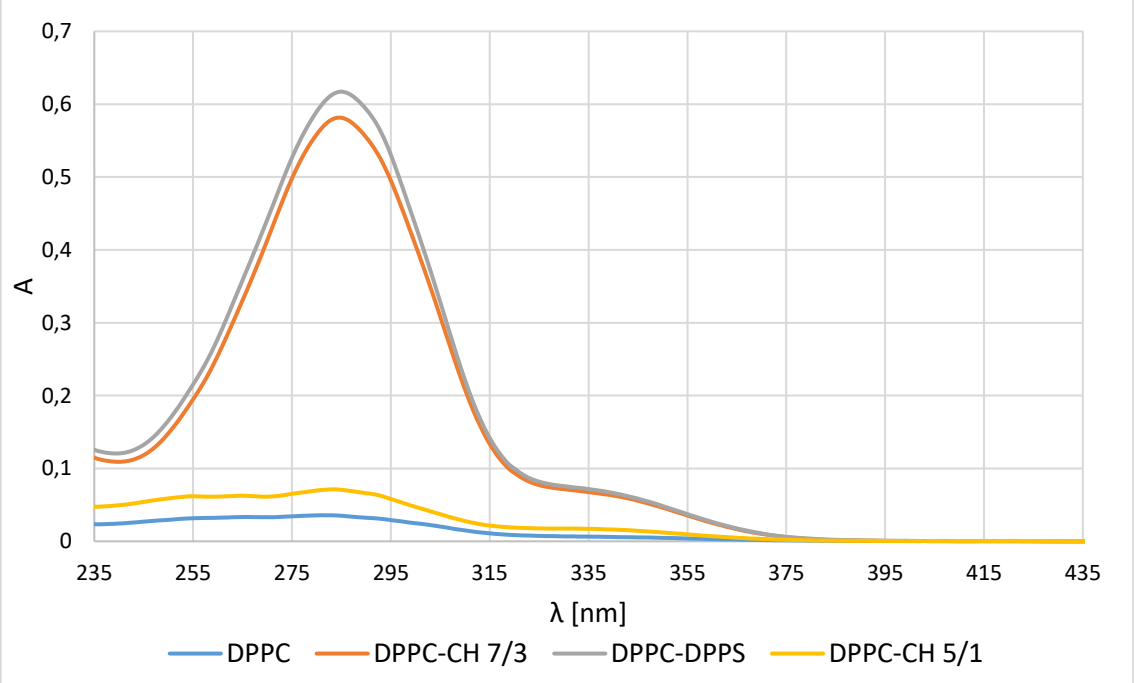
Obr. 18: Agregované a rozpadlé liposomy z DPPC-CH v poměru 5/1

8.5 Enkapsulační účinnost

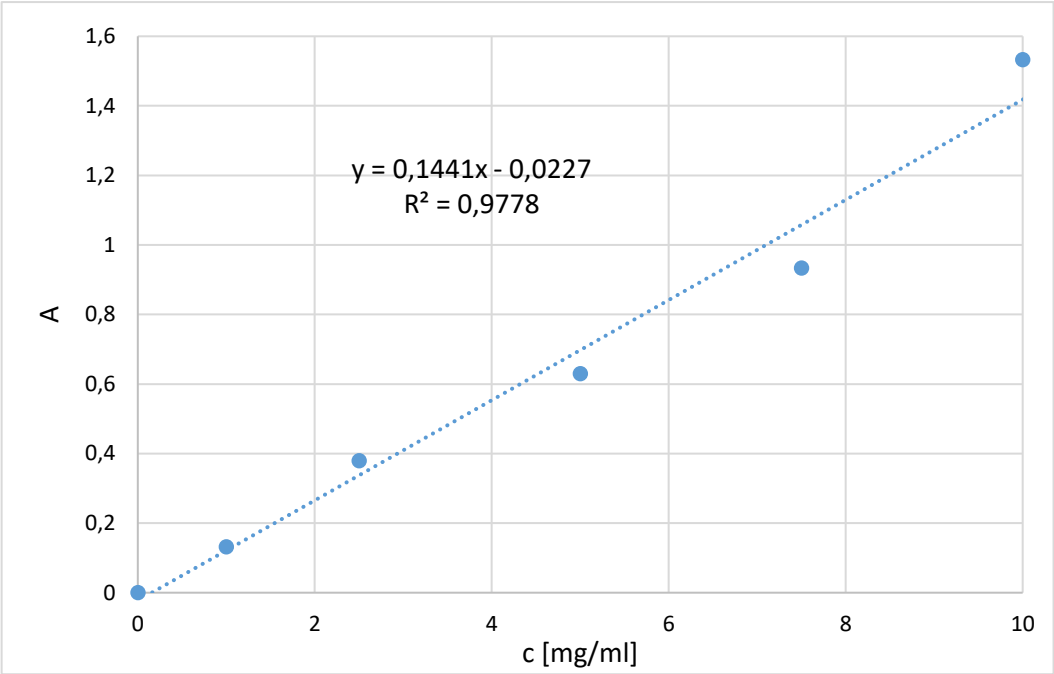
Po přeměření absorpčních spekter roztoků z kalibrační řady esenciálního oleje byla ve stejném ředění proměřena i spektra jednotlivých formulací liposomů s uvolněným esenciálním olejem (Obr. 19, 20). Maximální absorbance skořicového esenciálního oleje byla zaznamenána při vlnové délce 285 nm. Právě z hodnot absorbance při této vlnové délce byla sestavena kalibrační přímka (Obr. 21)a dle její rovnice byla vypočítána, na základě hodnot absorbance esenciálního oleje uvolněného z liposomů, koncentrace oleje v jednotlivých formulacích (Tab. 3).



Obr. 19: Absorpční spektra kalibrační řady esenciálního oleje



Obr. 20: Absorpční spektra formulací s esenciálním olejem rozpuštěná v methanolu



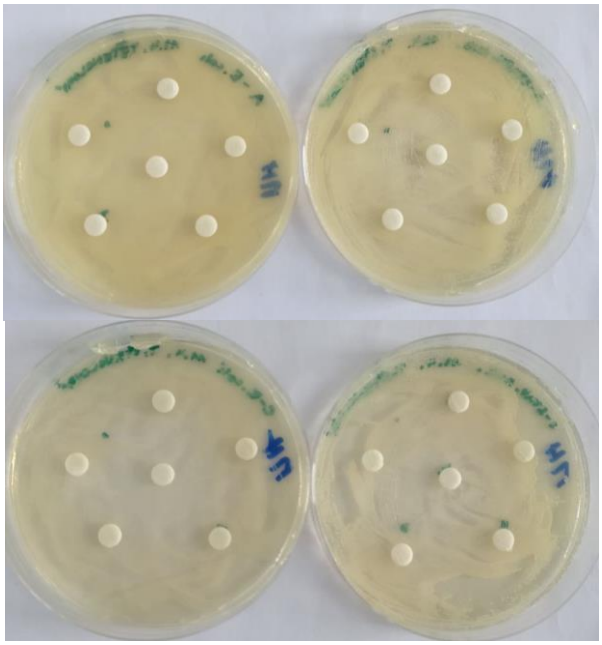
Obr. 21: Kalibrační přímka esenciálního oleje

Tab. 3 : Enkapsulační účinnost studovaných liposomů stanovená pomocí absorpčního měření

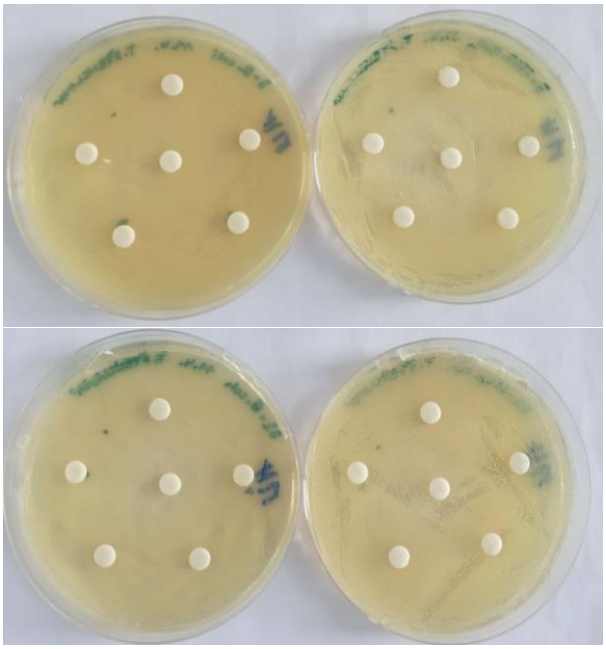
Vzorek	c [mg/ml]	Enkapsulační účinnost [%]
DPPC	0,40	3
DPPC-DPPS	4,44	30
DPPC-CH 7/3	4,19	28
DPPC-CH 5/1	0,65	4

8.6 Antimikrobní aktivita

Po inkubaci vzorků na Petriho miskách s mikroorganismy nedošlo ke vzniku inhibičních zón, tudíž nebylo možné usuzovat míru interakce a případné inhibice kultur *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* (Obr. 22, 23).



Obr. 22: Disková difuzní metoda pro liposomy DPPC (vlevo) a DPPC-DPPS (vpravo)



Obr. 23 : Disková difuzní metoda pro liposomy DPPC-CH 7/3 (vlevo) a DPPC-CH 5/1 (vpravo)

8.7 Stanovení transdermální absorpce *in vitro*

Integrita použitých kožních vzorků byla stanovena pomocí transepidermální ztráty vody (TEWL). Ta byla měřena Tewametrem na kůži oddělené od chrupavky. Na každém vzorku bylo provedeno patnáct měření a v Tab. 4 je uveden jejich průměr. Tloušťka kůže byla měřena pomocí mikrometru. Sedm vzorků kůže bylo použito pro hodnocení transdermální absorpce ve Franzových komůrkách, osmý vzorek sloužil pro fluorescenční stanovení.

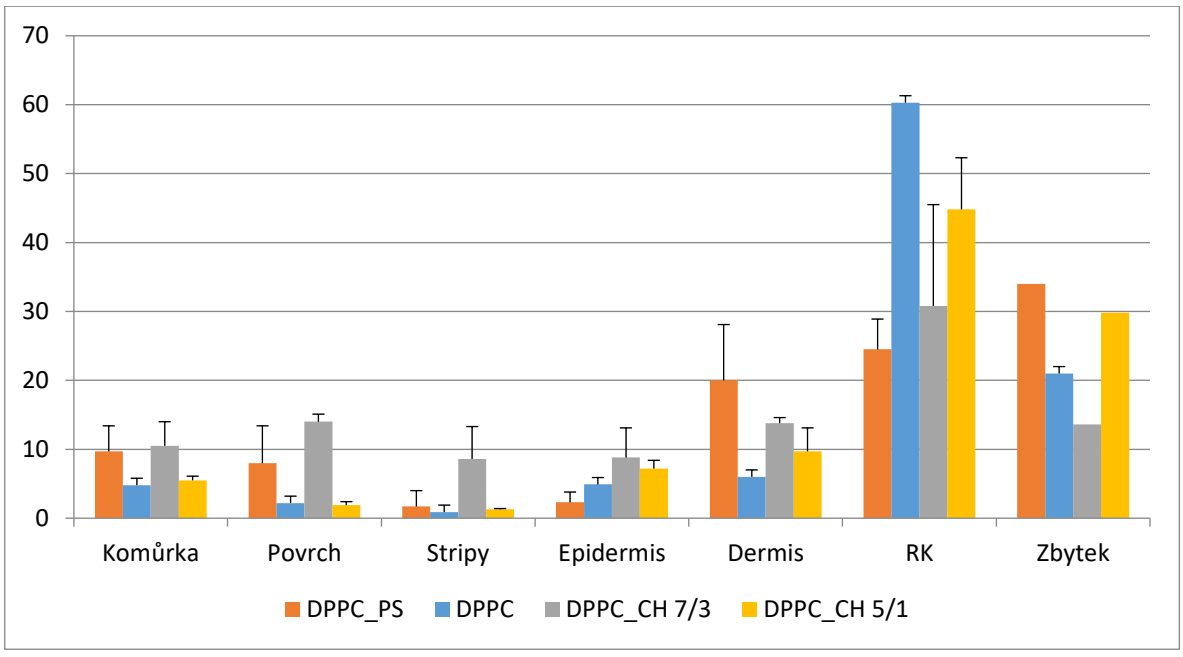
Tab. 4: TEWL a tloušťka kůže použité pro následná měření

Vzorek kůže	TEWL [g/hm^2]	Tloušťka kůže [mm]
1	10,1	1,68
2	9,3	1,78
3	6,7	1,61
4	8,1	1,58
5	8,6	1,59
6	10,6	1,85
7	8,2	1,51
8	13,3	1,56

Jednotlivé vzorky získané při testu transdermální penetrace pomocí Franzových komůrek byly extrahovány v methanolu. Množství esenciálního oleje přítomného v jednotlivých vrstvách kůže pak bylo hodnoceno spektroskopicky. Fluorescence všech vzorků byla sečtena a počítána jako celková (100 %), poté bylo vypočteno procentuální zastoupení oleje v odebraných vrstvách kůže (Tab. 5, Obr. 24).

Tab. 5: Fluorescence zaznamenaná v jednotlivých vrstvách kůže po transdermální absorpci ve Franzových komůrkách

Vzorek	[%]			
	DPPC	DPPC-DPPS	DPPC-CH 7/3	DPPC-CH 5/1
Komůrka	4,8 ± 1,6	9,7 ± 3,7	10,5 ± 3,5	5,5 ± 0,6
Povrch kůže	2,2 ± 0,2	8,0 ± 5,4	14,0 ± 1,1	1,9 ± 0,5
Stripy	0,9 ± 1,3	1,7 ± 2,3	8,6 ± 4,7	1,3 ± 0,1
Epidermis	4,9 ± 0,7	2,3 ± 1,5	8,8 ± 4,3	7,2 ± 1,2
Dermis	6,0 ± 5,4	20,0 ± 8,1	13,8 ± 0,8	9,7 ± 3,4
Zbytek	21,0 ± 8,4	34,0 ±2,5	13,6 ± 4,2	29,8 ± 6,4
Receptorová kapalina	60,3 ± 13,1	24,5 ± 4,4	30,8 ± 14,7	44,8 ±7,5

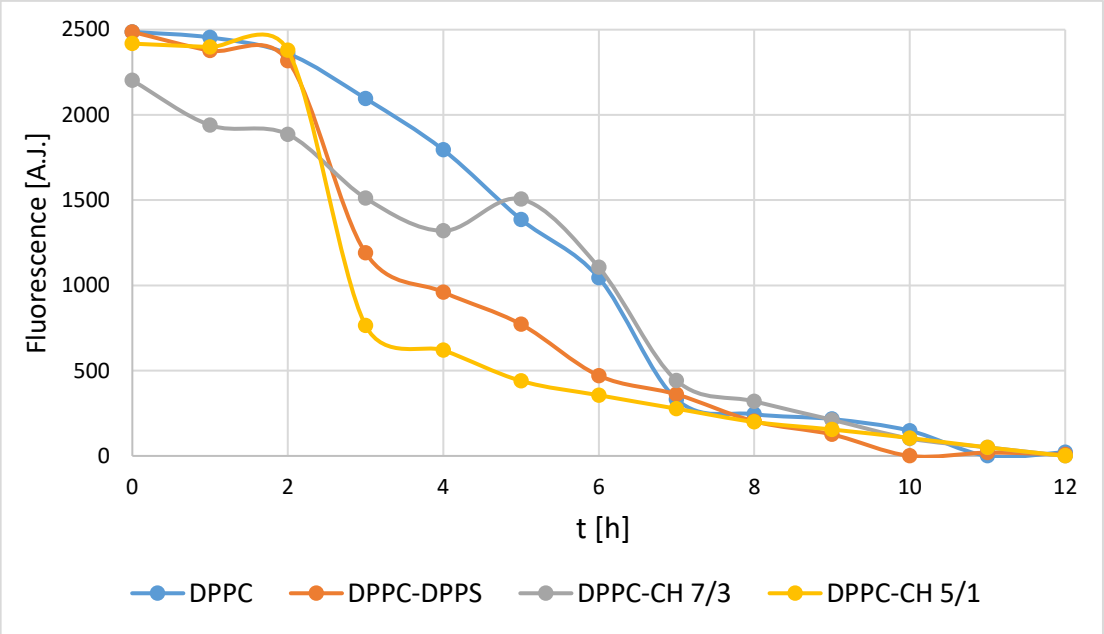


Obr. 24: Procentuální zastoupení esenciálního oleje v jednotlivých vrstvách

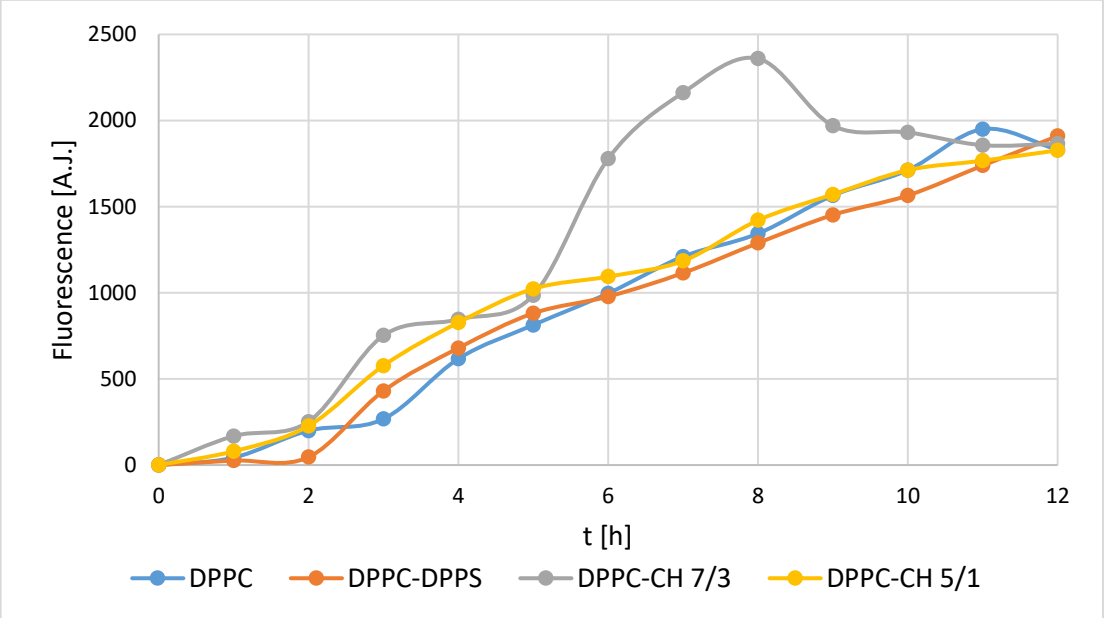
Pro fluorescenční detekci transdermální absorpce v reálném čase byl vzorek snímán detektory z horní i spodní části pro vizualizaci rychlosti průniku látky kůží (Tab. 6)

Tab. 6: Intenzita fluorescence detekována horním detektorem (T) a spodním (B) při transdermální penetraci připravených liposomů

Čas [h]	Fluorescence [R. J.]							
	DPPC		DPPC-DPPS		DPPC-CH 7/3		DPPC-CH 5/1	
	T	B	T	B	T	B	T	B
0	2487	0	2487	0	2202	0	2418	0
1	2454	43	2377	26	1940	168	2398	80
2	2360	200	2318	46	1886	252	2379	227
3	2096	267	1191	430	1512	752	765	577
4	1795	617	961	679	1320	846	620	827
5	1387	813	772	881	1506	986	440	1023
6	1045	997	471	978	1106	1778	356	1094
7	332	1210	361	1115	442	2162	277	1185
8	245	1344	203	1289	320	2360	199	1421
9	216	1565	126	1452	212	1970	155	1571
10	148	1712	0	1565	102	1931	105	1712
11	0	1950	19	1739	50	1857	50	1767
12	21	1831	8	1910	0	1865	0	1827



Obr. 25: Fluorescence esenciálního oleje detekovaná horním detektorem



Obr. 26: Fluorescence esenciálního oleje detekovaná spodním detektorem

8.8 Hodnocení cytotoxicity

8.8.1 Myší fibroblasty

Cytotoxicita na myších fibroblastech byla měřena absorpčním readerem v mikrotitračních testičkách. Na základě hodnot absorbance byla pak stanovena životaschopnost buněk při různých koncentracích přidaných liposomů s obsaženým esenciálním olejem. Každá koncentrace liposomů byla měřena ve čtyřech opakováních a hodnoty průměrovány. Průměrná hodnota absorbance pro referenční vzorek bez přítomnosti liposomů byla 1,52 ± 0,09 a je brána jako relativní hodnota životaschopnosti buněk rovna 100 %. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 7.

Tab. 7: Hodnoty životaschopnosti myších fibroblastů po inkubaci s liposomy

Koncentrace liposomů [%]	Životaschopnost fibroblastů [%]			
	DPPC	DPPC-DPPS	DPPC-CH 7/3	DPPC-CH 5/1
50	5,4 ± 0,2	8,1 ± 2,7	9,2 ± 0,2	6,2 ± 0,4
40	5,0 ± 0,3	6,1 ± 0,4	6,8 ± 0,2	5,8 ± 0,3
30	5,0 ± 0,4	5,3 ± 0,3	5,8 ± 0,1	5,7 ± 0,3
20	5,9 ± 0,9	5,3 ± 0,1	5,0 ± 0,3	5,8 ± 0,3
10	65,2 ±8,6	21,5 ± 15,3	4,8 ± 0,2	47,6 ± 3,7
5	82,3 ± 3,0	54,7 ± 5,6	5,3 ± 0,2	72,9 ± 4,3

8.8.2 U937

Před inkubací s liposomálními disperzemi byla kultura nádorových buněk změřena a bylo zjištěno, že 8 x 10^5 buněk v 1 ml kultivačního média je živých, což představuje 79 % buněk z celkového počtu. Kontrolní buňky byly kultivovány pouze s čistým médiem a průměrné zastoupení živých buněk po inkubaci zde dosahovalo 3,62 x 10^5 buněk/ml, tedy 60 %. Výsledky změny životaschopnosti buněk inkubovaných se studovanými liposmy jsou uvedeny v Tab. 8.

Tab. 8: Hodnoty životaschopnosti rakovinných buněk U937 po inkubaci s liposomy

Koncentrace liposomů [%]	Životaschopnost nádorových buněk [počet živých buněk v 1 ml média, % živých buněk z celkového počtu]			
	DPPC	DPPC-DPPS	DPPC-CH 7/3	DPPC-CH 5/1
100	$5{,}18 \times 10^5$ 43	2×10^6 75	$4{,}86 \times 10^6$ 48	$4{,}77 \times 10^6$ 46
80	$1{,}42 \times 10^5$ 36	$5{,}16 \times 10^5$ 55	$4{,}78 \times 10^6$ 44	$2{,}84 \times 10^6$ 33
60	$8{,}33 \times 10^4$ 35	$5{,}44 \times 10^5$ 42	$3{,}1 \times 10^6$ 37	$2{,}69 \times 10^6$ 49
40	$1{,}44 \times 10^5$ 41	$5{,}28 \times 10^5$ 42	$2{,}13 \times 10^6$ 34	$1{,}36 \times 10^6$ 42
20	$1{,}06 \times 10^5$ 34	$4{,}28 \times 10^5$ 41	$9{,}44 \times 10^6$ 30	$1{,}39 \times 10^5$ 45

8.9 Vliv na Na^+, K^+-ATPasu

Z důvodu přítomnosti esenciálního oleje v liposomech byla očekávána inhibice sodno-draselné pumpy. Dle literatury [156] je však rovněž intenzivně zkoumána interakce některých domén Na^+/ K^+-ATPasy se specifickými fosfolipidy, které mohou naopak mít za následek indukci její aktivity.

Do reakce bylo přidáno 10 µl liposomů, potenciálních inhibitorů, o 5, 10, 25 a 50% koncentraci původní liposomální disperze, přičemž objem všech ostatních komponent byl 240 µl. Vzorky připravených liposomů byly tedy ještě 25 × ředěny. Protein byl inkubován s inhibitory (liposomy) po dobu 5 minut. Celé měření probíhalo za konstantní teploty 25 °C. Výsledná aktivita byla počítána jako rozdíl oubainové aktivity a specifické aktivity pumpy. Vliv působení liposomů na aktivitu ATPasy je souhrnně představen v Tab. 9.

Tab. 9: Výsledná aktivita Na^+, K^+-ATPasy po reakci s liposomy

Koncentrace inhibitoru [%]	0	5	10	25	50
Vzorek	Výsledná aktivita [%]				
DPPC	4,3 ± 0,5	2,5 ± 0,5	3,8 ± 1,1	8,2 ± 0,4	6,0 ± 0,1
DPPC/DPPS	5,4 ± 0,1	4,5 ± 0,3	6,6 ± 1,1	6,7 ± 1,1	7,8 ± 0,7
DPPC-CH 7/3	5,4 ± 0,1	5,3 ± 0,9	5,2 ± 0,3	5,8 ± 0,2	5,2 ± 0,0
DPPC-CH 5/1	5,4 ± 0,1	4,0 ± 0,0	4,1 ± 0,6	4,6 ± 1,0	5,0 ± 0,6

8.10 Stabilita liposomů

Stabilita liposomů byla sledována v čase pomocí měření velikosti částic a zeta potenciálu v týdenních intervalech. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 10 a 11.

Tab. 10: Stabilita liposomů v čase hodnocená ze změn jejich velikosti stanovené ihned po přípravě, po 1, 2 a 3 týdnech skladování při 4 °C

Vzorek	Velikost [nm]			
	0	1	2	3
DPPC	210 ± 3	282 ± 6	324 ± 40	344 ± 20
DPPC-DPPS	157 ± 5	157 ± 3	142 ± 1	140 ± 1
DPPC-CH 7/3	222 ± 20	314 ± 32	349 ± 26	328 ± 58
DPPC-CH 5/1	526 ± 31	803 ± 50	643 ± 130	657 ± 28

Tab. 11: Stabilita liposomů v čase hodnocená ze změn jejich zeta potenciálů ihned po přípravě, po 1, 2 a 3 týdnech skladování při 4 °C

Vzorek	Zeta potenciál [mV]			
	0	1	2	3
DPPC	1,1 ± 0,6	8,3 ± 1,2	-7,7 ± 0,7	-9,1 ± 0,8
DPPC-DPPS	-26,5 ± 1,6	-29,6 ± 2,5	-18,2 ± 1,0	-34,9 ± 2,4
DPPC-CH 7/3	-19,0 ± 1,5	-15,4 ± 0,8	-43,4 ± 4,3	-27,6 ± 0,7
DPPC-CH 5/1	-7,5 ± 1,0	-19,4 ± 0,9	-12,1 ± 0,3	-14,6 ± 1,3

Vliv solí na stabilitu liposomů byl zkoumán v prostředí chloridu vápenatého a charakterizován pomocí změny distribuce velikosti částic a zeta potenciálu (Tab. 12, 13)

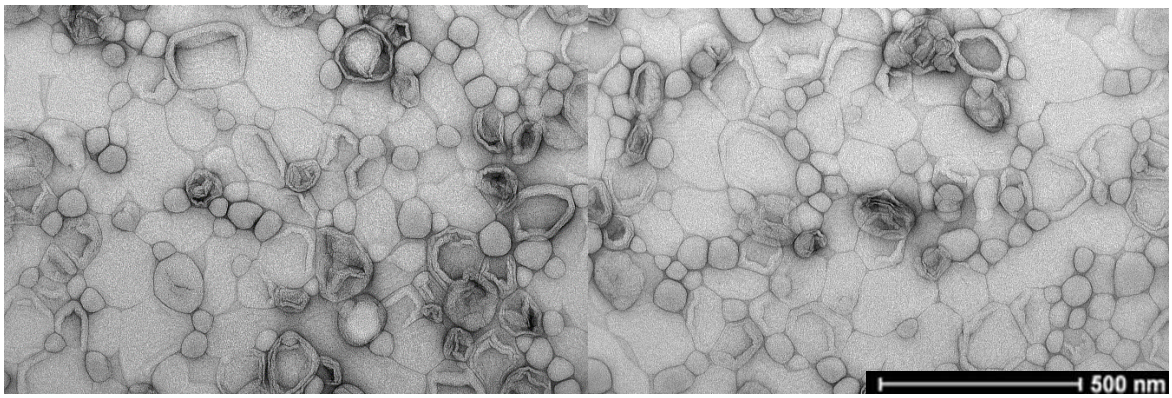
Tab. 12: Změna distribuce velikosti částic po inkubaci s $CaCl_2$ o různých koncentracích

Vzorek	Velikost [nm]				
	0 M	0,001 M	0,01 M	0,1 M	1 M
DPPC	158 ± 3	171 ± 2	146 ±3	150 ± 1	198 ±9
DPPC-DPPS	362 ± 99	5489 ± 571	1436 ± 982	4972 ± 1108	3360 ± 443
DPPC-CH 7/3	681 ± 40	442 ± 37	578 ± 44	406 ± 58	577 ± 73
DPPC-CH 5/1	526 ± 31	367 ± 11	232 ± 6	247 ± 1	287 ± 11

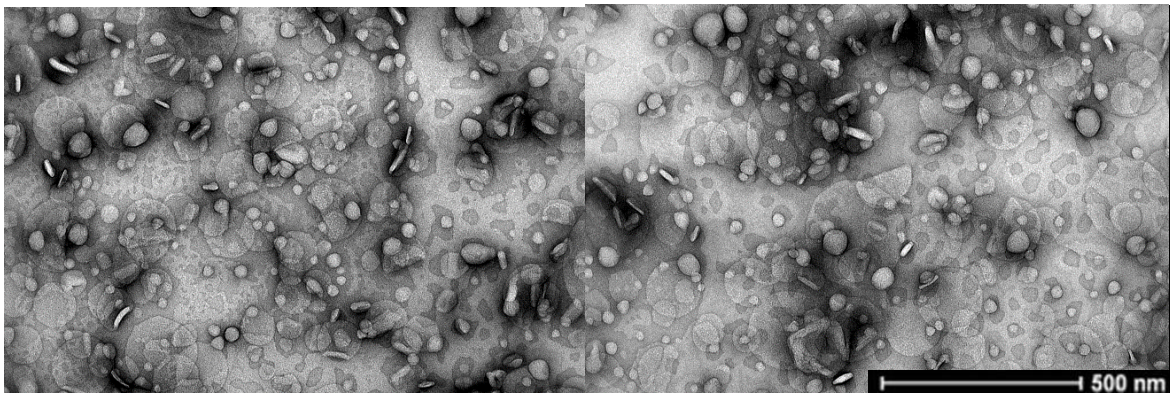
Tab. 13: Změna zeta potenciálu liposomů po inkubaci s $CaCl_2$ o různých koncentracích

Vzorek	Zeta potenciál [mV]				
	0 M	0,001 M	0,01 M	0,1 M	1 M
DPPC	3,9 ± 0,9	-8,7 ± 1,4	8,3 ± 1,6	10,5 ± 0,6	15,6 ± 0,8
DPPC-DPPS	- 31,1 ± 2,5	- 23,3 ± 1,2	-16,0 ± 0,7	- 7,0 ± 0,5	7,1 ± 0,6
DPPC-CH 7/3	- 20,4 ± 1,0	- 20,8 ± 1,3	- 13,9 ± 0,7	- 1,7 ± 0,1	4,1 ± 0,5
DPPC-CH 5/1	- 16,4 ± 1,7	- 2,8 ± 0,8	0,3 ± 0,2	7,7 ± 2,3	12,5 ± 1,0

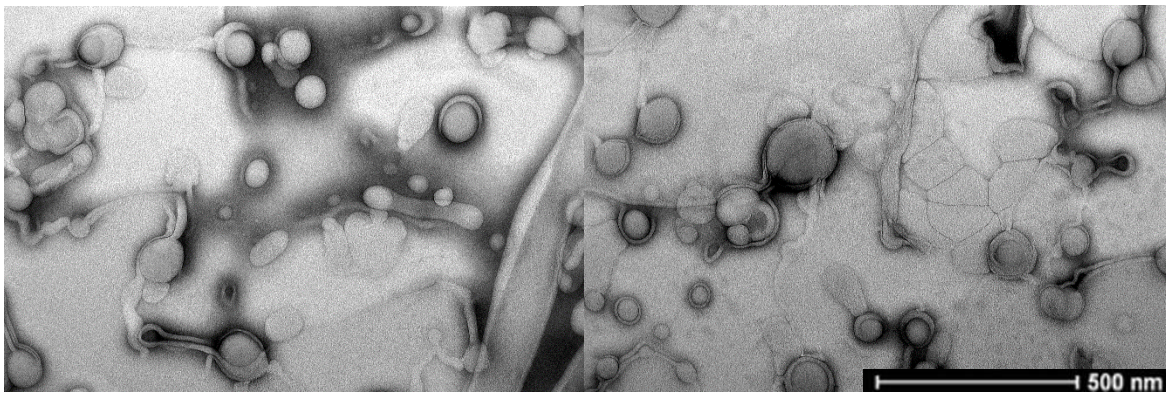
Dále byly sledovány i změny v morfologii a velikosti liposomů. Na elektronovém mikroskopu byly snímkovány liposomy staré 2 týdny. Byla sledována distribuce jejich velikosti, agregáty, lamelarita, ruptury, celkové zničení a reaktivita s kontrastní látkou (obr. 27 až 30).



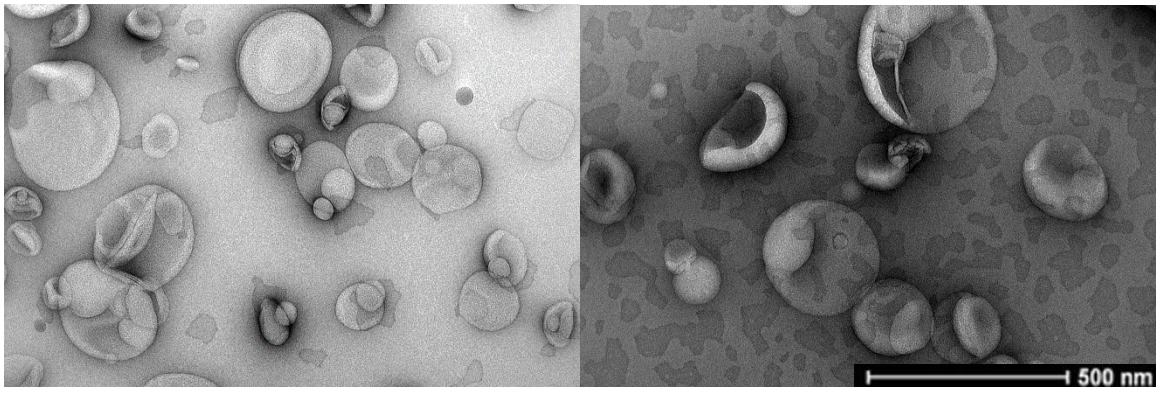
Obr. 27: Dva týdny staré liposomy připravené z DPPC (velikost částic 100-200 nm)



Obr. 28: Homogenní distribuce liposomů z DPPC/DPPS dva týdny od přípravy



Obr. 29: Značně popraskaná populace liposomů z DPPC/cholesterol v poměru 7:3 o velikosti okolo 100 nm stáří 2 týdnů



Obr. 30: Dva týdny staré liposomy od velikosti 200 nm z DPPC/cholesterolu v poměru 5:1 s rupturamy

9 DISKUZE

Vhodná látka pro enkapsulaci do liposomů byla vybírána na základě spektrálních vlastností. Za tímto účelem byla testována řada esenciálních olejů i jejich majoritních složek. Na základě absorpčních spekter byly vyřazeny esenciální oleje z máty, tea tree, eukalyptu, ze složek olejů pak mentol a citral, jelikož nedosahovaly významných hodnot absorbance ani při malém ředění. I když absorbance dalších testovaných složek esenciálních olejů byla dostatečná, nebyly přesto cinnamaldehyd, eugenol, thymol a carvacrol pro další experimenty použity, jelikož jejich samotná spektra tvoří převážnou část spektra olejů, ve kterých se tyto sloučeniny vyskytují. Navíc minoritní složky olejů modifikují celkové účinky olejů, složky mezi sebou interagují a mohou navzájem tlumit či zesilovat svůj účinek. Proto bylo pro další fluorometrickou analýzu použito pouze esenciálních olejů z hřebíčku, tymiánu, heřmánku a skořice. Tyto oleje byly excitovány při vlnových délkách odpovídajících absorpčním maximům v UV-Vis oblasti. Na základě emisních spekter byl jako vhodný esenciální olej pro další experimenty zvolen olej skořicový, jelikož vykazoval nejvyšší emisi a byl tedy nejvhodnější pro spektrální analýzy extraktů vzorků kůže po transdermální penetraci (Obr. 9).

V dalším kroku byl tedy tento olej použit pro přípravu čtyř formulací liposomů, která byly provedena hydratací forsfolipidového filmu s následnou sonikací. Již při přípravě liposomů docházelo k rozdílnému chování různých formulací fosfolipidů a cholesterolu, byla např. pozorována rozdílná rychlost vysychání filmu na stěnách baňky, filmy byly strukturálně odlišené a při hydrataci byly u některých formulací viditelné kapičky neenkapsulovaného oleje. Po sonikaci se začaly významně odlišovat liposomy tvořené DPPC-DPPS, jelikož se jejich suspenze jevila méně viskózní a oproti ostatním formulacím měla nažloutlou barvu (ostatní byly mléčně bíle zakalené), což může souviset s fluiditou membrány a množstvím enkapsulovaného oleje (Obr. 10).

Při stanovení distribuce velikosti liposomů bylo zjištěno, že všechny formulace tvoří poměrně uniformní populace, jejich velikost je však ovlivněna lipidovým složením, jelikož i přes stejný způsob přípravy dosahují liposomy různých formulací rozdílných velikostí (Tab. 2). U formulací z DPPC, DPPC-DPPS a DPPC-CH (7/3) bylo dosaženo velikosti 150 – 250 nm, což je přijatelná velikost vezikul pro transdermální penetraci. Pouze u formulace tvořené DPPC-CH (5/1) se ani po opakované sonikaci nepodařilo vytvořit částice menší než 500 nm. Poměr fosfolipidů a cholesterolu 7/3 je brán jako zlatý standard, proto bylo zajímavé sledovat rozdílné chování formulace s cholesterolem v jiném poměru.

Při stanovení zeta potenciálu bylo předpokládáno, že formulace s obsaženým fosfatidylserinem bude vykazovat jiné vlastnosti díky svému zápornému náboji pocházejícímu z tohoto záporně nabitého fosfolipidu. Tento fakt byl potvrzen a u formulace DPPC-DPPS byl naměřen nejvíce záporný potenciál – 25,5 ± 0,8 mV. Formulace s cholesterolem také nabývaly (díky jeho přítomnosti) hodnot záporného zeta potenciálu, pouze liposomy tvořené DPPC měly zeta potenciál blízký nule (1,1 ± 0,8 mV), jelikož fosfatidylcholin je neutrálním fosfolipidem. Všechny formulace však měly zeta potenciál vyšší než – 30 mV a nižší než 30 mV, tudíž lze, dle obecného pravidla, předpokládat, že jejich stabilita v čase bude jen omezená (Tab. 2).

Při porovnání snímků pořízených na transmisním elektronovém mikroskopu s daty naměřenými pomocí dynamického rozptylu světla na přístroji Zeta sizer bylo zřejmé, že ve většině případů jsou velikost i homo/heterogenita populace liposomů stanovená oběma technikami v dobré korelaci. U liposomů z DPPC nedocházelo k agregaci či rupturám, populace byla uniformní s velikostí liposomů 100 – 200 nm, liposomy byly uni- i multilamelární (Obr. 15). Liposomy s obsahem DPPS dosahovaly velikosti cca 100 nm v celém objemu, ruptury odhalovaly multilamelaritu membrán, docházelo však k mírné flokulaci částic (Obr. 16). U liposomů s cholesterolem DPPC-CH (7/3) docházelo k flokulaci malých unilamelárních vezikul za vzniku útvarů o velikosti 600 – 1000 nm; toto chování můžeme přičítat chování vezikul ve vakuu či reakci s kontrastní látkou při TEM analýze, jelikož jejich dříve naměřená velikost za běžných podmínek dosahovala ~ 220 nm (Obr. 17). U liposomů s cholesterolem (5/1) byl viditelný rozpad značné populace liposomů, což bylo možné detekovat jako tmavší plošky uvolněného obsahu enkapsulované látky, které byly patrné v celém mikroskopovaném objemu. Zbylé liposomy byly agregovány do nekulovitých útvarů složité struktury, nelze to však přičítat podmínkám elektronové mikroskopie, protože již dříve vykazovala tato formulace diametrálně vyšší velikost liposomů než v případě ostatních formulací (Obr. 18).

Výsledky měření enkapsulační účinnosti byly překvapivé (Tab. 3). Nejvyšší enkapsulační účinnosti bylo dosaženo u formulací DPPC-DPPS a DPPC-CH (7/3), v nichž bylo zapouzdřeno téměř 30 % esenciálního oleje. U liposomů tvořených pouze DPPC byla enkapsulační účinnost pouhá 3 %, což může být přisuzováno přítomnosti velmi malých multilamelárních liposomů. U formulace DPPC-CH (5/1) dosahovala účinnost 4 %, což je také velmi málo, ale předpoklad byl, že k vylití enkapsulovaného obsahu mohlo dojít již v průběhu přípravy, kdy malé liposomy agregovaly do větších struktur. O této skutečnosti mohou

svědčit i zmíněná mikroskopická pozorování. Je možné rovněž uvažovat že enkapsulační účinnost mohla být ovlivněna i dialýzou, která byla použita při purifikaci liposomů pro následné biologické testy.

Hlavním cílem diplomové práce bylo sledovat transdermální penetraci připravených liposomálních dispersí modelem pracečí kůže *in vitro*. Dle naměřených hodnot TEWL byly vzorky kůže ve velmi dobrém (0 – 9 g/h m^2) či dobrém stavu (10 – 14 g/h m^2) s neporušenou bariérovou funkcí, proto lze usuzovat, že výsledek experimentu nebyl nijak zkreslen (Tab. 4). Při vyhodnocení transdermální absorpce ve Franzových komůrkách bylo překvapivě detekováno největší procentuální zastoupení esenciálního oleje v receptorové kapalině u DPPC liposomů 60 % a DPPC-CH (5/1) 45 %, což může být přisuzováno vhodné velikosti liposomů, jejich flexibilitě či rozpadu agregátů. Dle očekávání bylo velké množství esenciálního oleje přítomno ve zbytcích kůže okolo terčíků, kam olej difundoval, ale nemohl již procházet dál do receptorové kapaliny. U formulace s DPPS bylo velké množství oleje (20 %) detekováno v *dermis* a do receptorové kapaliny proniklo 34 % oleje. Otázkou zde tedy zůstává, zda by v průběhu delšího času došlo k ještě k dalšímu transportu oleje/liposomů až do receptorové kapaliny. Globálně však u všech formulací platí, že kůží prošlo až do receptorové kapaliny větší množství oleje, než které zůstalo v jejích vrstvách, *stratum corneum*, *epidermis*, *dermis* a na jejím povrchu (Tab. 5).

Při vyhodnocení transdermální absorpce kůží v reálném čase pomocí fluorometru bylo použito přepočtu relativních jednotek fluorescence, kdy byla konečná hodnota fluorescence detekovaná horním detektorem korigována odečtením hodnot fluorescence, kterou vykazovala samotná kůže, resp. její komponenty (konečná hodnota fluorescence rovna nule). V případě spodního detektoru byla obdobným způsobem korigována počáteční hodnota fluorescence. Důvodem této korekce byla možnost lépe srovnat jednotlivé formulace navzájem mezi sebou a redukovat chybu měření. Při tomto měření nelze hodnotit obsah esenciálního oleje v jednotlivých vrstvách kůže, je možné však sledovat rychlost průchodu esenciálního oleje kůží v čase. Dle výsledků je zřejmé, že v případě DPPC-DPPS a DPPC-CH (5/1) dochází ke skokovitému zrychlení průchodu látky kůží po dvou hodinách interakce s kůží, u formulací DPPC a DPPC-CH (7/3) je průchod plynulejší a pozvolný. Po přibližně osmi hodinách působení se hodnoty fluorescence (tedy množství prošlého oleje) u všech formulací srovnávají a další čtyři hodiny dochází už jen k minimálnímu úbytku sledované látky (dle detekce horním detektorem). Ke zvýšení fluorescence detekované spodním detektorem dochází plynule až do 5. hodiny pozvolně, poté se však výrazně zvyšuje u liposomů z

DPPC-CH (7/3), které dosahují po 8 hodinách svého maxima; tento jev lze přisuzovat rychlejšímu průchodu spodními vrstvami kůže. Ostatní formulace jsou zřejmě zadržovány ve středních vrstvách kůže, jelikož rychlost jejich průchodu byla po zbytek experimentu lineární. Z výsledků lze tedy usuzovat, že většina látky obsažené v liposomech penetruje do kůže v prvních osmi hodinách (Obr. 25), průchod do receptorové kapaliny však trvá déle než 12 hodin, jelikož lze sledovat mírně vzrůstající míru fluorescence i ve dvanácté hodině (Obr. 26).

Testy biologických vlastností připravených liposomů zahrnovaly nejprve stanovení jejich antibakteriálních vlastností. Prokaryotické buňky *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* mají sice cytoplasmatickou membránu tvořenou liposacharidy a fosfolipidy, jejich povrch však pokrývá navíc buněčná stěna tvořená peptidoglykany, tudíž byla předpokládána jejich rozdílná inhibice olejem enkapsulovaným v liposomech oproti samotnému oleji. Neředěný a neenkapsulovaný skořicový esenciální olej tvořil na miskách s *Escherichia coli* inhibiční zónu o velikosti 15 mm, v případě *Staphylococcus aureus* se v přítomnosti koncentrovaného oleje tvoří inhibiční zóna velikosti 19 mm [157]. Jelikož při testu antimikrobní aktivity nedošlo ke vzniku inhibičních zón (Obr. 22, 23), nedochází zřejmě k žádné interakci mezi liposomy a buněčnou stěnou, tudíž nedochází k přenosu enkapsulovaného esenciálního oleje do buněk a jejich následné inhibici. Absenci antibakteriální aktivity lze rovněž zdůvodnit nízkým množstvím oleje v liposomech. Pro skořicový olej byla v publikaci [158] stanovena minimální inhibiční koncentrace (MIC) 1.0 mg/ml jak pro *Escherichia coli*, tak pro *Staphylococcus aureus*. Při objemu lipozomální disperse 10 µl, který byl použitý pro antibakteriální test a při dané enkapsulační účinnosti není množství oleje dostatečné pro to, aby liposomy vykazovaly aktivitu proti sledovaným bakteriálním kmenům.

Dalším biologickým testem bylo stanovení cytotoxicity liposomů. Při testech cytotoxicity na myších fibroblastech se jevily jako silně toxické (méně než 40 % životaschopných buněk) všechny formulace při zředění na 20 – 50 %, liposomy s DPPS i při koncentraci 10 %, DPPC-CH (7/3) dokonce i při koncentracích 5 – 10 %. Středně toxické (40 – 60 % životaschopných buněk) byly formulace z DPPC a DPPC-CH (5/1) při 10% ředění. Slabě cytotoxický efekt (60-80 % životaschopných buněk) měla formulace DPPC-CH (5/1) s ředěním 5 %. Necytotoxický účinek (více než 80 % buněk životaschopných) měly pouze liposomy tvořené DPPC při 5% ředění (Tab. 7). Po interakci liposomů s nádorovými buňkami U937 bylo zjištěno, že přítomnost liposomů s enkapsulovaným olejem inhibuje růst a množení buněk stejně za různých podmínek (formulace, koncentrace liposomu). Vyjímkou jsou

však liposomy s DPPS, které naopak při vysoké koncentraci indukují množení buněk, a po kultivaci bylo v interakční směsi přítomno ještě více buněk než v referenčním vzorku (Tab. 8). Tyto zajímavé výsledky mohou souviset s tím, že rakovinné buňky mají pozměněné složení plasmatické membrány (mastné kyseliny, antigeny aj.) a proto mohou interagovat s liposomy a reagovat na enkapsulovaný obsah rozdílně než běžné buňky. Dále je možné rozdílnou cytotoxicitu vztahovat na aktivitu Na^+/K^+-ATPasy (membránový protein), která může specificky reagovat s fosfolipidy a cholesterolem, vázat je na své domény a tím snižovat či zvyšovat svoji aktivitu, čímž ovlivňuje rychlost metabolismu celé buňky. Rozsah koncentrací určitých typů lipidů, které indukují funkci NKA, je však velmi úzký. Dle Tab. 9 lze usuzovat na indukci NKA liposomy z DPPC při koncentracích okolo 25 %, u DPPS u koncentrací vyšších než 50 %. Liposomy s obsahem cholesterolu aktivitu výrazným způsobem nemění. Podrobné zkoumání cytotoxicity a interakce s NKA bude předmětem dalšího zkoumání.

Stabilita liposomů byla posuzována na základě velikosti částic, zeta potenciálu, morfologie a vlivu solí ($CaCl_2$). U liposomů z DPPC se velikost dle měření na Zetasizeru zvýšila v průběhu tří týdnů asi o 140 nm, tudíž mohlo docházet k agregaci nebo flokulaci částic, to však snímky z elektronového mikroskopu nepotvrdily, zeta potenciál začal nabývat záporných hodnot (- 9 mV). Liposomy DPPC-DPPS svoji velikost neměnily, jejich náboj však klesl na – 35 mV, čímž se staly více stabilní. U formulací s cholesterolem docházelo ke zvětšování částic za současného snižování zeta potenciálu, mikroskopické snímky potvrdily agregaci částic. V přítomnosti $CaCl_2$ vykazovaly formulace s cholesterolem rozdílné chování, velikost částic se se vzrůstající koncentrací solí snižovala, u liposomů z DPPC se mírně zvyšovala, u DPPS docházelo ke vzniku agregátů, jelikož se jejich velikost se vzrůstající koncentrací $CaCl_2$ v roztoku až desetinásobně zvýšila. V tomto případě je chování liposomů ovlivněno přítomností negativně nabitého fosfatidylserinu a Ca^{2+} ionty v roztoku způsobují stínění negativního náboje tohoto fosfolipidu; zeta potenciál se pak posouvá do kladných hodnot (Tab. 12) a dochází k agregaci liposomů (Tab. 13). U všech formulací dochází k nárustu zeta potenciálu, což je vzhledem k přítomnosti iontů logické.

10 ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývala přípravou a charakterizací liposomů s obsahem esenciálního oleje. Byly testovány fyzikálně-chemické vlastnosti liposomů, jejich stabilita, dále také transdermální absorpce metodou *in vitro* s využitím Franzových difuzních komůrek a fluorescenční detekcí v reálném čase. Ve vztahu k biologickým vlastnostem připravených liposomů byla studována jejich antimikrobní aktivita (prokaryotické buňky) a cytotoxicita (eukaryotické buňky).

Byly testovány čtyři liposomální formulace s enkapsulovaným skořicovým esenciálním olejem, který byl vybrán na základě svých vhodných spektrálních vlastností. Odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti liposomálních disperzí (DPPC, DPPC-DPPS, DPPC-CH v poměru 7/3 a 5/1) byly ověřeny měřením velikosti částic, zeta potenciálu, vizualizací morfologie na transmisním elektronovém mikroskopu; spektroskopicky byla určena enkapsulační účinnost liposomů a jejich stabilita byla testována v čase i v prostředí solí.

Pro experimentální stanovení transdermální absorpce metodou *in vitro* byla použita zdravá prasečí kůže o celé tloušťce. Testovaná látka obsažená v methanolových extraktech jednotlivých vrstev kůže byla pak detekována pomocí fluorescence. Největší koncentrace esenciálního oleje se nacházela v receptorové kapalině, což znamená, že velká část aplikovaných liposomů interagovala s kůží a enkapsulovaný olej jí prošel. V reálné situaci to tedy znamená prostup enkapsulvané látky do systémového oběhu. U jednotlivých formulací se procentuální zastoupení v kožních frakcích lišilo jen nevýznamně. Při sledování absorpce v reálném čase byl fluorescenčně detekován průchod esenciálního oleje, který u DPPC-DPPS a DPPC-CH (5/1) skokově narůstal již po pár hodinách, u DPPC a DPPC-CH (7/3) byl průchod pozvolný. Po devíti hodinách penetrace do kůže ustává. Průchod skrz kůži až do receptorové kapaliny však lineárně stoupá i po dvanácti hodinách působení liposomů na kůži.

Liposomy s enkapsulovaným olejem nevykazovaly antimikrobní účinek, byly však silně toxické na myší embryonální fibroblasty. Netoxické účinky měly pouze formulace z DPPC a DPPC-CH (5/1) při 5% ředění výchozí liposomální disperse. Při měření cytotoxicity na leukemických buňkách se snížila životaschopnost buněk na 30 – 70 %, formulace s DPPS však při vysokých koncentracích indukovala buněčný cyklus a docházelo k rychlejšímu množení, což zřejmě souviselo s indukcí aktivity Na^+/K^+-ATPasy.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] FENDLER, J. H. Surfactant vesicles as membrane mimetic agents: characterisation and utilisation. *Account of Chemical Research.* 1980, 13, 7-13.

[2] SAHOO S. K., LABHASETWAR V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. DDT. 2003, 8:24.

[3] CHRAI, S. S., MURARI, R., IMRAN, A. Liposomes: a review. *Bio Pharmacology.* 2001, 14(11):10–14.

[4] ANDREAS, W., KAROLA, V. U. Liposome technology for industrial purposes. *Journal of Drug Delivery.* 2011, 2011:9.

[5] ATROOZ, O. M. Effects of alkylresorcinolic lipids obtained from acetonic extract of Jordanian wheat grains on liposome properties. *International Journal of Biological Chemistry.* 2011, 5(5):314–321.

[6] SHETATA, T., et al. Prolongation of residence time of liposome by surface-modification with mixture of hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics.* 2008, 359:272–279.

[7] HOFHEINZ R. D., et al.: Liposomal encapsulated anti-cancer drugs. *Anticancer Drugs.* 2005, 16:691–707.

[8] HIMASHU, A., SITASHARAN, P., SINGHAI, A. K. Liposomes as drug carriers. *International Journal of Pharmaceutical and Life Sciences.* 2011, 2(7):945–951.

[9] BANGHAM, A., STANDISH, M. M., WATKINS J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* 1965, 13, 238-252.

[10] HUANG, C. Studies of phosphatidylcholine vesicles, formation and physical characteristics. *Biochemistry*. 1969, 8, 344-352.

[11] RIAZ, M. Liposome preparation method. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 1996, 9(1):65–77.

[12] KATARIA, S., et al. Stealth liposomes: a review. *International Journal of Recent advances in Physics.* 2011, 2(5):1534–1538.

[13] LAWRENCE, M. J. Controlled Particle, Droplet and Bubble Formation. Butterworth – Heineman: 1994, ISBN – 10: 0750614943.

[14] PICK, U. Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1981, 212:186–194.

[15] DEAMER, D., BANGHAM, A. D. Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochimica et Biophysica Acta* 1976, 443(3):629–634.

[16] SCHIEREN, H., et al. Comparison of large unilamellar vesicles prepared by a petroleum ether vaporization method with multilamellar vesicles: ESR, diffusion and entrapment analyses. *Biochimica et Biophysica Acta* 1978, 542(1):137–153.

[17] BATZRI, S., KORN, E. D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochimica et Biophysica Acta* 1973, 298(4):1015–1019.

[18] SZOKA, F. Jr, PAPAHADJOPOULOS, D. 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* USA 1978, 75(9):4194–4198.

[19] HANDA, T., et al. Thermal SiO and $H_{13}CO^{+}$ line observations of the dense molecular cloud G0.11-0.11 in the Galactic Center Region. *The Astrophysical Journal* 2006, 636:261–266.

[20] SHAHEEN, S. M., et al. Liposome as a carrier for advanced drug delivery. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006, 9(6):1181–1191.

[22] MAYER, I. D., et al. pH gradient-mediated drug entrapment in liposomes. *Liposome Technology*. 2nd edition. Edited by Gregoriadis G. Boca Raton: CRC Press; 1993:27–44.

[22] ARCADIO, C., CULLIS, P. R. Recent advances in liposomal drug-delivery systems. *Current Opinion in Biotechnology* 1995, 6:698–708.

[23] HEMANTHKUMAR, M., SPANDANA, V. Liposomal encapsulation technology a novel drug delivery system designed for ayurvedic drug preparation. *International Research Journal of Pharmacy* 2011, 2(10):4–7.

[24] AWADA, A., et al. Prolonged schedule of temozolomide (Temodal) plus liposomal doxorubicin (Caelyx) in advanced solid cancers. *Anticancer Drugs* 2004, 15:499–502.

[25] BANERJEE, R., TYAGI, P., LI, S., HUANG, L. Anisamide-targeted stealth liposomes: a potent carrier for targeting doxorubicin to human prostate cancer cells. *International Journal of Cancer* 2004, 112:693–700.

[26] BASELGA, J., METSELAAR, J. M. Monoclonal antibodies: clinical applications: monoclonal antibodies directed against growth factor receptors. *Principles and Practice of Biological Therapy of Cancer*. Rosenburg SA. Philadelphia: Lippincott; 2000:475–489.

[27] MARIA LAURA, I., FRANCO, D., CATTEL, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine* 2006, 1(3):297–315.

[28] GABIZON, A. A. Stealth liposomes and tumor targeting: one step further in the quest for the magic bullet. *Clinical Cancer Research* 2001, 7:223.

[29] ROMBERG, B., HENNINK, W. E., STORM, G. Sheddable coatings for long-circulating nanoparticles. *Pharmaceutical Research* 2008, 25(1):55–71.

[30] KUNISAWA, J., MAYUMI, T. Fusogenic liposome delivers encapsulated nanoparticles for cytosolic controlled gene release. *Journal of Controlled Release.* 2005, 105:344–353.

[31] PARTHASARATHY, R., et al. Interaction of liposorae-associated all-trans-retinoic acid with squamous carcinoma cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 1994, 34:527–534.

[32] GILL, P. S., et al. Phase I/II clinical and pharmacokinetic evaluation of liposomal daunorubicin. *Journal of Clinical Oncology*. 1995, 13:996–1003.

[33] NEW, R. R. C., et al. Nature antileishmanial activity of antimonials entrapped in liposomes. *Nature.* 1978, 272:55–58.

[34] LOPEZ-BERESTEIN, G., et al. Liposomal amphotericin B for the treatment of systemic fungal infections in patients with cancer. *Journal of Infectious Disease.s* 1985, 151:704–710.

[35] LASIC, D. D. Mixed micelles in drug delivery. *Nature.* 1992, 355:279–280.

[36] SVENSON, C. E., POPESCU, M. C., GINSBERG, R. C. Liposome treatments of viral, bact and protozoal infections. *Critical Reviews in Microbiology.* 1988, 15:1–31.

[37] GABIZON, A. Liposomes as a drug delivery system in cancer therapy. *Drug Carrier Systems*. Roerdink, F. H. D., Kron, A. M. Chichester: Wiley; 1989:185–211.

[38] STORM, G., et al. Influence of lipid composition on the antitumor activity exerted by doxorubicin containing liposomes in a rat solid tumor model. *Cancer Research.* 1987, 47:3366–3372.

[39] AKBARZADEH, A., et al. Preparation and in vitro evaluation of doxorubicin-loaded Fe_3O_4 magnetic nanoparticles modified with biocompatible co-polymers. *International Journal of Nanomedicine.* 2012, 7:511–526.

[40] AKBARZADEH, A., et al. Synthesis, characterization, and in vitro evaluation of novel polymer-coated magnetic nanoparticles for controlled delivery of doxorubicin. *Nanotechnology, Science and Applications.* 2012, 5:13–25.

[43] AKBARZADEH, A., SAMIEI, M., DAVARAN, S. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Research Letters.* 2012, 7:144.

[42] VALIZADEH, A., et al. Quantum dots: synthesis, bioapplications, and toxicity. *Nanoscale Research Letteers.* 2012, 7:480.

[43] AKBARZADEH, A., et al. Synthesis, characterization and in vitro studies of doxorubicinloaded magnetic nanoparticles grafted to smart copolymers on A549 lung cancer cell line. *Journal of Nanobiotechnology*. 2012, 10:46.

[44] DAEMEN, T., et al. Liposomal doxorubicin induced toxicity: depletion and impairment of phagocytic activity of liver macrophages. *International Journal of Cancer.* 1995, 61:761–721.

[45] AKBARZADEH, A., et al. Liposome: classification, preparation, and applica-tions. *Nanoscale Research Letters.* 2013, vol. 8, s. 102. ISSN 1556-276X.

[46] ELOY, J. O., MARINA CLARO, J. O., PETRILLI, R. Lipo-somes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encap-sulation and delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014, 123, s. 345–363, ISSN 0927-7765.

[47] DAVIS, J. L., et al. Liposomal-encapsulated Ascorbic Acid: Influence on Vita-min C Bioavailability and Capacity to Protect Against Ischemia-Reperfusion Injury. *Nutrition and Metabolic Insights.* 2016, vol. 9, s. 25-30. ISSN 1178-6388.

[48] MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2015, vol. 219, s. 27-53. ISSN 0001-8686.

[49] WONG, H. L., et al. A new polymer-lipid hybrid nanoparticle system increases cytotoxicity of doxorubicin against multidrug-resistant human breast cancer cells. *Pharmaceutical Research.* 2006, vol. 23, no. 7, s. 1574-1585. ISSN 0724-8741.

[50] PUSHPAMALAR, J., et al. Biodegradable Polysaccharides for Controlled Drug Delivery. *Chempluschem*. 2016, vol. 81, no. 6, s. 504-514. ISSN 2192-6506.

[51] WECHTERSBACH, L., ULRIH, N. P., CIGIC, B. Liposomal stabili-zation of ascorbic acid in model systems and in food matrices. *Lwt-Food Science and Technology*. 2012, vol. 45, no. 1, s. 43-49. ISSN 0023-6438.

[52] EDWARDS, K., et al. Effect of polyethyleneglycol-phospholipids on aggregate structure in preparations of small unilamellar liposomes. *Biophysical Journal.* 1997, 73, 258.

[53] KEMPS, J. M. A., CROMMELIN, D. J. A. *Chemische stabiliteit* van fosfolipiden in farmaceutische preparaten: II. Peroxidatie van fosfolipiden in waterig milieu. *Pharmaceutisch Weekblad*. 1988. 123:457–469

[54] CROMMELIN, D. J. A., van BOMMEL, E. M. G. *Stability of liposomes on storage:* freeze dried, frozen or as an aqueous dispersion *Pharmaceutical Research.* 1984, 159.

[55] PATEL, A. R., BHANDARI, B. *Nano- and Microencapsulation of Vita-mins* H. S. KWAK. Oxford; Osney Mead, Oxford OX2 0EL, ENGLAND: Blackwell Science PUBL, 2014. 248 s. ISBN 978-1-118-29232-7.

[56] GRIT, M., de SMIDT, J. H., STRUIJKE, A., CROMMELIN, D. J. A. Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*. 1989, 50, 1.

[57] FORADA, M., PUJOL, M. D., BERMUDEZ, J. Chemical degradation of liposomes by serum components detected by NMR. *J. Chemistry and Physics of Lipids*, 2000, 104, 133**.**

[58] FRAENKEL, G. S. The raison d'etre of secondary plant substances. *Science.* 1959, 129, 1466–1470.

[59] EHRLICH, P. R., RAVEN, P. H. Butterflies and plants: A study in coevolution. *Evolution Psychology*. 1964, 586–608.

[60] FURSTENBERG-HAGG, J., ZAGROBELNY, M. BAK, S. Plant defense against insect herbivores. *International Journal of Molecular Sciences.* 2013, 14, 10242–10297.

[61] GUILLET, J. T. A. G., DURST, T. Phytochemical diversity of insect defenses in tropical and temperate plant families. In Advances in Insect Chemical Ecology; *Cambridge University Press*: Cambridge, UK, 2004; pp. 56–77.

[62] BERENBAUM, M. R., ZANGERL, A. R. Phytochemical diversity. In Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions; *Springer*: Berlin, Germany, 1996; pp. 1–24.

[63] FIRN, R. D., JONES, C. G. An explanation of secondary product "redundancy". In Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions; *Springer*: Berlin, Germany, 1996; pp. 295–312.

[64] HARBORNE, J. B. Twenty-five years of chemical ecology. *Natural Product Reports.* 2001, 18, 361–379.

[65] FIRN, R. D., JONES, C. G. Natural products - A simple model to explain chemical diversity. *Natural Product Reports.* 2003, 20, 382–391.

[66] LEWINSOHN, E., GIJZEN, M. Phytochemical diversity: The sounds of silent metabolism. *Plant Science.* 2009, 176, 161–169.

[67] FIRN, R. D., JONES, C. G. The evolution of secondary metabolism - A unifying model. *Molecular Microbiology.* 2000, 37, 989–994.

[68] WAR, A. R., et al. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling & Behavior*. 2012, 7, 1306–1320.

[69] International Organization for Standardization. Vocabulary of Natural Materials: ISO/D1S9235.2; 2013.

[70] WAR, A. R., et al. Herbivore induced plant volatiles: Their role in plant defense for pest management. *Plant Signaling & Behavior*. 2011, 6, 1973–1978.

[71] HOLOPAINEN, J. K., BLANDE, J. D. Where do herbivore-induced plant volatiles go? Front. *Plant Science.* 2013, 11, 185.

[72] GLAS, J. J., et al. Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012, 13, 17077–17103.

[73] SAKAI, A., YOSHIMURA, H. Monoterpenes of Salvia leucophylla. *Current Bioactive Compounds*. 2012, 8, 90–100.

[74] PICHERSKY, E., GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: Perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology.* 2002, 5, 237–243.

[75] HARE, J. D. Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects. *Annual Review Entomology*. 2011, 56, 161–180.

[76] MARKUS LANGE, B., TURNER, G. W. Terpenoid biosynthesis in trichomes -Current status and future opportunities. *Plant Biotechnology Journal.* 2013, 11, 2–22.

[77] GUO, J., et al. Development and structure of internal glands and external glandular trichomes in pogostemon cablin. *PLoS ONE*. 2013, 8, e77862.

[78] HUANG, S. S., et al. The capitate and peltate glandular trichomes of Lavandula pinnata L. (lamiaceae): Histochemistry, ultrastructure, and secretion. *Journal of the Torrey Botanical Society.* 2008, 135, 155–167.

[79] NAGEGOWDA, D. A. Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *FEBS Letters.* 2010, 584, 2965–2973.

[80] XIE, Z., KAPTEYN, J., GANG, D. R. A systems biology investigation of the MEP/terpenoid and shikimate/phenylpropanoid pathways points to multiple levels of metabolic control in sweet basil glandular trichomes. *Plant Journal.* 2008, 54, 349–361.

[81] LANGE, B. M. The evolution of plant secretory structures and emergence of terpenoid chemical diversity. *Annual Review of Plant Biology*. 2015, 66, 139–159.

[82] WAGNER, G., WANG, E., SHEPHERD, R. New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany*. 2004, 93, 3–11.

[83] TOOKER, J., et al. Trichomes as sensors: Detecting activity on the leaf surface. *Plant Signaling & Behavior*. 2010, 5, 73–75.

[84] BAKKALI, F., et al. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*. 2008, 46, 446–475.

[85] ZITZELSBERGER, C., BUCHBAUER, G. Essential oils as "a cry for help". A review. *Natural Product Communications.* 2015, 10, 1127–1138.

[86] FREIRES, I. A., et al. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: A systematic review. *Molecules.* 2015, 20, 7329–7358.

[87] RUSSO, R., et al. Exploitation of cytotoxicity of some essential oils for translation in cancer therapy. Evid. Based Complement. *Alternative Medicine.* 2015, 2015, 397821.

[88] BAYALA, B., et al. Anticancer activity of essential oils and their chemical components -A review. *American Journal of Cancer Research*. 2014, 19, 591–607.

[89] BEN ARFA, A., et al. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology.* 2006, 43, 149–154.

[90] BASSOLE, I. H. N., et al. Composition and antimicrobial activities of Lippia Multiflora moldenke, Mentha piperita L. and Ocimum basilicum L. Essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. *Molecules*. 2010, 15, 7825–7839.

[91] DORMAN, H., DEANS, S. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 2000, 88, 308–316.

[92] O'BRYAN, C. A., et al. Potential of plant essential oils and their components in animal agriculture -In vitro studies on antibacterial mode of action. *Frontiers in Veterinary Science*. 2015, 2, 35.

[93] JULIANI, H., KOROCH, A., SIMON, J. Chemical diversity of essential oils of Ocimum species and their associated antioxidant and antimicrobial activity. In *Essential Oils and Aromas: Green Extractions and Applications*; Har Krishan Bhalla & Sons: Uttrakhand, India, 2009.

[94] PRABUSEENIVASAN, S., JAYAKUMAR, M., IGNACIMUTHU, S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement. Altern. Med*. 2006, 6, 1.

[95] OUSSALAH, M., et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157: H7, Salmonella typhimurium, staphylococcus aureus and listeria monocytogenes. *Food Control* 2007, 18, 414–420.

[96] HAZZIT, M., et al. Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils. *Food Chemistry.* 2009, 116, 714–721.

[97] GODIN, B., TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2007. v. 59, n.11, p.1152-1161.

[98] PASPARAKIS, M., HAASE, I., NESTLE, F. O. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology.* 2014. 14:289–301

[99] BARRY, B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2001. v. 14, n. 2, p. 101-114.

[100] MAGHRABY, G. M., BARRY, B. W., WILLIAMS, A. C. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008. v. 34, 4-5, 203-222.

[101] ANDREWS, S. N.; JEONG, E., PRAUSNITZ, M. R. Transdermal delivery of molecules is limited by full epidermis, not just stratum corneum. *Pharmaceutical Research*, 2013. v. 30, n. 4, 1099-109.

[102] CASPERS, P. J., et al. In vitro and in vivo Raman spectroscopy of human skin. *Biospectroscopy*, 1998. v. 4, n. 5 Suppl, S31-S39.

[103] WILLIAMS, A. C., BARRY, B. W. Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2012. v. 64, 128-137.

[104] ALEXANDER, A., et al. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release.* 2012. 164, 1, 26-40.

[105] KALIA, Y. N., GUY, R. H. Modeling transdermal drug release. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2001. v. 48, 2-3, 159-172.

[106] BARBERO, A. M., FRASCH, H. F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: A quantitative review. *Toxicology in Vitro.* 2009, 23, 1–13.

[107] HATANAKA, T. et al. In Silico Estimation of Skin Concentration Following the Dermal Exposure to Chemicals. *Pharmaceutical Research.* 2015, 32, 3965–3974.

[108] SUGIBAYASHI, K. et al. Utility of a three dimensional cultured human skin model as a tool to evaluate the simultaneous diffusion and metabolism of ethyl nicotinate in skin. *Drug Metabolism Pharmacokinetics*. 2004, 19, 352–362.

[109] SOUTO, E. B. SLN and NLC for Topical Delivery of Antifungals. Institut of Pharmacy, Freie Universitat, Berlin, 2005. p. 21.

[110] PONEC, M. In vitro cultured human skin cells as alternatives to animals for skin irritancy screening. *International Journal Cosmetic Science.* 1992. 14, 245–264.

[111] VAN GELE, M., et al. Threedimensional skin models as tools for transdermal drug delivery: challenges and limitations. *Expert Opinion in Drug Delivery*. 2011. 8, 705–720.

[112] SEMLIN, L., et al. In vitro models for human skin disease. *Drug Discovery*. 2011. 16, 132–139.

[113] HENNING, A., SCHAEFER, U. F., NEUMANN, D., Potential pitfalls in skin permeation experiments: influence of experimental factors and subsequent data evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2009. 72, 324–331.

[114] MATHES, S. H., RUFFNER, H., GRAF-HAUSNER, U., The use of skin models in drug development. *Advanced Drug Delivery Rev*iews 2014. 69–70, 81–102.

[115] OLIVEIRA, G., et al. Alcohol enhanced permeation in model membranes. Part I. Thermodynamic and kinetic analyses of membrane permeation. *International Journal of Pharmaceutics* 2010. 393, 61–67.

[116] SINKO, B., et al. Skin-PAMPA: a new method for fast prediction of skin penetration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2012. 45, 698–707.

[117] ENGESLAND, A., et al. New applications of phospholipid vesicle-based permeation assay: permeation model mimicking skin barrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2013. 102, 1588–1600.

[118] CHEN, J., et al. Skin permeation behavior of elastic liposomes: role of formulation ingredients. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2013. 10(6):845–856.

[119] MISHRA, D., et al. Elastic liposomes mediated transdermal delivery of an anti-hypertensive agent: propranolol hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007. 96(1):145–155.

[120] ELSAYED, M. M., et al. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007. 332(1–2):1–16.

[121] CHRISTOPHERS, E., KLIGMAN, A. M. Visualization of the cell layers of the stratum corneum. *Journal of Investigative Dermatology*. 1964. 42:407–409.

[122] SINGH, S., et al. The role of surfactants in the formulation of elastic liposomal gels containing a synthetic opioid analgesic. *International Journal of Nanomedicine*. 2016;11:1475–1482.

[123] CEVC, G., BLUME, G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1992. 1104(1):226–232.

[124] SINICO, C., FADDA, A. M. Vesicular carriers for dermal drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2009. 6(8):813–825.

[125] CEVC, G., et al. Occlusion effect on transcutaneous NSAID delivery from conventional and carrier-based formulations. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008 359(1–2):190–197.

[126] BENSON, H. A. Transfersomes for transdermal drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2006. 3(6):727–737.

[127] GEUSENS, B. Ultradeformable cationic liposomes for delivery of small interfering RNA (siRNA) into human primary melanocytes. *Journal of Controlled Release*. 2009. 133(3):214–220.

[128] DE JAGER, M. A novel in vitro percutaneous penetration model: evaluation of barrier properties with p-aminobenzoic acid and two of its derivatives. *Pharmaceutical Research*. 2006. 23, 951–960.

[129] OCHALEK, M., Characterization of lipid model membranes designed for studying impact of ceramide species on drug diffusion and penetration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2012. 81, 113–120.

[130] BOLZINGER, M. A., et al. Penetration of drugs through skin, a complex-rate controlling membrane. *Current Opinion in Colloid Interface Science*. 2012. 17, 156–165.

[131] STAHL, J., WOHLERT, M., KIETZMANN, M., The effect of formulation vehicles on the in vitro percutaneous permeation of ibuprofen. *BMC Pharmacology*. 2011. 11, 12.

[132] DRAGICEVIC-CURIC, N., et al. Temoporfin-loaded invasomes: development, characterization and in vitro skin penetration studies. *Journal of Controlled Release*. 2008. 127, 59–69.

[133] RABER, A. S., et al. Quantification of nanoparticle uptake into hair follicles in pig ear and human forearm. *Journal of Controlled Release*. 2014. 179, 25–32.

[134] GILLET, A., et al. Liposome surface charge influence on skin penetration behaviour. *International Journal of Pharmacology*. 2011. 411, 223–231.

[135] KNUDSEN, N. O., et al. Calcipotriol delivery into the skin with PEGylated liposomes. *European Journal of Pharmacology and Biopharmacology*. 2012. 81, 532–539.

[136] CEVC, G., Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2004. 56, 675–711.

[137] CHITTENDEN, J. T., BROOKSM, J. D., RIVIERE, J. E. Development of a mixed-effect pharmacokinetic model for vehicle modulated in vitro transdermal flux of topically applied penetrants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014. 103, 1002–1012.

[138] TUREK, C., STINTZING, F. C. Impact of different storage conditions on the quality of selected essential oils. *Food Res. Int.* 2012. 46, 341–353.

[139] SEBAALY, C., et al. Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. *Food Chem.* 2015. 178, 52–62.

[140] DETONI, C. B., et al. Essential oil from Zanthoxylum tingoassuiba loaded into multilamellar liposomes useful as antimicrobial agents. *J. Microencapsul*. 2009. 1–8.

[141] GHARIB, R., et al. Interaction of selected phenylpropenes with dipalmitoylphosphatidylcholine membrane and their relevance to antibacterial activity. *J. Membr. Biol.* 2017. 250, 259–271.

[142] GHARIB, R., et al. Effect of a series of essential oil molecules on DPPC membrane fluidity: a biophysical study. *J. Iran. Chem. Soc.* 2018. 15, 75–84.

[143] GHARIB, R., et al. Drug-in-cyclodextrinin- liposomes as a carrier system for volatile essential oil components: application to anethole. *Food Chem.* 2017. 218, 365–371.

[144] COIMBRA, M., et al. Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 2011. 416, 433–442.

[145] ZHIGALSTEY, I. V., et al. Liposome-encapsulated vincristine, vinblastine and vinorelbine: a comparative study of drug loading and retention. *Journal of Controlled Release*. 2005. 104, 103–111.

[146] SEBAALY, C., et al. Effect of composition, hydrogenation of phospholipids and lyophilization on the characteristics of eugenol-loaded liposomes prepared by ethanol injection method. *Food Biosci*. 2016. 15, 1–10.

[147] HAMMOUD, Z., et al. New findings on the incorporation of essential oil components into liposomes composed of lipoid S100 and cholesterol. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019. 561. 161-170.

[148] VEMURI, S., RHODES, C, T. Preparation andcharacterization of liposomes as therapeutic deliverysystems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 1995. 70, 95–111.

[149] USKOKOVIC, V., et al. Dynamic light scattering and zeta potential ofcolloidal mixtures of amelogenin andhydroxyapatite in calcium and phosphate rich ionicmilieus.*Archives of Oral Biology*. 2011. 56, 521–532.

[150] LAOUINI, A., et al. Preparation,characterization and applications of liposomes: stateof the art. *Journal of Colloid Science*. 2012. 1, 147–168.

[151] BEDNÁŘ, M., SOUČEK, A., FRAŇKOVÁ, V. Bakteriologie, virologie, parazitologie, 1996. Triton

[152] KAPLAN, J. H. Biochemistry of Na,K - ATPase. *Annual Review Biochemistry.* 2002. 71,511–535.

[153] NEWMAN, R. A., et al. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. *Molecular Interventions*. 2008. 8, 36–49.

[154] BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation ofmicrogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976.72, 248–254.

[155] BAGINSKY, E., FOA, P., ZAK, B. Determination of phosphorus. *Clinical Chemistry* 1966 12, 546-552.

[156] HABECK, M., et al. Specific phospholipid binding to Na,K - ATPase at two distinct sites. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the USA.* 2017. 114 (11), 2904-2909

[157] SUCHÁ, P. Účinky esenciálních olejů na růst vybraných bakterií. *Diplomová práce.* Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. 2013.

[158] ZHANG, Y., LIU, X., WANG, Y. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against Escherichia coli and Staphylococcus aureus . *Food Control*. 2016. 59, 282-289

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A. J.	fluorescence – arbitrární jednotky
API	aktivní farmaceutické složky
ATP	adenosintrifosfát
CH	cholesterol
CMC	kritická micelární koncentrace
DMPC	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-fosfocholin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPPC	dipalmitoyl fosfatidylcholin
DPPS	1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-fosfo-L-serin
DSPC	distearoyl fosfatidylcholin
ELs	elastické liposomy
GSH	glutathion
GUV	obří unilamelární vezikuly
kDa	kilodaltony
LET	technologie enkapsulace liposomy
LUV	velké unilamelární vezikuly
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy
MLV	multilamelární vezikuly
MVV	multivezikulární vezikuly
MPS	mononukleární fagocytový systémem
NHK	běžné lidské keratinocyty
NKA	Na^+/K^+-ATPasa
OLV	velké oligolamelární vezikuly
O/V	emulze typu olej ve vodě
PAMPA	testy membránové permeability

PEG	polyethylenglykol
PV	těkavé látky rostlin
PVPA	test propustnosti založený na fosfolipidových vezikulách
R. J.	fluorescence – relativní jednotky
ROS	reaktivní formy kyslíku
SC	*stratum corneum*
SM	sekundární metabolity
SUV	malé unilamelární vezikuly
TEWL	transepidermální ztráta vody
UV	unilamelární vezikuly
V/O	emulze typu voda v oleji

SEZNAM OBRÁZKŮ

1 *Preparace kůže od chrupavky*

2 *Aparatura pro stanovení TEWL použité kůže*

3 *Aparatura pro transdermální absorpci – Franzovy komůrky*

4 *Absorpční spektrum hřebíčkového esenciálního oleje (10× zředěný)*

5 *Absorpční spektrum tymiánového esenciálního oleje (10× zředěný)*

6 *Absorpční spektrum esenciálního oleje z heřmánku (40× zředěný)*

7 *Absorpční spektrum skořicového esenciálního oleje (80× zředěný)*

8 *Emisní spektra esenciálních olejů z hřebíčku a tymiánu*

9 *Emisní spektra esenciálních olejů z heřmánku a skořice*

10 *Liposomy po dialýze; A) DPPC, B) DPPC-CH 7/3, B2) DPPC-CH 5/1, C) DPPC-DPPS 7/3*

11 *Distribuce velikostí liposomů z DPPC dle intenzity, objemu a počtu částic*

12 *Distribuce velikostí liposomů z DPPC-DPPS (7/3) dle intenzity, objemu a počtu částic*

13 *Distribuce velikostí liposomů z DPPC-CH (7/3) dle intenzity, objemu a počtu částic*

14 *Distribuce velikostí liposomů z DPPC-CH (5/1) dle intenzity, objemu a počtu částic*

15 *Liposomy připravené z DPPC (velikost částic 100-200 nm)*

16 *Značně popraskaná populace liposomů z DPPC-DPPS (velikost 100 nm)*

17 *Agregované liposomy z DPPC-CH v poměru 7:3*

18 *Agregované a rozpadlé liposomy z DPPC-CH v poměru 5:1*

19 *Absorpční spektra kalibrační řady esenciálního oleje*

20 *Absorpční spektra formulací s esenciálním olejem rozpuštěná v methanolu*

21 *Kalibrační přímka esenciálního oleje*

22 *Disková difuzní metoda pro liposomy DPPC (vlevo) a DPPC-DPPS (vpravo)*

23 *Disková difuzní metoda pro liposomy DPPC-CH 7/3 (vlevo) a DPPC-CH 5/1 (vpravo)*

24 *Procentuální zastoupení esenciálního oleje v jednotlivých vrstvách*

25 *Fluorescence esenciálního oleje detekovaná horním detektorem*

26 *Fluorescence esenciálního oleje detekovaná spodním detektorem*

27 *Dva týdny staré liposomy připravené z DPPC (velikost částic 100-200 nm)*

28 *Homogenní distribuce liposomů z DPPC/DPPS dva týdny od přípravy*

29 *Značně popraskaná populace liposomů z DPPC/cholesterol v poměru 7:3 o velikosti okolo 100 nm stáří 2 týdnů*

30 *Dva týdny staré liposomy od velikosti 200 nm z DPPC/cholesterolu v poměru 5:1 s rupturamy*

SEZNAM TABULEK

1 *Množství fosfolipidů a cholesterolu pro přípravu liposomů (na 5 ml liposomální disperze)*

2 *Velikost částic a zeta potenciál vytvořených liposomů vyjádřené jako průměr ± směrodatná odchylka*

3 *Enkapsulační účinnost studovaných liposomů stanovená pomocí absorpčního měření*

4 *TEWL a tloušťka kůže použité pro následná měření*

5 *Fluorescence zaznamenaná v jednotlivých vrstvách kůže po transdermální absorpci ve Franzových komůrkách*

6 *Intenzita fluorescence detekována horním detektorem (T) a spodním (B) při transdermální penetraci připravených liposomů*

7 *Hodnoty životaschopnosti myších fibroblastů po inkubaci s liposomy*

8 *Hodnoty životaschopnosti rakovinných buněk U937 po inkubaci s liposomy*

9 *Výsledná aktivita Na^+, K^+-ATPasy po reakci s liposomy*

10 *Stabilita liposomů v čase hodnocená ze změn jejich velikosti stanovené ihned po přípravě, po 1, 2 a 3 týdnech skladování při 4 °C*

11 *Stabilita liposomů v čase hodnocená ze změn jejich zeta potenciálů ihned po přípravě, po 1, 2 a 3 týdnech skladování při 4 °C*

12 *Změna distribuce velikosti částic po inkubaci s $CaCl_2$ o různých koncentracích*

13 *Změna zeta potenciálu liposomů po inkubaci s $CaCl_2$ o různých koncentracích*