



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**VYUŽITÍ NANOFLUIDNÍHO SMĚŠOVÁNÍ PRO PŘÍPRAVU
LIPOSOMÁLNÍCH NOSIČŮ ZNAČENÝCH GADOLINIEM
PRO KONTRASTNÍ ZOBRAZOVÁNÍ MAGNETICKOU
RESONANCÍ (MRI)**

USE OF NANOFLUIDIC MIXING FOR PREPARATION OF LIPOSOME CARRIERS STAINED BY GADOLINIUM
FOR CONTRAST IMAGING BY MAGNETIC RESONANCE (MRI)

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kamila Velínská

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Jaroslav Turánek, CSc.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1113/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Kamila Velínská**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **RNDr. Jaroslav Turánek, CSc.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Využití nanofluidního směšování pro přípravu liposomálních nosičů značených gadoliniem pro kontrastní zobrazování magnetickou resonancí (MRI)

Zadání diplomové práce:

1. Příprava liposomů technikou nanofluidního směšování
2. Modifikace liposomů pomocí syntetických lipidů a chelatačních komplexů vázajících gadolinium pro MRI
3. Charakterizace liposomálních preparátů pomocí moderních fyzikálně chemických metod (DLS, NTA)
4. Ověření konceptu Gd-liposomů pro zobrazování pomocí MRI

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

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

Bc. Kamila Velínská
student(ka)

RNDr. Jaroslav Turánek, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá přípravou liposomů obsahujících metalochelateční lipidy s Gd^{3+} pro kontrastní zobrazování magnetickou rezonancí. Liposomy byly připravovány pomocí hydratace lipidního filmu s následnou extruzí a také pomocí nové metody nanofluidního mísení na přístroji NanoAssemblr™ Benchtop. Technologie přípravy byla optimalizována na parametry, jako je složení lipidní kompozice, rychlost průtoku a poměr vodné a organické fáze. Byla vypracována metoda povrchové modifikace liposomů komplexy gadolinia s využitím konjugační reakce mezi lipidy nesoucími kyselinou kyanurovou a Gd-DOTA. Připravené liposomy obsahující gadolinium byly komplexně charakterizovány pomocí DLS a NTA. Morfologie liposomů byla pozorována pomocí TEM a cryo-TEM. Byly využity metody na stanovení obsahu fosfolipidů (Stewartův test) a zbytkové vody v lyofilizátech liposomů (Karl-Fischer titrace). Gadolinium v liposomálních preparátech bylo stanoveno na ICP-OES. Pomocí MR byl ověřen koncept gadoliniových liposomů, určených pro MRI zobrazování trombů. Byl vytvořen koncept popisující mechanismus tvorby liposomů metodou nanofluidního mísení, který je založen na experimentálně doložené existenci fragmentu fosfolipidové dvojvrstvy.

ABSTRACT

This diploma thesis focuses on the preparation of the liposomes, containing lipids with Gd^{3+} , which are used for a contrast magnetic resonance imaging. The liposomes were prepared by the lipid film hydration followed by an extrusion and also by a new nanofluid mixing method on the NanoAssemblr™ Benchtop. The preparation technology has been optimized for parameters such as the composition of lipids, the flow rate ratio and total flow rate. The method of modification of the liposomes surface by gadolinium complexes has been developed. This method is using a conjugation reaction between the lipids containing cyanuric acid and Gd-DOTA. Prepared Gd-liposomes, which contain gadolinium, were complexly defined by the characterization techniques of DLS and NTA. The morphology of liposomes was observed by TEM and cryo-TEM. Methods for the determination of phospholipid content (Stewart test) and residual water in the lyophilisates of liposomes (Karl-Fischer titration) were used. Gadolinium in liposomal preparations was determined by ICP-OES. Using MR, the concept of gadolinium liposomes was verified and designed for MRI imaging of thrombi. The concept describing the mechanism of liposomes formation based on the experimentally proven existence of a phospholipid bilayer fragment has been developed. This concept is based on the experimentally proven existence of a phospholipid bilayer fragment.

KLÍČOVÁ SLOVA

Liposomy, gadolinium, liposomální teranostika, magnetická rezonance, nanofluidní mísení, NanoAssemblr

KEYWORDS

Liposomes, gadolinium, theranostic liposomes, magnetic resonance, nanofluidic mixing, NanoAssemblr

VELÍNSKÁ, K. *Využití nanofluidního směšování pro přípravu liposomálních nosičů značených gadoliniem pro kontrastní zobrazování magnetickou rezonancí (MRI)*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 92 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Jaroslav Turánek, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování

Ráda bych především poděkovala panu RNDr. Jaroslavovi Turánkovi, CSc., za odborné konzultace, cenné rady a také za ochotu, vstřícnost a za čas, který mi věnoval při zpracování mé diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat celému kolektivu oddělení Farmakologie a imunoterapie, na Výzkumném ústavu veterinárního lékařství, za příjemné prostředí a spolupráci při vzniku této práce. Zejména pak Mgr. Františkovi Hubatkovi, Ing. Janu Kotoučkovi za jejich pomoc a rady. Můj dík patří i panu MVDr. Pavlovi Kulichovi Ph.D., doc. Ing. Pavlovi Divišovi, Ph.D., Mgr. Dominikovi Hřebíkovi a Ing. Radovanu Jiříkovi, Ph.D. za jejich pomoc při měření. V neposlední řadě děkuji svým nejbližším za pochopení a podporu při vypracovávání této práce.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	LIPOSOMY	9
2.1.1	<i>Fyzikálně-chemická charakterizace liposomů</i>	9
2.1.2	<i>Strukturální rozdělení liposomů</i>	13
2.1.3	<i>Rozdělení liposomů podle funkce</i>	14
2.1.4	<i>Rozdělení metod přípravy liposomů</i>	16
2.1.5	<i>Příprava liposomů pomocí nanofluidizace</i>	17
2.1.6	<i>Sekundární procesy úpravy liposomů</i>	20
2.1.7	<i>Stabilizace a lyofilizace liposomů</i>	21
2.2	NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÁ REZONANCE (NMR)	22
2.2.1	<i>Kontrastní látky pro MRI</i>	25
2.2.2	<i>Liposomy značené gadoliniem</i>	26
2.3	VYBRANÉ METODY PRO CHARAKTERIZACI LIPOSOMŮ	29
2.3.1	<i>Dynamický rozptyl světla</i>	29
2.3.2	<i>Analýza trajektorie částic, NTA</i>	32
2.3.3	<i>Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem</i>	34
2.4	ELEKTRONOVÉ MIKROSKOPY	34
2.4.1	<i>Transmisní elektronový mikroskop – TEM</i>	35
2.4.2	<i>Skenovací elektronová mikroskopie – SEM</i>	37
2.4.3	<i>Kryo-transmisní elektronová mikroskopie</i>	38
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
3.1	PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ	39
3.2	POMŮCKY	39
3.3	CHEMIKÁLIE	39
3.4	OPTIMALIZACE NANOFLUIDIZAČNÍ METODY	40
3.5	VLIV LIPIDNÍ KOMPOZICE A SLOŽENÍ VODNÉ FÁZE NA VELIKOST LIPOSOMŮ	40
3.6	OPTIMALIZACE OBSAHU CHOLESTEROLU V LIPOSOMECH	40
3.7	POROVNÁNÍ LIPOSOMŮ, ZÍSKANÝCH METODOU HYDRATACE LIPIDNÍHO FILMU S NÁSLEDNOU EXTRUZÍ A POMOCÍ METODY NANOFLUIDINÍHO SMĚŠOVÁNÍ	41
3.8	CHARAKTERIZACE LIPOSOMŮ OBSAHUJÍCÍ GADOLINIUM	41
3.8.1	<i>Příprava liposomů obsahujících gadolinium pomocí hydratace lipidního filmu s následnou extruzí</i>	42
3.8.2	<i>Příprava liposomů obsahujících gadolinium pomocí nanofluidizace</i>	43
3.9	URČENÍ MORFOLOGIE LIPOSOMŮ, OBSAHUJÍCÍCH GADOLINIUM, POMOCÍ CRYO-TEM	44
3.10	OVĚŘENÍ PŘÍTOMNOSTI GADOLINIA V LIPOSOMECH POMOCÍ TEM SE SPEKTROMETREM RENTGENOVÉHO ZÁŘENÍ	45
3.11	KVANTIFIKACE GADOLINIA POMOCÍ ICP-OES	45
3.12	STANOVENÍ OBSAHU FOSFOLIPIDŮ V GD-LIPOSOMECH	45
3.13	VLIV LYOFILIZACE NA VELIKOST A Z-POTENCIÁL LIPOSOMŮ	46

3.14	STANOVENÍ ZBYTKOVÉ VODY DLE KARL-FISCHERA.....	47
3.15	OVĚŘENÍ KONCEPTU Gd-LIPOSOMŮ PRO ZOBRAZOVÁNÍ POMOCÍ MRI	47
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	49
4.1	OPTIMALIZACE NANOFLUIDIZAČNÍ METODY PRO PŘÍPRAVU LIPOSOMŮ	49
4.2	VLIV LIPIDNÍ KOMPOZICE A SLOŽENÍ VODNÉ FÁZE NA VELIKOST LIPOSOMŮ	51
4.3	VLIV CHOLESTEROLU NA VELIKOST LIPOSOMŮ	53
4.4	POROVNÁNÍ LIPOSOMŮ PŘIPRAVENÝCH POMOCÍ METODY HYDRATACE LIPIDNÍHO FILMU A METODOU NANOFLUIDNÍHO MÍSENÍ	57
4.5	CHARAKTERIZACE LIPOSOMŮ OBSAHUJÍCÍ NAVÁZANÉ KOMPLEXY GADOLINIA	61
4.6	URČENÍ MORFOLOGIE Gd-LIPOSOMŮ, POMOCÍ CRYO-TEM	69
4.7	OVĚŘENÍ PŘÍTOMNOSTI GADOLINIA V LIPOSOMECH POMOCÍ TEM S EDS	71
4.8	STANOVENÍ OBSAHU GADOLINIA POMOCÍ ICP-OES	74
4.9	STANOVENÍ OBSAHU FOSFŘIOLIPIDU V Gd-LIPOSOMECH, DLE STEWARTOVA TESTU	75
4.10	VLIV KRYOPROTEKTANTU NA STABILITU Gd-LIPOSOMŮ PO LYOFILIZACI.....	76
4.11	STANOVENÍ ZBYTKOVÉ VODY V LYOFILIZOVANÝCH LIPOSOMECH, KARL-FISCHER.....	77
4.12	OVĚŘENÍ KONCEPTU Gd-LIPOSOMŮ	78
5	ZÁVĚR.....	79
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	80
7	LITERATURA.....	82

1 ÚVOD

Liposomy patří mezi první nanočástice, které byly použity v medicíně a jsou schváleny FDA (Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv) a EMA (Evropskou agenturou pro léčiva) pro humánní použití pro parenterální aplikaci [1]. Dnes se liposomy řadí mezi nejúspěšnější systémy pro cílenou distribuci léčiv. Mající schopnost inkorporace různých látek. Lze je použít i ke konstrukci nosičů pro rekombinantní vakcíny [2].

Povrch liposomů lze modifikovat navázáním specifických ligandů, například připojením protilátky získáváme tzv. imunoliposomy [3]. Liposomy mohou mít i multi-funkční využití, například teranostické liposomy obsahují jak léčebnou látku, tak vhodnou zobrazovací komponentu. Byly popsány například paramagnetické bi-funkční liposomální systémy, které představují začátek velkého posunu směrem k vytvoření multi-funkčního zobrazování paramagnetickými liposomálními systémy [4]. Jde o vezikuly mající obrovský potenciál především na poli medicíny, diagnostiky a farmakologie.

Moje diplomová práce je součástí projektu: *Nanoliposomální systémy pro rychlou diagnózu trombů pomocí MRI*. Výzkumným cílem tohoto projektu, je vývoj pokročilých bifunkčních nanočásticových systémů na bázi liposomů se specifickou afinitou k trombu. Tyto nanočástice jsou určeny k rychlému zobrazení trombů v kardiovaskulárním systému, zejména v mozku, za použití *in vivo* zobrazovací techniky MRI. Mým úkolem je příprava liposomů pomocí nanofluidního směšování a jejich charakterizace. Liposomy budou modifikovány pomocí syntetických funkcionalizovaných lipidů pro vazbu peptidových ligandů a lipidy s chelatačními komplexy vázajícími gadolinium (ve formě Gd^{3+}). Tyto liposomy poté budou testovány jako kontrastní látky pro zobrazení magnetickou rezonancí a jako nanočásticové nosiče cíleně dopravující trombolytika.

Liposomy obsahující Gd^{3+} budou intravenózně vpraveny do krevního řečiště pacienta. Poté dojde k jejich akumulaci v postiženém místě. Cílení liposomů k trombu bude dosaženo vazbou specifických ligandů na povrch liposomu pomocí aktivovaných polyethylenových spacerů. Například RGD peptidy (arginin-glycin-aspartát) představují specifické ligandy cílené k aktivovaným krevním destičkám a vláknům fibrinu. Pro cílení k vláknům fibrinu jsou také vyvíjeny specifické proteinové bindery, které budou navázány na liposomy.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Liposomy

Liposomy jsou uměle připravované vezikuly, které se využívají především pro výzkumné a pro terapeutické aplikace [5]. Poprvé byly popsány britským hematologem Dr. A. D. Banghamem a kol., z univerzity Cambridge, v roce 1964. Díky tomu se liposomy od roku 1970 začaly intenzivně zkoumat, především jako systémy pro cílení léčiv [6][7]. Liposomy jsou velmi často využívány v různých vědních oborech včetně biofyziky, koloidní chemie, biochemie, biologie, farmakologie atp. [1].

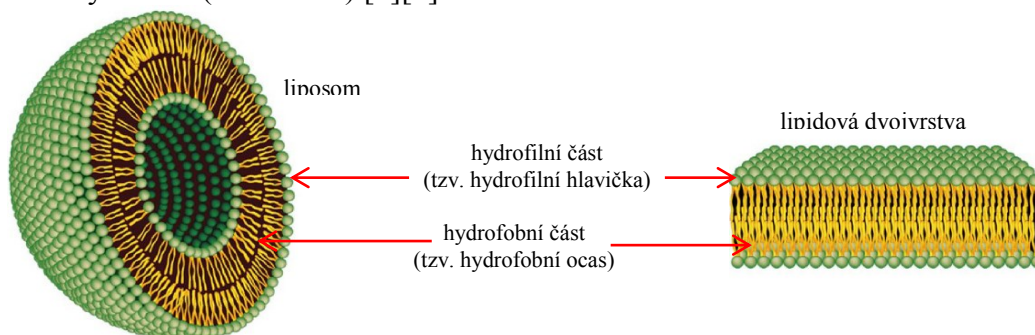
V dnešní době jsou liposomy ceněny díky svým biologickým a fyzikálně-chemickým vlastnostem a jsou považovány za nejúspěšnější systém nosičů léčiv (např. pro antibiotika, vakcíny, cytostatika). Liposomy se vyznačují vysokou biokompatibilitou, neboť jejich struktura je podobná struktuře lipidní dvojvrstvy v buněčných membránách a jsou snadno biodegradovatelné v organismu. Díky své struktuře mají schopnost enkapsulace celé řady molekul s rozličnými fyzikálně-chemickými parametry (molekulární hmotnost, hydrofilita/hydrofobicita) [8]. Klíčovou výhodou liposomů a liposomálních vakcín je tedy zejména jejich biokompatibilita, univerzálnost použití jako nosičů léčiv a vakcín.

Složení liposomů i jejich příprava predikují finální vlastnosti liposomálního přípravku s ohledem na zamýšlené použití. Faktory ovlivňující vlastnosti liposomů jsou zejména lipidní kompozice, povrchový náboj a jeho velikost, distribuce velikosti liposomů, lamelarita, charakter enkapsulované látky nebo povrchová modifikace liposomů. U liposomálních vakcín je klíčovým parametrem také forma asociace antigenů a adjuvans s liposomálním nosičem [2].

2.1.1 Fyzikálně-chemická charakterizace liposomů

Samotný název liposom byl odvozen ze dvou řeckých slov: *lipós* – tuk, *sóma* – což značí „tělo“ [6]. Základní stavební složkou liposomů jsou amfipatické lipidy, často fosfolipidy, které se ve vodném prostředí samsopřádávají do koloidních částic. Molekuly fosfolipidu obsahují hydrofilní část (tzv. hlavičku) a hydrofobní část (tzv. ocas).

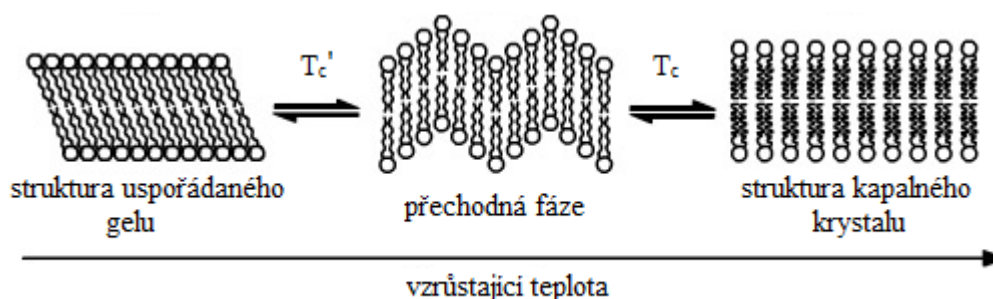
Ve vodě a ve vodných roztocích se fosfolipidy zformují tak, že hydrofobní části jsou orientovány proti sobě a vytvoří se tak bimolekulární membrána. V této membráně, která tvoří liposom, jsou utvářející lipidové dvojvrstvy uspořádány tak, aby polární hlavičky lipidů směřovaly do vnitřní dutiny a do extravezikulárního prostředí a hydrofobní řetězce opět směřovaly k sobě (Obrázek 1) [5][9].



Obrázek 1: Liposom a lipidová dvojvrstva [8]

Vlastnosti liposomů jsou ovlivněny mnoha faktory. Jak bylo již uvedeno výše, především záleží na složení lipidů, na povrchovém náboji, velikosti a způsobu přípravy. Kromě toho volba komponent lipidové dvojvrstvy určuje „pevnost“, „tekutost“ (souhrnně elasticitu membrány) a náboj této dvojvrstvy. Například nenasycené fosfatidylcholin, získané z přírodních zdrojů (vaječný nebo sojový fosfatidylcholin), poskytují více elastické, permeabilnější a méně stabilní lipidové dvojvrstvy, zatímco nasycené fosfolipidy s dlouhým acylovými řetězci (např. dipalmitoylfosfatidylcholin) vytváří pevnou, rigidní a poměrně nepropustnou lipidovou dvojvrstvu při teplotách pod hodnotou fázového přechodu [1].

Charakteristická teplota fázového přechodu (T_c) lipidů představuje teplotu, při které se lipidy transformují z pevné, nebo gelové fáze do fáze kapalné nebo fluidní (Obrázek 2). Teplota, při které dojde k tomuto přechodu je závislá především na délce řetězce lipidů a stupni nenasycenosti [10][11].



Obrázek 2: Uspořádání lipidové dvojvrstvy v závislosti na teplotě [10]

Například hodnoty T_c pro DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-fosfocholin), DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfocholin) a DSPC (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-fosfocholin) jsou 23, 41 a 55 °C. Hydratace lipidů při přípravě liposomů se provádí nad teplotou T_c (lipidní dvojvrstva má strukturu kapalného krystalu a je elastičtější ve srovnání se strukturou gelu) stejně tak jako některé sekundární procesy (např. extruze), které vedou ke změně morfologie a distribuce velikosti liposomálních preparátů [11].

Agregace amfifilních molekul

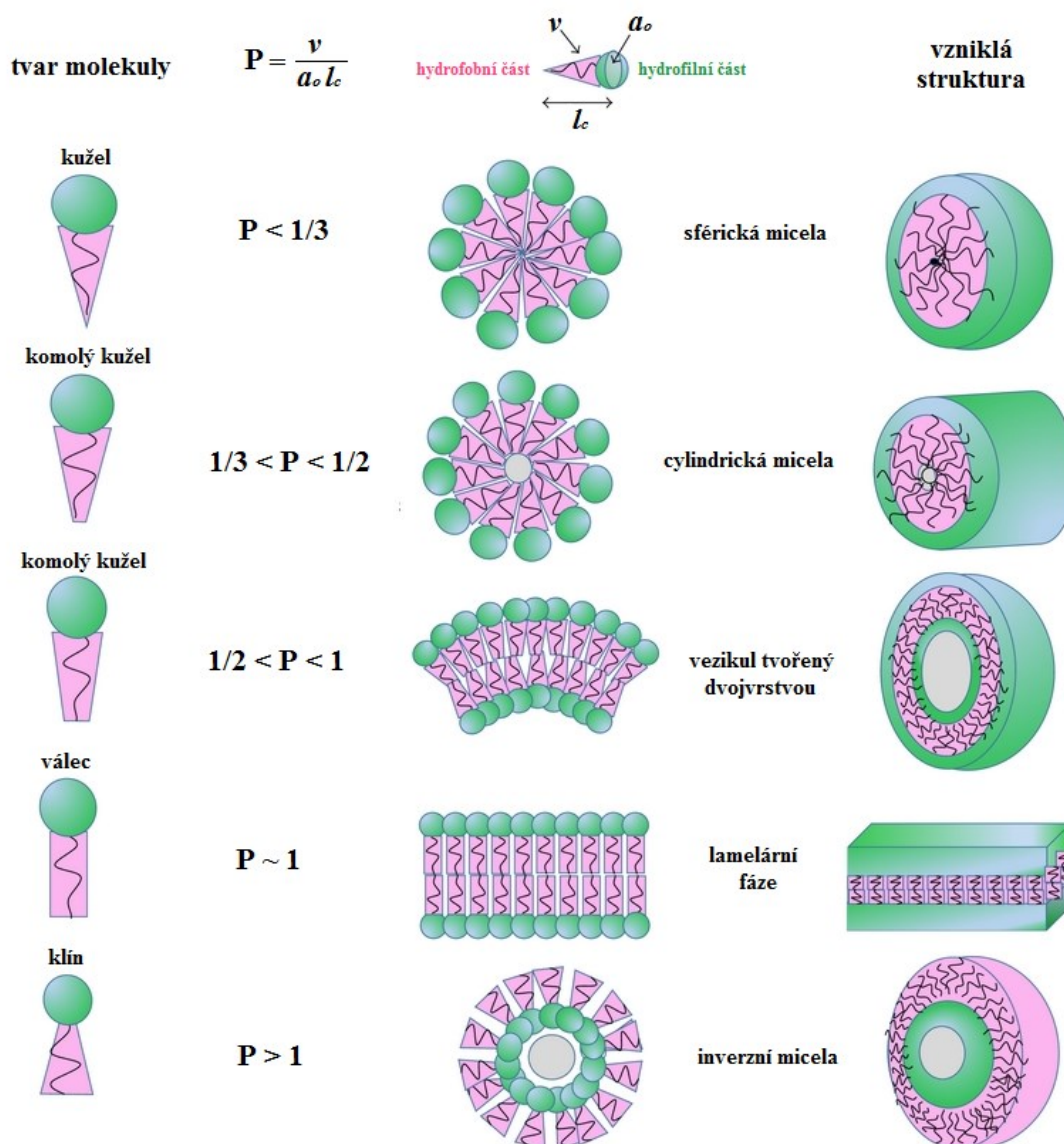
Lipidy používané pro přípravu liposomů se řadí mezi amfifilní látky, tj látky které jsou složeny z části hydrofobní a hydrofilní. To znamená, že látky amfifilního charakteru mají tendenci tvořit v polárním rozpouštědle samoskladné supramolekulární struktury (vesikly, micely) nebo amorfní precipitáty. Amfifily se ve vodném roztoku rozpouští jako monomery jen do určité koncentrace. Nad touto koncentrací spontánně agregují, aby minimalizovaly energeticky nevýhodné interakce hydrofobních částí molekuly s molekulami polárního rozpouštědla, např. vody. Tato agregace nebo samsopřádání je doprovázena zvyšováním entropie systému, díky uvolnění molekul vody z uspořádaných struktur solvatujících hydrofobní uhlovodíkové řetězce lipidů [12].

Aby lipidy dosáhly stavu s nejnižší energií a vyšší stabilitou, vytváří micely nebo lipidové dvojvrstvy. Tento děj je popsán kritickou micelární koncentrací (CMC). S vzrůstající koncentrací amfifilních látek, v oblasti CMC, dochází k agregaci těchto látek. Překročení CMC vede k tvorbě micel nebo lipidových dvojvrstev [13].

Pojem „*molecular packing parametr*“ nebo také tvarový faktor, založený na geometrické úvaze, je uplatňován k vysvětlení, nebo dokonce k predikci struktury molekulového samouspořádání u roztoku amfifilů. Tento geometrický parametr je spojen s vlastností molekuly lipidu podle následující rovnice (1):

$$P = \frac{V}{a \cdot l} \quad (1)$$

kde V je objem hydrofobní části (pokud má molekula 2 řetězce je V rovno $2v$ kde v je objem, který zaujímá jeden alkylový řetězec), a je plocha polární hlavy lipidu a l je maximální délka hydrofobního řetězce [14]. Vzorec může být aplikován nejen na čistý lipid, ale i na směs lipidů, kde je brán v úvahu i poměr lipidů ve směsi.



Obrázek 3: Tvar amfifilní molekuly a vznikající struktura dle hodnoty tvarového faktoru (*molecular packing parametr*) [15]

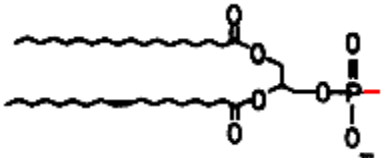
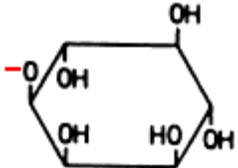
Pokud je P menší než $1/3$ odpovídá vzniklá struktura sférické micely, pokud je P větší než $1/3$ a zároveň menší než $1/2$ vzniká cylindrická micela, při hodnotě P mezi $1/2$ a 1 vzniká vezikul tvoření (fosfolipidovou) dvojvrstvou a při hodnotě P blíží se 1 vzniká lamelární fáze (struktura v liposomech), pokud je P větší než 1 vzniká inverzní micela, viz obrázek 3. Molekulární geometrie většiny lipidů může být aproximována na válec a dle „*molecular packing parametr*“ upřednostňují lipidy tvorbu planární dvojvrstvy. U vyšších koncentrací lipidů dochází k tvorbě lamelární fáze, kde se dvourozměrné planární lipidové vrstvy střídají s vrstvami vody (např. u multilamelárních liposomů) [12].

Složení liposomů

Liposomy, které jsou určeny jako nosiče pro diagnostické látky a teranostika, by měly být připraveny ze složek, které jsou bezpečné pro použití v humánní nebo veterinární medicíně.

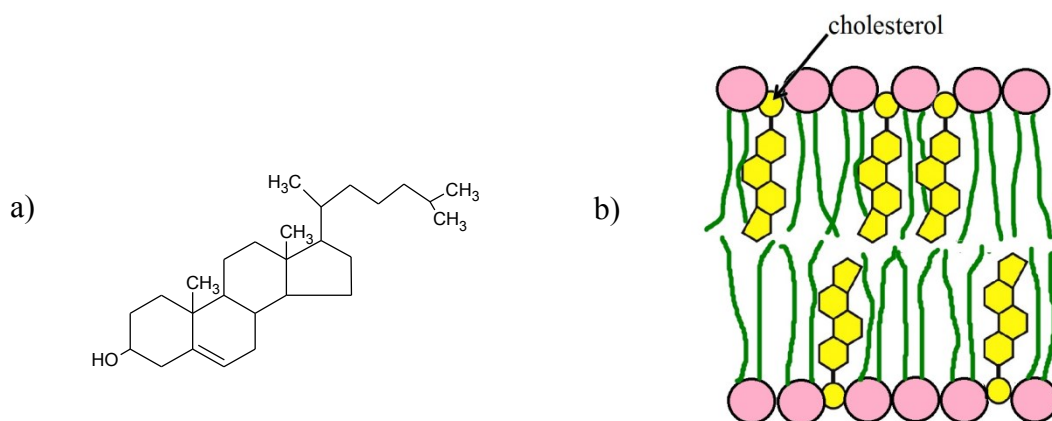
S fosfatidylcholinu a fosfatidylglyceroly, které jsou získané z přírodních zdrojů, semisynteticky nebo zcela synteticky spolu s cholesterolem a PEGylovanými fosfatidylethanolaminy se často setkáme v liposomech, které jsou navrženy jako nosiče léčiv pro parenterální podání nebo pro diagnostické účely při zobrazování *in vivo*. Běžně používané fosfolipidy a jejich struktura jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: některé přirozeně se vyskytující fosfolipidy [17]

Fosfatidylová skupina	Hlavní skupina	Obecný název Fosfatidyl-	Zkratka
	$-O-CH_2-CH_2-\overset{\text{Me}}{\underset{\text{Me}}{\text{N}}}-\overset{\text{Me}}{\text{Me}}^+$	-cholin	PC
	$-O-CH_2-CH_2-NH_3^+$	-ethanolamin	PE
	$-O-CH-\overset{NH_3^+}{\text{C}}-\overset{COO^-}{\text{C}}$	-serin	PS
	$-O-CH_2-\underset{OH}{\text{CH}}-\underset{OH}{\text{CH}_2}$	-glycerol	PG
	$-O-H$	1,2-diacylglycerol-3-fosforečná kyselina	PA
		-inositol	PI

Fosfatidylcholin (PC) se běžně používá jako neutrální lipid. Jako záporně nabitý lipid bývá často používán fosfatidylglycerol (PG). Někdy se záměrně vkládají do lipidové dvojvrstvy lipidy se speciální afinitou pro určité cílové buňky.

V případě, že je žádoucí snížit permeabilitu „kapalino-krytalického stavu“ dvojvrstvy, přidává se do struktury dvojvrstvy cholesterol [17]. Cholesterol je důležitou součástí buněčných membrán. Má strukturální a regulační funkci, pomáhá zachovávat správnou tekutost a tuhost dvojvrstvy. Hydroxylová skupina cholesterolu interaguje s polární částí membránových fosfolipidů. Sterolové jádro cholesterolu a uhlovodíkový řetězec jsou zanořeny spolu s nepolárními mastnými řetězci lipidů v membráně fosfolipidů [5], viz obrázek 4.

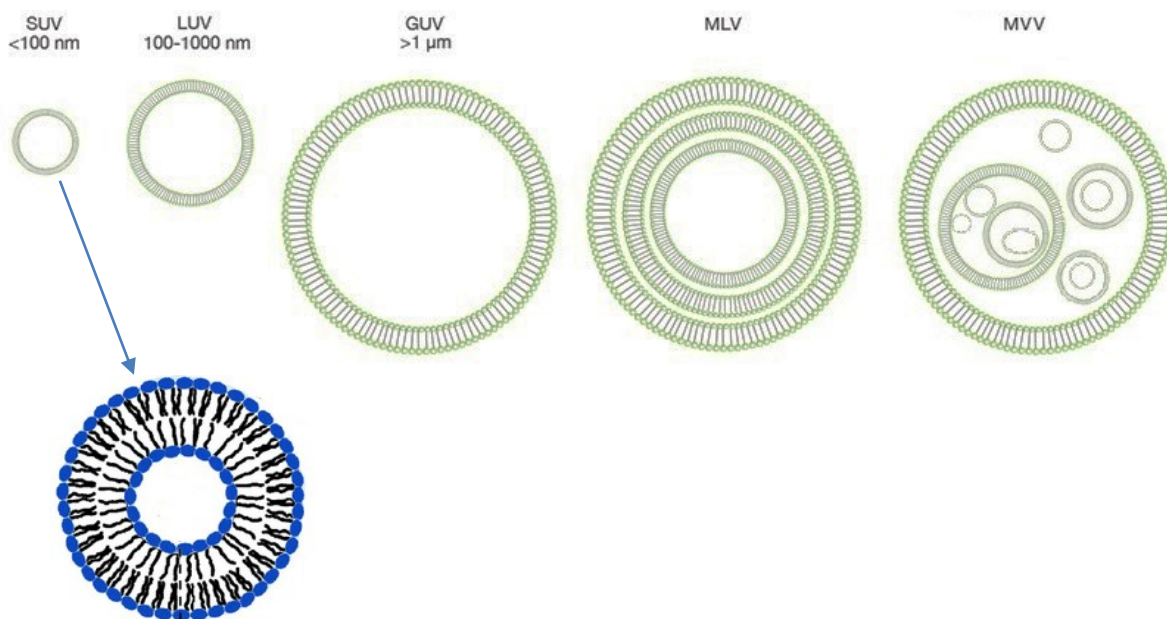


Obrázek 4: a) vzorec cholesterolu; b) molekuly cholesterolu zanořeny mezi fosfolipidy

2.1.2 Strukturální rozdělení liposomů

Liposomy můžeme na základě jejich morfologie rozdělit do několika kategorií. Liposomy s jednou lipidovou dvojvrstvou jsou nazývány unilamelární vezikuly. Ty se podle velikosti dále dělí na malé unilamelární vezikuly (small unilamellar vesicle – SUV) s typickou velikostí 20 až 100 nm, velké unilamelární vezikuly (large unilamellar vesicle – LUV) s velikostí 100 nm až 1 μ m, liposomy s velikostí větší než 1 μ m se nazývají obří unilamelární vezikuly (giant unilamellar vesicle – GUV). Tyto unilamelární liposomy obsahují pouze jednu lipidovou dvojvrstvu, která obklopuje vodné jádro. Tento typ liposomů je využíván například pro studium fázových separací v membráně pomocí fluorescenční mikroskopie.

Liposomy, které obsahují větší počet soustředných lipidových dvojvrstev oddělených vodnou fází, se nazývají multilamelární vezikuly (multilamellar vesicle – MLV). Multilamelární vezikuly představují heterogenní skupinu co do velikosti a morfologie [11]. Další skupinou jsou multivesikulární vesikuly (multivesicular vesicle – MVV), kde jsou lamely nesoustředně uspořádány, velikost takových to liposomů je obvykle větší než 1 μ m (obrázek 5).



Obrázek 5: Struktura různých tříd liposomů a detailní zobrazení SUV [18][19]

Šířka lipidní membrány není ve stejném měřítku pro jednotlivé zobrazené liposomy. Detailní zobrazení membrány SUV ukazuje asymetrické uspořádání molekul fosfolipidů ve vnější a vnitřní vrstvě. Minimální velikost SUV je určena právě maximálním možným zakřivením fosfolipidové dvojvrstvy

2.1.3 Rozdělení liposomů podle funkce

Jedinečná schopnost liposomálních systémů, které jsou schopny zachytit jak hydrofilní, tak lipofilní sloučeniny, umožňuje enkapsulaci široké škály látek s různým charakterem hydrofobicity. Látka, která je enkapsulována do liposomu může být chráněna například před předčasnou metabolickou inaktivací, enzymatickou degradací nebo před zředěním v krevním oběhu a rychlejším vyloučením ledvinami. Liposomy můžeme rozdělit podle funkce na několik typů: konvenční liposomy, stericky chráněné liposomy, cílené liposomy a tzv. teranostické liposomy [20].

Konvenční liposomy se dají zařadit do „první generace“ liposomů, byly vyvinuty pro nitrožilní podání léčiv na bázi nanočásticových nosičových systémů. Formulace obsahující konvenční liposomy snižují toxicitu sloučenin *in vivo*, a to prostřednictvím modifikace farmakokinetiky a biodistribuce, což zlepšuje dodání léčiva do postižené tkáně (oproti volnému léčivu) a eliminaci kumulace léčiva v ostatních tkáních, čímž se zvyšuje terapeutický index léčiva. Nicméně lékový nosič je náchylný k rychlému odstranění z krevního oběhu buňkami retikuloendotelového systému a tím se snižuje jeho terapeutická účinnost [21][22].

Terapeutický index (TI) je důležitým farmakologickým parametrem, který charakterizuje účinnost léčiva. Je to poměr dávky léčiva, která vyvolává toxické (TD_{50}) nebo smrtící účinky (LD_{50}) k dávce způsobující požadovaný léčebný účinek (ED_{50}) [23][24], viz rovnice (2)

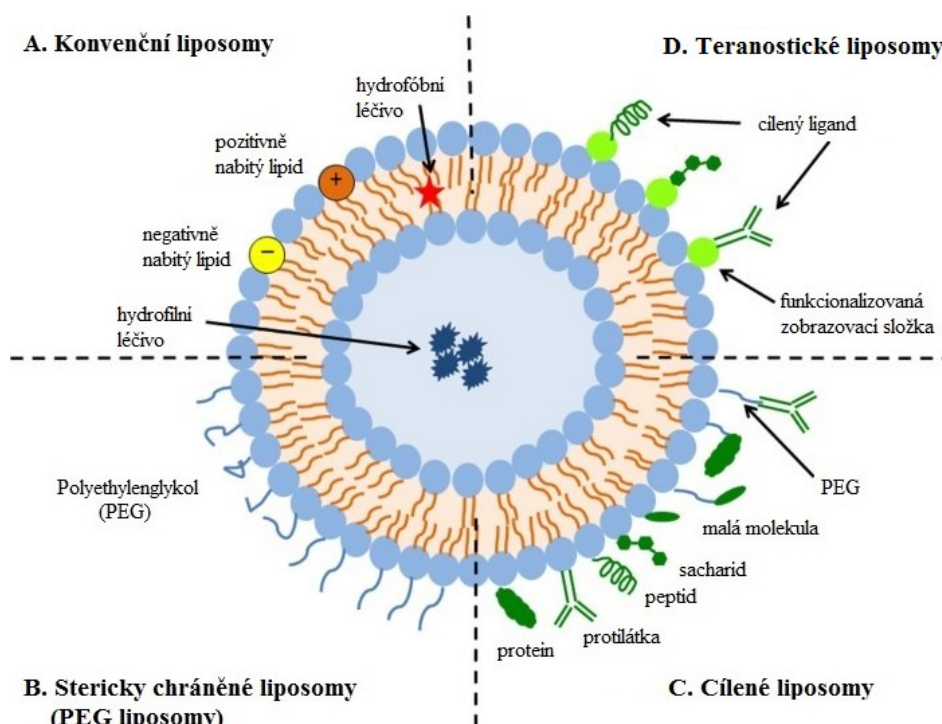
$$TI = \frac{TD_{50}}{ED_{50}} \text{ nebo } \frac{LD_{50}}{ED_{50}} \quad (2)$$

Čím vyšší je terapeutický index, tím větší, lepší je účinek léčiva a nižší vedlejší účinky [24].

Stericky chráněné liposomy představují druhou generaci lékových liposomálních nosičů s povrchovou modifikací pomocí hydrofilních polymerů (nejčastěji polyethylenglykol, PEG). Takto upravené liposomy jsou méně rozpoznávané imunitním systémem v podmínkách *in vivo* a díky tomu mohou dlouhodobě cirkulovat v krevním řečišti. Dochází i k lepší selektivní lokalizaci liposomů v nádorech nebo jiných patologických místech [21][22].

Modifikace povrchu navázáním specifických ligandů (např. specifické protilátky, ligandy receptorů) vede k vývoji *cílených liposomů*, které nabízí obrovský potenciál pro přesné doručení léčiva do cílových buněk, tkání nebo orgánů *in vivo*. Existuje mnoho typů ligandů (resp. signálních molekul) například: protilátky, peptidy, proteiny, sacharidy. Tyto ligandy jsou navázány biokonjugačními reakcemi na stericky chráněné liposomy, čímž lze získat cílené liposomy, které specificky reagují s odpovídajícím receptorem na cílové buňce. Připojením protilátky, zvláště monoklonální protilátky, získáme tzv. imunoliposomy, schopné vysoce selektivní interakce s membránovými strukturami buněk.

Teranostické liposomy kombinují léčebnou látku s vhodným kontrastním agens (zobrazovací komponenta). Jde o formu diagnostické terapie, která vizualizuje v reálném čase proces kumulace léčiva v cílové tkáni a zároveň také terapeutický účinek [20]. Pro názornost je zde uveden obrázek 6, zobrazující jednotlivé typy liposomů.



Obrázek 6: Schematické znázornění různých typů liposomálních systémů[20]

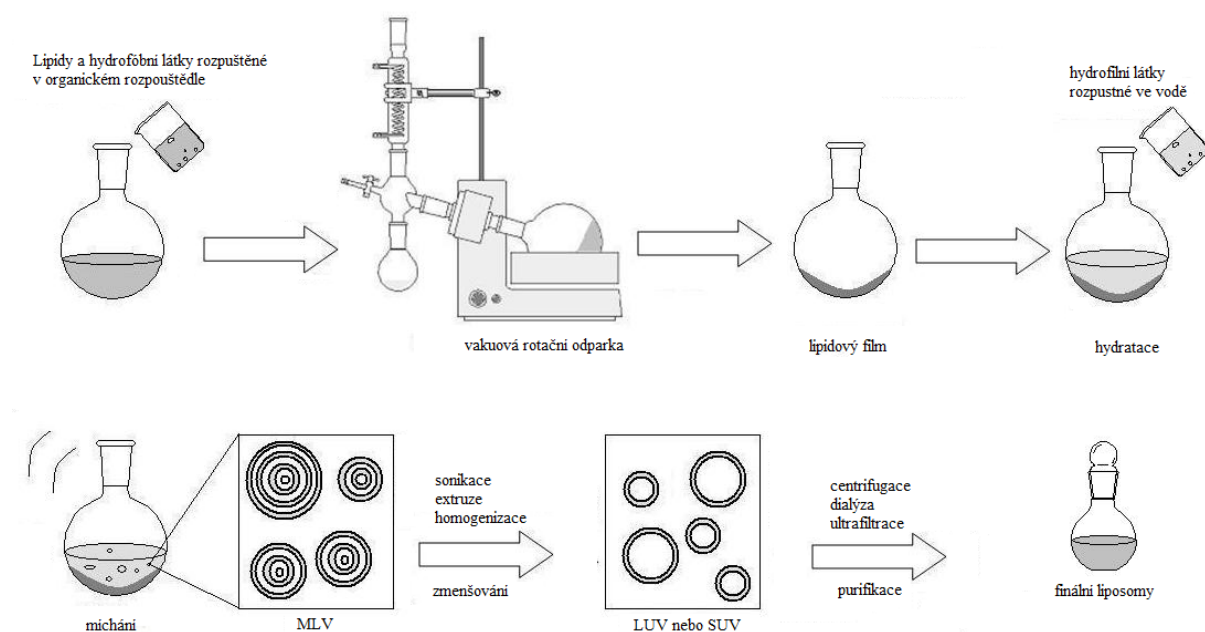
2.1.4 Rozdělení metod přípravy liposomů

Existuje mnoho metod pro přípravu liposomů. Podle způsobu přípravy liposomů se metody dají rozdělit do tří hlavních skupin[25]:

Mechanické disperzní metody

Do této skupiny patří asi nejstarší a nejpoužívanější metoda na přípravu liposomů

- Hydratace lipidního filmu (obrázek 7). Kde lipidy nebo směs lipidů musí být nejprve důkladně rozpuštěna v organickém rozpouštědle, aby se zajistila homogenita směsi lipidů. Jako rozpouštědlo se obvykle používá chloroform nebo směs chloroform-metanol. Jakmile jsou lipidy důkladně rozpuštěny, rozpouštědlo se odstraní, čímž se získá tenký lipidový film. U malých objemů (< 1 ml) je možné rozpouštědlo odstranit za použití suchého dusíku nebo argonu v digestoři. Pro větší objemy se organické rozpouštědlo odpařuje za pomoci vakuové rotační odparky. Po úplném odpaření rozpouštědla se do baňky přidá vodný roztok a dochází k hydrataci lipidního filmu. Teplota hydratačního roztoku by měla být nad T_c lipidu. Složení vodného hydratačního média se obecně volí podle následné aplikace liposomů. Obvyklá hydratační média jsou biokompatibilní pufrы nebo fyziologický roztok. Například pro aplikace *in vivo* se doporučuje fyziologická osmolalita (290 mOsm/kg). Hydrataci lipidního filmu získáme MLV. Směs liposomů lze dále upravit pomocí sekundárních procesních metod (např. sonifikací, extruzí, vysokotlakou homogenizací, mrazícím cyklem atd.) [26][27].



Obrázek 7: Hydratace lipidního filmu a následné sekundární procesní metody [28]

Dvoufázové disperzní metody

- Etherová injekce (odpaření rozpouštědla): roztok lipidů je rozpuštěn v diethyletheru nebo v ethero-methanolvé směsi a je postupně vstřikován do vodného roztoku, kde dochází k tvorbě liposomů a enkapsulaci látek při 55 až 65 °C. Zvýšení odpařování organického rozpouštědla lze také dosáhnout použitím sníženého tlaku. Hlavními

nevýhody této techniky je vysoká teplota a zisk heterogenní populace liposomů, jejichž velikost se pohybuje od 70 do 200 nm.

- Ethanolová injekce: roztok lipidů v ethanolu se rychle vstříkuje do velkého přebytku pufru. Jakmile ethanolový roztok přijde do kontaktu s vodnou fází, dochází k spontánní tvorbě MLV. Nevýhodou této metody je vznik heterogenní populace, liposomy jsou velmi zředěné a odstranění veškerého ethanolu je obtížné (obvykle je zařazen následný technologický krok lyofilizace).
- Reverzně-fázová evaporace: je založena na tvorbě inverzních micel. Tyto micely jsou formulovány při použití sonikace pufrové vodní fáze, která obsahuje ve vodě rozpustné molekuly, které mají být enkapsulovány do liposomů. Další složkou je organická fáze, ve které jsou rozpuštěny amfifilní molekuly. Pomalé odstraňování organického rozpouštědla vede k přeměně těchto převrácených micel do viskózního stavu a gelové fáze. V kritickém bodě tohoto procesu se gelová fáze začne hroutit a díky přebytku fosfolipidů v prostředí dochází k vytvoření kompletní dvojvrstvy kolem zbytkových micel, což vede k vytvoření liposomů. Touto metodou mohou vznikat liposomy z mnoha lipidových formulací a mají větší vnitřní vodný objem oproti liposomům, které vznikly mechanickými disperzními metodami. Výhodou metody je vysoká enkapsulační účinnost pro hydrofilní látky, nevýhodou je nemožnost převedení do průmyslového měřítka [1].

Detergentové dispersní metody

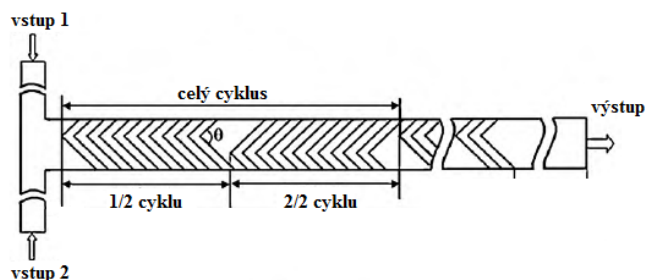
- Jsou založeny na tvorbě směsných micel, které vznikají při rozpouštění lipidů pomocí vodného roztoku detergentu. Pro vytvoření liposomů je třeba, aby došlo ke snížení koncentrace detergentu pod CMC. K tomu se využívá ředění, gelová permeační chromatografie (využívá se například Sephadex G-50), adsorpce na sorbenty nebo dialýza. U dialýzy je výhodou kromě zisku homogenní liposomové populace i reprodukovatelnost přípravy liposomů. Jde o velmi jemnou techniku, díky které si i citlivé proteiny (tj. proteiny, které při fyzikální a chemické úpravě ztrácí svou funkci) zachovávají svoji funkci a mohou být v případě membránově vázaných proteinů rekonstruovány do lipidové dvojvrstvy liposomů [29].

2.1.5 Příprava liposomů pomocí nanofluidizace

Nanofluidizace je poměrně nový způsob přípravy liposomů v laboratorním i průmyslovém měřítku. Tato technika je založena na řízeném směřování kapalin v nano/mikrokanálku. Výhody nanofluidizace oproti ostatním technikám spočívají v nižší spotřebě energie, v nižších výrobních nákladech i v časovém zkrácení výrobního procesu [30][31][32].

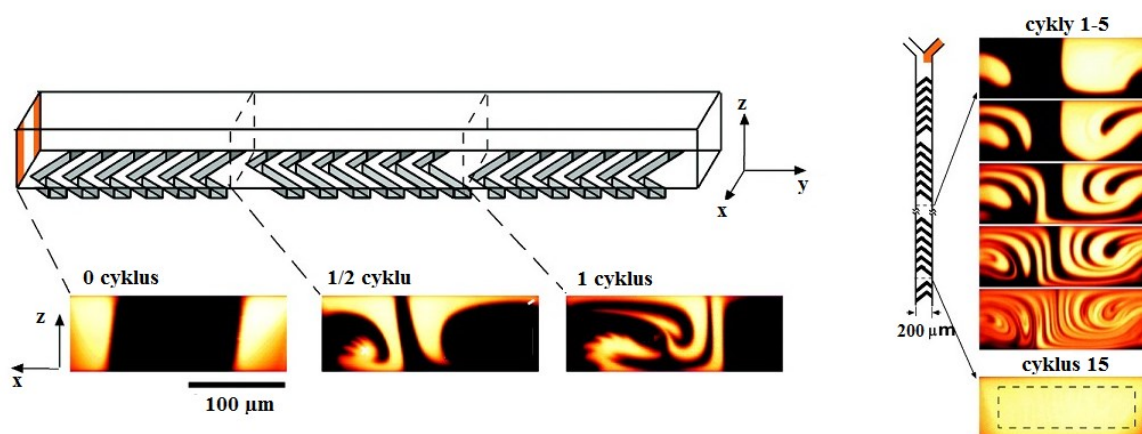
Pro optimalizaci míchání v nano i mikrofluidice se využívá pasivních mixérů (bez pohyblivých částí), které umožňují promíchávání reakčních složek. Mezi nejpoužívanější mixéry se řadí „*the staggered herringbone mixer*“ (SHM). SHM obsahuje speciálně umístěné šikmé drážky na dně nano/mikrokanálku [30][31].

Drážky v nano/mikrokanálku způsobují příčné proudění, což dává vzniku dvou proti sobě se otáčejících vírů podél délky tohoto kanálku. Vrcholky drážek jsou přibližně v 1/3 šířky kanálu. Kanál obsahuje střídající se poloviční cykly, které jsou k sobě vzájemně zrcadlově otočeny (viz obrázek 8), díky čemuž se vytváří kompletní míchací cyklus. Dochází při něm k přeorientování cirkulujícího toku a k výraznému zlepšení v promíchávání, jde o tzv. „*chaotic mixing*“ [33].



Obrázek 8: Schéma „Staggered herringbone“ mixeru [34]

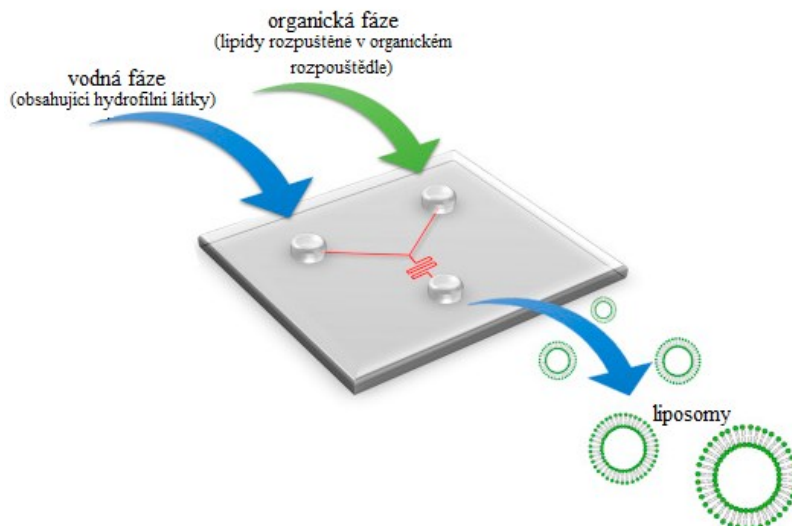
Pro názornější představu je zde uveden obrázek 9. Uvedená série snímků ukazuje průřezy ze směšovací kazety obsahující SHM. Do kanálku byla vpravena fluorescenční směs (1mM roztok fluoresceinem značených polymerů) a voda. Při průchodu kapalin kanálkem byly pořízeny snímky znázorňující distribuci a míšení jednotlivých složek v různých cyklech kanálku. Z obrázku lze vidět, že se zvyšujícím počtem cyklů dochází k dokonalejšímu promíchání jednotlivých složek [35][86].



Obrázek 9: Promíchávání složek v mikrokanálku s SHM [35]

NanoAssemblr™ Benchtop

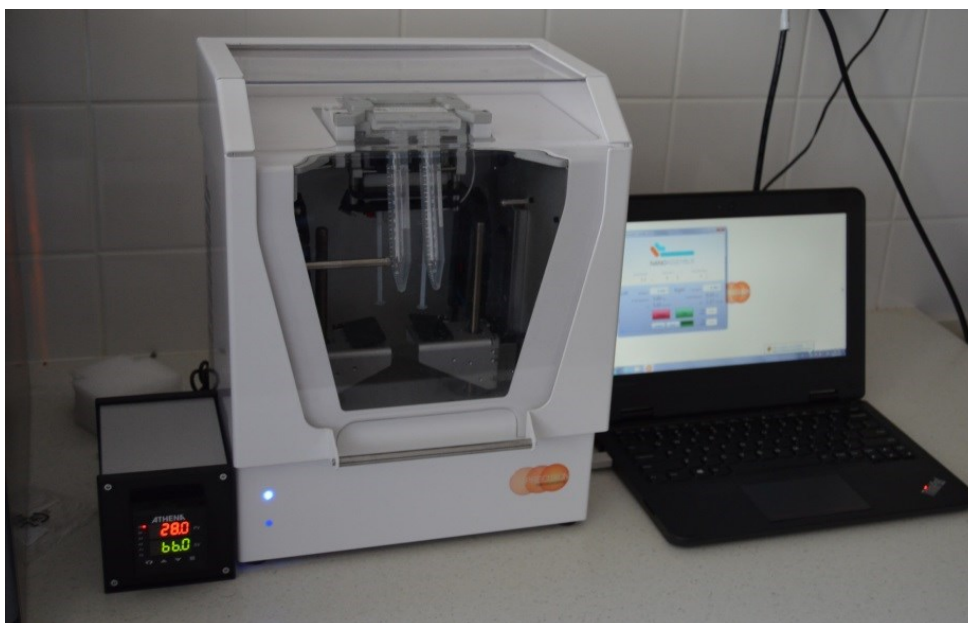
Systém nanofluidního mísení na bázi SHM se využívá i u přístroje NanoAssemblr™ Benchtop (obrázek 11), jedná se o laboratorní zařízení, které je navrženo tak, aby velmi rychle vyrábělo homogenní a reprodukovatelné nanočástice definovaným nanofluidním mísením. Tvorba nanočástic (např. liposomů) probíhá v tzv. směšovací kazetě, která je opatřena mikrokanálkem typu SHM. Kazeta má dva vstupy a jeden výstup. Do prvního vstupu je dávkován lipid rozpuštěný v organickém rozpouštědle mísitelném s vodou (např. ethanol) a do druhého vstupu je dávkován vodný roztok. Tyto složky se poté mísí a reagují spolu v mikrokanálku (obrázek 10) [36].



Obrázek 10: Směšovací kazeta pro Nanoassemblr[37]

Díky rychlému promíchávání vodné a organické fáze vzrůstá polarita rozpouštědla. Čímž dochází k samouspořádání hydrofobních komponentů do různých struktur v závislosti na směsi lipidů [38]. Zvyšování polarity a následné vytvoření liposomů lze ovlivňovat změnou rychlosti průtoku nebo poměrem vodné a organické fáze [36].

Rychlost průtoku lze nastavit v rozmezí 2 až 12 ml/min, lze nastavit i teplotu pro mísení pomocí termobloku v rozsahu od 20 do 70 °C. Pomocí přístroje NanoAssemblr lze připravit nanočástice většinou od 20 nm do 120 nm. Výhodou je, že příprava nanočástic je rychlá (v rozmezí minut) [39].



Obrázek 11: NanoAssemblr™ Benchtop (firma: Precision NanoSystems; Laboratoř NanoPharm, VÚVeL, Brno)

NanoAssemblr využívá samouspořádání nanočástic, liposomů. Kdy jsme v jednom kroku schopni vyrobit nanočástice o volitelné velikosti, s nízkou polydisperzitou. Navíc kvůli dobré automatizaci přístroj umožňuje vysokou reprodukovatelnost šarží [39].

2.1.6 Sekundární procesy úpravy liposomů

Extruze liposomů patří mezi nejvíce používanou sekundární metodu úpravy liposomů. Při extruzi dochází pod tlakem k protlačování liposomů přes polykarbonátové filtry. Extruzí se získá homogenní populace liposomů, jejichž velikost ovlivníme volbou filtru s definovanou velikostí pórů [40]. Se vzrůstajícím průměrem pórů ve filtru klesá homogenita liposomů [41]. Správně provedená extruze liposomů by měla probíhat při vyšší teplotě, než je charakteristická teplota fázového přechodu lipidů (T_c). Opakováním extruze lze získat liposomy s užší distribucí velikosti částic (PdI pod 0,1) [26][41].

Extruzi lze provádět například pomocí ručního extrudéru (obrázek 12). Ten se skládá ze dvou skleněných injekčních stříkaček a těla extrudéru, který je vyroben z nerezové oceli nebo slitin titanu. Vlastní komůrka pro polykarbonátové filtry je z inertního teflonu. Injekční stříkačky se spojí s kovovým tělem extrudéru. Tlakem na píst prochází vzorek membránou tam a zpět, mezi dvěma injekčními stříkačkami. Extrudér může být ponořen a temperován ve vodě, pokud je potřeba dosáhnout vyšší T_c [42][43].



Obrázek 12: Ruční extrudér (Laboratoř NanoPharm, VÚVeL, Brno)

Další z variant je extruze za využití stlačeného plynu, nejčastěji dusíku. Například extrudér od firmy Lipex Biomembranes Inc. (Vancouver, Kanada) viz obrázek 13. Kde lze dobře temperovat extruzní celu i vzorek a k dispozici je široká škála rozsahu tlaku [44].



Obrázek 13: Extrudér Lipex 10 (Laboratoř NanoPharm, VÚVeL, Brno)

Velmi využívanou sekundární metodou na úpravu liposomů je i proces zmrazování a rozmrazování. Tato metoda je výhodná pro zvýšení objemu vodné fáze v MLV, zvyšuje se tak enkapsulační účinnost. Při tomto procesu dochází k rozrušování fosfolipidových dvojvrstev liposomů, pravděpodobně v důsledku ledových krystalků, vznikajících v průběhu procesu tuhnutí, a nasátí vodné fáze do vezikulu [45][46]. Enkapsulační účinnost se pohybuje mezi 20 a 60 % v závislosti na koncentraci lipidů a iontové síle vodné fáze.

Mezi sekundární procesní metody také patří sonifikace. Je to jedna z nejvíce používaných metod pro přípravu SUV. Pro MLV se používá sonifikace ve vodní lázni nebo sonifikace pod inertní atmosférou (dusík, argon). Velkou nevýhodou je nízká enkapsulační účinnost, možná degradace fosfolipidů oxidací nebo kontaminace kovem z kovové sondy a také přítomnost frakce MLV ve výsledných SUV [1][25].

2.1.7 Stabilizace a lyofilizace liposomů

Stejně jako u všech produktů i u liposomů je žádoucí určitá trvanlivost produktu, a to delší než jeden rok. Stabilita liposomů je důležitá hlavně při vývoji liposomů pro farmaceutické aplikace. Zvýšit stabilitu liposomů je možné pomocí vhodně zvoleného lipidového složení a koncentrace, nebo také pomocí přísady látek, které zlepšují skladovatelnost liposomů.

Například jak již bylo zmíněno využití cholesterolu nebo jeho derivátů, které snižují permeabilitu membrány a brání úniku enkapsulované látky z liposomů při skladování ve vodné suspenzi.

Významnými degradačními procesy lipidů jsou hydrolýza a oxidace. Obecně lze říci, že nenasycené lipidy podléhají oxidaci a proto se využívají antioxidanty nebo chelatační činidla různých kovů, uchovávání liposomů pod inertní atmosférou. Hydrolýzu lze potlačit adjustací pH do neutrálních hodnot. Lyofilizace (vakuové sušení) představuje nejefektivnější metodu pro stabilizaci liposomálních preparátů [47][48].

Proces lyofilizace probíhá v několika krocích:

Mrazení, tato fáze probíhá za atmosférického tlaku, mrazí se většinou na teploty -15 až -50 °C, kdy se analyt zmrazí pod eutektický bod (eutektická teplota, je nejnižší teplota, kdy se v soustavě ještě vyskytuje kapalná fáze). Rychlost mrazení ovlivňuje velikost vzniklých krystalů, například u pomalého chlazení vniká větší množství velkých krystalů. U biologických materiálů se upřednostňuje rychlé chlazení. Zde se vytváří malé krystalky a nehrozí tak poškození materiálu.

Následným krokem je proces sublimace ledu, kdy dochází ke snižování tlaku nad zmraženým roztokem. Hodnota vakua se většinou pohybuje okolo několika desítek až jednotek pascalů (tlak je pod hodnotou trojného bodu).

Vzniklé páry jsou rychle odváděny, aby nedocházelo k snížení vakua. Sublimační proces odstraní okolo 95 % vody.

V třetí fázi lyofilizace se odstraňuje zbytková vlhkost. Tlak je stále nízký, avšak teplota se postupně zvyšuje nad 0 °C, dochází k tzv. vakuovému sušení. Na konci této fáze obsahuje materiál pouze několik málo procent vlhkosti, často i méně než 1 %.

Poslední fází je vyrovnání tlaku, to se provádí vháněním suchého filtrovaného vzduchu nebo inertního plynu (většinou dusík nebo argon) [49].

Pokud jsou liposomy lyofilizovány, může u nich dojít k úniku enkapsulovaného materiálu v průběhu procesu rehydratace v důsledku změny struktury lipidní dvojvrstvy (přechod ze struktury uspořádaného gelu sol na kapalný krystal). Proto se k nim přidává adekvátní množství kryoprotektiv na bázi disacharidů, jako je např. trehalóza. Ta je ideálním kryoprotektivem, které brání tvorbě ledových krystalů poškozujících liposomální membrány. Zároveň uchovává lipidní membrány tvořené nenasycenými fosfolipidy ve struktuře kapalných krystalů, což zabrání permeabilizaci membrán při rehydrataci [6].

2.2 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Magnetická rezonance (MR) patří mezi moderní zobrazovací metody. Její velkou výhodou je výrazný tkáňový kontrast – schopnost odlišení jednotlivých tkání i tkání s podobnou strukturou. Tohoto se využívá při odlišení normální tkáně od tkáně patologické. V tomto ohledu má MR výsadní postavení mezi všemi zobrazovacími metodami.

Využití MR je velmi široké, od klasického zobrazení centrální nervové soustavy po zobrazení cév (MR angiografie), kloubů, orgánů hrudníku (srdce) a břicha či další speciální techniky jako například funkční MR mozku. Doba MR vyšetření je různá, podle vyšetřované oblasti, většinou kolem 30–60 minut [50].

NMR je fyzikálně-chemická analytická metoda. Její název lze rozložit na:

<i>nukleární</i> -	protože metoda využívá vlastností jader
<i>magnetická</i> -	magnetické momenty jader zaujímají v homogenním magnetickém poli $2I + 1$ orientací lišících se energií, vektor magnetického momentu jádra vykonává kolem vektoru magnetického pole precesní pohyb
<i>rezonance</i> -	jádra na nižší energetické hladině jsou schopna absorbovat energii a přecházet do excitovaného stavu [51].

Absorpce radiofrekvenčního záření u NMR je podmíněna přítomností silného magnetického pole, které je homogenní.

Magnetické vlastnosti jader, můžeme dle spinového kvantového čísla rozdělit na:

$I = 0$... protonové i neutronové číslo je sudé, nemají magnetický moment, neposkytují NMR signál ($^{12}_6\text{C}$, $^{16}_8\text{O}$)

$I > 0$... jádra s lichým počet protonů, neutronů nebo obojího, mají magnetický moment, jsou aktivní v NMR experimentu.

$I = \frac{1}{2}$... NMR aktivní, mají dipolární magnetický moment (jsou výhodné, mají jednoduchá spektra s velkou výpovědní hodnotou) (^1_1H , $^{13}_6\text{C}$, $^{15}_7\text{N}$)

$I \geq 1$... jádra s kvadrupólovým magnetickým momentem, NMR aktivní, komplikované NMR měření ($^{16}_3\text{Li}$, $^{14}_7\text{N}$) [51].

Všechna jádra, která mají nenulový magnetický moment, zaujmou po umístění do homogenního magnetického pole určitý konečný počet orientací, konkrétně $(2I+1)$, ke směru vloženého magnetického pole. Jednotlivé orientace se energeticky liší a je možné dodáním vhodného energetického kvanta vynutit změnu orientace jaderného magnetického momentu a způsobit tak přechod z nižší energetické hladiny na vyšší [52].

Jádra mnoha atomů s jaderným spinem (spin – forma úhlového momentu) se tedy chovají jako magnetické dipóly a mohou se vyskytovat buď v excitovaném stavu (kdy jsou orientovány proti vnějšímu magnetickému poli) nebo v základním stavu (zde jsou orientovány souhlasně s vnějším magnetickým polem). Přechod mezi těmito stavy je doprovázen absorpcí nebo emisí energie v radiofrekvenčním pásmu. Frekvence energie emitované excitovanými jádry je přímo úměrná intenzitě vnějšího magnetického pole. Vztah mezi rezonanční frekvencí a vnějším magnetickým polem je závislý na typu rezonujícího jádra, tím je možné v NMR detekovat různá atomová jádra.

Rezonanční frekvence je modulována stínícími efekty elektronů, které obíhají kolem jádra (elektron nese záporný náboj a protože se pohybuje, vytváří kolem sebe lokální magnetické pole, které ovlivňuje vnější (vložené) magnetické pole). Tyto nepatrné rozdíly rezonanční frekvence protonů v různých strukturních skupinách se využívají pro NMR [53].

Samotný NMR experiment lze shrnout tak, že po vložení do silného magnetického pole, dojde k rozštěpení původně jednotné energetické hladiny jader na $2I+1$ hladin (Zeemanův jev); u nejčastěji sledovaných prvků se spinovým kvantovým číslem $I = \frac{1}{2}$ jde o štěpení na dvě hladiny. Dochází k uspořádání magnetických momentů jader ve směru souhlasném (nižší energetická hladina, populace α) nebo proti směru magnetického pole (vyšší energetická hladina, populace β), přičemž velmi nepatrně převažuje populace α . Magnetický moment jader vykonává tzv. precesní pohyb, jehož frekvence (tzv. Larmorova frekvence) závisí na typu atomového jádra (vyjádřeném gyromagnetickým poměrem – charakteristika jádra) a na intenzitě efektivního magnetického pole. Současně odpovídá frekvenci (energii) fotonu schopného excitovat jádro (tj. převést jej z populace α do populace β) [51].

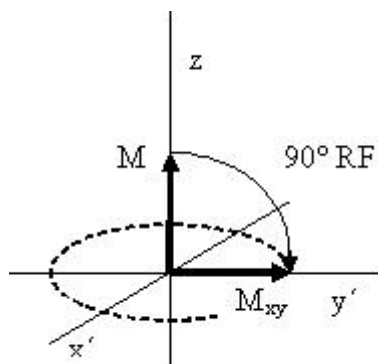
Frekvenci lze vyjádřit vztahem, viz rovnice (3):

$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \cdot \gamma \cdot B_0 \cdot (1 - \sigma) = \frac{1}{2\pi} \cdot \gamma \cdot B_{\text{eff}} \quad (3)$$

kde: f je frekvence, γ je gyromagnetický poměr, B_0 je magnetická indukce vloženého magnetického pole, σ je stínící konstanta a B_{eff} je intenzita efektivního magnetického pole působícího na konkrétní jádro.

S časem se mění směr magnetického momentu, každého precesujícího protonu. Tyto protony se pohybují v různých fázích, tím dochází k vzájemnému vyrušení jejich vlivu na celkový vektor matrice tkáně v ose x a y [53].

Důležité je chování vektoru výsledné makroskopické magnetizace M (tj. součet magnetických momentů všech jader, jehož velikost je přímo úměrná rozdílu četností populací α a β). K tomu, abychom změřili – “zviditelnili“ vektor makroskopické magnetizace, snažíme se ho vychýlit ze směru osy z do roviny xy . K překlopení dochází působením radiofrekvenčního pulsu, tj. dodáním energie, která převede část jader z populace α do β . Pohyb vektoru M se pak jeví jako sklápění do roviny xy , kdy úhel sklopení závisí na integrálu dodané energie, tzn. na intenzitě radiofrekvenčního impulsu a na délce jeho trvání [51].



Obrázek 14: Působení radiofrekvenčního pulsu[53]

Po dodání energie radiofrekvenčním impulsem, se vektor M sklopí v ideálním případě o 90° (dojde k vyrovnání četností populací α a β) a rotuje v rovině xy s Larmorovou frekvencí. Po ukončení impulsu dochází k deexcitaci – ustavuje se původní četnost populací α a β a vektor makroskopické magnetizace se navrácí zpátky do původního stavu, tj. do souhlasné orientace s osou z . Když do roviny xy umístíme přijímací cívku, bude se v ní indukovat napětí. Signál, který takto získáme, se označuje FID (free induction decay), závislost intenzity signálu (napětí) na čase. Tuto závislost poté přetransformujeme Fourierovou transformací (matematická metoda, která změní funkci z časové domény do domény frekvenční) [51].

Proces návratu systému z vybuzeného stavu do stavu původního, se nazývá relaxace, jádro se zbavuje energie, kterou absorbovalo bez jejího vyzáření. Časová konstanta, která určuje jak rychle v dané látce (tkáni) tento proces probíhá, se označuje T_1 . Jde o spin-mřížkovou (podélnou) relaxaci - T_1 .

Přerušením elektromagnetického impulsu se přeruší i synchronizační efekt, protony nemusí nadále vykonávat svůj precesní pohyb s naprosto stejnou (Larmorovou) frekvencí. Díky malým nehomogenitám v magnetickém poli MR magnetu a vlivem slabých magnetických polí, které vznikají v okolní tkáni, se jednotlivé protony začnou od této frekvence odchylovat. Tedy protony se nepohybují synchronně a má to za následek ztrátu magnetizace. Rychlost

tohoto děje popisuje příčný (spin-spinový) relaxační čas T_2 , jehož velikost závisí (stejně jak u času T_1) na chemické struktuře zkoumané látky.

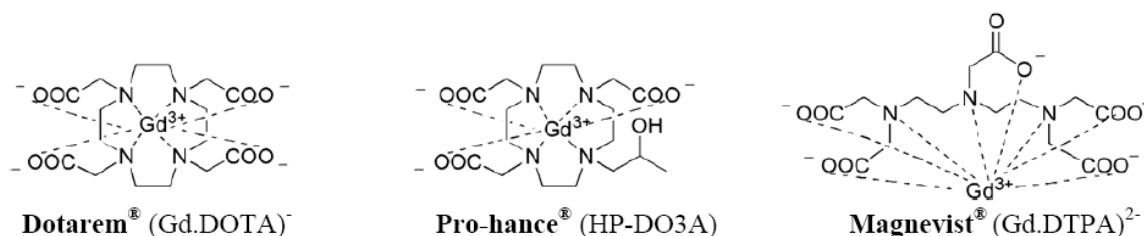
V praxi je však těžké určit okamžik, kdy je podélná nebo příčná relaxace úplně ukončena, proto si zde pomáháme “poločasem rozpadu“ a T_1 definujeme jako dobu potřebnou k tomu, aby vektor podélné magnetizace získal zpět 63 % svojí původní velikosti. A T_2 jako čas, za který velikost příčné magnetizace klesne na 37 % původní hodnoty.

Obecně platí, že tkáň s vysokým obsahem tekutin (vody) mívají dlouhé časy T_1 , T_2 a tkáň s obsahem tuku mají ve srovnání s tekutinou oba časy relativně krátké. Molekuly tuků jsou totiž o dost větší než molekuly vody a proto se ve svém prostředí pohybují pomaleji. Protony díky tomu snadněji předávají svou přebytečnou energii molekulám tuku. Protony tedy relaxují zpět do svého paralelního uspořádání v tukovém prostředí rychleji, T_1 je kratší. Relaxační čas T_2 je v tukové tkáni také kratší. Tím, že se molekuly tuku pohybují pomaleji, vytváří tak delší dobu větší nehomogenity v magnetickém poli tkáň, a tak narušují původně synchronní precesi všech protonů [4]. Pro lékařské zobrazování je nejvýznamnější vodík ^1H , který tvoří skoro 2/3 všech atomů lidského těla. Proto se využívají především vodíková NMR spektra [53].

2.2.1 Kontrastní látky pro MRI

Při vyšetření MR může být aplikovaná kontrastní látka (většinou intravenózně). Samotné kontrastní látky usnadňují relaxaci protonů a tím zkracují relaxační čas T_1 a T_2 . Jedná se o paramagnetické substance (nejběžnější z užívaných látek je gadolinium ve formě Gd^{3+}), které tím, že zkracují čas T_1 , dávají v T_1 vážených obrazech silnějších signál z těch tkání, do kterých tato látka proniká. Tyto kontrast zvyšující substance v některých případech umožňují zviditelnit i struktury, které by nebylo možné od sebe odlišit na nativním MR obrazu. Kontrastní látky používané pro MR obsahují nejčastěji sloučeniny gadolinia, vzácně manganu nebo železa vázané ve stabilních sloučeninách, tzv. chelátech [54][4].

V současné době nejvíce využívané kontrastní látky jsou termodynamicky i kineticky stabilní. Gd-DTPA byla první ve vodě rozpustná, ledvinami vylučovatelná kontrastní látka, která byla schválena i pro klinické použití. V dnešní době je používána pod komerčním jménem Active Ingredient[®]. Běžně se dnes používají v klinické praxi i jiné kontrastní látky obsahující Gd^{3+} , např.: Gd-DOTA nebo HP-DO3A (obrázek 15).



Obrázek 15: Kontrastní látky používané v klinické praxi obsahující gadolinium [4]

Nevýhodou nízkomolekulárních chelátů gadolinia, které se využívají v MRI, je fakt že rychle difundují do tkáně a do intersticiálního prostoru, což vede ke snížení intenzity signálu v poškozené oblasti nebo v oblasti, kterou chceme zobrazit, a současně se zvyšuje signál okolních tkání. Mezi další nevýhodu těchto látek lze zařadit i to, že jsou rychle vylučovány z krevního oběhu. Kvůli těmto nevýhodám je třeba přesného injekčního dávkování a optimální načasování pro získání diagnosticky významných obrazů z MR. Uvedené rychlé snižování koncentrace v krvi těchto látek limituje množství zobrazovacího času, který máme k dispozici pro post-injekční zobrazování, a činí tak tyto kontrastní látky nevhodné například pro kvantitativní perfúzní zobrazování [4].

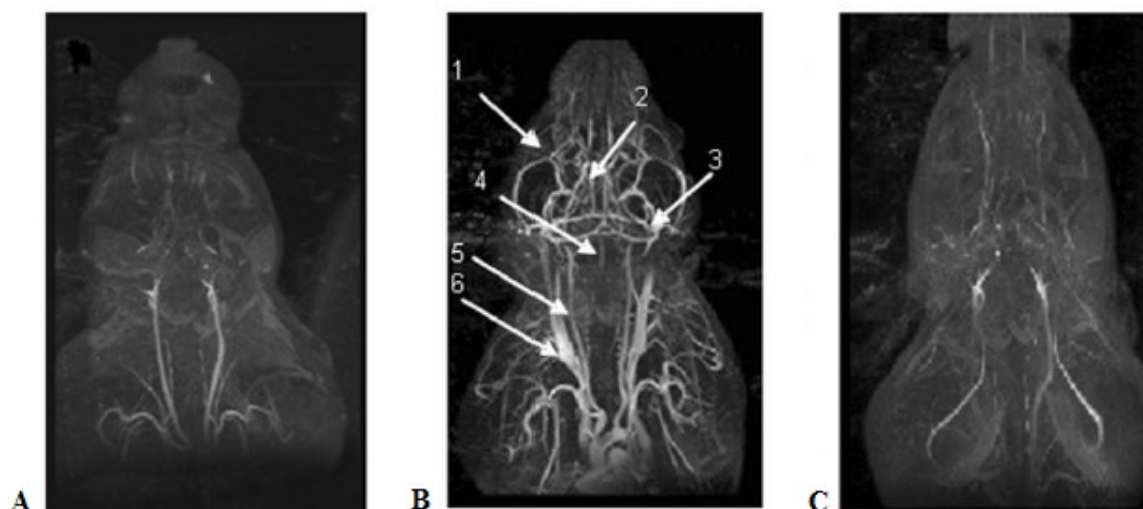
Perfúzní zobrazování je způsob zobrazení tkání, které jsou pro klasickou MR příliš nevýrazné nebo malé. Typickým příkladem jsou cévy, kapiláry a nekrotické tkáně. Objekty se na MR snímcích jednoduše zvýrazní pomocí kontrastní látky. Při vyhodnocování se poté analyzuje série snímků v různých částech těla a v různých časových intervalech. Na základě získaných informací se sestaví model průtoku kontrastní látky tkáněmi [55].

2.2.2 Liposomy značené gadoliniem

Jeden ze způsobů jak zvýšit účinnost zobrazování s kontrastními látkami je zajištění vysoké koncentrace gadoliniových skupin v požadované oblasti. Tento přístup vedl k navržení a syntetizování makromolekulárního Gd^{3+} , např. ve formě liposomů, které tedy obsahují kontrastní činidla, jako jsou Gd-DOTA nebo Gd-DTPA. Navíc tyto makromolekulární systémy mohou být i bi-funkční, to znamená, že mohou působit současně jako zobrazovací kontrastní činidla a zároveň jako nosiče léčiv (teranostika). Nejběžněji se do liposomů zabudovávají kontrastní látky, které jsou schválené FDA.

Kabalka a kol. před více než 20 lety jako první demonstrovali, jak začlenit Gd-lipid do liposomů. Také dokázali, že liposomy obsahující Gd-lipidy skutečně zvyšují intenzitu signálu MR a vyzorovali, že jejich paramagnetické liposomy byly vhodné na zobrazení jater, sleziny, kostní dřeně a dalších orgánů. Oliver a kol. v roce 2006 a Kamaly a kol. v roce 2008 popsali bi-funkční paramagnetické liposomy. Takovéto systémy představují začátek nového a většího posunu směrem k vytvoření multi-funkčního zobrazování paramagnetickými liposomálními systémy. Pro úspěšné aplikace *in vivo* bylo zapotřebí zvýšit poločas cirkulace liposomů v krvi. Toho bylo dosaženo modifikací liposomálního povrchu polyethylenglykolem (PEG) [4].

Například Ayyagari a kol. připravovali PEGylované liposomy (samotné liposomy byly složeny z DPPC, cholesterol, mPEG₂₀₀₀-DSPE v poměru 55:40:5) s enkapsulovaným gadoliníem (hydratace 0,5M gadodiamidem což je účinná látka, která je v přípravku Active Ingredient[®]) s velikostí okolo 100 nm. Tyto liposomy v krysím modelu vykazovaly významné zvýšení kontrastního zobrazení cév (které vydrželo více jak 4 hodiny) po aplikaci takto značených liposomů docházelo i ke zlepšení prostorových detailů [56].



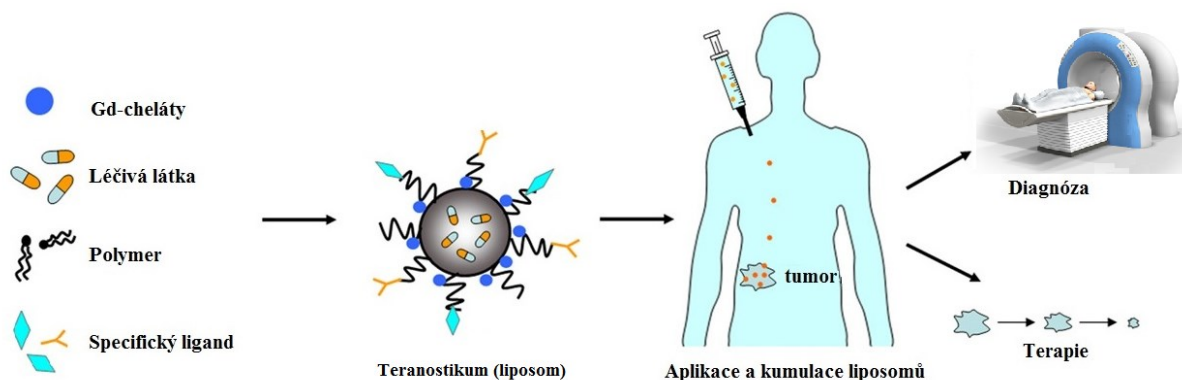
Obrázek 16: Potkaní MR-angiogramy, oblasti krku a hlavy [56]

Na obrázku 16 jde vidět získané potkaní MR-angiogramy oblasti krku a hlavy, kde jsou zobrazeny snímky:

- A. Pre-kontrastní snímek mozku a hrudníku.
- B. Post-kontrastní obraz mozku a hrudníku, po 4 hodinách od aplikace 0,2 mmol Gd/kg, kdy byly použity Gd-liposomy s PEG. Na snímku lze jasně vidět bazilární tepny (které jsou označeny čísly 1-4), krkavici (5) a krční žíly (6).
- C. Post-kontrastní obraz mozku a hrudníku, 1 hodinu po injekci 0,2 mmol Gd/kg klinicky užívaného gadodiamidu (Active Ingredient[®]).

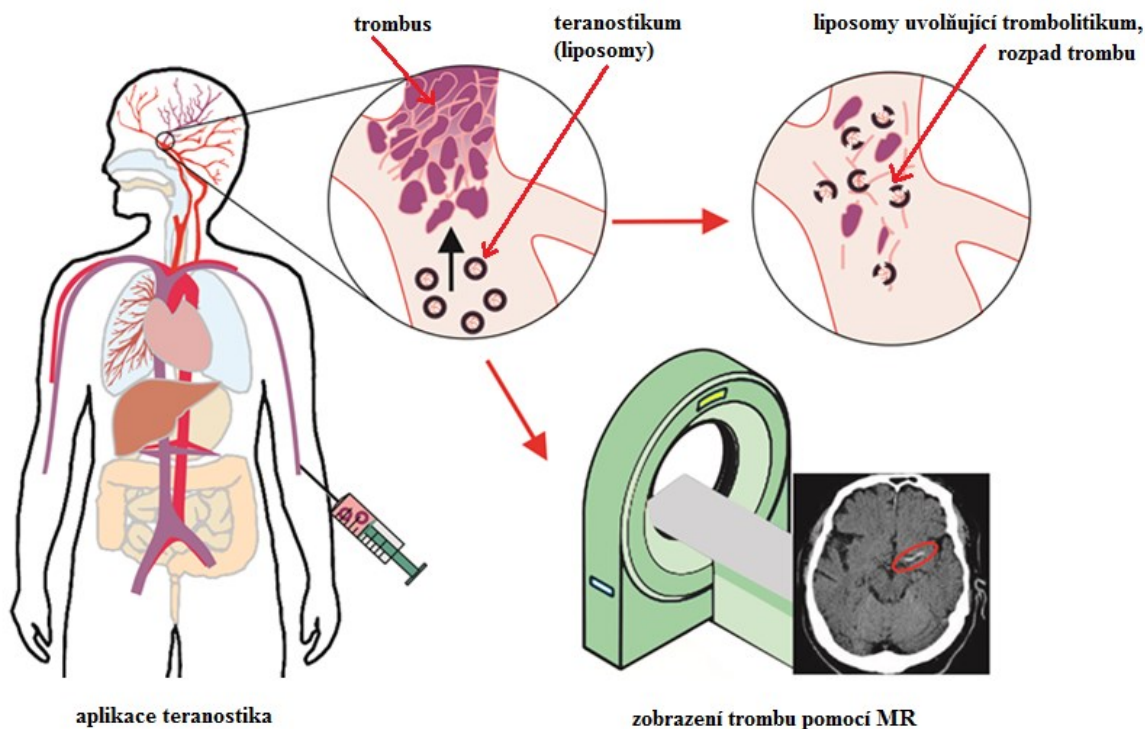
Ze studie vyplývá, že použití Gd-liposomů s PEG poskytuje vynikající vizualizaci cév. A je lepší alternativou než nízkomolekulární Gd-cheláty. Navíc i několik hodin po aplikaci zde je možnost opakovat snímky, pokud by byl výsledek po prvním zobrazení nejednoznačný [56].

Do budoucna by multi-funkční Gd-liposomy mohly být vpravovány intravenózně do krevního řečiště pacienta, následně by docházelo k jejich akumulaci v cílovém, postiženém, místě. Pacient by podstoupil MR, kde by liposomy sloužily jako kontrastní látka a zároveň by docházelo k uvolňování enkapsulovaných léčebných látek přímo v postiženém místě, viz obrázek 17. Jedním z možných využití je léčba tumoru, kde by aplikace těchto nanočástic mohla vést k diagnosticky i terapeuticky účinnější léčbě [57].



Obrázek 17: Schéma složení multi-funkčních Gd-liposomů, jejich aplikace, následná diagnóza a terapie[57][58]

Jednou z dalších možných variant využití těchto liposomů je i zobrazení a léčba trombů, viz obrázek 18. Kdy by bylo možné použít jako specifické ligandy například RGD peptidy cílené k aktivovaným krevním destičkám, nebo proteinové bindery rozpoznávající vlákna fibrinu. Liposomy by tedy opět sloužily jako cílený nosič kontrastní látky (diagnostikum) a zároveň by obsahovaly enkapsulované trombolitikum, např. plasmin (terapeutikum), které způsobí postupnou degradaci trombu [59]. Dohromady tento systém tvoří moderní teranostikum (diagnostikum plus terapeutikum).



Obrázek 18: Zobrazení aplikace a využití liposomů značených gadoliniem, při léčbě a zobrazení trombů [59]

2.3 Vybrané metody pro charakterizaci liposomů

Liposomy mohou být charakterizovány několika metodami, dle toho jakou informaci chceme přesně získat. K analýze lipidů se využívá například chromatografie na tenké vrstvě, vysokoúčinná kapalinová chromatografie a plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií, zřídka také NMR. Pro určení velikosti liposomů se nejčastěji využívají metody jako je analýza pomocí dynamického rozptylu světla (DLS), analýzy trajektorie částic (NTA, nanoparticle tracking analysis). Komplexnějšími metody pro zobrazení struktury liposomů jsou například: transmisní elektronová mikroskopie (TEM), skenovací elektronová mikroskopie (SEM), kryo-transmisní elektronová mikroskopie (cryo-TEM) atp. [60].

2.3.1 Dynamický rozptyl světla

Tato metoda slouží ke stanovení velikosti částic v nesedimentujících koloidních disperzích. DLS je také známá jako fotonová korelační spektroskopie nebo kvazielastický rozptyl světla (QLS). Částice se v kapalině pohybují Brownovým pohybem, náhodnými směry, vzdálenost, kterou musí rozptýlené světlo urazit k detektoru je tedy funkcí času. Výsledkem jsou fluktuační intenzity rozptýleného světla okolo její průměrné hodnoty. Z těchto fluktuačních se získá korelační funkce, která představuje vztah mezi průměrem intenzity v čase $(t+\tau)$ a v čase t . Při velké hodnotě τ (τ je zpoždění) jsou $I(t)$ a $I(t+\tau)$ na sobě nezávislé. Naopak při krátkém zpoždění na sobě závislé jsou. V případě kulovitých částic, které mají stejnou velikost lze korelační funkci vyjádřit v exponenciálním tvaru, rovnice (4):

$$g(\tau) = \exp\left(\frac{-\tau}{\tau_c}\right) \quad (4)$$

kde τ_c je úměrné difúznímu koeficientu částic D , rovnice (5)

$$\tau_c = \frac{1}{DQ^2} \quad (5)$$

Q je vlnový vektor. τ_c má časový význam, je to doba, za kterou se intenzita vrátí z fluktuační zpět na průměrnou hodnotu. Získá se vynesáním $\ln g(\tau)$ proti τ . Hydrodynamický poloměr částic R je poté, za použití Stokes-Einsteinovy rovnice pro difúzní koeficient dán vztahem, viz rovnice (6):

$$R = \left(\frac{kT}{6\pi\eta}\right) \cdot Q^2 \cdot \tau_c \quad (6)$$

kde R je hydrodynamický poloměr, k je Boltzmannova konstanta a η je dynamická viskozita rozpouštědla [60][61][62].

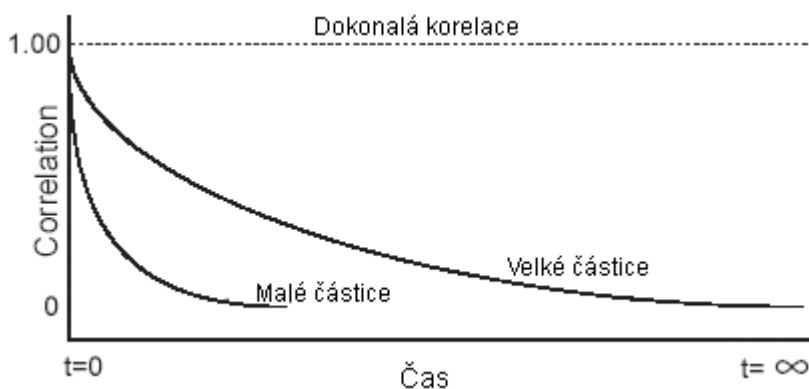
DLS je neinvazivní metoda velmi využívá pro určení velikosti, nebo stanovení velikostní distribuce koloidních částic. Výsledky bývají v dobré shodě s výsledky získanými pomocí elektronové mikroskopie [61].

Přístroje DLS (například Zetasizer Nano ZSP, of firmy Malvern, viz obrázek 19) měří tedy rychlost fluktuační intenzity, kterou využívají pro vypočítání velikosti částic pomocí korelační funkce.



Obrázek 19: Zetasizer Nano ZSP, of firmy Malvern (Laboratoř NanoPharm, VÚVeL, Brno)

Pokud se měří velké částice, které se pohybují pomalu, fluktuace intenzity rozptýleného světla bude nižší než v případě malých částic, které se pohybují rychleji. Viz obrázek 20 [63].



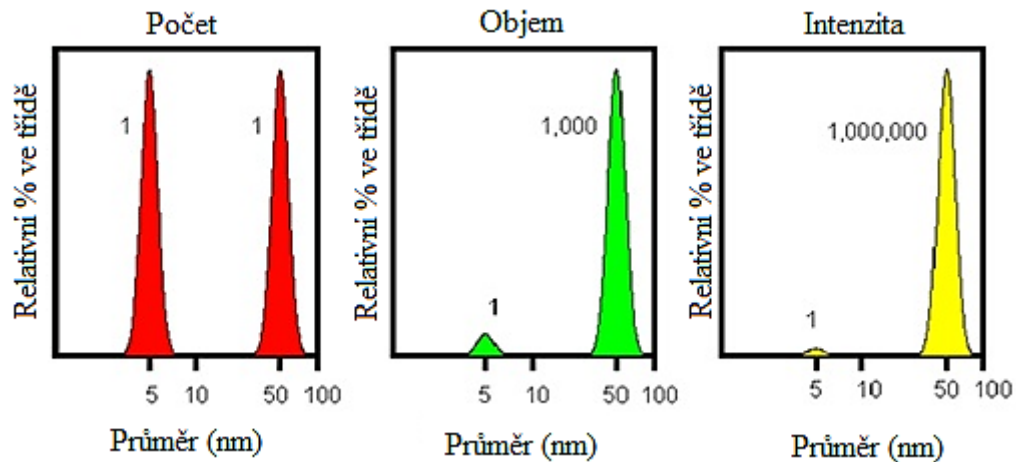
Obrázek 20: Korelační funkce pro malé a velké částice[63]

Z korelační křivky je poté vypočítána distribuce velikosti. Metoda DLS nabízí tři módy vyjádření distribuce: distribuce intenzity, objemu a počtu. Dobrý způsob jak popsat rozdíl těchto distribucí je vzorek, obsahující jen dvě velikosti částic (např. 5 a 50 nm) s rovnajícím se počtem každé velikosti. Viz obrázek 21.

Distribuce počtu: maxima mají stejnou velikost (1:1), protože je ve vzorku stejný počet částic.

Distribuce objemu: plocha maxima pro 50 nm částici je 1000krát větší než maxima pro 5 nm (poměr je 1:1000), to proto, že objem 50 nm částice je 1000krát větší než 5 nm částice (objem koule se rovná $\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3$)

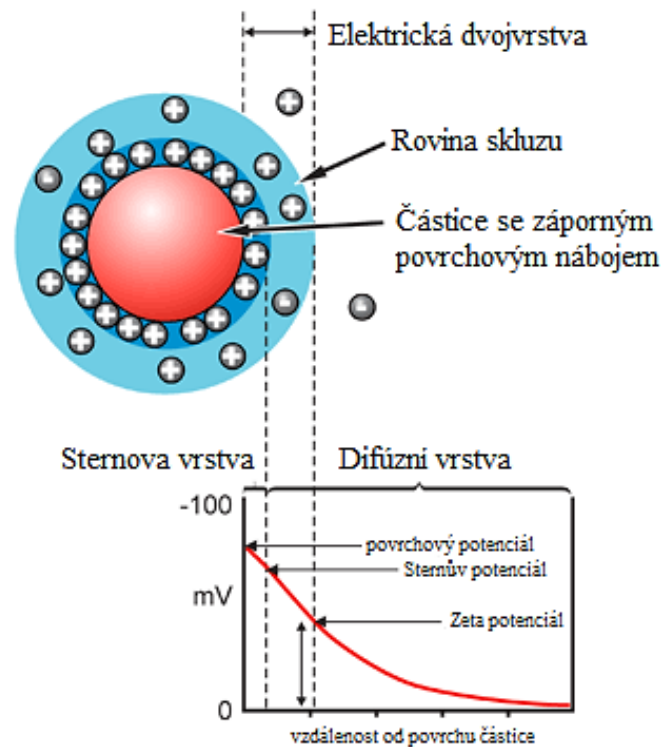
Distribuce intenzity: plocha maxima pro 50 nm je milionkrát větší, než maximum pro 5 nm (poměr 1:1 000 000), protože velké částice rozptylují mnohem více světla než malé částice, intenzita rozptylu částice je úměrná šesté mocnině jejího průměru [63]



Obrázek 21: Distribuce částic na počet, objem a intenzitu. [64]

DLS je možné také využít pro měření ζ -potenciálu. Vznik síťového náboje na povrchu částic ovlivňuje distribuci iontů. To má za následek zvýšenou koncentraci opačných iontů těsně u povrchu částice. Kolem každé částice tedy existuje elektrická dvojvrstva [60].

Zjištěná velikost ζ -potenciálu vypovídá o stabilitě koloidního systému. Pokud by měli částice v suspenzi velký nebo malý záporný ζ -potenciál budou se navzájem odpuzovat a snižuje se pravděpodobnost flokulace. Jestliže je hodnota zeta potenciálu nízká, pak není v suspenzi přítomna síla, která by flokulaci zabraňovala. Obecně lze říci, že pokud je ζ -potenciál větší než +30 mV, nebo menší než -30 mV, lze považovat koloidní systém za stabilní. Velmi důležitým faktorem je hodnota pH, která výrazně ovlivňuje ζ -potenciál [65]. V elektrickou dvojvrstvu můžeme tedy rozdělit na dvě základní části. Kompaktní bližší část k povrchu částice zde působí síly adsorpční a elektrostatické, tzv. Sternova vrstva. A vzdálenější, vnější difúzní část, kde můžeme tyto síly zanedbat, ionty jsou zde méně pevně připojené. Uvnitř difúzní vrstvy existuje pomyslná hranice, kde částice a ionty tvoří stabilní jednotku. Když se daná částice pohybuje, ionty uvnitř hranice putují spolu s ní, kdežto ionty za touto hranicí s částicí neputují. Tato hranice se označuje, jako rovina skluzu nebo povrch hydrodynamického smyku. Existující potenciál na této hranici se označuje jako ζ -potenciál (obrázek 22) [65][66].



Obrázek 22: Zobrazení elektrické dvojevrstvy, ζ -potenciálu[67]

2.3.2 Analýza trajektorie částic, NTA

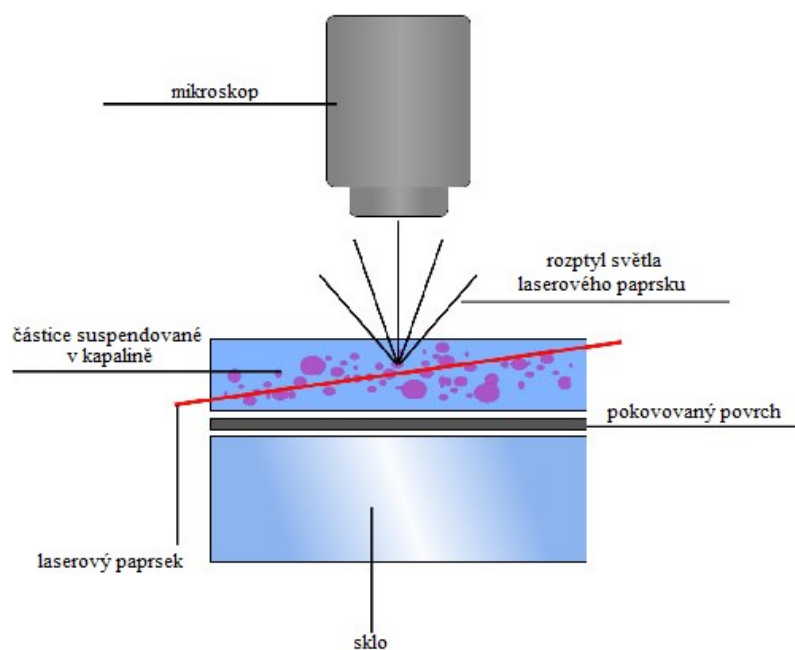
Analýza trajektorie částic je poměrně nová technika, která využívá jak rozptylu světla, tak Brownova pohybu k získání distribuce velikosti částic vzorku v kapalně suspenzi. Brownův pohyb nanočástic je analyzován v reálném čase vysoko citlivostní CMOS kamerou. Částice jsou souběžně, ale odděleně vizualizovány a sledovány. Díky tomu, že částice jsou vizualizovány a analyzovány odděleně, získaná velikost částic a distribuce velikosti není brána jako Z-average distribuce, jako je tomu standardně u metody DLS a výsledek je díky tomu přesnější [68].

Princip metody spočívá ve vedení laserového paprsku přes komoru se vzorkem, kde dochází k rozptylu světla na částicích vzorku, což umožňuje jejich vizualizaci (obrázek 23). Kamera poté zachycuje video soubor s Brownovým pohybem částic. Částice jsou sledovány jednotlivě a pomocí Stokes-Einsteinovi rovnice jsou vypočítané hydrodynamické průměry [69].

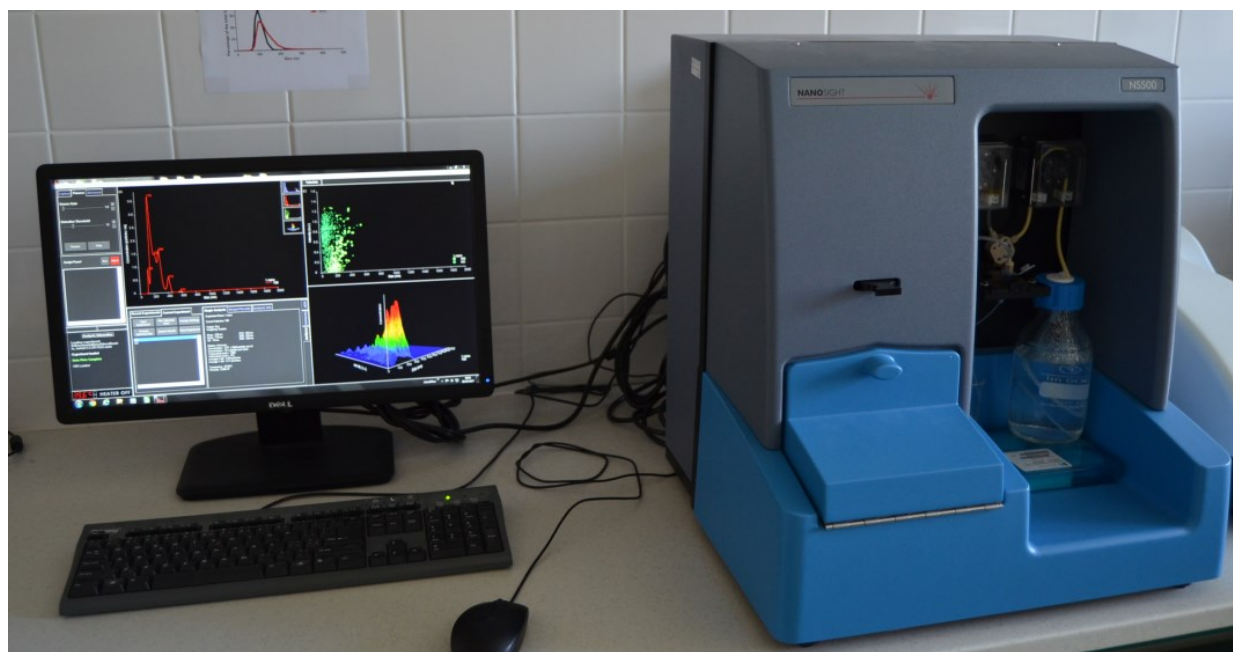
Mikroskop se skládá z několika hlavních částí a to z: tubusu s elektronovou optikou, vakuového systému, nezbytné elektroniky (jako je např. napájení čoček pro zaostření nebo vychylování elektronového paprsku) a softwaru.

NTA analýzou lze sledovat částice s průměrem okolo 50 až 2 000 nm. Analýza je závislá na typu částic. Například vizualizace nejmenších částic je možná, pokud mají vysoký index lomu, jako je zlato nebo stříbro.

NTA má využití v celé řadě aplikací, od nanotoxikologie, agregace proteinů nebo u nosičů léčiv [70]. Na obrázku 24 lze vidět přístroj NanoSight NS500 od firmy Malvern Instruments Ltd.



Obrázek 23: znázornění optického uspořádání použitého v NTA[69]

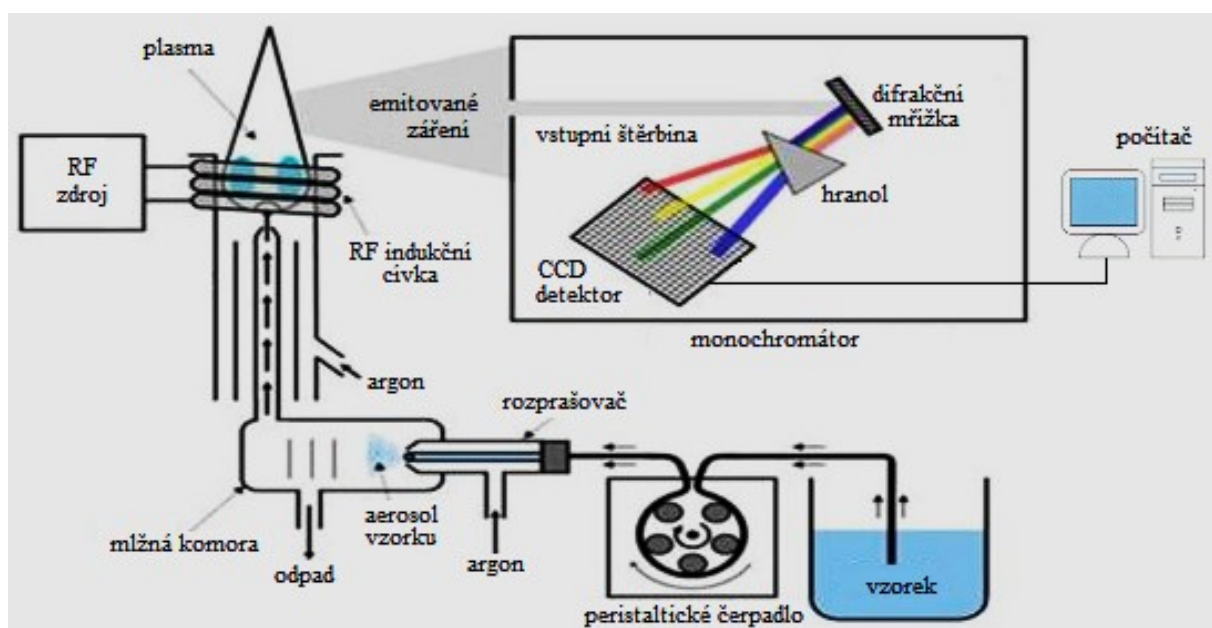


Obrázek 24: NanoSight NS500 (Malvern Instruments) (Laboratoř NanoPharm, VÚVeL, Brno)

2.3.3 Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

Pro určení složení liposomů, respektive k jejich prvkové analýze lze využít metodu optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES). Při této technice, jak již název napovídá, se využívá emisní atomové spektrometrie a indukčně vázaného plazmatu.

Analyzované vzorky jsou v kapalně formě. Pevné látky se před analýzou musí převést do jemné suspenze. Vzorek vstupuje zpravidla pomocí peristaltické pumpy do zmlžovače, kde dochází k vytvoření aerosolu. Velké kapky aerosolu se díky odstředivým silám odseparují v mlžné komoře. Jemné kapičky aerosolu se poté pomocí injektoru přivádí do plazmatu [71]. Plazma je soubor nabitých a neutrálních částic, kdy platí, že jeho prostorový náboj je přibližně roven nule (je tedy kvazineutrální) [72]. Plasma slouží k atomizaci a je zdrojem energie pro excitaci částic. Vzniká působením vysokofrekvenčního elektromagnetického pole pomocí indukční cívky, obvykle v prostředí argonu a dosahuje teploty, až 10 000 K. Excitované částice vzorku poté emitují záření o daných vlnových délkách, které se dále detekuje [71] [73]. Další částí přístroje jsou disperzní prvky monochromátor nebo polychromátor (např. Czerny-Turner, Paschen-Runge) a detektor (nejčastěji fotonásobiče, popřípadě fotodiody, diodová pole, CCD detektor), viz obrázek 25.



Obrázek 25: Schéma ICP-OES[74]

Každý prvek má své vlastní charakteristické spektrum. Emisní záření, které je detekováno se převádí na elektronické signály, které jsou dále zpracovány, a výsledkem je stanovení koncentrace daného prvku v analytu [73].

2.4 Elektronové mikroskopy

Elektronové mikroskopy, jsou optické přístroje, které na rozdíl od světelných mikroskopů využívají elektrickým polem urychlené elektrony a místo skleněných čoček se využívají čočky elektromagnetické. Vzorek musí být po celou dobu sledování umístěn ve vakuu, aby nedocházelo k interakci elektronů s molekulami plynu a nedocházelo tak k ovlivnění dráhy

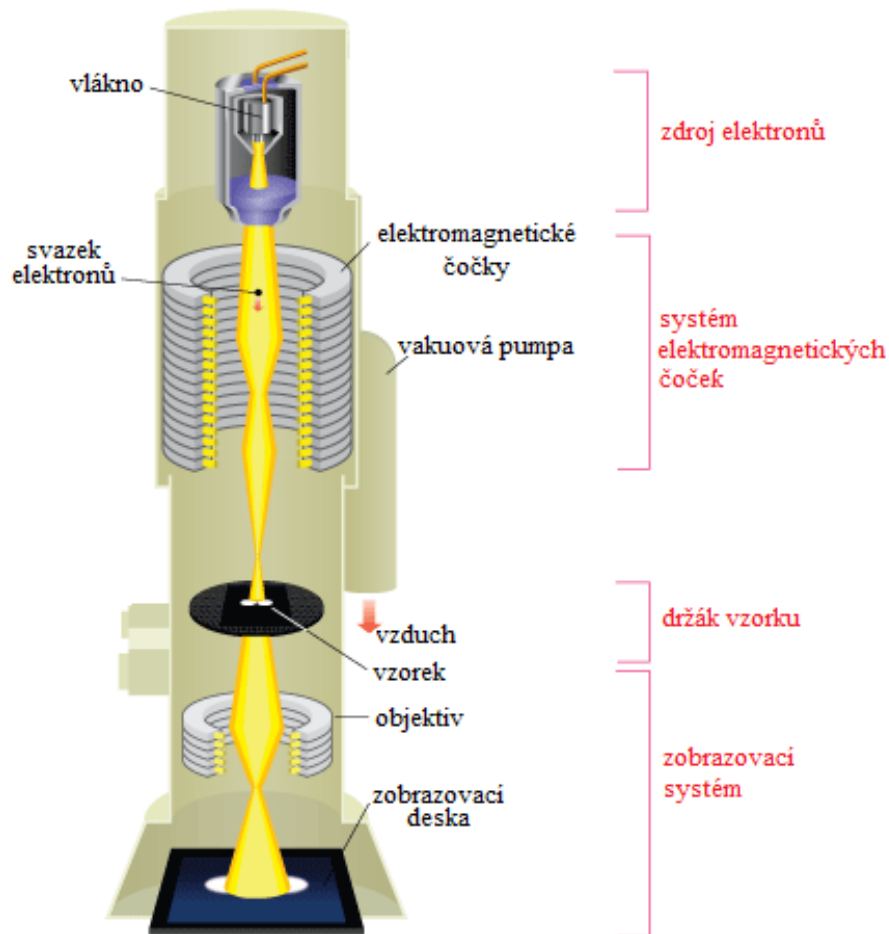
letu elektronů. Velmi důležitý je fakt, že elektronové mikroskopy pracují s podstatně kratší vlnovou délkou ($\sim 0,01\text{--}0,001\text{ nm}$), než má viditelné světlo ($400\text{--}700\text{ nm}$), nám umožňují dosáhnout mnohem vyššího rozlišení. Elektronové mikroskopy nám mohou poskytnout informaci o mikrostruktuře vzorku, jeho krystalografii nebo o jeho chemickém složení. Obecně lze rozlišit elektronové mikroskopy do dvou kategorií. Na transmisní elektronové mikroskopy (TEM) a na skenovací (rastrovací) elektronovou mikroskopii (SEM) [75].

2.4.1 Transmisní elektronový mikroskop – TEM

TEM byl poprvé sestaven v roce 1930 Ruskou a Knollem, vývoj tohoto mikroskopu byl započat především kvůli omezené rozlišovací schopnosti světelného mikroskopu [75].

Z transmisní elektronové mikroskopie získáváme obraz nebo difrakční obrazec tenkého vzorku, který se prozařuje rychlými elektrony, elektrony tedy prochází skrz vzorek a až poté jsou detekovány. Mikroskop může být vybaven spektrometry rentgenového záření a poté je možné provádět i lokální kvantitativní chemickou analýzu prvků, s prostorovým rozlišením okolo 1 nm a citlivostí blízkou se několika atomům [76].

Mikroskop se skládá z několika hlavních částí: tubusu s elektronovou optikou, vakuového systému, nezbytné elektroniky (např. napájení čoček pro zaostřování a vychylování elektronového paprsku, zdroj vysokého napětí pro zdroj elektronů) a softwaru [77].



Obrázek 26: Schéma transmisního elektronového mikroskopu [78]

TEM pracuje, například v případě materiálového výzkumu, s urychlovacím napětím od 100 až 400 kV. S nově vyvíjejícími se korektory magnetických čoček roste v poslední době i zájem o urychlovací napětí i pod 100 kV, při použití nižší energie dopadajících elektronů nedochází k tak velkému radiačnímu poškození citlivých vzorků [76].

V základní skříni je umístěn vakuový systém mikroskopu a řídicí elektronika. Ve svislém tubusu je elektronová tryska, akcelerátor elektronů, magnetické čočky osvětlovací a zobrazovací soustavy a také pozorovací a fotografická komora (obrázek 26). V celém tomto systému je neustále udržováno vakuum 10^{-3} až 10^{-5} Pa. Kolem elektronové trysky nebo v prostoru vzorku, který se vkládá do tubusu, je potřeba nejvyššího vakua [79].

U elektronového mikroskopu je třeba, aby elektronový zdroj poskytoval koherentní svazek elektronů, ty by měly vycházet z bodového zdroje a měly by mít stejnou energii [80]. Nejčastěji emisi elektronů zajišťuje katoda z wolframového drátku, která je ve tvaru písmene V, žhaví se na teplotu okolo 2 800 K. Méně se používají autoemisní elektronové trysky, jejich nevýhodou je nutné dosažení ultravakua, 10^{-7} až 10^{-8} Pa, což je velmi nákladné [79].

Anoda, s kruhovým otvorem ve svém středu, elektrony přitahuje a dává jim dostatečné zrychlení na průlet tubusem mikroskopu. Katodové vlákno je vystředěno do otvoru tzv. Wehneltova válce, se záporným předpětím, kde se díky jeho působení, okolo emitujícího hrotu katody vytvoří mrak elektronů. Ty jsou postupně odsávány z Wehneltova válce k anodě, elektrony mají dostatečnou rychlost a správný směr, aby prolétly dále do tubusu. Wehneltův válec tak v podstatě funguje jako první elektrostatická čočka mikroskopu.

Elektronová optika elektronové trysky promítá obraz emisního hrotu vlákna do prostoru křížiče. To slouží jako zdroj elektronů a jeho poloha lze měnit centrováním katody. Čím kruhovější je průmět vlákna v křížiči, tím je zdroj elektronů koherentnější a bodovější.

Urychlené elektrony vstupují do magnetického pole kondenzovaných čoček, ty ho přenášejí z křížiče na preparát. Obvykle se používají dvě kondenzorové čočky, první vytváří obraz křížiče a změnou její ohniskové vzdálenosti ovlivníme velikost obrazu. Druhou čočkou tento obraz zaostříme do roviny preparátu [79][80].

Elektronová tryska s kondenzorovými čočkami, tvoří osvětlovací část transmisního elektronového mikroskopu. Část zobrazovací se skládá z držáku na preparát, do kterého se vkládají síťky. Na kterých je preparát, který chceme pozorovat. Další částí je objektiv, ten je nejvýkonnější čočkou mikroskopu. Má největší zvětšení a nejkratší ohniskovou vzdálenost. Samotná cívka objektivu má velký počet závitů, aby se dosáhlo požadovaného výkonu. Zobrazovací část mikroskopu také tvoří mezičočky, projektivy a pozorovací stínítka [80].

Pro zobrazení elektronů, které prošly preparátem a zobrazovacím systémem, je třeba převést informace, které nesou, do oblasti viditelného světla pomocí stínítka. Stínítka bývají pokryta nejčastěji ZnS, který je schopný v závislosti na energii a množství dopadajících elektronů emitovat světlo s vlnovou délkou 450 nm. Kvůli nečistotám se však emise posouvá blíže k 550 nm, tedy k zelenému světlu [77].

Po dopadu elektronů na vzorek, může docházet například k *amplitudovému kontrastu obrazu* (kdy některé elektrony jsou absorbovány v závislosti na tloušťce a složení vzorku), *fázovému kontrastu v obraze* (některé elektrony jsou rozptýleny pod malými úhly, velikost úhlu závisí na složení vzorku), *difrakčním kontrastu obrazu* (v krystalických preparátech jsou elektrony rozptýleny do odlišných směrů, v závislosti na krystalické struktuře), *zpětně*

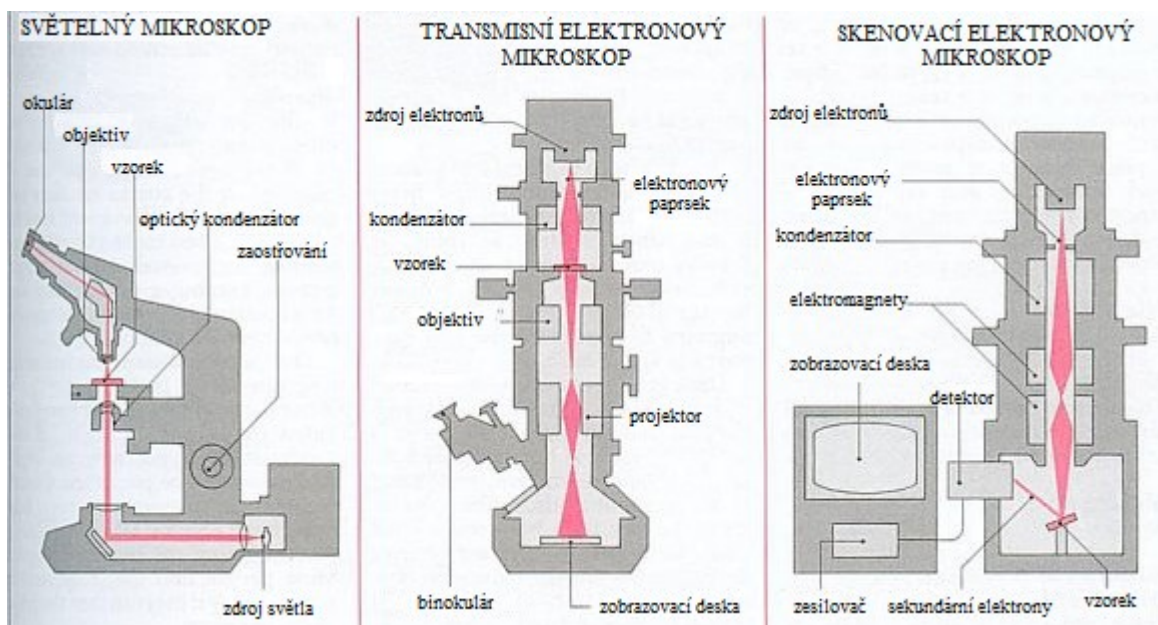
rozptýleným elektronům (některé dopadající elektrony jsou odraženy) nebo může docházet ke vzniku sekundárních elektronů (dopadající elektrony, způsobí, že vzorek sám začne elektrony emitovat). Pro zobrazení biologických preparátů v TEM jsou nejdůležitější první dva jevy. Celkovým výstupem z TEM je trvalý záznam snímku, který se získá pomocí CCD (charge coupled device) kamer [77][80].

2.4.2 Skenovací elektronová mikroskopie – SEM

První funkční skenovací elektronový mikroskop byl zkonstruován V. K. Zworykinem a kol. již v roce 1942. SEM umožňuje získávat informaci o površích širokého spektra materiálů [75]. U SEM dochází k interakci primárních elektronů se vzorkem za uvolnění sekundárních elektronů, které se využívají k zobrazení. Druhou možností je zobrazení pomocí zpětně odražených elektronů. Vzorek se tedy ozáří koncentrovaným svazkem elektronů. Zdrojem elektronů je žhavená katoda z wolframového vlákna [81].

Elektronový svazek se pohybuje po vzorku řádek po řádku a výsledný obraz se tedy vytváří postupným skenováním. Jednoduchá příprava vzorků a snadná interpretace obrazu činí SEM populárním a rozšířeným [82]. Skenovací mikroskop má statisícinásobné zvětšení. Rozlišovací mez SEM závisí především na průměru stopy fokusovaného elektronového svazku na povrchu preparátu. U přístrojů s wolframovou přímo žhavenou katodou se rozlišovací mez dostává do rozmezí 10 až 15 nm. U novějších typů, které používají autoemisní elektronové trysky dosahují rozlišovací meze až na 1 nm. Rozlišovací mez SEM (stejně jako je tomu u TEM) je ovlivněna mnoha vadami zobrazení (např. chromatická vada, astigmatismus aj.). Tyto vady lze minimalizovat použitím clonek a speciálními druhy elektromagnetických čoček. S rostoucím zvětšením u SEM klesá hloubka ostrosti vzniklého obrazu. Proto se při zobrazování musí volit kompromis mezi zvětšením a hloubkou ostrosti obrazu tak, aby bylo získáno optimální hloubky ostrosti v zobrazených detailech povrchu preparátu [83].

Rozdíly mezi mikroskopy, jsou pro lepší pochopení, znázorněny na obrázku 27.



Obrázek 27: Rozdíl mezi elektronovými mikroskopy (TEM, SEM) a světelným mikroskopem [84]

2.4.3 Kryo-transmisní elektronová mikroskopie

Transmisní elektronová kryo-mikroskopie (Cryo-TEM) nám umožňuje zobrazit a studovat struktury nanoobjektů (např. viry, proteinové komplexy) na úrovni atomárního rozlišení [85].

Jde o techniku, při které se vzorek pozoruje při kryogenních podmínkách. Mikroskop je vybaven speciálním kryogenním držákem, který je chlazen pomocí kapalného dusíku a funkcí, která umožňuje minimální osvit vzorku. Z důvodu, aby při pozorování vzorku nedocházelo k jeho zahřívání díky dopadajícím elektronům a nedocházelo tak k sublimaci ledu z jeho povrchu. Můžou se používat dva typy vzorků a to tenké řezy nebo tenké filmy. Například tenký film připravíme nanesením suspenze na síťku, která je pokrytá uhlíkovou blankou. Po odsání přebytečné kapaliny se provede mrazová fixace ponořením do kapalného chladičského média [76].

Samotná příprava vzorků je celkem náročná, proto se pro zajištění spolehlivých a opakovatelných výsledků používá automat Vitrobot (obrázek 28). Ten umožní přesně definované, opakovatelné a vysoce kvalitní zmrazení vzorku [86].



Obrázek 28: Mikroskop TEM FEI Tecnai F20 (vlevo), Vitrobot (vpravo) (Laboratoř elektronové mikroskopie CEITEC)

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a zařízení

- Zetasizer Nano ZSP, *Malvern Instruments*, UK
- NanoSight NS500, *Malvern Instruments*, UK
- NanoAssemblr™ Benchtop, *Precision NanoSystems*, Kanada
- Extrudér, *Lipex Biomembranes Inc.*, Kanada
- Rotační odparka Heidolph Hei-VAP, *Heidolph Instruments GmbH & Co.*, Německo
- Vodní lázeň Julabo U3-6A, *JULABO GmbH*, Německo
- Analytické váhy Scaltec SBC-22, *Scaltec Instruments GmbH*, Německo
- Mini pH metr Beckman Φ 110 ISFET, USA
- pH metr pH720 InoLab, *WTW*, Německo
- Termoblok Cool-hotter dry bath incubator, *Major Science*, USA
- Lyofilizátor Lyovac GT2, *Leybold Hereaus*, Německo
- Karl Fischer titrátor, *Mettler Toledo*, Švýcarsko a USA
- Magnetická míchačka IKA Big Squid Froggy, *IKA*, Německo
- Vortex IKA MS3 digital, *IKA*, Německo
- Centrifuga Hermle Z200A, *Hermle LaborTechnik GmbH*, Německo
- TEM: Jeol 2100, 100 kV, *JEOL*, USA s EDS: Oxford x-MAX 80T (SSD) *Oxford Instruments*, UK
- TEM Philips EM 208, software Morgagni 268, *FEI*, Česká republika
- Mikroskop cryo-TEM Tecnai F20, *FEI*, USA
- Cary 50 UV-VIS spektrofotometr, *Agilent Technologies*, USA
- ICP-OES model ULTIMA 2, *Horiba Jobin Yvon*, Francie
- 9,4 T NMR systém Bruker-BioSpec 94/30 USR, *Bruker*, Německo

3.2 Pomůcky

- Dialyzační membrána, Spectra/Por® 12-14 kD, *Spectrum Laboratories, Inc.*, USA
- Injekční filtry Millex-GV PVDF 0.22 μ m, *Merck Millipore + Sigma-Aldrich*, USA
- Stříkačky INJ Braun Omnifix-f 1-3 ml, *B. Braun Medical s.r.o.*, Česká republika
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky

3.3 Chemikálie

- Soy PC, 840054, >99%, *Avanti Lipids*, USA
- Egg PC, 840051, >99%, *Avanti Lipids*, USA
- Cholesterol, >99%, *Sigma-Aldrich*, USA
- 18:0 DSPC, 850365, >99%, *Avanti Lipids*, USA
- Bis (18:0 PE)-DTPA (Gd), 791299, >99%, *Avanti Lipids*, USA
- 18:0 PE DTPA (Gd), 791275, >99%, *Avanti Lipids*, USA
- 16:0 Cyanur Cap PE, 870275, >99%, *Avanti Lipids*, USA
- DSPE-PEG(2000) Cyanur, 880122, >99%, *Avanti Lipids*, USA
- Gd-DOTA, *Macrocyclics*, USA

- EDTA, $\geq 98\%$, *Sigma-Aldrich*, USA
- Hexahydrát chloridu gadolinitého, 99,999%, *Sigma-Aldrich*, USA
- Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan), 99.9 %, *Serva*, USA
- Sacharosa 99,8%, *Penta*, Česká republika
- Chlorid železitý hexahydrát 98%, *Sigma-Aldrich*, USA
- Thiokyanatan draselný 98%, *Rodapis*, Česká republika
- HydranalTM Coulomat AG Fluka, *Sigma-Aldrich*, USA
- Absolutní ethanol, *Penta*, Česká republika
- Chloroform p.a., *Penta*, Česká republika
- DMSO 99%, *Sigma-Aldrich*, USA
- Milli-Q voda

3.4 Optimalizace nanofluidizační metody

Pro přípravu liposomů metodou nanofluidizace byl použit přístroj NanoAssemblrTM Benchtop (dále jen NanoAssemblr). Byl studován vliv rychlosti průtoku a poměru organické:vodné fáze na velikost připravených liposomů. Vodnou fází byl 5mM roztok Tris o pH = 7. Organickou fází byl absolutní ethanol s rozpuštěnými lipidy (EPC). Koncentrace lipidů byla 6 mg/ml.

Na přístroji NanoAssemblr byly následně nastaveny různé poměry pro míchání organické a vodné fáze (1:1, 1:3; 1:5) a různé rychlosti průtoku (4 ml/min, 7 ml/min, 11 ml/min). Velikost získaných liposomů byla proměřena na Zetasizeru Nano ZSP (Malvern Instruments).

3.5 Vliv lipidní kompozice a složení vodné fáze na velikost liposomů

Liposomy s různou lipidní kompozicí a vodnou fází byly připraveny pomocí přístroje NanoAssemblr. Poměr organické a vodné fáze byl 1:5, rychlost průtoku byla 7 ml/min. Vodné fáze byly miliQ voda, 5mM Tris (pH = 7) a PBS. Jako organické fáze byly použity lipidy SoyPC, EPC a DSPC rozpuštěné v absolutním ethanolu. Příprava liposomů z DSPC lipidu probíhala při teplotě 70 °C. Velikost liposomů byla proměřena na Zetasizeru Nano ZSP.

3.6 Optimalizace obsahu cholesterolu v liposomech

Na přístroji NanoAssemblr byly připraveny liposomy, obsahující různé molární procenta cholesterolu (10; 20; 30; 40 a 50 mol %). Poměr organické a vodné fáze byl 1:5, rychlost průtoku byla 7 ml/min. Vodnou fází byl 5mM pufr Tris o pH = 7. Organickou fází představoval ethanolový roztok EPC lipidu s přidaným množstvím cholesterolu.

Z hlediska dalšího vývoje liposomálních preparátů pro účely budoucí intravenózní aplikace byl vybrán DSPC a proto byl postup přípravy liposomů optimalizován také pro tento lipid. Při přípravě liposomů z DSPC byla nastavena teplota na termobloku přístroje NanoAssemblr na 70 °C, tedy nad teplotu fázového přechodu lipidní membrány tvořené z DSPC. Koncentrace výsledných liposomů byla 1 mg/ml. Velikost liposomů byla proměřena na Zetasizeru Nano ZSP.

3.7 Porovnání liposomů, získaných metodou hydratace lipidního filmu s následnou extruzí a pomocí metody nanofluidiního směšování

Liposomy (70 mol % DSPC a 30 mol % cholesterolu) byly připravovány na přístroji NanoAssemblr. Kde poměr organické a vodné fáze byl 1:5, rychlost průtoku byla 7 ml/min. Vodnou fází byl 5mM pufr Tris o pH = 7. Organická, ethanolová, fáze byla složena ze 70 mol % DSPC a 30 mol % cholesterolu. Koncentrace výsledných liposomů byla 1 mg/ml. Teplota termobloku na NanoAssemblru byla nastavena na 70 °C.

Liposomy o identickém složení byly připraveny i hydratací lipidního filmu. Potřebné množství DSPC lipidu a cholesterolu bylo naváženo a rozpuštěno ve 3 ml chloroformu. Směs byla převedena do baňky s kulatým dnem. Rozpuštědlo bylo odpařeno pomocí vakuové rotační odparky, při tlaku 50 mBar. Vzniklý lipidový film byl hydratován 5mM Tris o pH = 7. Hydratace vždy probíhala nad teplotou fázového přechodu, tedy při 65 °C.

Liposomy získané z hydratace lipidního filmu byly extrudovány, pomocí extrudéru Lipex (viz obrázek 13), přes polykarbonátové filtry o velikosti pórů 100 nm. Extruze probíhala při teplotě 65 °C.

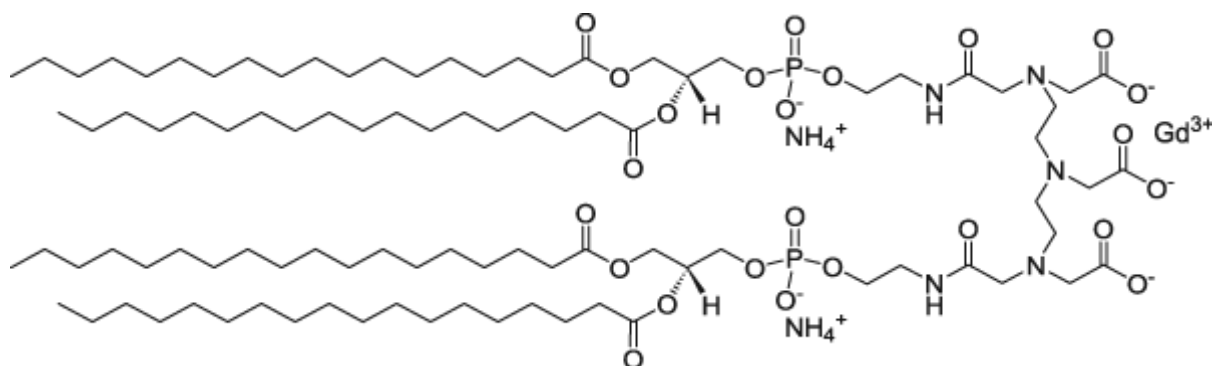
Velikosti liposomů, získaných z obou metod, byly proměřeny na přístrojích Zetasizer Nano ZSP, NanoSight NS500. Pro zjištění morfologie liposomů, byly vzorky pozorovány pomocí TEM (TEM, Philips EM 208), na VÚVeL, v laboratoři Elektronové mikroskopie, s pomocí MVDr Pavla Kulicha, Ph.D.

Vzorky liposomů byly negativně barveny (molybdenan amonný, 2% roztok), z důvodu zvýšení kontrastu. Vzorek liposomů byl nanesen na karbonovou mřížku potaženou vrstvičkou mědi. Po adhezi vzorku na síťku, byl vzorek odsán kouskem filtračního papíru. Poté byl na mřížku se vzorkem nakápnut 2% roztok molybdenanu amonného, ten byl po minutě odsán filtračním papírem. Následně byl obarvený vzorek upevněn do nástavce a byl vložen do TEM.

3.8 Charakterizace liposomů obsahující gadolinium

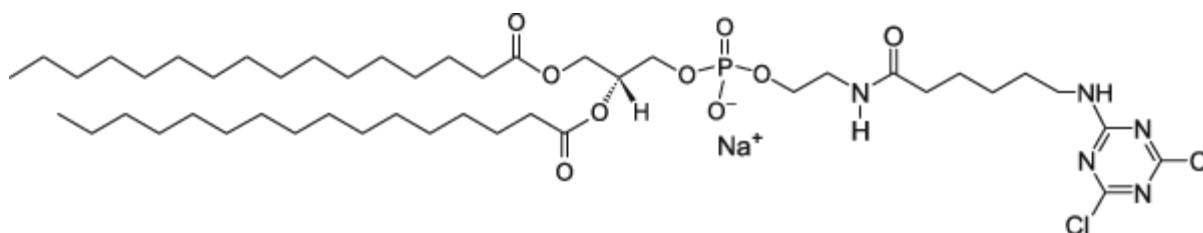
Liposomy byly připraveny metodou hydratace lipidního filmu a metodou nanofluidizace. Byly nachystány vzorky o složení:

Vzorky 1 a 3: DSPC 65 mol %, cholesterol 30 mol % a Gd-lipid 5 mol % [Bis (18:0 PE)-DTPA (Gd)]



Obrázek 29: Vzorec použitého Gd-lipidu; Bis (18:0 PE)-DTPA (Gd), 791299, od Avanti Lipids [87]

Vzorky 2 a 4: DSPC 65 mol %, cholesterol 30 mol % a Cyanur Cap 5 mol % [16:0 Cyanur Cap PE]



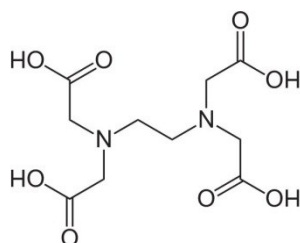
Obrázek 30: Vzorec použitého 16:0 Cyanur Cap PE, 870275, od Avanti Lipids [88]

3.8.1 Příprava liposomů obsahujících gadolinium pomocí hydratace lipidního filmu s následnou extruzí

Potřebné množství jednotlivých lipidů dle požadované kompozice bylo rozpuštěno ve 3 ml chloroformu. Roztoky byly převedeny do baněk s kulatým dnem. Chloroform byl odpařen pomocí vakuové rotační odpary, při tlaku 50 mBar. Vzniklý lipidový film byl hydratován v 3 ml 5mM Tris o pH = 7. Hydratace probíhala při teplotě 65 °C. Výsledná koncentrace liposomů byla 10 mg/ml. Následná extruze byla provedena pomocí extrudéru Lipex, přes 100 nm filtr, extrudér i vzorky byly temperovány na 65 °C, extruze byla opakována 5x pro každý vzorek.

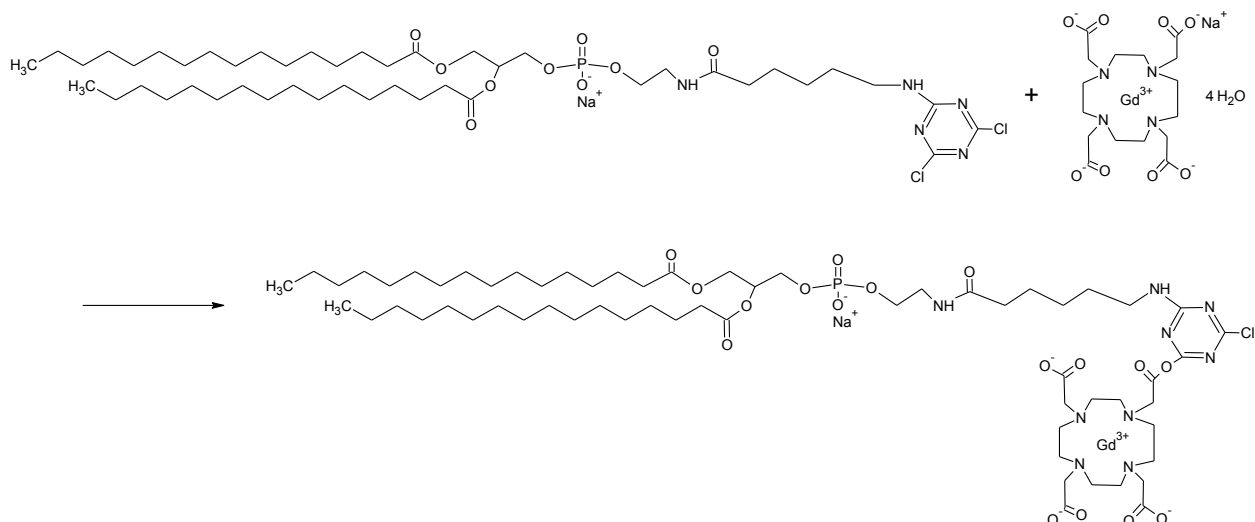
Vzorek 1 byl zředěn na koncentraci 1 mg/ml a rozdělen na dvě části. K jedné polovině vzorku byla přidána EDTA (tak aby její koncentrace v roztoku s liposomy byla 1 mM). Po dvou hodinách byly liposomy spolu s EDTA dialyzovány v 5 mM Tris o pH = 7.

EDTA (viz obrázek 31) byla přidána k liposomům za účelem odstranění Gd^{3+} z vnějšího povrchu liposomů. Gadolinium by mělo po této reakci zůstat pouze z vnitřní strany liposomu.



Obrázek 31: Strukturální vzorek EDTA [89]

Vzorek 2 byl zředěn na koncentraci 1 mg/ml. Byl připraven zásobní roztok Gd-DOTA ($c = 10$ mg/ml) v TRIS o pH = 8,8. Gd-DOTA byla k liposomům přidána v pětinasobném nadbytku. Nadbytek byl vztažen k molárnímu procentu Cyanur Cap v liposomech. Následně bylo pH liposomů upraveno na 8,8 pomocí 1mM NaOH. Reakce, navázání komplexu Gd-DOTA na liposomy (viz obrázek 32), probíhala 16 hodin, ve tmě, při laboratorní teplotě.



Obrázek 32: Vazba Gd-DOTA na Cyanur CAP

Reakce byla zastavena snížením pH na hodnotu 7, pomocí 1mM HCl. K jedné polovině vzorku byla přidána EDTA (tak aby její koncentrace v roztoku s liposomy byla 1 mM). Po dvou hodinách byly liposomy spolu s EDTA dialyzovány v 5mM Tris o pH = 7.

Velikosti liposomů byly proměřeny pomocí přístrojů Zetasizer Nano ZSP a NanoSight NS500; ζ -potenciál byl proměřen pomocí přístroje Zetasizer Nano ZSP. V průběhu přípravy liposomů byla opakovaně proměřována jejich velikost i ζ -potenciál.

3.8.2 Příprava liposomů obsahujících gadolinium pomocí nanofluidizace

Liposomy, se složením viz kapitola 3.8, byly připraveny pomocí přístroje NanoAssemblr. Gd-lipid nebyl rozpustný v ethanolu, proto byla zvolena směs EtOH:DMSO v poměru 1:1. Tato směs byla vybrána s ohledem na kompatibilitu rozpouštědel se směšovací kazetou v přístroji NanoAssemblr. Lipidy byly tedy rozpuštěny ve směsi EtOH:DMSO. Organická fáze byla před vložením do přístroje NanoAssemblr, vortexována a temperována na teplotu 65 °C. Průtok byl nastaven na 7 ml/min a poměr organické:vodné fáze byl 1:5. Výsledné liposomy (vzorek 3), o koncentraci 1 mg/ml, byly rozděleny na dvě části. K jedné polovině liposomů byla přidána EDTA, viz kapitola 3.8.1. Na závěr byly liposomy dialyzovány 24 hodin, v 5 mM Tris o pH = 7 při laboratorní teplotě.

Pro vzorek 4, byla nachystána potřebná směs lipidů (DSPC 65 mol %, cholesterol 30 mol % a Cyanur Cap 5 mol %). Lipidy byly rozpuštěny v ethanolu. Na přístroji Nanoassemblr byl nastaven průtok 7 ml/min a poměr organické:vodné fáze byl 1:5. Ethanolová i vodná fáze byly temperovány na teplotu 65 °C. K získaným liposomům, o koncentraci 1 mg/ml, byla přidána Gd-DOTA, která byla rozpuštěná v Tris o pH 8,8. Gd-DOTA byla v pětinasobném nadbytku. Nadbytek byl vztažen k molárnímu procentu Cyanur Cap v liposomech. Poté bylo pH liposomů upraveno pomocí 1mM NaOH na 8,8. Reakce, navázání komplexu Gd-DOTA na liposomy, probíhala 16 hodin, ve tmě, za laboratorní teploty. Reakce byla zastavena snížením pH na hodnotu 7, pomocí 1 mM HCl. K jedné polovině liposomů byla přidána EDTA, viz kapitola 3.8.1. Liposomy byly 24 hodin dialyzovány v 5mM Tris o pH = 7.

Velikost liposomů a ζ -potenciál byl proměřen na přístroji Zetasizer Nano ZSP. Tyto hodnoty byly opakovaně měřeny v průběhu přípravy liposomů. Velikost liposomů byla proměřena i na přístroji Nanosight NS500. Výsledky jsou uvedeny v kapitole 4.5.

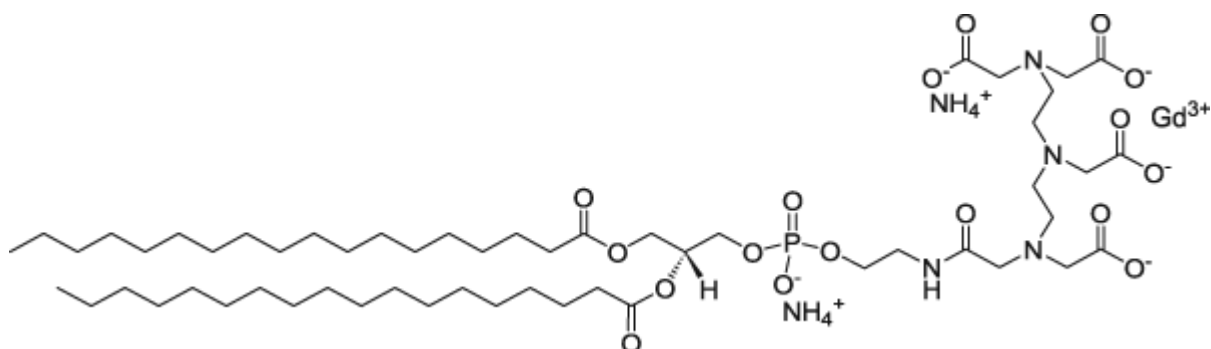
3.9 Určení morfologie liposomů, obsahujících gadolinium, pomocí cryo-TEM

Pomocí nanofluidizace byly připraveny liposomy obsahující komplexy gadolinia.

Vzorky o složení:

kontrola: DSPC 70 mol % a cholesterol 30 mol %

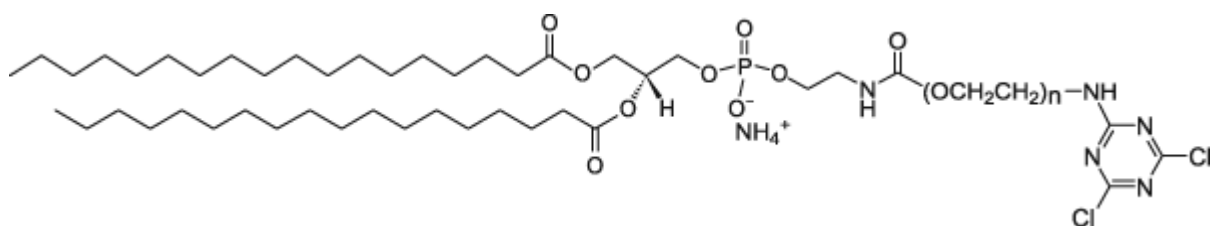
vzorek 1: DSPC 65 mol %, cholesterol 30 mol % a Gd-lipid 5 mol % (18:0 PE DTPA (Gd), 791275)



Obrázek 33: Vzorec použitého Gd-lipidu; 18:0 PE DTPA (Gd), 791275, od Avanti Lipids[90]

vzorek 2: DSPC 65 mol %, cholesterol 30 mol %, Gd-lipid 5 mol % (18:0 PE DTPA (Gd), 791275) po reakci s EDTA

vzorek 3: DSPC 65 mol %, cholesterol 30 mol %, Cyanur-PEG (DSPE-PEG(2000) Cyanur, 880122)



Obrázek 34: Vzorec použitého Cyanur-PEG; DSPE-PEG(2000) Cyanur, 880122, od Avanti Lipids[91]

byly připraveny dle postupu v kapitole 3.8.2, koncentrace liposomů byla 1 mg/ml. Morfologie vzniklých liposomů byla pozorována pomocí mikroskopu cryo-TEM Tecnai F20, v Laboratoři elektronové mikroskopie CEITEC, s pomocí Mgr. Dominika Hřebíka.

Liposomy pro cryo-TEM byly nanášeny na karbonovou síťku pomocí přístroje Vitrobot a zmrazeny v kapalném ethanu. Takto připravené vzorky byly upevněny do nástavce a byly postupně snímány pomocí cryo-TEM.

3.10 Ověření přítomnosti gadolinia v liposomech pomocí TEM se spektrometrem rentgenového záření

Liposomy o složení DSPC 65 mol %, cholesterol 30 mol %, Gd-lipid 5 mol % (18:0 PE DTPA (Gd), 791275) spolu s kontrolními liposomy (70 mol % DSPC, 30 mol % cholesterol), byly připraveny pomocí přístroje NanoAssemblr. Postup přípravy liposomů byl identický jako v kapitole 3.8.2, koncentrace liposomů byla 1 mg/ml.

Vzorky byly proměřeny v *Regionálním centru pokročilých technologií a materiálů* v Olomouci, s pomocí MVDr Pavla Kulicha, Ph.D na TEM (Jeol 2100, 100 kV) vybaveným EDS (Oxford x-MAX 80T (SSD)). EDS je určeno k rychlé kvalitativní analýze vzorku. Při bombardování zkoumaného vzorku primárními elektrony vzniká rentgenové záření, které je detekováno právě pomocí EDS.

3.11 Kvantifikace gadolinia pomocí ICP-OES

Liposomy o koncentraci 1 mg/ml, připravené na přístroji NanoAssemblr, obsahující Gd-lipid (18:0 PE DTPA (Gd), 791275), se složením DSPC 65 mol %, cholesterol 30 mol %, Gd-lipid 5 mol %, byly proměřeny na ICP-OES. Kalibrační řada byla připravena z vodného roztoku hexahydrátu chloridu gadolinitého (o čistotě 99.999%), v rozsahu od 0,1 do 50 mg/l. Kalibrační roztoky spolu se vzorky byly umístěny do autosampleru a postupně byly proměřeny. Analýza probíhala na Fakultě Chemické. VUT, v laboratoři 3062. Nastavení přístroje ICP-OES, je uvedeno v tabulce 2:

Tabulka 2: Základní nastavení přístroje ICP -OES

Přístroj	ICP-OES Ultima 2
Průtok argonu:	Plazmový plyn: 13,96 l/min Pomocný plyn: 0,78 l/min
Mlžná komora:	Cyklonová
Rychlost otáček peristaltického čerpadla:	15 rpm
Vlnová délka pro Gd:	342,246 nm
Výkon generátoru:	1 400 W

Výsledky byly po analýze zpracovány v programu MS Excel 2010.

3.12 Stanovení obsahu fosfolipidů v Gd-liposomech

Pro stanovení obsahu fosfolipidu v liposomech obsahujících Gd-lipid (18:0 PE DTPA (Gd) 791275) byl využit Stewartův test. Princip této metody spočívá ve schopnosti fosfolipidů vytvářet komplex s ferothiokyanátem draselným v organickém rozpouštědle (v chloroformu). Výhodou této metody je fakt, že anorganický fosfát neovlivňuje samotné stanovení.

Reakční činidlo, 0,1 M roztok hexa(thiokyanato)železitanu draselného, byl připraven rozpuštěním 2,307 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ a 3,881 g KSCN ve 100 ml vody.

Kalibrační křivka byla připravena z DSPC 65 mol %, 30 mol % cholesterolu a 5 mol % Gd-lipidu rozpuštěných v chloroformu. Kalibrační řada byla 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 a 0,05 mg/ml. Ke každému bodu kalibrační křivky byl přidán 1 ml reakčního činidla. Do zkumavek byly jednotlivé složky pipetovány dle tabulky 3.

Tabulka 3: Pipetovaná množství standardu, chloroformu a reagentu (ferothiokyanát):

Zkumavka č:	Standard [ml]	Chloroform [ml]	Reagent [ml]
blank	0,00	1,00	1,00
1	0,05	0,95	1,00
2	0,10	0,90	1,00
3	0,20	0,80	1,00
4	0,30	0,70	1,00
5	0,40	0,60	1,00
6	0,50	0,50	1,00

Směs byla vortexována 15 sekund a poté byla odstředěna v centrifuze, po dobu 5 minut, při 1 000 ot/min. Po odstředění byla spodní, organická fáze, odebrána a proměřena na spektrofotometru při vlnové délce 485 nm.

Vzorek liposomů (DSPC 65 mol %, cholesterol 30 mol %, Gd-lipid 5 mol %) byl připraven pomocí nanofluidizace na přístroji NanoAssemblr. Byl nastaven průtok 7 ml/min, poměr 1:5 organické:vodné (DMSO:EtOH a 5 mM Tris, pH 7) fáze a teplota termobloku byla nastavena na 70 °C. Získané liposomy o koncentraci 1 mg/ml byly zředěny na koncentraci 0,1 mg/ml. Liposomy byly poté smíseny s chloroformem, tak aby obsah DSPC a Gd-lipidu v liposomech byl v rámci kalibrační křivky. Poté byl ke vzorku přidán 1 ml reagentu, další postup byl shodný jako u kalibrační křivky.

Z rovnice regrese kalibrační křivky byl vypočítán obsah fosfolipidů ve vzorku. Stanovení vycházelo z knihy *Liposomes: a practical approach* [92].

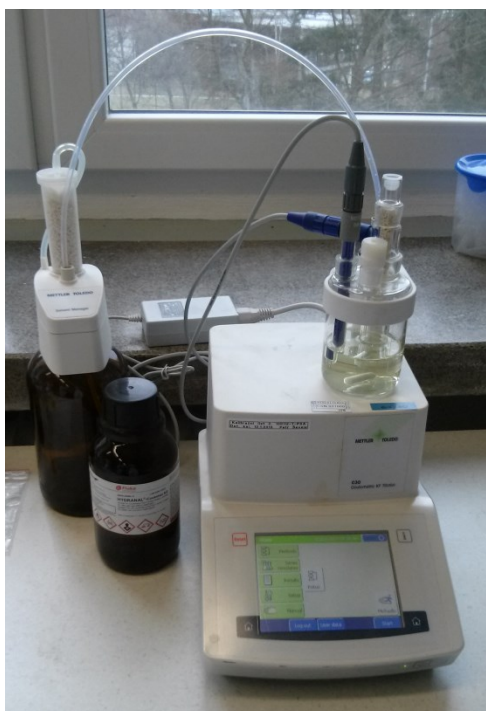
3.13 Vliv lyofilizace na velikost a ζ -potenciál liposomů

Liposomy (DSPC 65 mol %, cholesterol 30 mol %, Gd-lipid 5 mol % (18:0 PE DTPA (Gd) 791275)) připravené pomocí nanofluidizace (příprava viz kapitola 3.8.2), o koncentraci 1 mg/ml byly smíchány s kryoprotektantem, sacharózou, v molárních poměrech 1:5, 1:7 a 1:9 (liposomy:kryoprotektant), jeden vzorek byl připraven bez obsahu kryoprotektantu. Získaná směs byla sterilizovaná pomocí filtrace přes injekční filtr s velikostí pórů 0,22 μ m. Připravené roztoky byly po 1 ml rozpipetovány do skleněných vialek, určených k lyofilizaci. Vialky byly zváženy před a po naplnění vzorkem. Poté byly zmrazeny na teplotu -80°C . Samotná lyofilizace probíhala na přístroji Lyovac GT2. Vzorky byly umístěny do sušící komory vychlazené na -45°C . Proces lyofilizace probíhal 24 hodin při tlaku 8 Pa. Po lyofilizaci byly vzorky uschovány v chladničce.

Pro každý poměr vzorku a kryoprotektantu byly připraveny 2 ml vzorku, které byly rozpipetovány do 2 skleněných vialek. Po lyofilizaci byla jedna vialka s lyofilizátem použita pro stanovení zbytkové vody Karl-Fischerovou titrací. Druhá vialka (se stejným molárním poměrem vzorek:kryoprotektant) byla použita pro stanovení stability. U stability byla proměřena velikost a ζ -potenciál liposomů na přístroji Zetasizer Nano ZSP.

3.14 Stanovení zbytkové vody dle Karl-Fischera

Zbytková voda, která byla obsažena v lyofilizovaném vzorku, byla stanovena Karl-Fischerovou titrací na Karl-Fischer titrátoru, Mettler Toledo (viz obrázek 35).



Obrázek 35: Karl Fischer titrátor, Mettler Toledo, (Laboratoř NanoPharm, VÚVeL, Brno)

Jedná se o coulometrickou titraci s biamperometrickou indikací. Jde o jednu z nejpřesnějších metod pro stanovení obsahu vody v reakční směsi, ve které je díky vloženému napětí generován jod. Ten pak reaguje podle rovnice (7):



kde ROH je rozpouštědlo (byl použit methanol) a RN je báze (imidazol). Jakmile je všechna voda ztitrována, objeví se volný jod a vyvolá mezi elektrodami náhlý pokles napětí. Množství jodu, který byl vygenerován na elektrodě a plně spotřebován ve výše uvedené reakci (7) je přímo úměrný množství vody v reakční směsi [93].

Pomocí injekční stříkačky bylo, přes septum, do lyofilizátu liposomů přidáno určité množství roztoku HydranalTM Coulomat (přesné množství bylo zaznamenáno). Poté bylo do injekční stříkačky nabráno známé množství hydratovaného vzorku. Vzorek byl převeden do Karl-Fischerovy titrační nádoby. Po zadání množství vzorku bylo, pomocí Karl-Fischerova titrátoru, vypočítáno procento zbytkové vody ve vzorku.

3.15 Ověření konceptu Gd-liposomů pro zobrazování pomocí MRI

Pro ověření konceptu Gd-liposomů jako kontrastního agens pro zobrazování trombů a dalších struktur *in vivo*, byly liposomy obsahující gadolinium (DSPC 65 mol %, cholesterol 30 mol %, Gd-lipid 5 mol %) poslány na Ústav přístrojové techniky AV ČR, k panu Ing.

Radovanu Jiříkovi, Ph.D. Zde byly liposomy proměřeny na 9,4 T NMR systému Bruker-BioSpec 94/30 USR.

Liposomy byly připraveny tak, aby v 1 ml byla koncentrace gadoliniového lipidu (18:0 PE DTPA (Gd), 791275, od Avanti Lipids) 1mM. Liposomy byly připraveny pomocí hydratace lipidního filmu s následnou extruzí přes 100 nm filtr, postup byl obdobný jako v kapitole 3.8.1, pouze s rozdílem hydratačního média, kdy zde byla použita MiliQ voda.

Liposomy byly naředěny do koncentrační řady:

1 mM; 0,50 mM; 0,25 mM; 0,13 mM; 0,06 mM; 0,03 mM a 0,02 mM. Pro srovnání byla připravena stejná koncentrační řada, běžně používané kontrastní látky, Gd-DOTA, která byla rozpuštěna v destilované vodě. U těchto sérií byl změřen a porovnán relaxační čas T_1 a T_2 a vypočítána relaxivita.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace nanofluidizační metody pro přípravu liposomů

Liposomy byly připraveny pomocí nanofluidizace, za použití přístroje NanoAssemblr. Byly nastaveny různé poměry organické a vodné fáze (1:1; 1:3 a 1:5). Liposomy byly připravovány při třech rychlostech průtoku (4 ml/min, 7 ml/min a 11 ml/min), přesný postup je uveden v kapitole 3.4. Z výsledku je patrné, že největší liposomy vznikaly při poměru organické:vodné fáze 1:1. U dalších poměrů nebyla změna velikosti tak patrná, viz graf 2.

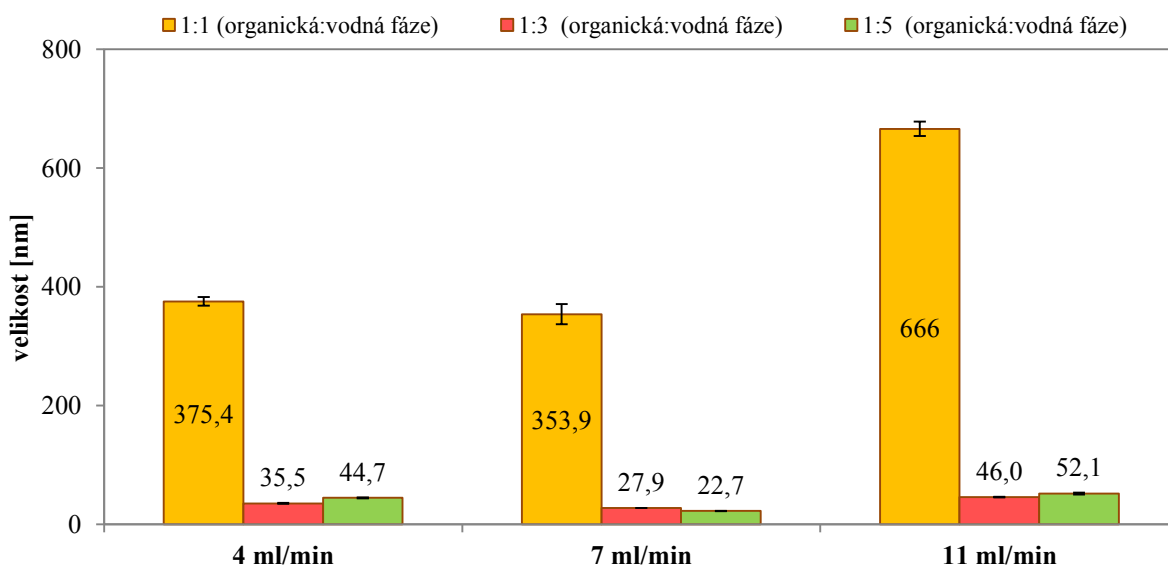
Při směšování vodné a organické fáze, při využití metody nanofluidizace, dochází k zvyšování polaroty prostředí, čímž se snižuje rozpustnost lipidů. Díky tomu se lipidy uspořádávají do rovinných dvojvrstev, které se ve snaze minimalizovat kontakt s vodným prostředím ohýbají a vezikulují za tvorby liposomálních částic [94].

Vznik největších liposomů při poměru organické:vodné fáze 1:1, lze odůvodnit tím, že při tomto poměru se polarita ve směšovací kanálku mění pozvolna. A částice mají více času na to, aby spolu interagovaly a vytvářely tak větší liposomy. U poměru s vyšším obsahem vodné fáze, například 1:3 dochází k rychlejší změně polaroty ve směšovací kanálku. Fragmentsy lipidních dvojvrstev, jejichž stabilita je nižší, mají tendenci rychleji vezikulovat a vytvářet menší liposomy. Čož bylo experimentálně prokázáno, viz graf 2

Tabulka 4: Vliv rychlosti průtoku a poměru organické:vodé fáze na velikost liposomů

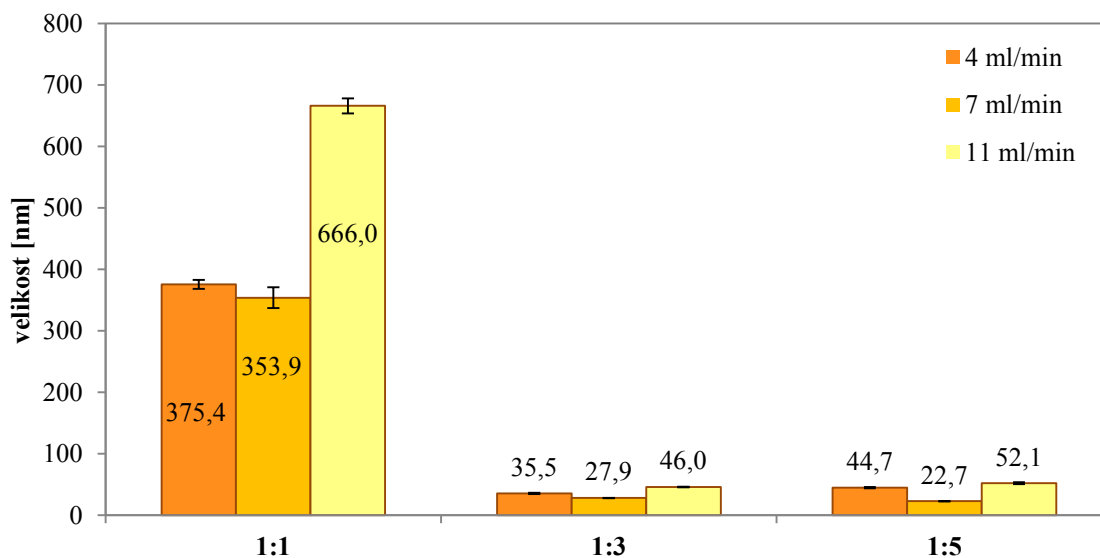
rychlost průtoku [ml/min]	poměr organické a vodné fáze					
	1:1		1:3		1:5	
	Z-Ave [nm]	PdI [1]	Z-Ave [nm]	PdI [1]	Z-Ave [nm]	PdI [1]
4	375,40 ± 7,24	0,374 ± 0,02	35,50 ± 0,96	0,59 ± 0,02	44,68 ± 0,92	0,52 ± 0,01
7	353,90 ± 16,95	0,517 ± 0,07	27,89 ± 0,06	0,39 ± 0,00	22,74 ± 0,25	0,17 ± 0,01
11	666,00 ± 12,12	0,528 ± 0,03	45,96 ± 0,38	0,54 ± 0,01	52,11 ± 1,61	0,50 ± 0,02

Měření velikosti a ζ -potenciálu probíhalo při teplotě 25 °C.



Graf 1: Vliv rychlosti průtoku na velikost liposomů

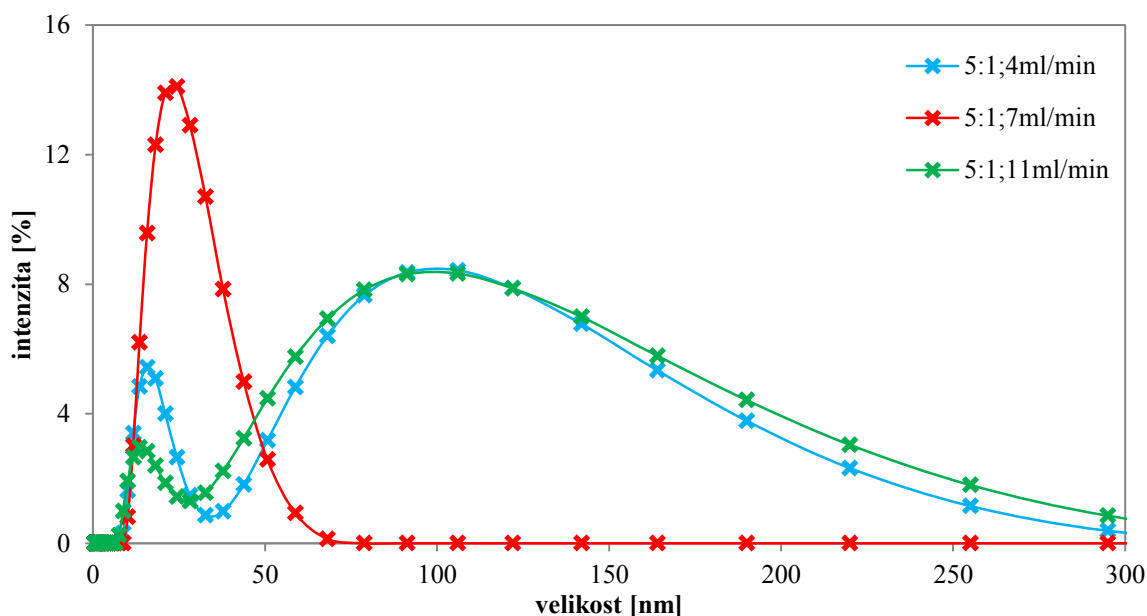
Z výsledku je patrné, že nejmenší liposomy vznikaly při průtoku 7 ml/min. Při této rychlosti navíc liposomy vykazovaly nejnižší polydisperzitu.



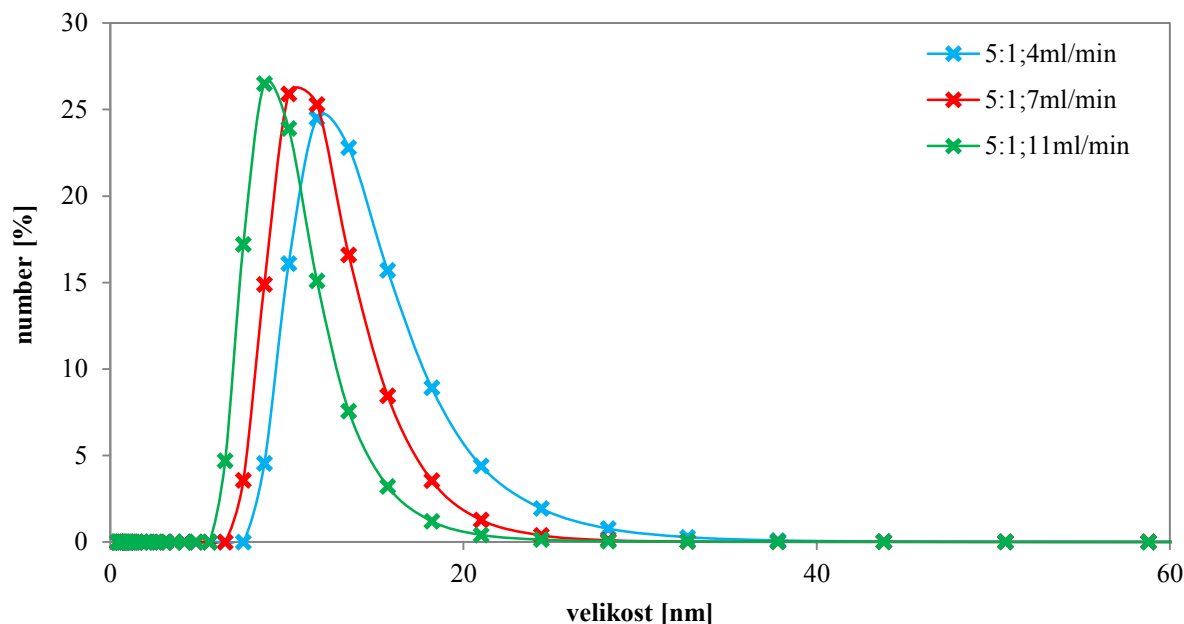
Graf 2: Vliv poměru (1:1, 1:3 a 1:5) organické:vodé fáze na velikost liposomů

Z grafu 2 je zřejmé, že velikost liposomů se se zvyšujícím poměrem vodné fáze zmenšovala. Tento trend potvrzuje i samotný výrobce přístroje NanoAssemblr. Ten se odkazuje na měření, v kterém byl použit, při výrobě liposomů, nasycený (DSPC) i nenasycený (POPC) lipid a různé poměry organické:vodné fáze[95].

Nejmenší liposomy a zároveň liposomy s nejnižší polydisperzitou byly tedy připraveny při poměru 1:5 s průtokem 7 ml/min. Toto nastavení bylo zvoleno jako optimální i z důvodu, že při ostatních poměrech a průtocích docházelo k vzniku další populace liposomů, čímž se zvyšovala hodnota polydisperzity, viz graf 3.



Graf 3: Distribuce velikosti liposomů dle změny intenzity rozptylu světla.



Graf 4: Distribuce velikosti liposomů dle změny množství částic

Z výsledků experimentů vyplývá, že zvyšující průtok urychlující mísení vodné a organické fáze, může mírně ovlivnit velikost liposomů.

4.2 Vliv lipidní kompozice a složení vodné fáze na velikost liposomů

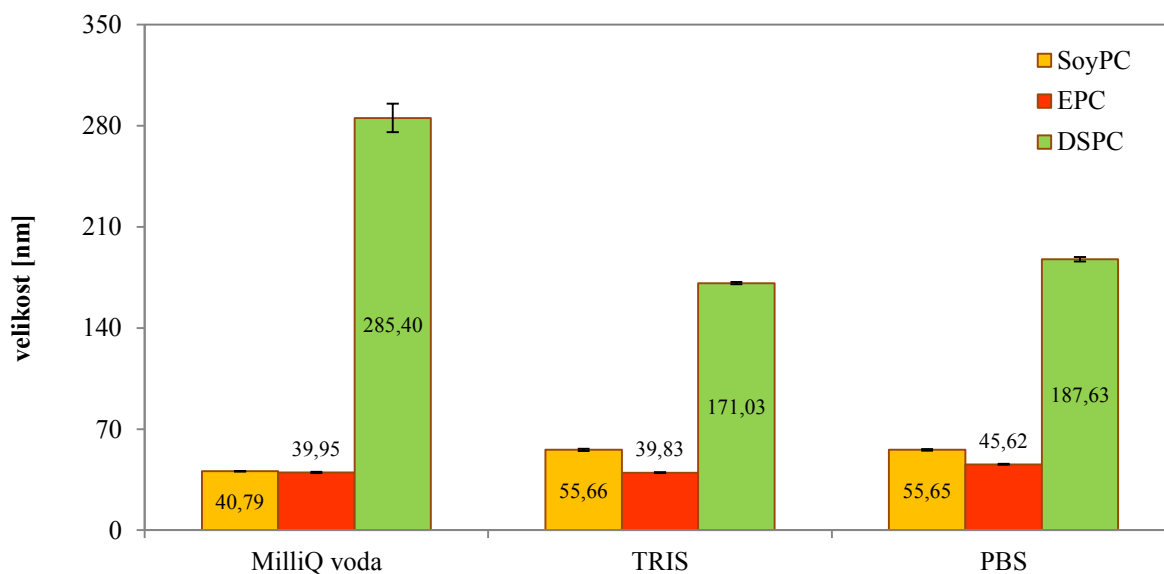
Pomocí přístroje NanoAssemblr byly připraveny liposomy za podmínek uvedených v kapitole 3.5, měření probíhalo při teplotě 25 °C. Koncentrace výsledných liposomů byla 1 mg/ml.

Tabulka 5: velikost liposomů v závislosti na různé vodné fázi a různých lipidech

lipid:	SoyPC		EPC		DSPC	
	Z-Ave [nm]	PdI [1]	Z-Ave [nm]	PdI [1]	Z-Ave [nm]	PdI [1]
vodná f.:						
H ₂ O	40,79 ± 0,11	0,10 ± 0,01	39,95 ± 0,43	0,24 ± 0,00	285,4 ± 9,92	0,70 ± 0,06
Tris	55,66 ± 0,72	0,35 ± 0,01	39,83 ± 0,29	0,20 ± 0,00	171,03 ± 0,80	0,24 ± 0,01
PBS	55,65 ± 0,60	0,25 ± 0,01	45,62 ± 0,37	0,26 ± 0,00	187,63 ± 1,59	0,24 ± 0,02

Získaná data potvrdila předpoklad, že vodná složka má vliv na velikost připravovaných liposomů. Pro SoyPC byla nejvhodnějším vodným médiem voda, v ní byly vytvářeny malé liposomy s nízkou polydisperzitou. Roztok Tris, 5mM, byl vyhodnocen jako nejlepší vodné médium pro EPC a DSPC, proto v něm budou liposomy dále připravovány (viz graf 5).

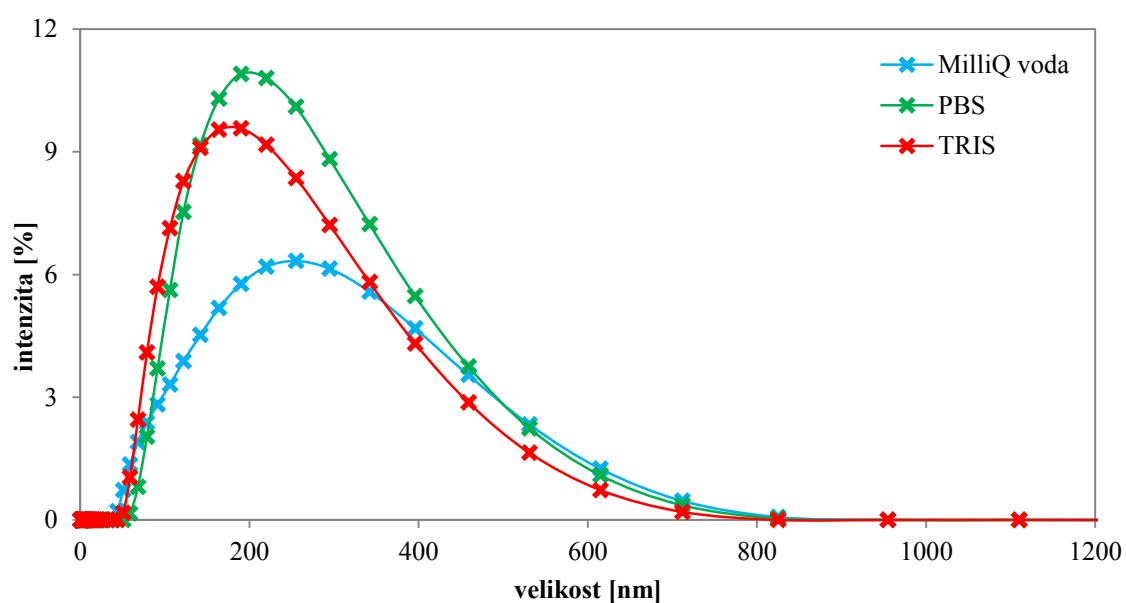
Sameer Joshi a kol (2016,[96]) potvrdil ve svém článku, předpoklad, že liposomy s nižší polydisperzitou a menší velikostí z DSPC lze lépe připravit za použití Tris jako vodného média spíše než za použití pufru PBS.



Graf 5 : Vliv vodné fáze a lipidní kompozice výslednou na velikost liposomů

Při použití vodné fáze, 5 mM, Tris, vykazovaly liposomy složené z DSPC nejmenší polydisperzitu a velikost. I přesto, že pokles polydisperzity není příliš výrazný, lze jej pozorovat na grafu 6.

Z naměřených dat lze vidět, že volba samotného lipidů ovlivňuje velikost liposomů. Velikost liposomů získaných, pomocí nanofluidizace, je pravděpodobně spjata s lipidovou kompozicí. Důležitá je délka řetězce mastných kyselin v lipidu. Pokud lipid obsahuje nenasycené mastné kyseliny je teplota fázového přechodu nižší (klesá se vzrůstajícím počtem dvojných vazeb). Naproti tomu u lipidů složených z nasycených mastných kyselin je teplota fázového přechodu vyšší, fosfolipidová membrána je rigidnější.



Graf 6: Distribuce velikosti DSPC liposomů, za použití různých vodných fází, dle změny intenzity rozptylu světla.

Z výzkumů, např Zook a kol. (2010) [97], bylo prokázáno, že u přípravy liposomů pomocí nanofluidiky je velikost získaných vezikul ovlivňována teplotou. Lipidy s vysokou T_c vykazují vysoký modul elasticity membrán, tzn., že jejich membrána je rigidnější. Z tohoto důvodu se při teplotě nižší, než je teplota fázového přechodu lipidů, vytváří větší liposomy. Tento závěr je v souladu s pozorovanými experimentálními daty. Zvýšení teploty přípravy liposomů z nasycených fosfolipidu je také potřeba kvůli zvýšení jejich rozpustnosti v ethanolu.

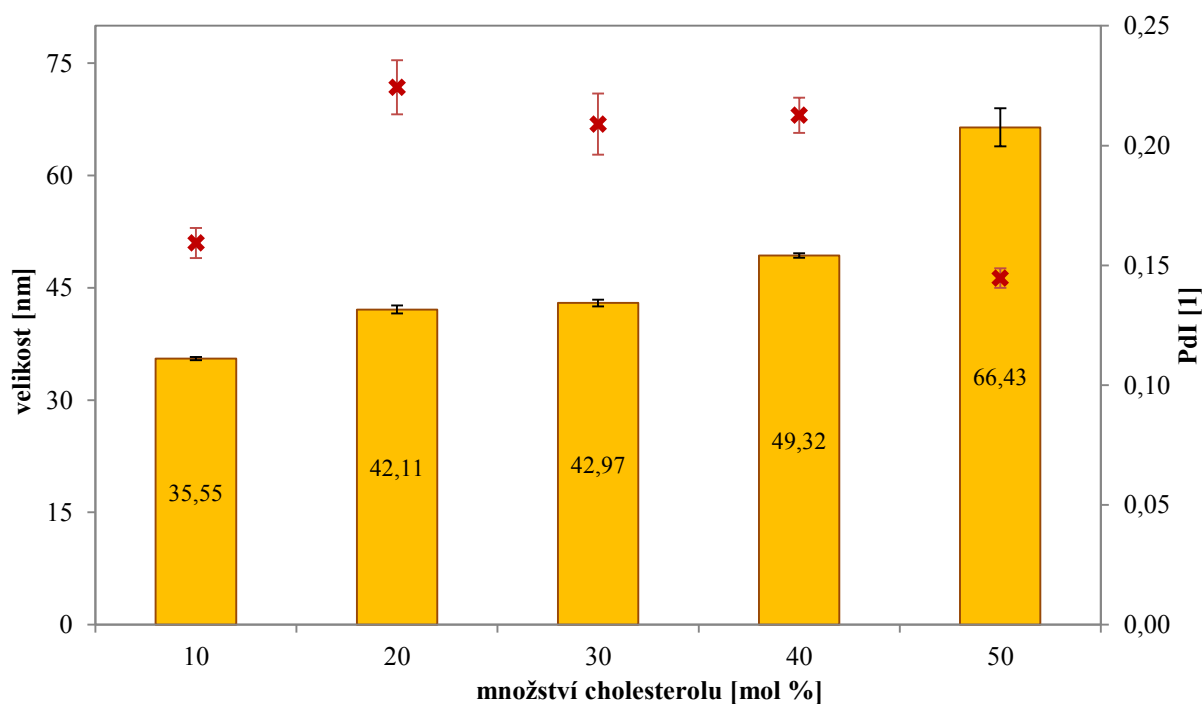
4.3 Vliv cholesterolu na velikost liposomů

Liposomy byly připraveny pomocí přístroje NanoAssemblr o koncentraci 1 mg/ml, viz kapitola 3.6. Jako první byly proměřeny liposomy z nenasyčeného lipidu EPC.

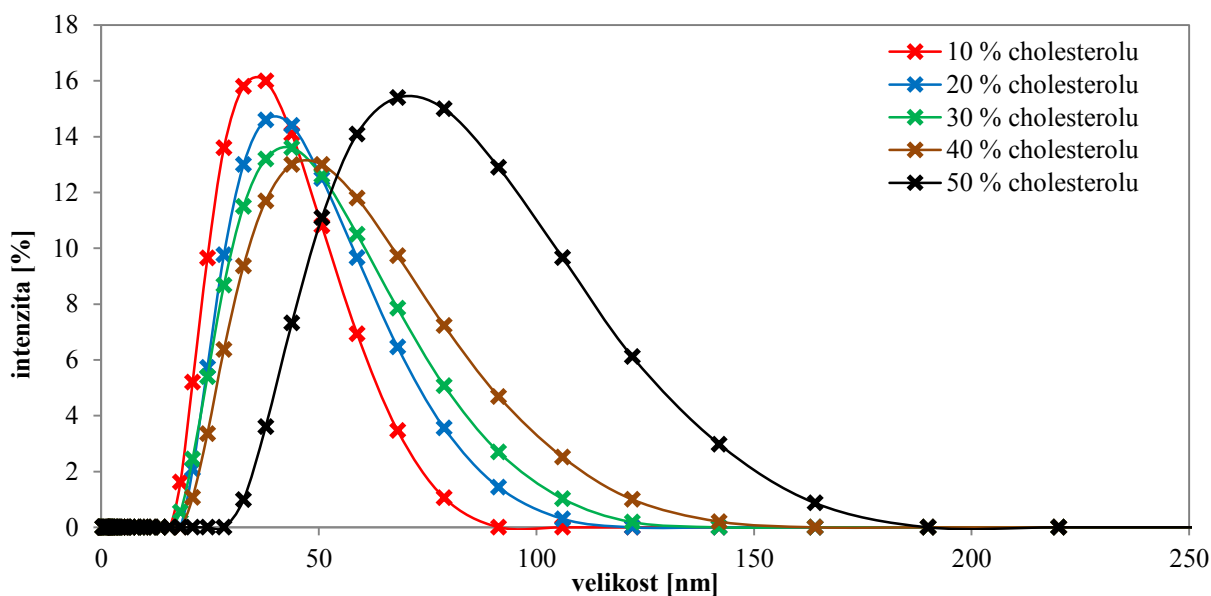
Z výsledků je patrné, že se zvyšujícím procentem cholesterolu roste velikost liposomů, viz graf 7 a 8. Tento trend je potvrzen v článku od Sarvesh Kumar Pathaka a kol. z roku 2012 [98] i v knize *Water-insoluble drug formation* [99], kde autor poukazuje na skutečnost, že se zvyšujícím se obsahem cholesterolu roste i velikost liposomů získaných pomocí nanofluidizace.

Tabulka 6: Velikost a ζ -potenciál EPC-liposomů v závislosti na různém mol % cholesterolu

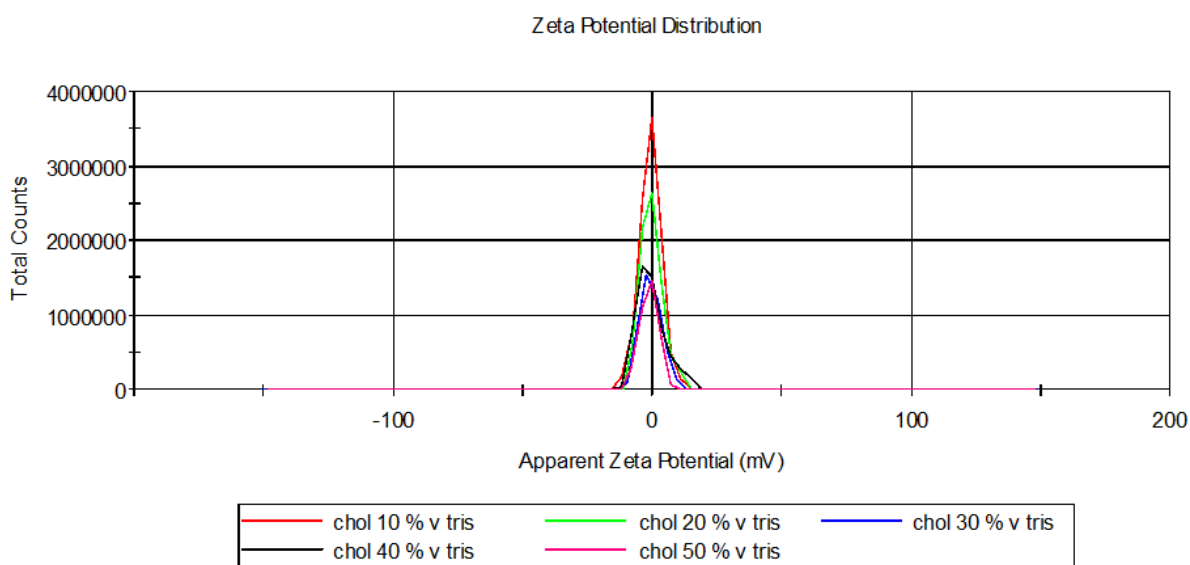
Obsah cholesterolu [mol %]	Z-Average [nm]	PdI [1]	ζ -potenciál [mV]
10	35,55 ± 0,22	0,16 ± 0,01	-0,49 ± 0,51
20	42,11 ± 0,53	0,22 ± 0,01	-0,20 ± 0,32
30	42,97 ± 0,44	0,21 ± 0,01	-0,43 ± 0,24
40	49,32 ± 0,31	0,21 ± 0,01	-0,82 ± 0,65
50	66,43 ± 2,55	0,14 ± 0,00	-1,06 ± 0,29



Graf 7: Velikost liposomů, složených z ECP a různého mol % cholesterolu



Graf 8: Distribuce velikosti EPC-liposomů, s různým mol % cholesterolu, dle změny intenzity rozptylu světla.



Graf 9: ζ -potenciál EPC-liposomů s různým mol % cholesterolu

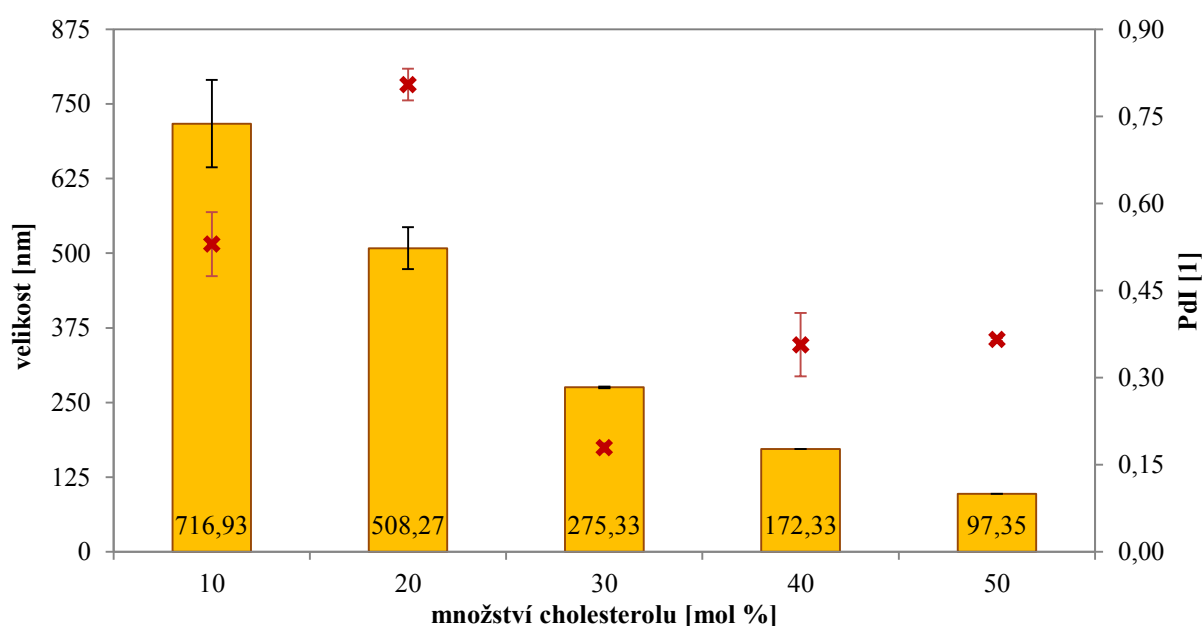
U liposomů složených z EPC lipidu s 10 až 50 mol % cholesterolu byl naměřen ζ -potenciál pohybující v rozmezí od $-0,20$ do $-1,06$ mV. ζ -potenciál pohybující se okolo nuly odpovídá liposomům bez kladného nebo záporného náboje.

Vliv cholesterolu na velikost liposomů byl ověřen i za použití DSPC lipidu, s ohledem na finální lipidovou kompozici. Liposomy byly připraveny dle postupu v kapitole 3.6. Velikosti a ζ -potenciály získaných liposomů jsou shrnuty v tabulce 7.

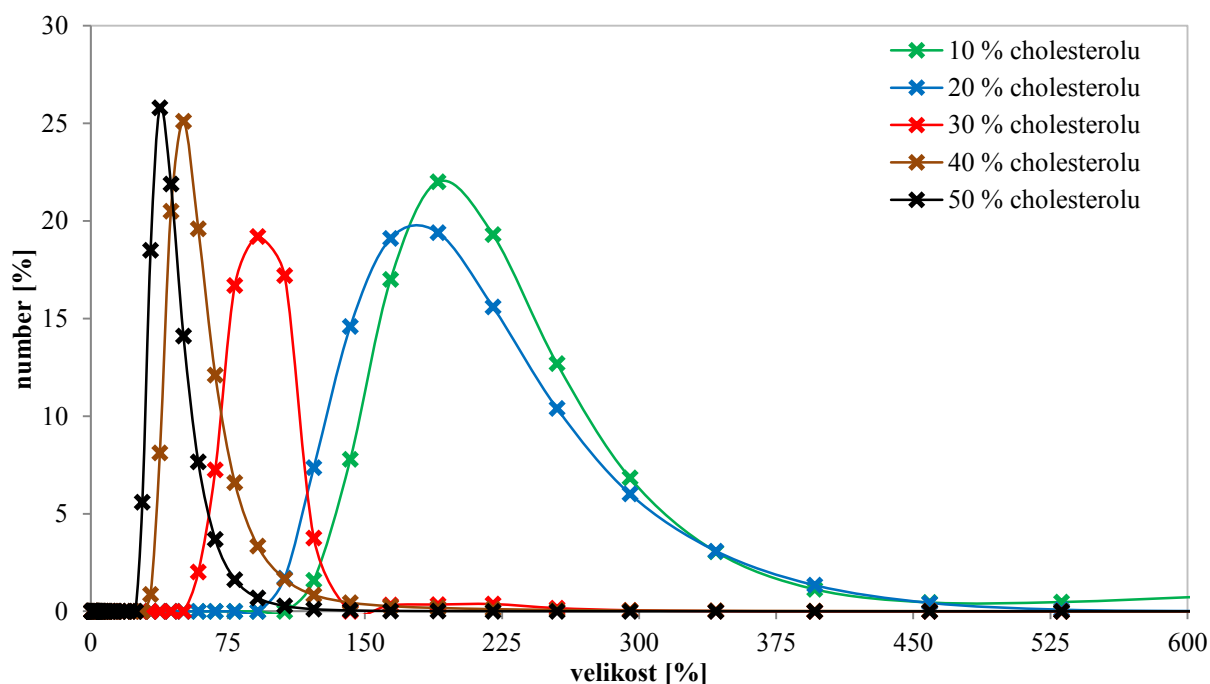
Tabulka 7: Velikost a ζ -potenciál DSPC-liposomů obsahující různé mol % cholesterolu

Obsah cholesterolu [mol %]	Z-Average [nm]	PdI [1]	ζ -potenciál [mV]
10	716,93 ± 73,35	0,53 ± 0,06	-0,04 ± 0,35
20	508,27 ± 35,12	0,80 ± 0,03	0,61 ± 0,27
30	275,33 ± 1,44	0,18 ± 0,01	-0,47 ± 0,25
40	172,33 ± 0,05	0,36 ± 0,05	-0,08 ± 0,25
50	97,35 ± 0,00	0,37 ± 0,00	0,02 ± 0,03

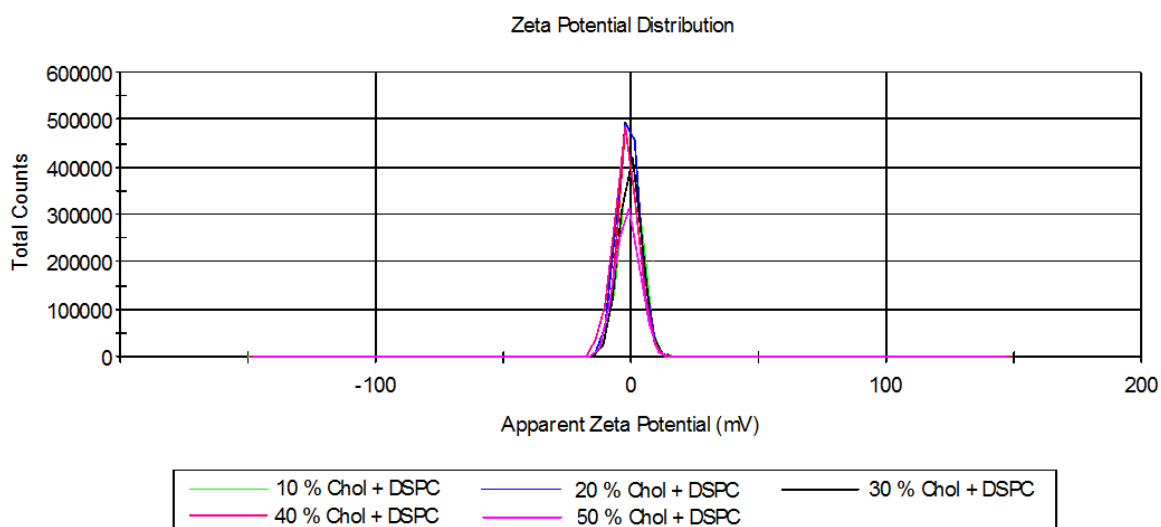
U liposomů připravených z DSPC, mělo přidávání molárního procenta cholesterolu opačný efekt než je tomu u ECP. Z výsledků je patrné, že se zvyšujícím procentem cholesterolu klesá velikost liposomů (viz graf 10). Nejlepší kompozice byla při použití 30 mol % cholesterolu a 70 mol % DSPC. Vhodnost kompozice liposomů, obsahující 30 mol % cholesterolu a 70 mol % DSPC a jejich stabilitu potvrzuje článek, který publikovala Maria-Lucia Briuglia s kol (2015, [100]).



Graf 10: Velikost DSPC-liposomů při různém mol % cholesterolu



Graf 11: Distribuce velikosti DSPC liposomů, s různým mol % cholesterolu, dle změny množství částic



Graf 12: ζ -potenciál DSPC-liposomů s různým mol % cholesterolu

Změřený ζ -potenciál, DSPC-liposomů s různým molárním procentem cholesterolu, se pohyboval stejně jako u EPC-liposomů, s různým molárním % cholesterolu, okolo nulových hodnot.

Z naměřených dat lze vyvodit, že velikost liposomů souvisí s fluiditou fosfolipidové membrány. Větší fluidita a tudíž elasticita membrány umožňuje vesikulaci menších fragmentů fosfolipidové membrány, které se tvoří při procesu nanofluidního mísení. Přídavek cholesterolu k nasyceným fosfolipidům snižuje rigidnost membrány a zvyšuje její elasticitu. To se projeví vesikulací již menších diskovitých fragmentů lipidní dvojvrstvy a tudíž tvorbou liposomů s menší velikostí. U nenasycených lipidů má přídavek cholesterolu opačný účinek.

Dochází k rigidizaci membrány a tedy k její nižší fluiditě a elasticitě. Formované fragmenty lipidní dvojvrstvy musí mít pro veskulaci větší velikost, což vede k tvorbě větších liposomů. Tento koncept, popisující mechanismus formování liposomů metodou nanofluidního směšování, je v dobrém souladu se získanými experimentálními daty. Zbytky fragmentů fosfolipidové membrány jsme také pozorovali na vzorcích liposomů pomocí kryoelektronové mikroskopie. (obrázek 41), což nás vedlo k formulování základní myšlenky konceptu tvorby liposomů metodou nanofluidního mísení, jehož ústředním motivem je tvorba fragmentu fosfolipidové membrány, ze kterého se formují finalní liposomy.

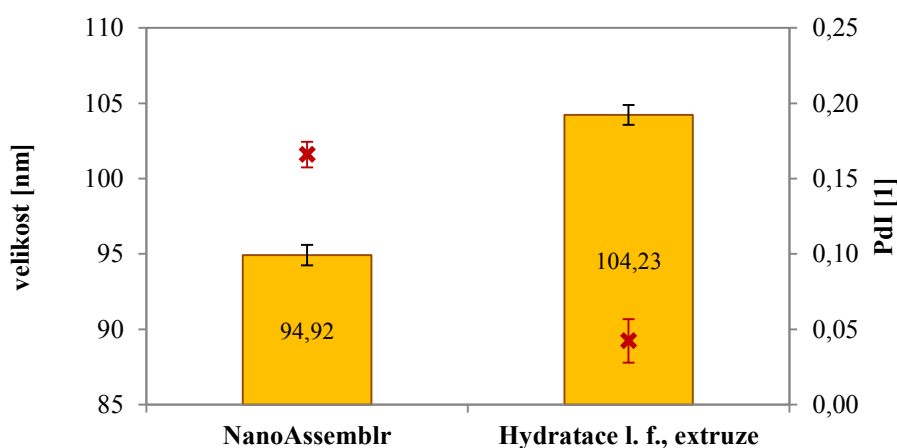
4.4 Porovnání liposomů připravených pomocí metody hydratace lipidního filmu a metodou nanofluidního mísení

Liposomy, o lipidní kompozici 70 mol % DSPC a 30 mol % cholesterolu, byly připraveny pomocí dvou metod, viz kapitola 3.7. Nanofluidizací, na přístroji NanoAssemblr a pomocí metody hydratace lipidního filmu s následnou extruzí.

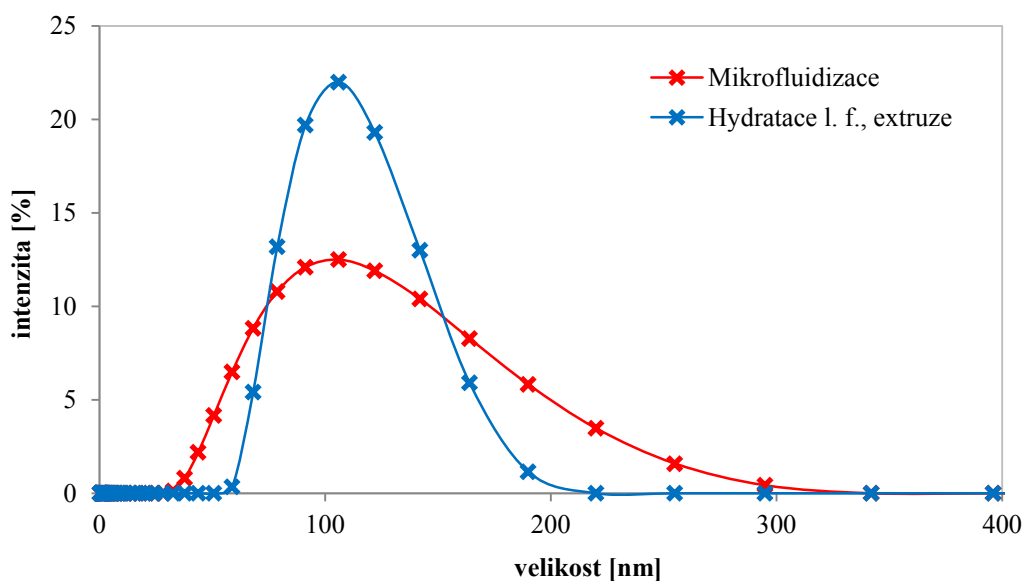
Velikost liposomů byla proměřena pomocí přístrojů Zetasizer Nano ZSP (viz tabulka 8) a NanoSight NS500; ζ -potenciál byl proměřen pomocí přístroje Zetasizer Nano ZSP.

Tabulka 8: Velikost a ζ -potenciál liposomů (70 mol % DSPC, 30 mol % cholesterolu)

Příprava pomocí	Z-Average [nm]	PdI [1]	ζ -potenciál [mV]
nanofluidizace	94,92 ± 0,68	0,17 ± 0,01	-0,54 ± 0,24
hydratace l. f., extruze	104,23 ± 0,66	0,04 ± 0,01	-1,98 ± 0,69

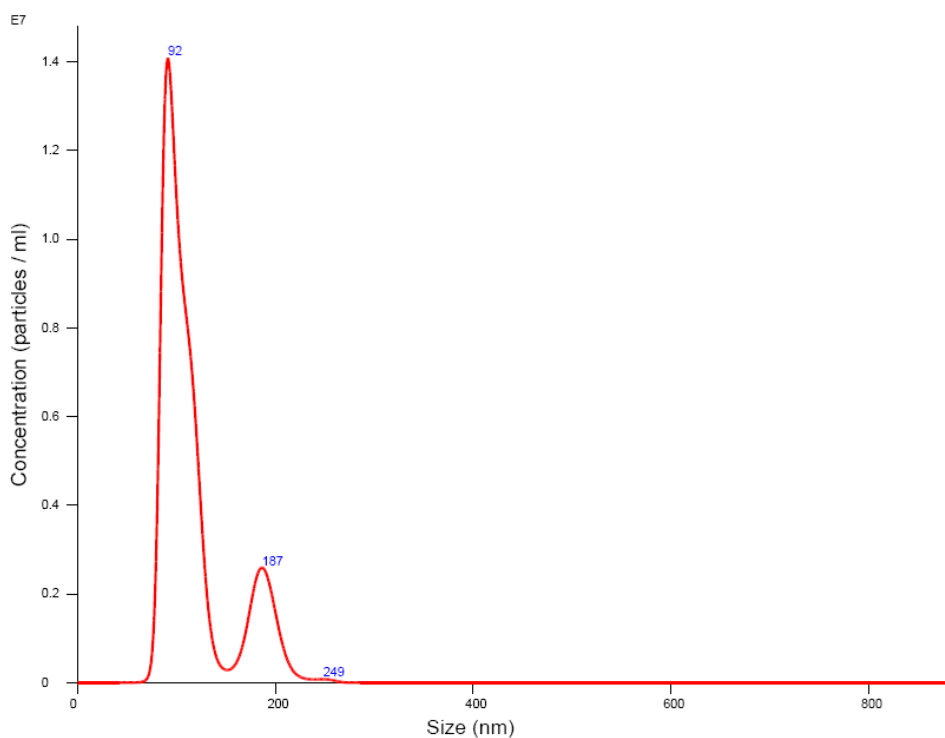


Graf 13: Velikost liposomů (DSPC, cholesterol) připravených různými metodami

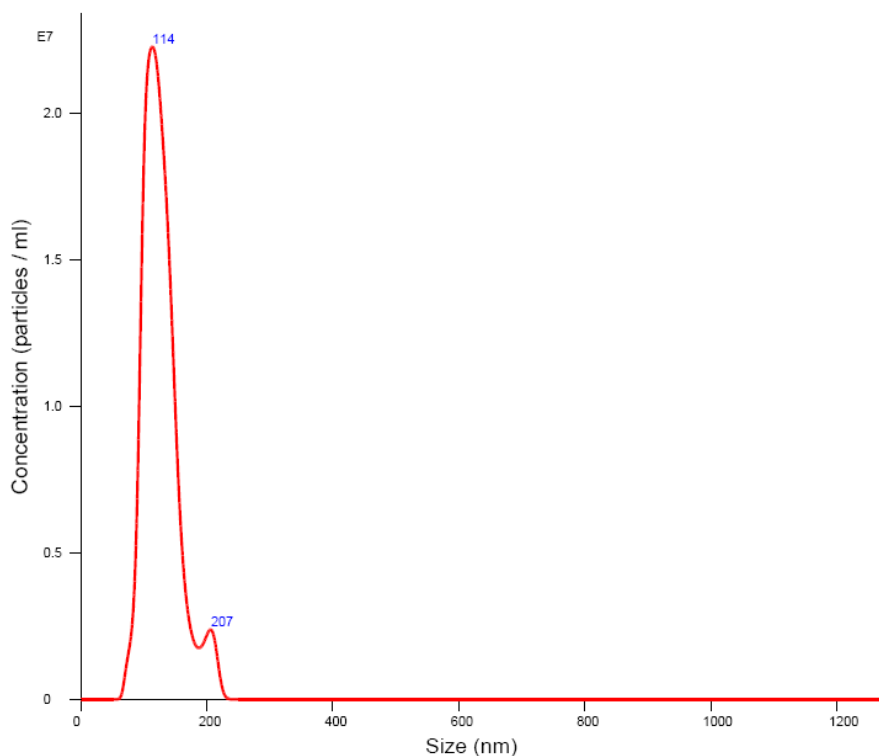


Graf 14: Distribuce velikosti liposomů (70 mol % DSPC, 30 mol % cholesterolu), dle změny intenzity rozptylu světla.

Získané výsledky z DLS (Zetasizer Nano ZSP) poukazují na to, že liposomy připravené na přístroji NanoAssemblr jsou menší, ale mají větší polydisperzitu, což lze vidět na grafu 14. Snížení polydisperzity u těchto liposomů, by se dosáhlo zařazením dalšího procesního kroku (extruze). Pro ověření velikosti byly liposomy proměřeny pomocí NTA (NanoSight NS500).



Graf 15: Velikost liposomů připravených pomocí NanoAssemblru, proměřeno pomocí NTA

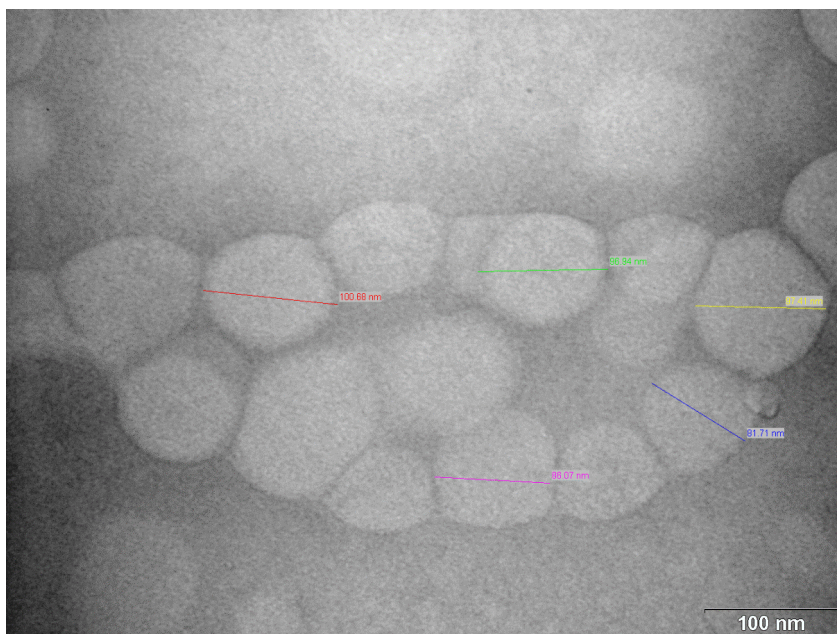


Graf 16: Velikost liposomů připravených metodou Hydratace lipidního filmu s následnou extruzí přes 100 nm filtr, proměřeno pomocí NTA

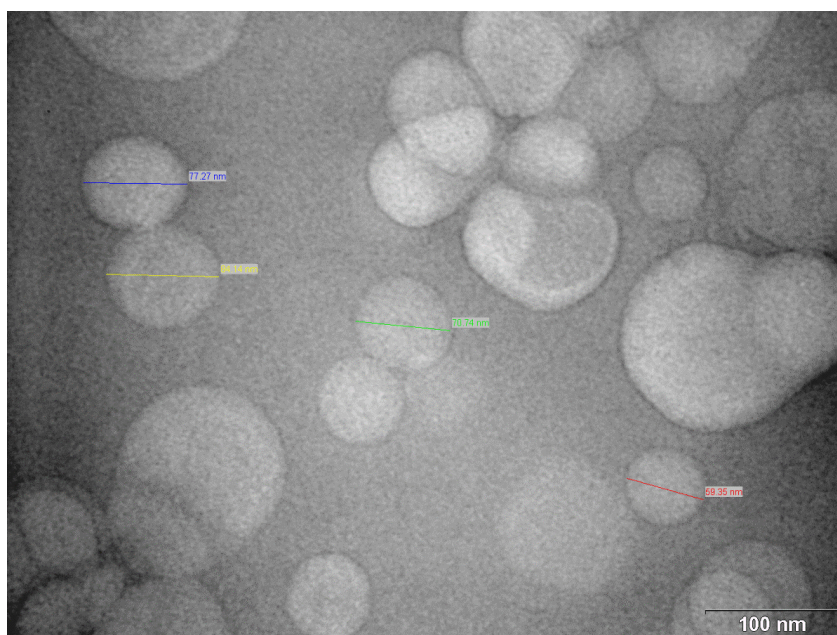
Ze získaných výsledků bylo potvrzeno, že liposomy získané z NanoAssemblru měly menší velikost. A oproti hydrataci lipidního filmu měly mírně větší polydisperzitu (viz graf 15 a 16). Velikosti získané z NTA korespondují s naměřenými velikostmi z DLS. Pro zjištění morfologie liposomů, byly liposomy proměřeny na TEM (Philips EM 208). Na obrázcích 36, 37 a 38 lze vidět struktury získaných liposomů.



Obrázek 36 : Snímek liposomů získaných pomocí hydratace lipidového filmu, před extruzí, TEM (Philips EM 208) VÚVeL, laboratoř Elektronové mikroskopie



Obrázek 37: Snímek liposomů získaných pomocí Hydratace lipidového filmu, po extruzi, TEM (Philips EM 208) VÚVeL, laboratoř Elektronové mikroskopie



Obrázek 38: Snímek liposomů získaných pomocí NanoAssemblu, TEM (Philips EM 208) VÚVeL, laboratoř Elektronové mikroskopie

Na obrázku 36 je snímek MLV, liposomů, které byly připraveny pomocí hydratace lipidního filmu. Na dalším snímku (obrázek 37) jsou liposomy připraveny toutéž metodou, kde po hydrataci lipidního filmu, byla navíc zařazena extruze, při 65 °C přes 100 nm filtr, pomocí Extrudéru Lipex (viz obrázek 13). Na snímku lze vidět poměrně homogenní populaci LUV liposomů s průměrnou velikostí okolo 90–100 nm. Oproti tomu na obrázku 38 lze pozorovat liposomy připravené pomocí nanofluidizace, na přístroji NanoAssemblr, s velikostí od 60 do 80 nm.

Snímky potvrdily, že pomocí nanofluidizace (za použití přístroje NanoAssemblr) není získaná populace liposomů tak homogenní, jak je tomu u druhé metody. Snížení polydispersity liposomů připravených nanofluidním mísením je možné dosáhnout použitím sekundárního procesu jakým je následná extruze. Avšak i bez zařazení extruze, lze pomocí přístroje NanoAssemblr připravit monodispersní liposomální preparáty v jednom rychlém kroku a s vysokou mírou reprodukovatelnosti.

4.5 Charakterizace liposomů obsahující navázané komplexy gadolinia

Vzorky byly připraveny podle kapitoly 3.8. Liposomy, které byly připraveny pomocí hydratace lipidového filmu, byly proměřeny v průběhu přípravy a bezprostředně po přípravě (vždy po 24 hod). Pátý den byly vzorky dialyzovány v 5mM Tris o pH = 7 (24 h; 25 °C). K liposomům obsahující gadolinium byly vždy připraveny i kontrolní liposomy bez gadolinia.

Tabulka 9: Velikost a ζ -potenciál liposomů obsahující Gd v různých formách, kontrola

Metoda přípravy liposomů:	Hydratace lipidového filmu a následná extruze přes 100 nm filtr			
vzorek	den	Z-Average [nm]	PdI [1]	ζ -potenciál [mV]
kontrola (DSPC 70 mol %, Chol 30 mol %)	1.	108,80 ± 0,62	0,05 ± 0,02	-1,96 ± 0,30
	2.	111,00 ± 0,78	0,05 ± 0,01	-1,81 ± 0,24
	3.	111,70 ± 0,59	0,07 ± 0,01	-2,30 ± 0,35
	4.	115,30 ± 0,43	0,04 ± 0,01	-1,99 ± 0,29
vzorek 1 (DSPC 65 mol % Chol 30 mol % + Gd-lip 5 mol %)	1.	105,90 ± 0,73	0,10 ± 0,01	-4,82 ± 0,42
	2.	110,90 ± 0,64	0,17 ± 0,02	-5,12 ± 0,39
	3.	110,20 ± 0,50	0,16 ± 0,01	-5,44 ± 0,50
	4.	111,10 ± 0,46	0,13 ± 0,02	-8,82 ± 0,45
	4. + EDTA	108,80 ± 0,52	0,14 ± 0,01	-28,1 ± 0,35
vzorek 2 (DSPC 65 mol % Chol 30 mol % + kyan. 5 mol %)	1.	112,20 ± 0,98	0,06 ± 0,01	-7,10 ± 1,56
	2.	112,90 ± 0,78	0,06 ± 0,01	-7,17 ± 1,80
	3.+ Gd-DOTA	114,20 ± 0,64	0,07 ± 0,01	-12,00 ± 1,60
	4.+ Gd-DOTA	115,70 ± 0,58	0,05 ± 0,01	-13,55 ± 2,30
	4. + Gd-DOTA +EDTA	114,50 ± 0,28	0,04 ± 0,02	-39,23 ± 2,59

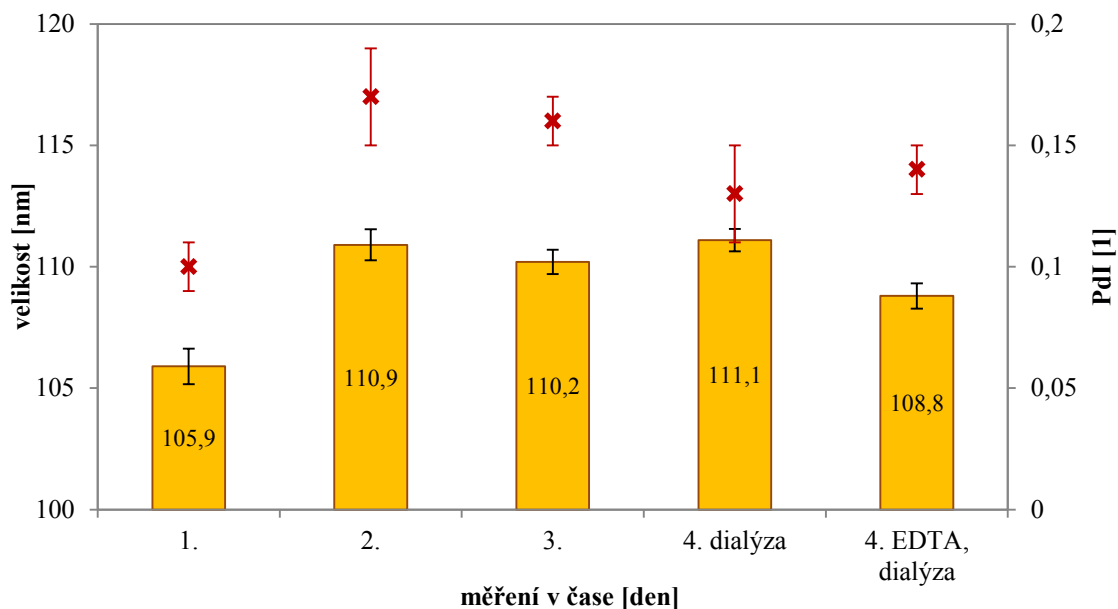
Poznámka k průběhu měření:

První den byly liposomy připraveny pomocí hydratace lipidního filmu a extrudovány při 65 °C přes 100 nm filtr.

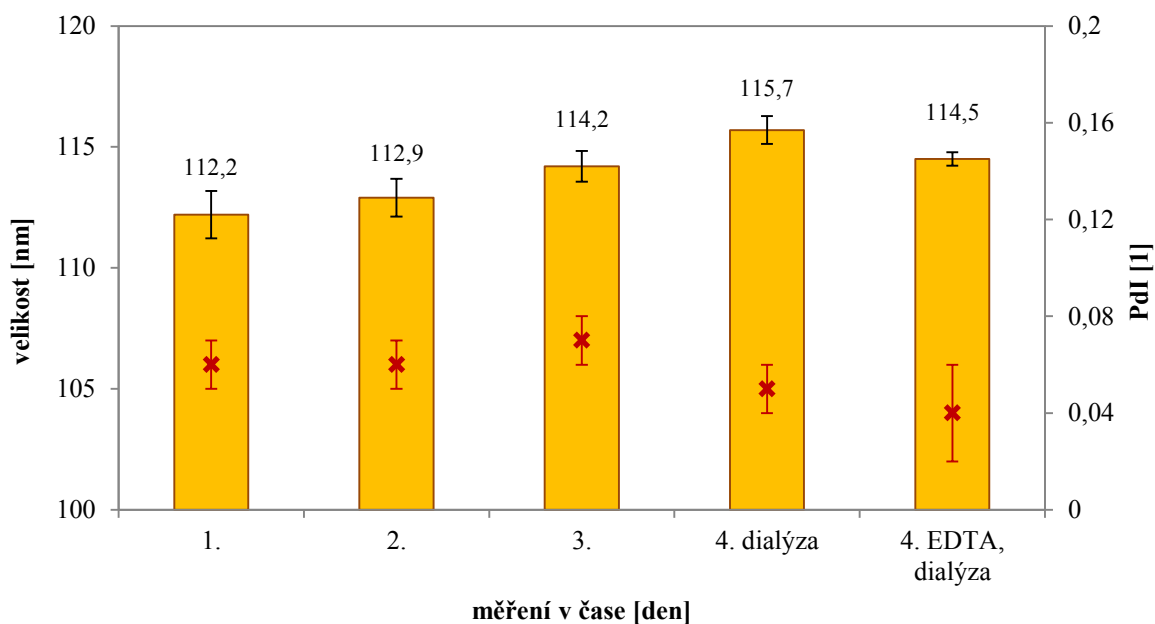
Druhý den byly liposomy proměřeny, aby byla zjištěna jejich stabilita, u vzorku 2 byla zahájena reakce liposomů s Gd-DOTA, která probíhala 16 hod, ve tmě při laboratorní teplotě.

Třetí den byla u vzorku 2 zastavena reakce s Gd-DOTA, u liposomů (vzorky 1 a 2) byla proměřena velikost a ζ -potenciál.

Čtvrtý den byla k polovině vzorku 1 a 2 přidána EDTA, všechny vzorky byly dialyzovány v 5 mM Tris o pH = 7 (24 h; 25 °C)

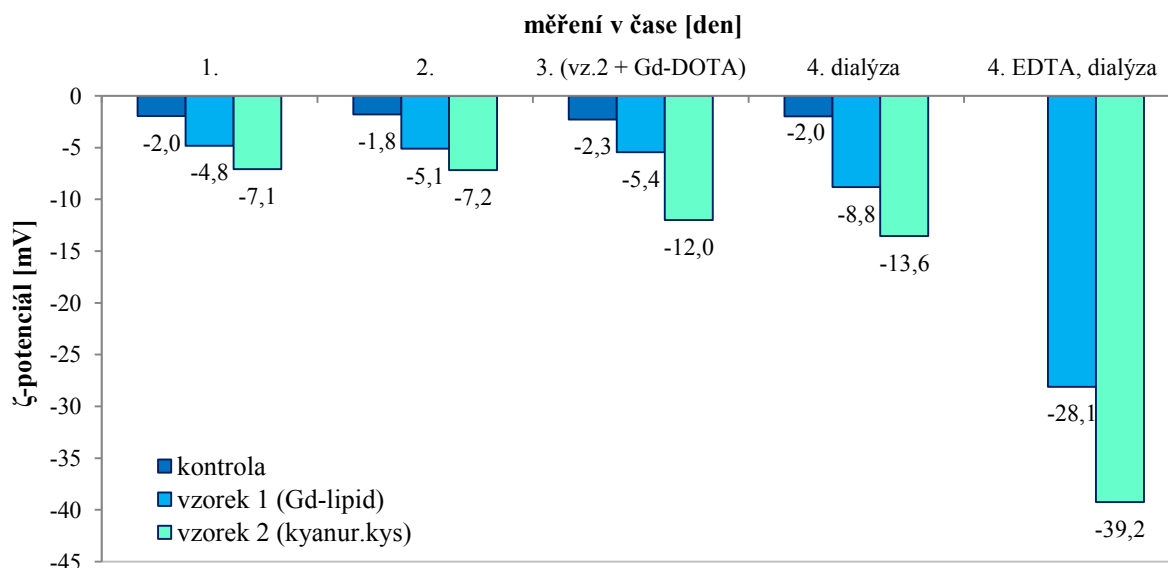


Graf 17: Velikost Gd-liposomů (Vzorek 1) připravených hydratací lipidního filmu s následnou extruzí



Graf 18: Velikost liposomů (Vzorek 2) bez nebo s navázanou Gd-DOTA (Gd-DOTA byla navázána třetí den), metoda: hydratace lipidního filmu s následnou extruzí

Graf 19 zobrazuje naměřené ζ -potenciály, pro kontrolní liposomy. Jejich hodnota byla okolo 0 mV. Po začlenění Gd-lipidu do liposomů klesla hodnota ζ -potenciálu přibližně na -5 mV (vzorek 1), po reakci s EDTA došlo k dalšímu snížení a to až na -28 mV. U liposomů obsahující Cyanur Cap PE (vzorek 2) klesl ζ -potenciál po navázání Gd-DOTA na hodnoty okolo -13 mV, po reakci s EDTA byl pokles ζ -potenciál výrazný, hodnoty se pohybovaly okolo -39 mV.

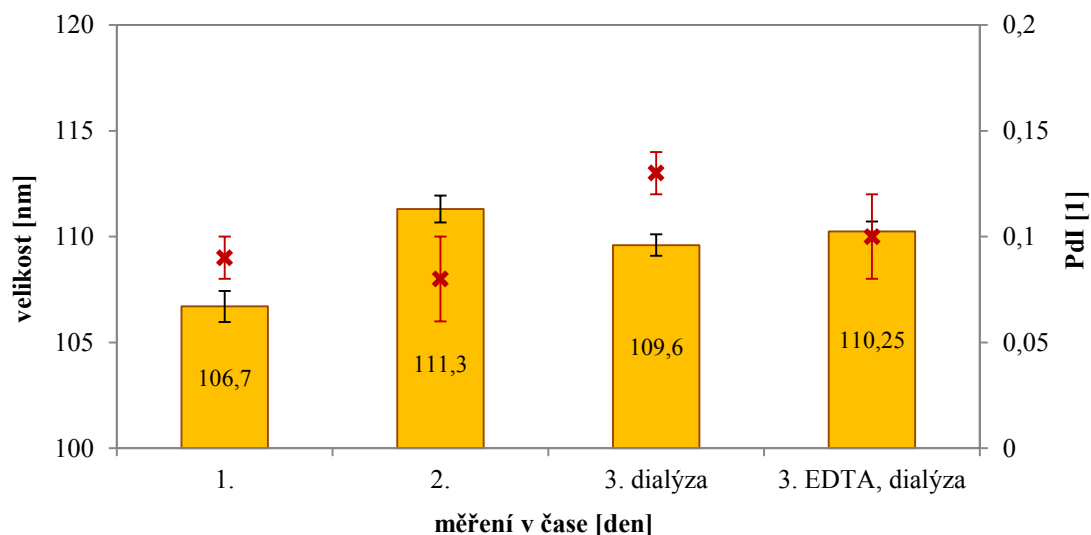


Graf 19: ζ -potenciály, kontrolních liposomů, vzorku 1 a 2, naměřené v průběhu přípravy vzorků (hydratace lipidního filmu s následnou extruzí)

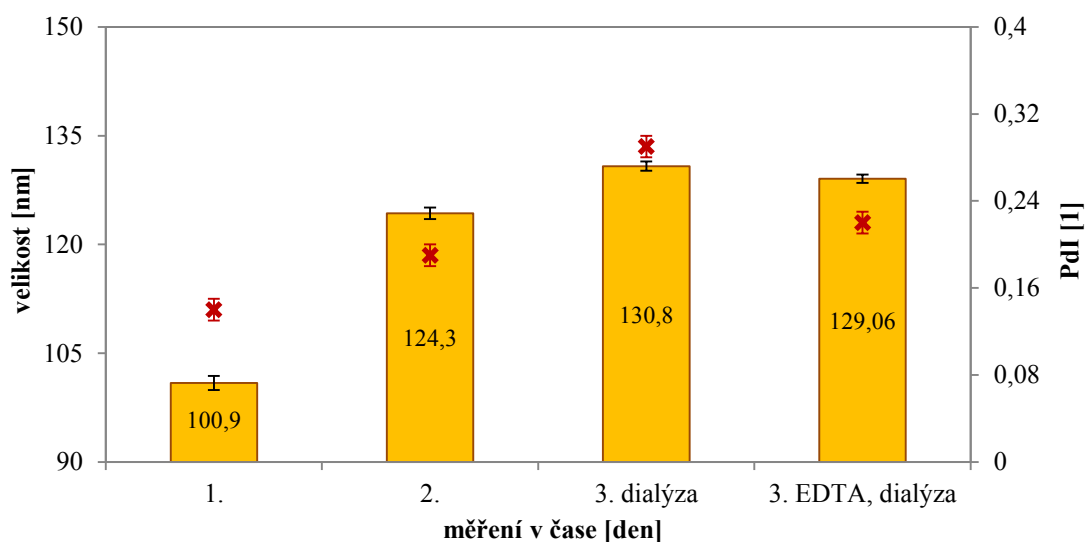
Liposomy připravené (dle kapitoly 3.8) pomocí přístroje NanoAssemblr byly proměřeny v průběhu přípravy a bezprostředně po přípravě (vždy po 24 hod). Třetí den byly vzorky dialyzovány v 5 mM Tris o pH = 7 (24 h; 25 °C). K liposomům obsahující gadolinium byly připraveny i kontrolní liposomy bez gadolinia.

Tabulka 10: Velikost a ζ -potenciál liposomů obsahující Gd v různých formách, kontrola

Metoda přípravy liposomů: Nanofluidní směšování (pomocí přístroje NanoAssemblr)				
vzorek	den	Z-Average [nm]	PdI [1]	ζ -potenciál [mV]
kontrola (DSPC 70 mol %, Chol 30 mol %)	1.	94,82 ± 0,40	0,07 ± 0,01	-0,36 ± 0,05
	2.	104,30 ± 0,60	0,13 ± 0,02	-1,13 ± 0,12
	3.	110,40 ± 2,57	0,18 ± 0,04	0,13 ± 0,09
Vzorek 3 (DSPC 65 mol % Chol 30 mol % + Gd-lip 5 mol %)	1.	106,70 ± 0,60	0,09 ± 0,01	-5,60 ± 1,20
	2.	111,30 ± 0,30	0,08 ± 0,01	-6,56 ± 1,35
	3.	109,60 ± 2,58	0,13 ± 0,02	-8,90 ± 1,68
	3. + EDTA	110,25 ± 1,16	0,10 ± 0,02	-34,00 ± 3,95
Vzorek 4 (DSPC 65 mol % Chol 30 mol % + kyan. 5 mol %)	1.	100,90 ± 0,90	0,14 ± 0,01	-8,84 ± 2,36
	2.+ Gd-DOTA	124,30 ± 1,03	0,19 ± 0,02	-13,80 ± 3,45
	3.+ Gd-DOTA	130,80 ± 2,30	0,29 ± 0,01	-14,81 ± 1,45
	3. + Gd-DOTA + EDTA	129,06 ± 2,05	0,22 ± 0,02	-42,12 ± 3,01



Graf 20: Velikost Gd-liposomů (Vzorek 3) připravených nanofluidním směřováním (pomocí přístroje NanoAssemblr)

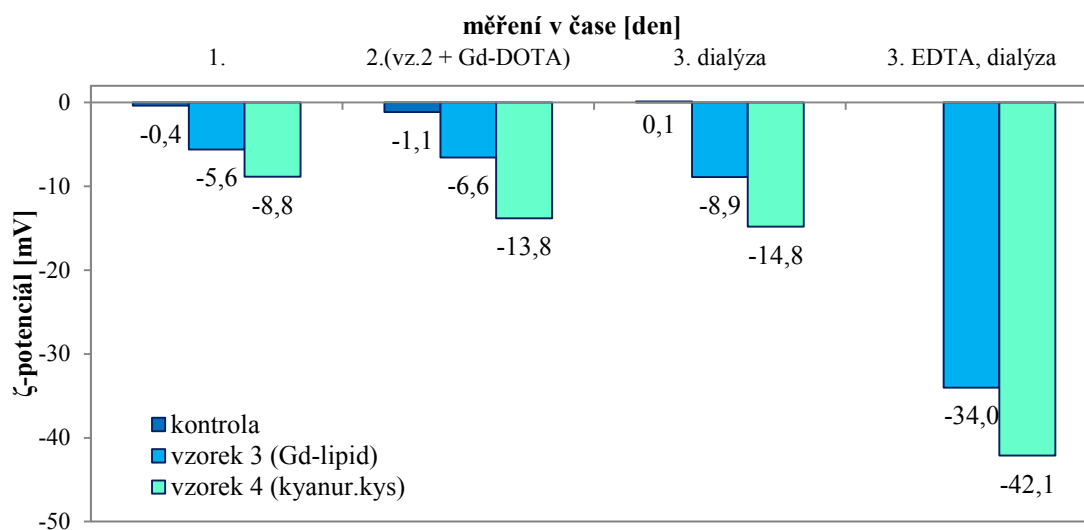


Graf 21: Velikost liposomů (Vzorek 4) bez nebo s navázanou Gd-DOTA (Gd-DOTA byla navázána druhý den) připravených pomocí nanofluidizace (NanoAssemblr)

ζ -potenciál kontrolních liposomů se pohyboval, stejně jako u metody hydratace lipidového filmu, okolo 0 mV. Po začlenění Gd-lipidu do liposomu se hodnota ζ -potenciálu snížila a pohybovala se od -6 do -9 mV, po reakci s EDTA byl pokles ζ -potenciál výrazný (až na -34 mV). U vzorku 4, po navázání Gd-DOTA na liposomy a po reakci s EDTA se ζ -potenciál výrazně snížil a to až na hodnotu -42 mV.

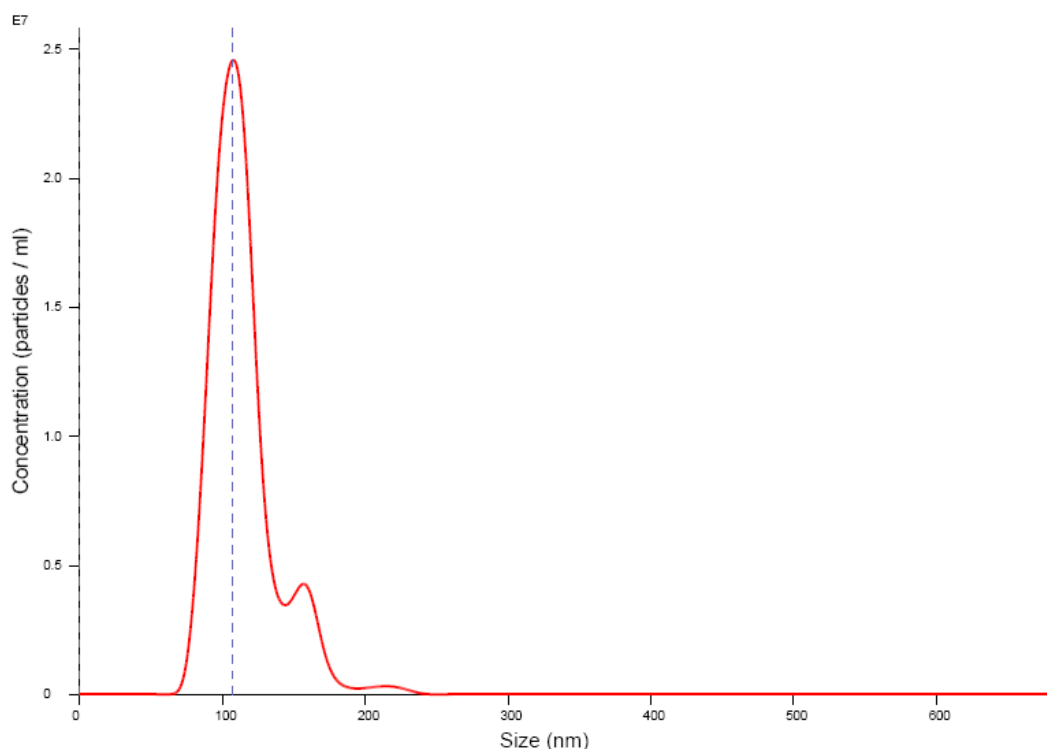
Hodnoty ζ -potenciálu citlivě reflektují změny povrchového náboje, který je výsledkem uvolňování iontů Gd^{3+} z chelatačního komplexu Gd-lipid, nebo z Gd-DOTA navázané na liposomech. Odstranění Gd^{3+} z komplexu pomocí chelatačního činidla (např. mnou použitá EDTA) vedl zároveň k uvolnění karboxylových ligandů z komplexu a tyto negativně nabitě karboxylové skupiny výrazně zvyšovaly negativní povrchový náboj liposomů,

což se projevilo negativnějším ζ -potenciálem. Tato skutečnost byla experimentálně potvrzena (viz. graf 19 a 22).

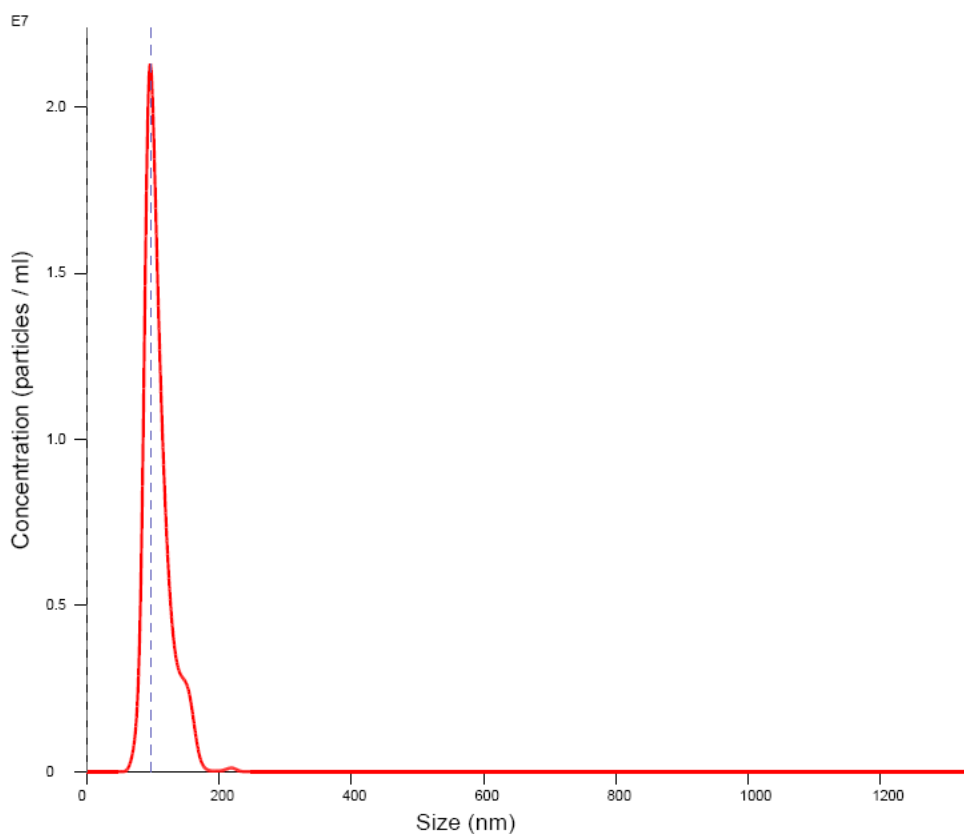


Graf 22: ζ -potenciály, kontrolních liposomů a vzorků 3 a 4, naměřené v průběhu přípravy vzorků (nanofluidizací (pomocí přístroje NanoAssemblr))

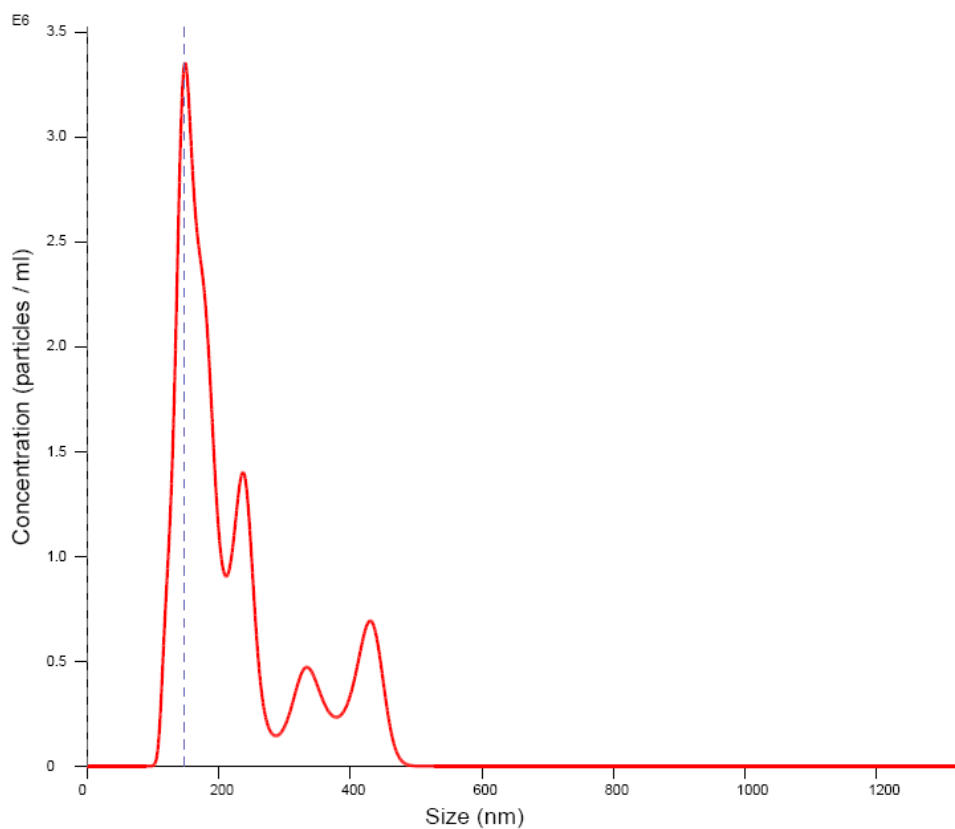
Pro confirmaci výsledků z metody DLS byly liposomy proměřeny také metodou NTA (přístroj NanoSight).



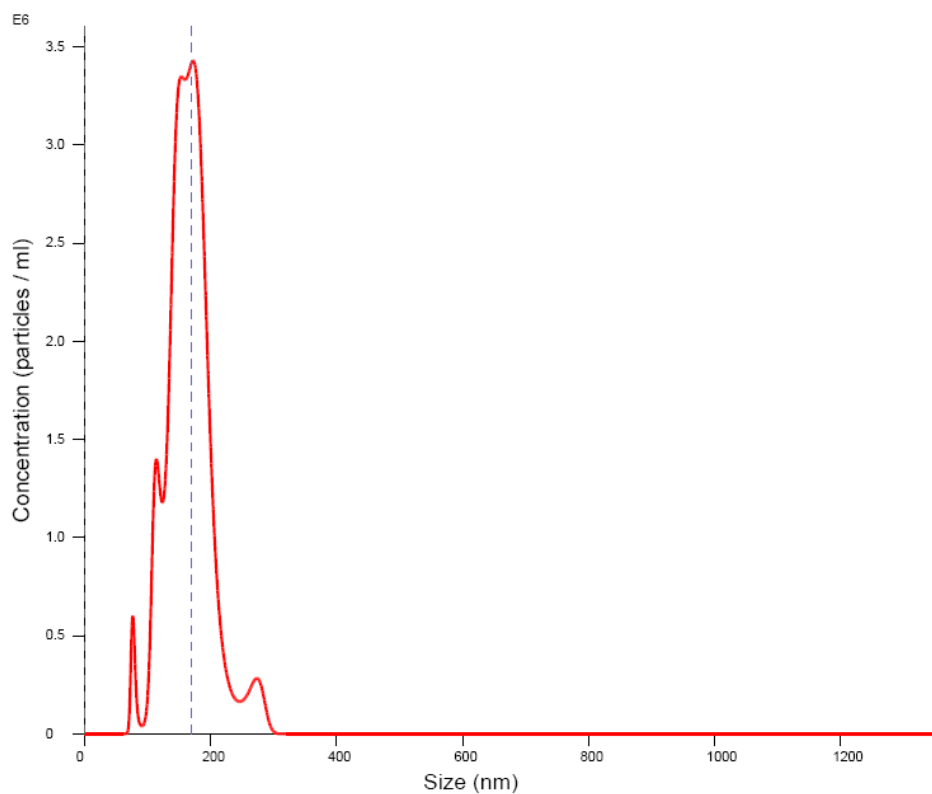
Graf 23: Gd-liposomy (Gd-lipid, DSPC, cholesterol), 107 nm, připravené metodou Hydratace lipidového filmu s následnou extruzí, proměřeno pomocí NTA



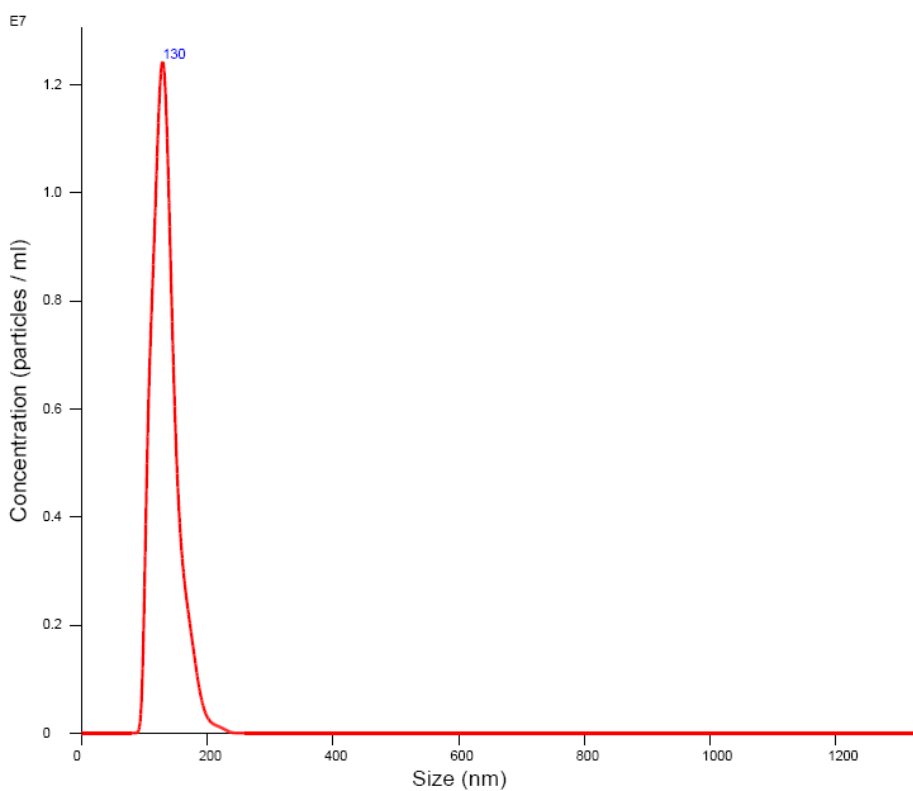
Graf 24: *Gd-liposomy + EDTA (Gd-lipid, DSPC, cholesterol), 98 nm, připravené metodou Hydratace lipidového filmu s následnou extruzí, proměřeno pomocí NTA*



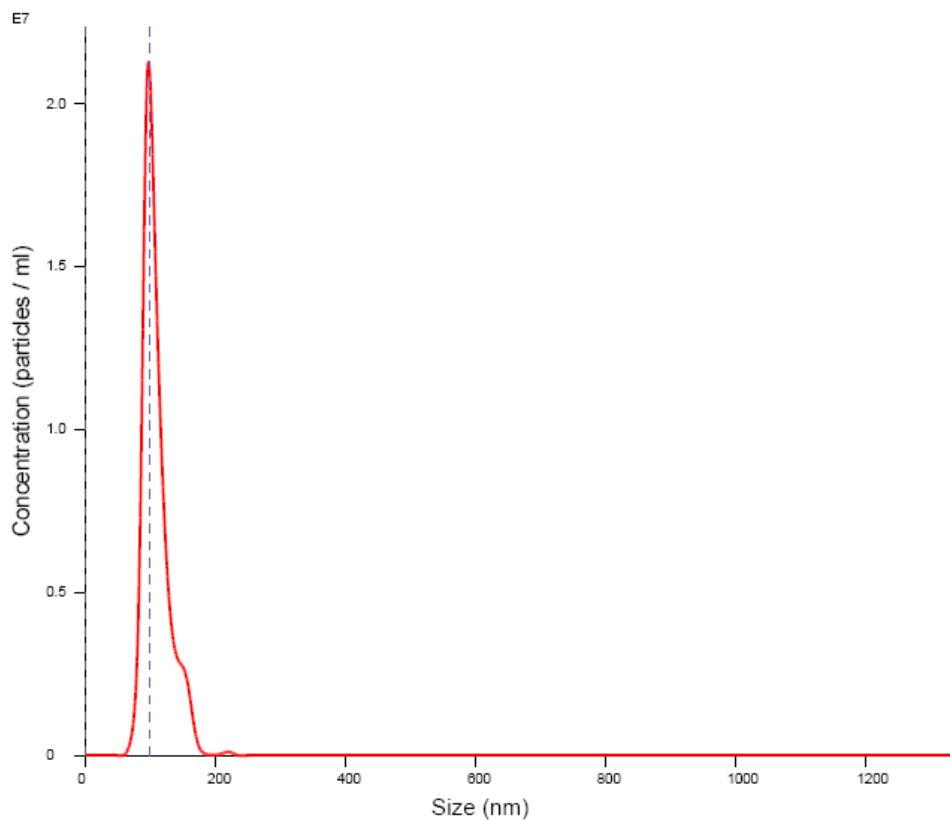
Graf 25: *Gd-liposomy (Gd-lipid, DSPC, cholesterol), 148nm, připravené pomocí NanoAssemblu, proměřeno pomocí NTA*



Graf 26: *Gd-liposomy + EDTA (Gd-lipid, DSPC, cholesterol), 160 nm, připravené pomocí NanoAssemblru, proměřeno pomocí NTA*



Graf 27: *Liposomy modifikované Gd-DOTA (Cyanur CAP, DSPC, cholesterol), 130 nm, připravené metodou Hydratace lipidového filmu s následnou extruzí, proměřeno pomocí NTA*

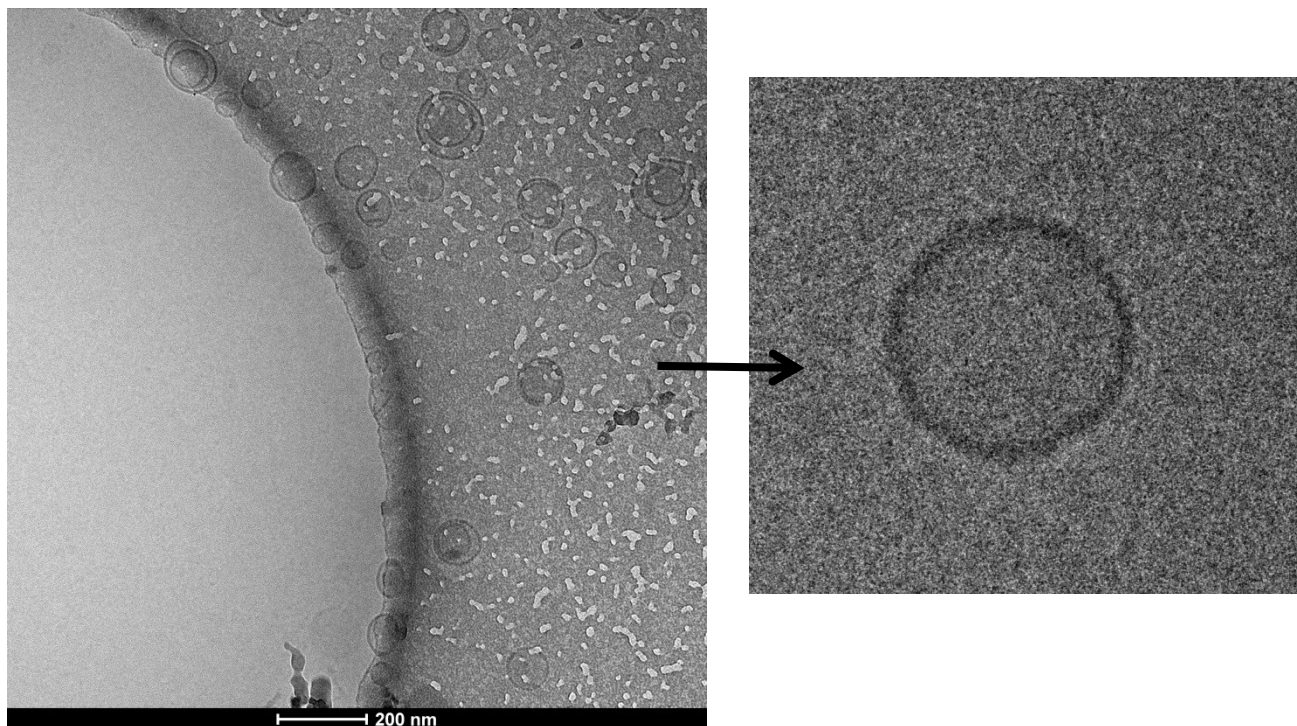


Graf 28: *Liposomy modifikované Gd-DOTA (Cyanur CAP, DSPC, cholesterol), 105 nm, připravené pomocí NanoAssemblru, proměřeno pomocí NTA*

Metoda NTA je méně citlivá k detekci liposomů o velikosti pod 50 nm. Toto omezení může posunout měřené hodnoty preparátů na hraně citlivost NTA do vyšších hodnot velikostí. Nicméně, velmi dobře výsledky korelují zejména s ohledem na polydispersitu preparátů připravených nanofluidním mísením a hydratací lipidního filmu spojenou s extruzí přes 100 nm polykarbonátové filtry.

4.6 Určení morfologie Gd-liposomů, pomocí cryo-TEM

Pomocí nanofluidního směšování byly připraveny čtyři vzorky liposomů (viz kapitola 3.9): kontrolní vzorek (DSPC 70 mol % a cholesterol 30 mol %), vzorek 1 (DSPC 65 mol %, cholesterol 30 mol % a Gd-lipid 5 mol %). Vzorek 2 (DSPC 65 mol %, cholesterol 30 mol %, Gd-lipid 5 mol %) byl po reakci s EDTA a na vzorek 3 (DSPC 65 mol %, cholesterol 30 mol %, Cyanur-PEG) byla navázána Gd-DOTA. Všechny liposomy byly připravovány o koncentraci 1 mg/ml. Liposomy byly sledovány na cryo-TEM Tecnai F20 v laboratoři elektronové mikroskopie, CEITEC Brno.

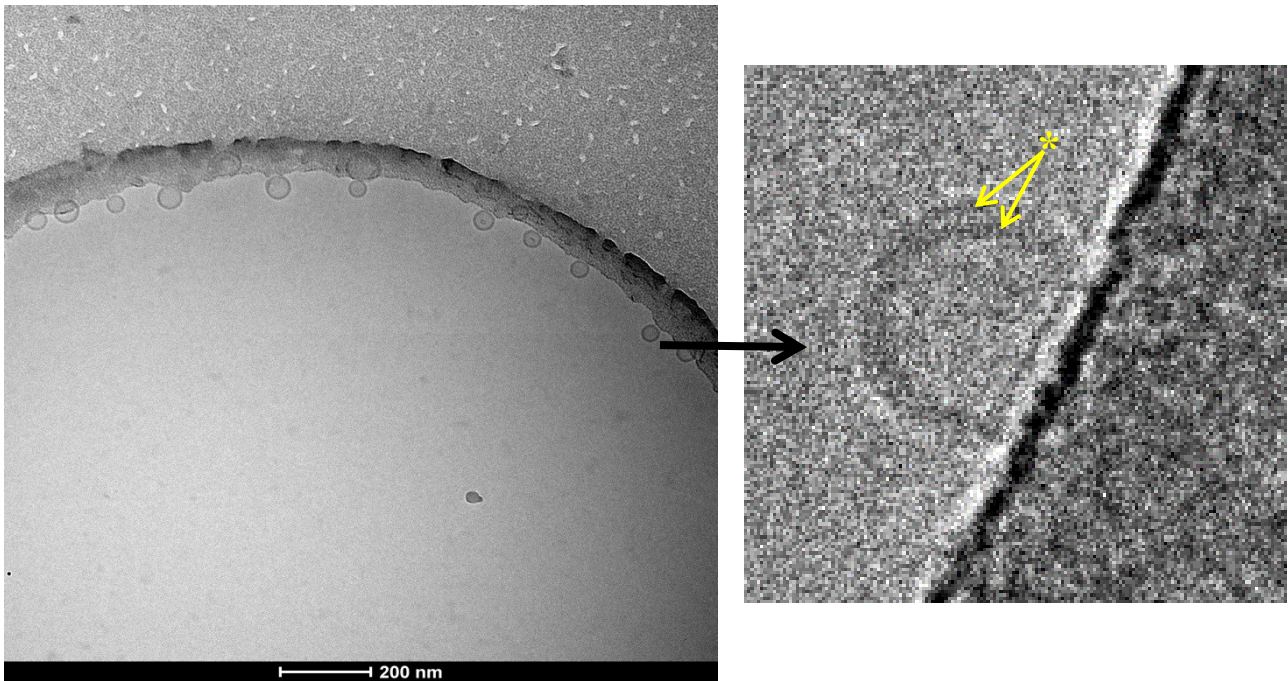


Obrázek 39: Snímek kontrolních liposomů (70 mol % DSPC, 30 mol % cholesterol), cryo-TEM Tecnai F20 Laboratoř elektronové mikroskopie, CEITEC Brno

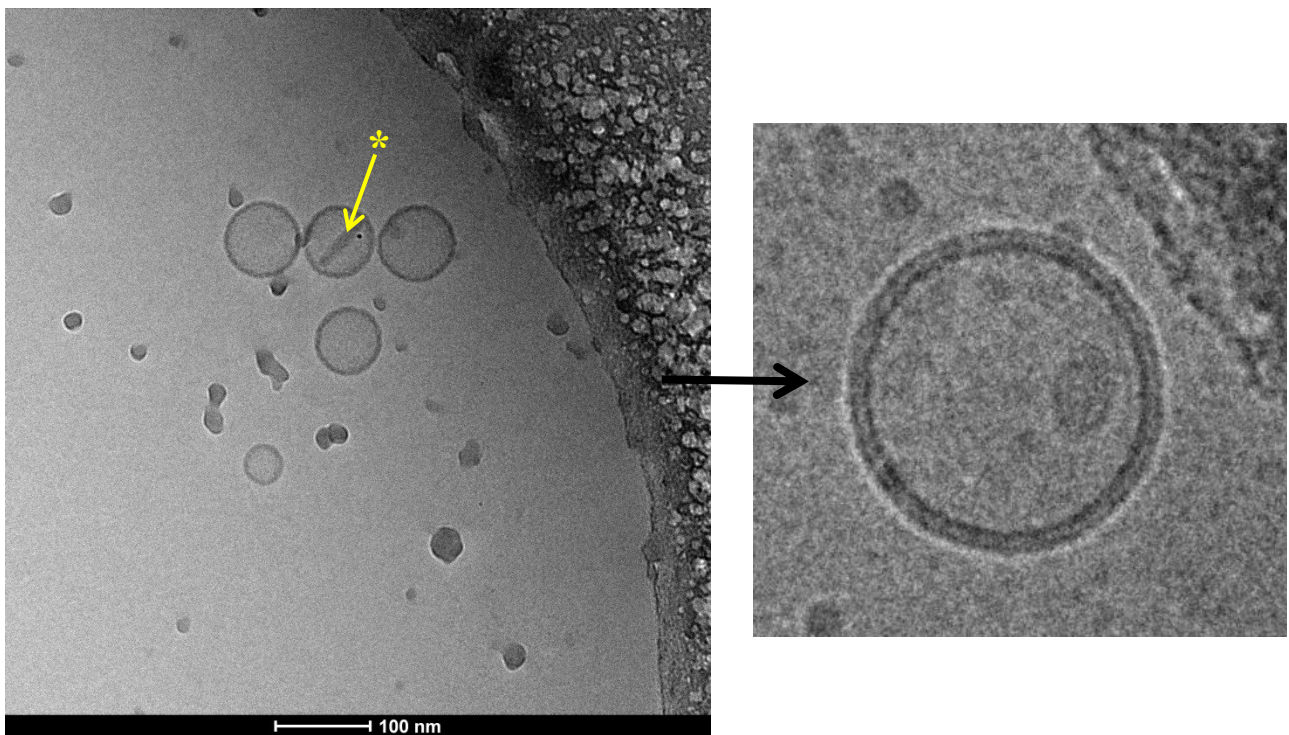
Obrázek 39 zachycuje kontrolní mono a bilamelární liposomy složené pouze s DSPC a cholesterolu. Na snímcích lze vidět, že stěna liposomů byla tenčí v porovnání s liposomy obsahující gadolinium. V průměru dosahovala šířka stěny kontrolních liposomů 4,3 nm.

Na obrázku 40 jsou snímky liposomů obsahující Gd-lipid (65 mol % DSPC, 30 mol % cholesterol, 5 mol % Gd-lipid). U zvětšeného liposomu lze pozorovat gadolinium navázané z vnější i vnitřní stěny fosfolipidové dvojvrstvy. Tloušťka fosfolipidové dvojvrstvy u těchto liposomů byla v průměru 6 až 7 nm. Po reakci s EDTA se tloušťka dvojvrstvy snížila v průměru na 5,3 až 6,3 nm. Kontrastnější je u těchto liposomů vnitřní strana fosfolipidové dvojvrstvy, kde zůstalo navázané gadolinium. Tuto skutečnost, lze pozorovat u zvětšeného liposomu na obrázku 41.

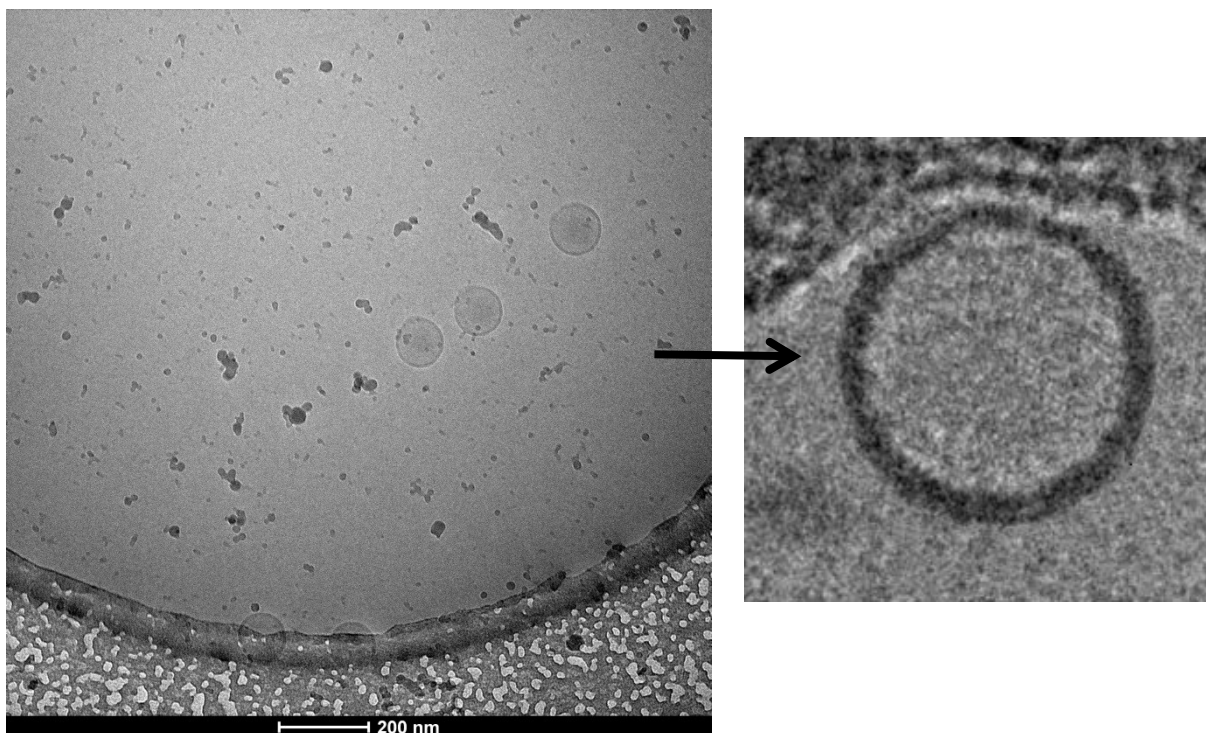
Na obrázku 42, lze vidět snímky liposomů složených z DSPC 65 mol %, cholesterol 30 mol %, Cyanur-PEG 5 mol %, po navázání Gd-DOTA. Tyto liposomy měly ze všech vzorků nejširší stěny, pravděpodobně z důvodu navázání Gd-DOTA. Stěna dosahovala v průměru šířky 6,5 až 7,5 nm.



Obrázek 40: Snímek liposomů obsahující Gd-lipid (65 mol % DSPC, 30 mol % cholesterol, 5 mol % Gd-lipid), * šipky směřují na vnější a vnitřní stranu fosfolipidové dvojvrstvy liposomu, která je viditelně kontrastnější, díky obsahu Gd^{3+} , cryo-TEM Tecnai F20 Laboratoř elektronové mikroskopie, CEITEC Brno



Obrázek 41: Snímek liposomů obsahující Gd-lipid (65 mol % DSPC, 30 mol % cholesterol, 5 mol % Gd-lipid) po reakci s EDTA, * fragment lipidní membrány uvnitř liposomů, cryo-TEM Tecnai F20 Laboratoř elektronové mikroskopie, CEITEC Brno

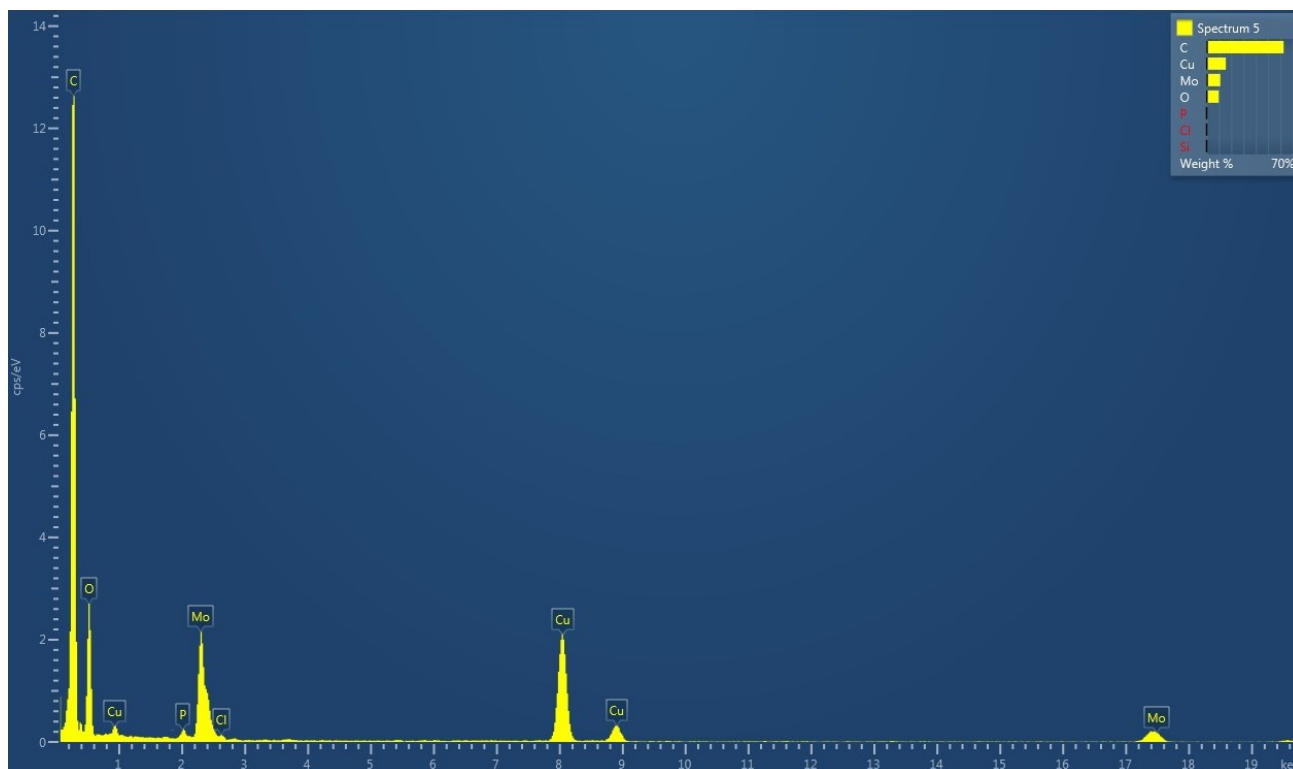


Obrázek 42: Snímek liposomů složených z DSPC 65 mol %, cholesterol 30 mol %, Cyanur-PEG 5 mol %, po navázání Gd-DOTA, cryo-TEM Tecnai F20 Laboratoř elektronové mikroskopie, CEITEC Brno

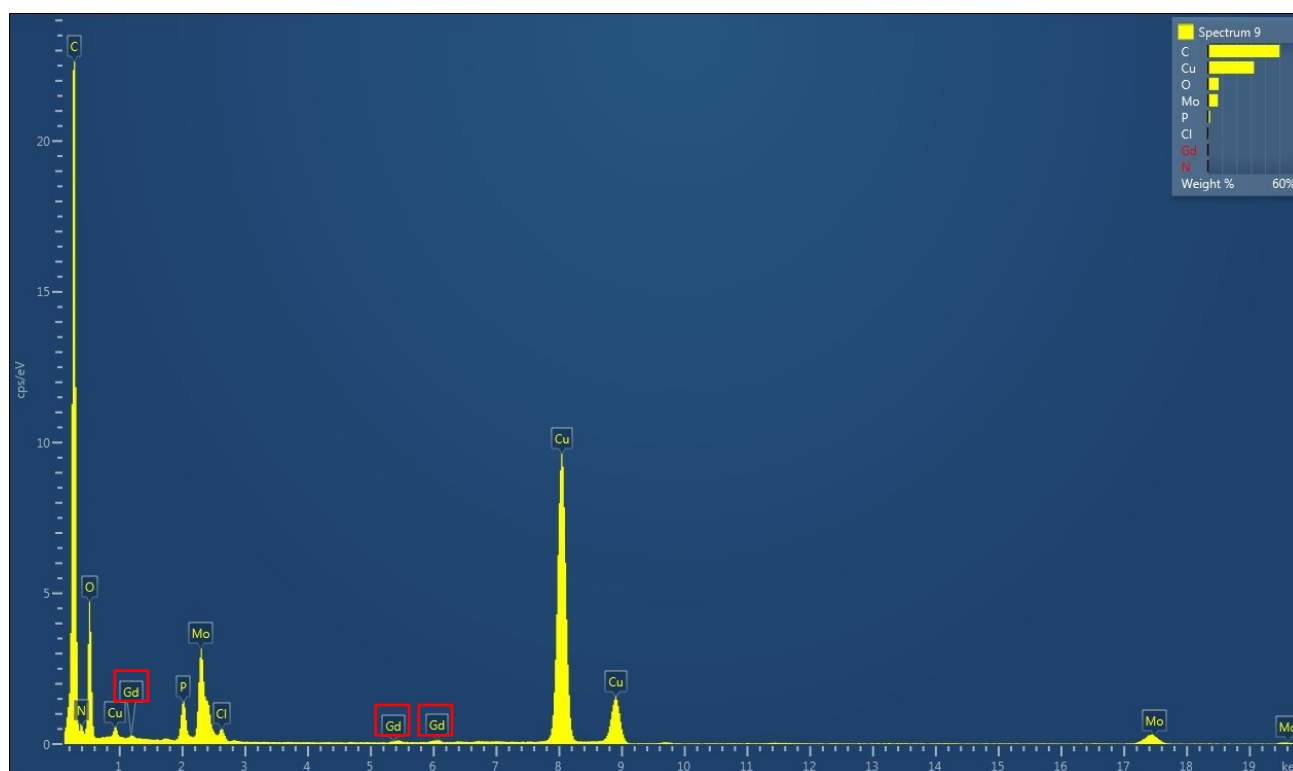
Využití kryoelektronové mikroskopie přineslo podstatný vzhled do ultrastruktury membrány liposomů. Gadolinium je vrazně těžší atom než fosfor, což značí, že v EM je daleko kontrastnější, neboť více odráží elektrony. Díky větší vzdálenosti mezi atomy Gd na vnitřní a vnější straně liposomů je možné rozlišit na snímcích z kryoelektronové mikroskopie jednotlivé vrstvy lipidní membrány (vnější a vnitřní lipidní vrstvu). Dalším významným jevem je přítomnost fragmentů lipidní membrány uvnitř liposomů (viz obrázek 41) nebo pozorování lipidní dvojvrstvy tvořící přepážku mezi dvěma liposomy. Průkaz těchto fragmentů nás vedl k vytvoření konceptu mechanismu tvorby liposomů metodou nanofluidního směšování. Centrálním intermediátem je v naší koncepci fragment lipidní dvojvrstvy, ze kterého se tvoří velké diskovité micely. Tyto micely při dosažení kritické velikosti spontánně vesikulují. Kritická velikost je dána lipidní kompozicí, její elasticitou a poměrem vodné a organické fáze při mísení v bodě agregace lipidů. Koncept mechanismu tvorby liposomů metodou nanofluidního mísení je předmětem přípravy manuskriptu.

4.7 Ověření přítomnosti gadolinia v liposomech pomocí TEM s EDS

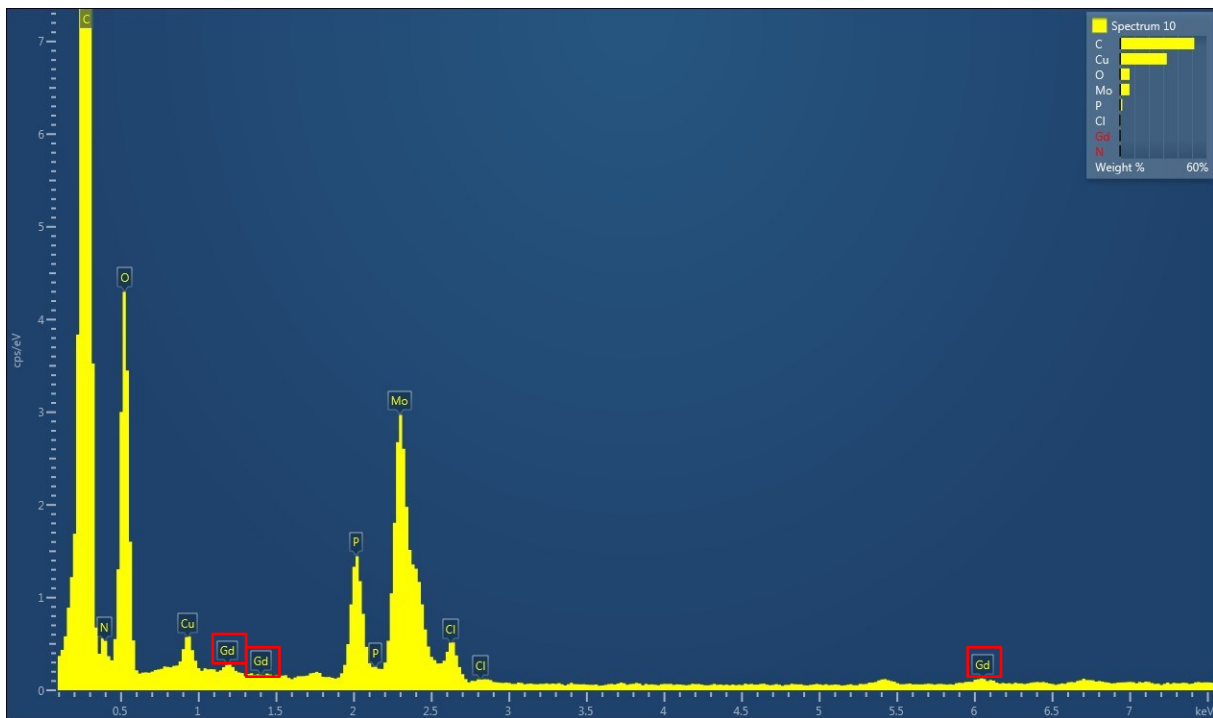
Na přístroji NanoAssembler, byly připraveny kontrolní liposomy (70 mol % DSPC, 30 mol % cholesterol) a liposomy obsahující Gd-lipid (DSPC 65 mol %, cholesterol 30 mol %, Gd-lipid 5 mol %). Liposomy byly připravovány o koncentraci 1 mg/ml. Postup přípravy liposomů byl identický jako v kapitole 3.8.2. Liposomy byly proměřeny, s pomocí MVDr Pavla Kulicha, Ph.D na TEM s EDS.



Obrázek 43: Spektrum (z TEM s EDS), pro kontrolní vzorek liposomů



Obrázek 44: Spektrum (z TEM s EDS) liposomů obsahující Gd-lipid (DSPC 65 mol %, cholesterol 30 mol %, Gd-lipid 5 mol %)



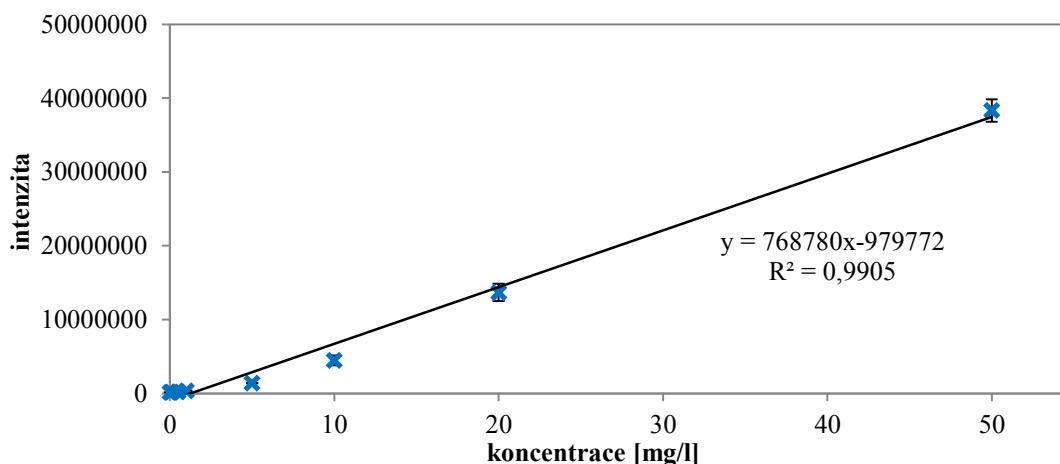
Obrázek 45: Detail předchozího spektra (Obrázek 50) liposomů obsahující Gd-lipid (DSPC 65 mol %, cholesterol 30 mol %, Gd-lipid 5 mol %)

Ze získaných spekter se potvrdila přítomnost gadolinia v připravovaných liposomech. U kontrolních liposomů, nebylo dle očekávání gadolinium detekováno. Využití této metody je unikátní v tom aspektu, že přítomnost Gd byla stanovena přímo v jednotlivém objektu, tedy v liposomu, nikoliv v celkovém objemu preparátu. Nejedná se tedy o souhrn gadolinia v roztoku (liposomální a volné Gd), ale o přímý průkaz gadolinia asociovaného s liposomy. Zároveň jako vnitřní kontrolu máme detekci atomů fosforu, což nazávisle potvrzuje asociaci Gd s liposomy, neboť atom fosforu je součástí fosfolipidů. Bohužel, tato metoda v současnosti neumožňuje kvantifikaci prvků. Přítomnost atomu mědi je dána použitím kovové mřížky jako podložky pro vzorky v TEM.

4.8 Stanovení obsahu gadolinia pomocí ICP-OES

Na přístroji NanoAssemblr byly připraveny liposomy (DSPC 65 mol %, cholesterol 30 mol %, Gd-lipid 5 mol %) o koncentraci 1 mg/ml. Dle teoretických výpočtů měla být koncentrace gadolinia v liposomech 11,27 µg/ml. Pro ověření a zjištění reálné koncentrace byly liposomy proměřeny na ICP-OES.

Kalibrační řada byla připravena z vodného roztoku hexahydrátu chloridu gadolinitého v rozsahu od 0,1 do 50 mg/l gadolinia. Body kalibrační křivky byly 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 20 a 50 mg/ml, viz graf 29.



Graf 29: Kalibrační křivka použitá pro výpočet stanovení obsahu gadolinia ve vzorku liposomů

Rovnice regrese kalibrační křivky: $y = 768780 \cdot x - 979772$, průměrná intenzita vzorku: byla 6167724,7. Koncentrace gadolinia ve vzorku, byla vypočtena dle následujícího výpočtu:

$$c = \frac{6167724,7 + 979772}{768780} = 9,30 \text{ mg/l}$$

Obsah gadolinia byl pomocí ICP-OES stanovený na $9,30 \pm 1,49$ µg/ml. Metoda poskytla možnost analýzy gadolinia v koncentračním rozsahu od 0,5 do 50 mg/l

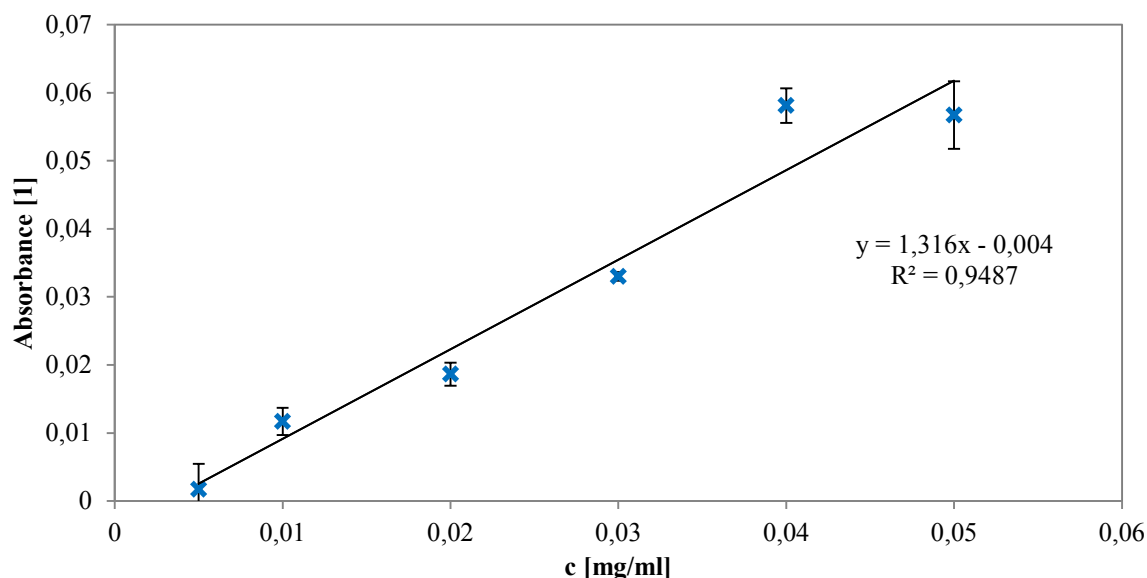
Rozdíl mezi teoreticky vypočítaným a stanoveným množstvím gadolinia je 1,97 µg/ml. Rozdíl teoretické hodnoty obsahu Gd v liposomech a zjištěná hodnota pomocí ICP-OES dobře koreluje s rozdílem hodnot celového obsahu fosfolipidu ve výsledných liposomech. Snížení obsahu je dáno ztrátami lipidů při technologickém procesu přípravy liposomů. Přibližně 10% ztráta lipidů je dána zejména tím, že pracujeme při nízkých koncentracích substancí a objemech, což vždy výrazně navyšuje procentuální ztráty díky sorpci na stěny kontejnerů, mrtvému objemu reakčního systému atd.

Vypracovaná metoda analýzy koncentrace Gd v liposomech je klíčovou pro charakterizaci preparátu a jeho dávkování při MRI experimentech *in vivo*. Zároveň bude tato metoda nezbytná pro převedení technologie do průmyslového měřítka a přípravu certifikovaného postupu hodnocení preparátu.

4.9 Stanovení obsahu fosfolipidu v Gd-liposomech, dle Stewartova testu

Obsah fosfolipidů v liposomech, obsahujících gadolinium, byl stanoven pomocí Stewartova testu. Příprava vzorku i kalibrační křivky je popsána v kapitole 3.12.

Výsledná koncentrace liposomů byla 0,1 mg/ml. Kompozice liposomů, byla DSPC 65 mol %, cholesterol 30 mol %, Gd-lipid 5 mol %. Ve Stewartově testu, na stanovení fosfolipidů, dochází k detekci organického fosfátu, který je ve vzorku liposomu přítomen v DSPC a v Gd-lipidu. Dle teoretických výpočtů měla být koncentrace fosfolipidů v liposomech 0,0356 mg/ml.



Graf 30: Kalibrační křivka použitá pro výpočet stanovení obsahu fosfolipidů ve vzorku liposomů

Rovnice regrese kalibrační křivky: $y = 1,316 \cdot x - 0,004$, průměrná absorbance vzorku: byla 0,03554. Koncentrace fosfolipidu ve vzorku, byla vypočtena dle výpočtu:

$$c = \frac{0,03554 + 0,004}{1,316} = 0,0301 \text{ mg/ml}$$

Obsah fosfolipidů v liposomech byl stanovený na $0,0301 \pm 0,004$ mg/ml. Rozdíl mezi teoreticky vypočítaným a stanoveným množstvím fosfolipidů je zhruba 15 %. Tento rozdíl mohl být způsoben při přípravě liposomů, například navázkou jednotlivých lipidových složek, nebo ztrátami způsobenými manipulací se vzorkem při přípravě a při měření.

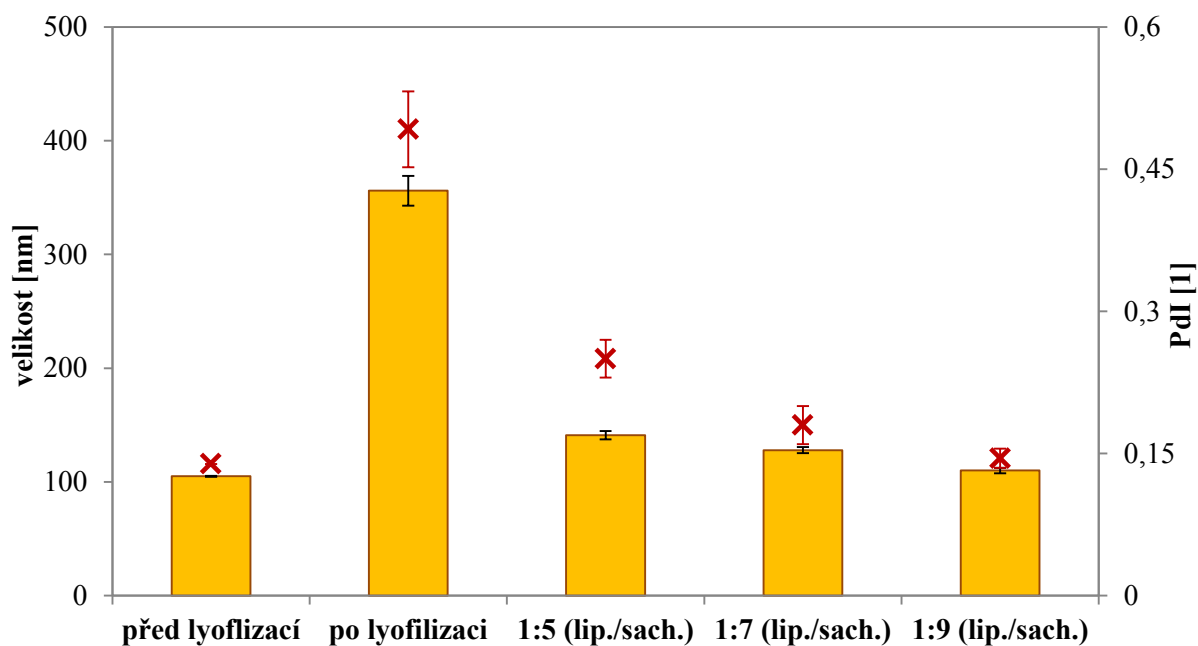
Zavedení metody stanovení obsahu fosfolipidů v liposomálních preparátech bylo nezbytným krokem pro jejich komplexní charakterizaci a kvantifikaci výtěžků jednotlivých kroků přípravy. Metoda poskytla možnost analýzy fosfolipidů v koncentračním rozsahu od 10 do 50 $\mu\text{g/ml}$, což je dostatečná citlivost pro plánované analytické využití v rámci projektu vývoje liposomálních teranostik. Mez detekce byla stanovena na 5 $\mu\text{g/ml}$.

4.10 Vliv kryoprotektantu na stabilitu Gd-liposomů po lyofilizaci

Liposomy obsahující Gd-lipid byly připravené pomocí nanofluidizace (viz kapitola 3.13), o koncentraci 1 mg/ml. Poté byly smíchány s kryoprotektantem, se sacharózou v molárních poměrech 1:5, 1:7 a 1:9 (liposomy:kryoprotektant), byl připraven i jeden vzorek bez kryoprotektantu. Vzorky byly následně lyofilizovány. Získané lyofilizáty byly hydratovány v 1 ml 5mM Tris o pH 7. Stabilita liposomů byla ověřena pomocí přístroje Zetasizer Nano ZSP. Byly proměřeny velikosti a ζ -potenciály hydratovaných liposomů. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 11: Vliv kryoprotektantu na velikost a ζ -potenciál liposomů:

Vzorek	Z-Average [nm]	PdI [1]	ζ -potenciál [mV]
před lyofilizací	105 ± 0,48	0,139 ± 0,00	-10,67 ± 0,95
vzorek bez kryoprotektantu	356 ± 13,09	0,492 ± 0,04	-15,00 ± 0,50
1:5 (liposom/sacharosa)	141 ± 3,70	0,250 ± 0,02	-15,55 ± 0,55
1:7 (liposom/sacharosa)	128 ± 2,80	0,180 ± 0,02	-15,15 ± 0,15
1:9 (liposom/sacharosa)	110 ± 2,30	0,145 ± 0,01	-13,90 ± 0,20

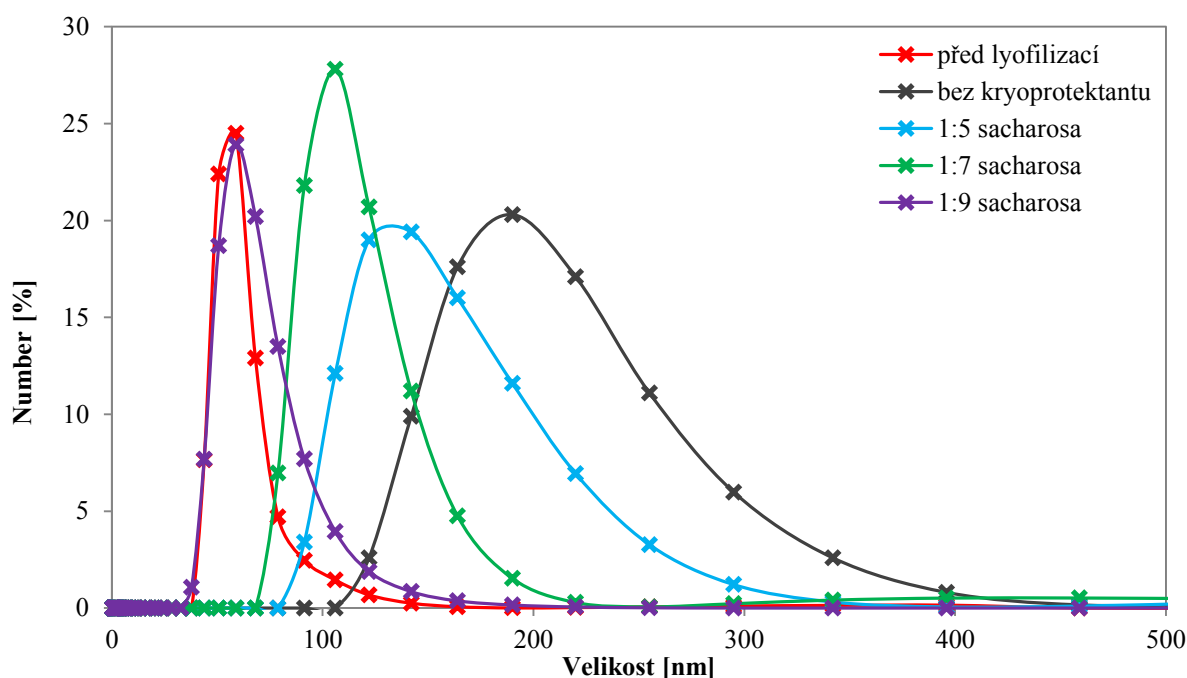


Graf 31: Velikost lyofilizovaných liposomů po hydrataci s různým obsahem kryoprotektantu

Velikost liposomů před lyofilizací byla 105 ± 0,48 nm. Liposomy po lyofilizaci, ke kterým nebyl přidán kryoprotektant byly po hydrataci nestabilní, což potvrzuje i jejich vysoká polydispersita.

Po přidání kryoprotektantu v poměru 1:5 měly hydratované liposomy sice akceptovatelnou velikost, ale stále se lišily od liposomů před lyofilizací zhruba o 40 nm.

S vyšším přidavkem kryoprotektantu docházelo ke stabilizaci liposomů. Nejlépe vyšel poměr 1:9, u tohoto přidavku sacharózy byla zachována velikost liposomů, což lze pozorovat na grafu 32.



Graf 32: Porovnání velikostí liposomů s různým obsahem kryoprotektantu dle změny množství částic

4.11 Stanovení zbytkové vody v lyofilizovaných liposomech dle Karl-Fischera

Postup pro stanovení zbytkové vody je uveden v kapitole 3.14. Lyofilizované liposomy byly rozpuštěny v 1 ml titračního činidla, HydranalTM Coulomat. Pomocí Karl-Fischer titrátoru, Mettler Toledo byl stanoven obsah vody ve vzorcích.

Obsah zbytkové vody v liposomech, by dle literatury, neměl překročit hodnotu 1,5 %. Po překročení této hodnoty by mohlo docházet k hydrolýze liposomů [101], čímž by se snížila jejich stabilita a tím pádem i jejich trvanlivost. V tabulce 12, jsou uvedené naměřené hodnoty, zbytkového obsahu vody v jednotlivých vzorcích liposomu. Nejmenší obsah vody byl při použití kryoprotektantu v molárním poměru 1:9 (liposomy:sacharóza).

Tabulka 12: Obsah vody ve vzorcích liposomů

Gd-liposomy:sacharóza (molární poměr)	Obsah vody [%]
1: 5	0,35 ± 0,05
1:7	0,29 ± 0,02
1:9	0,22 ± 0,00

Uvedené zjištění potvrzuje závěr z předchozího měření, že pro stabilizaci a získání neporušených liposomů s nízkým obsahem vody je vhodné použít molární poměr 1:9 (liposomy:sacharóza).

Vypracovaný postup pro lyofilizaci vedl k technologicky akceptovatelným parametrům lyofilizátu a pro budoucí vývoj teranostik umožňuje přípravu dlouhodobě skladovatelných

preparátů, které mohou být také zasílány k testování na zahraniční pracoviště preklinického výzkumu.

4.12 Ověření konceptu Gd-liposomů

Liposomy obsahující gadolinium (DSPC 65 mol %, cholesterol 30 mol %, Gd-lipid 5 mol %) byly poslány na Ústav přístrojové techniky AV ČR, k panu Ing. Radovanu Jiříkovi, Ph.D. Zde byly liposomy proměřeny na 9,4 T NMR systému Bruker-BioSpec 94/30 USR za účelem ověření konceptu Gd-liposomů, jako potencionálních teranostik.

Postup přípravy liposomů je uveden v kapitole 3.15.

Připravené Gd-liposomy a vodný roztok kontrastní látky Gd-DOTA, byly naředěny do koncentrační řady:

1 mM; 0,50 mM; 0,25 mM; 0,13 mM; 0,06 mM; 0,03 mM a 0,02 mM. U těchto řad byl změřen relaxační čas T_1 a T_2 , ze kterého byla vypočítána relaxivita.

Kontrastní látky používané v MR, po podání, mají schopnost ovlivnit rychlost relaxace protonů, což je popisováno tzv. relaxivitou r_1 nebo r_2 , kterou lze vypočítat pomocí vzorce (8):

$$r_1 = \frac{\left(\frac{1}{T_1}\right)}{c} \quad \text{či} \quad r_2 = \frac{\left(\frac{1}{T_2}\right)}{c} \quad (8)$$

kde c je koncentrace kontrastní látky. Relaxivita se udává v jednotkách $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ a je závislá na vnějších podmínkách (na teplotě, na magnetickém poli atd) [102].

V tabulce 13, lze vidět získané hodnoty relaxivity r_1 a r_2 , pro kontrastní látku Gd-DOTA a Gd-liposomy, r_1 je velmi podobná komerční látce

Tabulka 13: Výsledné hodnoty relaxivity r_1 a r_2 , pro kontrastní látku Gd-DOTA a Gd-liposomy

vzorek	r_1 relaxivita [$\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$]	r_2 relaxivita [$\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$]
Gd-liposomy	$3,9 \pm 0,6$	$44,7 \pm 4,9$
Gd-DOTA	$4,0 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,43$

Analytické metody (ICP, TEM-EDS) potvrdily přítomnost a očekávanou koncentraci Gd^{3+} v komplexech s liposomy. Výsledky měření hodnot relaxivity r_1 a r_2 prokázaly dostatečné hodnoty pro použití v plánovaných experimentech *in vivo* na zobrazení trombů na králičím a potkaním modelu. Obzvláště hodnota r_2 je výrazně vyšší pro liposomální Gd ve srovnání s nízkomolekulárním komplexem Gd-DOTA, což je výrazná výhoda pro kontrastní zobrazování pomocí MRI *in vivo*.

5 ZÁVĚR

- Byla vypracována metoda přípravy monodispersních liposomů novou technologií nanofluidního mísení. Tato technika byla použita pro přípravu liposomů s komplexem gadolinia pro další vývoj kontrastních preparátů určených pro *in vivo* zobrazování trombů a nádorů.
- Příprava liposomů značených Gd^{3+} byla založena na využití jednak komerčního metalochelatačního lipidu a také na naší originální metodě vazby metalochelatačního komplexu Gd-DOTA na vnější povrch liposomů pomocí konjugační reakce založené na lipidu s navázanou kyselinou kyarunovou.
- Pro charakterizaci liposomů byly využity pokročilé fyzikálně-chemické metody (DLS, NTA), elektronová mikroskopie (TEM, kryoTEM). Byl prokázán vesikulární charakter připravených nanočástic a zabudování Gd^{3+} do liposomálních membrán ve formě metalochelatačních lipidů. Přítomnost gadolinia v liposomech byla prokázána pomocí TEM s EDS. Přesná koncentrace gadolinia v liposomálních preparátech byla stanovena pomocí ICP-OES a odpovídala teoretickým výpočtům.
- Byla ověřena metoda stabilizace liposomálních preparátů lyofilizací v přítomnosti kryoprotektiv. Obsah reziuduální vody v lyofilizovaných liposomálních preparátech byl stanoven Karl-Fischerovou titrací a obsah fosfolipidů byl kvantifikován pomocí Stewartova testu.
- Kontrastní signál Gd-liposomů byl ověřen pomocí MR. Hodnota r_1 dosahovala hodnot srovnatelných s komerčně dostupnou a klinicky používanou kontrastní látkou Gd-DOTA. Hodnota r_2 výrazně a několikanásobně převyšovala hodnotu komerčního kontrastního agens Gd-DOTA.
- Vypracované metody a postupy budou využity pro další vývoj kontrastních preparátů pro MRI zobrazován. Konečným cílem je vývoj teranostik diagnostiku a terapii mozkových iktů.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CCD	charge coupled device, obrazový senzor
CMC	kritická micelární koncentrace
CMOS kamera	complementary metal oxide semiconductor - kamera
Cryo-TEM	kryo-transmisní elektronová mikroskopie
DLS	dynamický rozptyl světla
DMPC	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-fosfocholin
DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfocholin
DSPC	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-fosfocholin
ED ₅₀	efektivní dávka (dávka, při které se projeví sledovaný efekt u 50 % zvířat)
EDS	energieově disperzní spektrometr
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EPC	vaječný fosfatidylcholin
FID	free induction decay
Gd	gadolinium
Gd-DTPA	kontrastní látka (Active Ingredient [®]) - diethylenetriaminepentaacetic acid gadolinium(III)
Gd-DOTA	kontrastní látka (Dotarem [®]) - gadolinium (III) 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetate
GUV	obří unilamelární vezikuly
HP-DO3A	kontrastní látka (Pro-hance [®]) - gadolinium 1,4,7-Triscarboxymethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane
ICP-OES	optická emisní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou
LD ₅₀	letalita (dávka, při které umře 50 % intoxikovaných zvířat)
LUV	velké unilamelární vezikuly
<i>M</i>	výsledné makroskopické magnetizace
MLV	multilamelární vezikuly

MR	magnetická rezonance
MRI	zobrazování magnetickou rezonancí
MVV	multivesikulární vesikuly
NMR	nukleární magnetická rezonance
NTA	nanoparticle tracking analysis
PdI	index polydisperzity
PEG	polyethylenglykol
QLS	kvazielastický rozptyl světla
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SHM	the staggered herringbone mixer
Soy PC	sojový L- α -fosfatidylcholin
SUV	malé unilamelární vezikuly
T ₁	podélná (spin-mřížková) relaxace
T ₂	příčná (spin-spinový) relaxace
T _c	teplota fázového přechodu
TD ₅₀	toxická dávka (dávka, při které se projeví toxicita u 50 % zvířat)
TI	terapeutický index
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
DSPE- PEG(2000) Cyanur	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[cyanur(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt)
16:0 Cyanur- Cap PE	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-{6-[(cyanur)amino]hexanoyl} (sodium salt)
Bis (18:0 PE)- DTPA (Gd)	bis(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)-N-N'-diethylenetriaminepentaacetic acid (gadolinium salt)
18:0 PE DTPA (Gd)	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-diethylenetriaminepentaacetic acid (gadolinium salt)

7 LITERATURA

- [1] AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2013, 8(1), 102- [cit. 2016-07-31]. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102. ISSN 1556-276x. Dostupné z: <http://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-8-102>
- [2] SCHWENDENER, R. A. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *Therapeutic Advances in Vaccines* [online]. 2014, 2(6), 159-182 [cit. 2016-08-01]. DOI: 10.1177/2051013614541440. ISSN 2051-0136. Dostupné z: <http://tav.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/2051013614541440>
- [3] DUTTA, Ranjna C. Targeting Efficiency of Immunliposome; Quantitative Assessment. *Analytical & Pharmaceutical Research*. 2016, 2(2), 1. DOI: 10.15406/japlr.2016.02.00012. ISBN 10.15406/japlr.2016.02.00012. ISSN 2473-0831. Dostupné také z: <http://medcraveonline.com/JAPLR/JAPLR-02-00012.php>
- [4] KAMALY, Nazila a Andrew D. MILLER. Paramagnetic Liposome Nanoparticles for Cellular and Tumour Imaging. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2010, 11(4), 1759-1776 [cit. 2016-12-07]. DOI: 10.3390/ijms11041759. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/11/4/1759/>
- [5] NOVÁKOVÁ, Kateřina. Chemické listy: Modelové biologické membrány: jejich charakterizace a využití [online]. 2015, 109(3), 166–175 [cit. 2016-07-30]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2015_03_166-175.pdf
- [6] DUA, J.S., Prof. A. C. RANA a Dr. A. K BHANDARI. LIPOSOME: METHODS OF PREPARATION AND APPLICATIONS. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research* [online]. 2012, III(II), 14-20 [cit. 2016-07-31]. ISSN 2229-4619. Dostupné z: <http://www.technicaljournalonline.com/ijpsr/VOL%20III/IJPSR%20VOL%20III%20ISSUE%20II%20APRIL%20JUNE%202012/Article%204%20April%20June%202012.pdf>
- [7] SWAMI, Himanshi, Mahesh Kumar KATARIA, Ajay BILANDI, Prabhjot KOUR a Saroj BALA. Liposome: An art for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Letters* [online]. 2015, 5(2), 523-530 [cit. 2016-07-31]. ISSN 2277-4564. Dostupné z: http://ijpsl.com/admin/upload_data/journal_Himanshi.pdf

- [8] BOZZUTO, Giuseppina a Agnese MOLINARI. Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2015, 2015(10), 975- [cit. 2016-08-01]. DOI: 10.2147/IJN.S68861. ISSN 1178-2013.
Dostupné z: <http://www.dovepress.com/liposomes-as-nanomedical-devices-peer-reviewed-article-IJN>
- [9] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. Barevný atlas biochemie. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [10] Phase Transition Temperatures for Glycerophospholipids. Avanti, Polar lipids, Inc. [online]. Alabama, ©2016 [cit. 2016-10-04]. Dostupné z: <https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/phase-transition-temps/>
- [11] EDWARDS, Katie A. (ed.). Liposomes in Analytical Methodologies [online]. 1. CRC Press, 2016 [cit. 2016-09-16]. ISBN 978-981-4669-27-6. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=gBjYCwAAQBAJ&pg=PA54&lpg=PA54&dq=Liposomes:+technologies+and+analytical+applications&source=bl&ots=YEkQp-1zW3&sig=pjeWZVMpEm0qeISndzE6-F0hhHY&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwilrojJiIfPAhVLuBQKHaxbA_oQ6AEITzAG#v=onepage&q&f=false
- [12] BERGSTRAND, Nill. Liposomes for drug delivery: from physico-chemical studies to application. 1. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis, 2003. ISBN 91-554-5592-1.
- [13] LÁZNIČKOVÁ, Alice a Vladimír KUBÍČEK. Základy fyzikální chemie: vybrané kapitoly pro posluchače Farmaceutické fakulty. 2., přeprac. vyd. Praha: Karolinum, 2008. ISBN 978-80-246-1511-0.
- [14] ZHANG, Jianxiang, Xiaodong LI a Xiaohui LI. Stimuli-triggered structural engineering of synthetic and biological polymeric assemblies. *Progress in Polymer Science* [online]. 2012, 37(8), 1130-1176 [cit. 2017-01-30]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.11.005. ISSN 00796700. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670011001304>
- [15] LOMBARDO, Domenico, Mikhail A. KISELEV, Salvatore MAGAZÙ a Pietro CALANDRA. Amphiphiles Self-Assembly: Basic Concepts and Future Perspectives of Supramolecular Approaches. *Advances in Condensed Matter Physics*. 2015, 2015, 1-22. DOI: 10.1155/2015/151683. ISSN 1687-8108. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/acmp/2015/151683/>
- [16] TROUTIER, Anne-Lise, Laurent VÉRON, Thierry DELAIR, Christian PICHOT a Catherine LADAVIÈRE. New Insights into Self-Organization of a Model Lipid

- Mixture and Quantification of Its Adsorption on Spherical Polymer Particles †. *Langmuir* [online]. 2005, 21(22), 9901-9910 [cit. 2017-01-30]. DOI: 10.1021/la050796l. ISSN 0743-7463.
Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la050796l>
- [17] ED. BY JÖRG KREUTER. *Colloidal drug delivery systems*. New York, NY u.a.: Dekker, 1994. ISBN 08-247-9214-9.
- [18] Types of Vesicles. In: *Mirus Transfectopedia®* [online]. USA [cit. 2016-09-16]. Dostupné z: <https://www.mirusbio.com/transfectopedia/methods>
- [19] MANGIAPIA, Gaetano, Giuseppe VITIELLO, Carlo IRACE, et al. Anticancer Cationic Ruthenium Nanovectors: From Rational Molecular Design to Cellular Uptake and Bioactivity. *Biomacromolecules*. 2013, 14(8), 2549-2560. DOI: 10.1021/bm400104b. ISSN 1525-7797. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm400104b>
- [20] SERCOMBE, Lisa, Tejaswi VEERATI, Fatemeh MOHEIMANI, Sherry Y. WU, Anil K. SOOD a Susan HUA. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2015, 6, - [cit. 2016-09-30]. DOI: 10.3389/fphar.2015.00286. ISSN 1663-9812. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2015.00286>
- [21] WOODLE, Martin C. a Xuân Nam. PHẠM. Sterically stabilized liposome therapeutics: the origin, evolution, and impact of doi moi. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 1995, 16(2-3), 249-265 [cit. 2016-09-30]. DOI: 10.1016/0169-409X(95)00028-6. ISSN 0169409x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0169409X95000286>
- [22] WOODLE, Martin C., Mary S. NEWMAN a Joel A. COHEN. Sterically Stabilized Liposomes: Physical and Biological Properties. *Journal of Drug Targeting* [online]. 2008, 2(5), 397-403 [cit. 2016-09-30]. DOI: 10.3109/10611869408996815. ISSN 1061-186x. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10611869408996815>
- [23] Terapeutická šíře. LÜLLMANN, Heinz, Mohr KLAUS a Martin WEHLING. *Farmakologie a toxikologie*. Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004, s. 33-34. ISBN 80-247-0836-1.
- [24] NEPEJCHALOVÁ, Leona. Farmakodynamika (mechanismus účinku), Dávka a účinek. In: *Farmakologie*, [online]. ÚSKVBL [cit. 2017-04-02]. Dostupné z: www.farmakologie.webzdarma.cz/p8_farmakodynamika_davky_leku.ppt

- [25] MARRIPATI, Saraswathi, K. UMASANKAR a P. JAYACHANDRA REDDY. A REVIEW ON LIPOSOMES. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Nano Sciences* [online]. 2014, 3(3), 159 - 169 [cit. 2016-10-09]. ISSN 2319 – 9563. Dostupné z: <http://www.ijrpns.com/article/A%20REVIEW%20ON%20LIPOSOMES.pdf>
- [26] Liposome Preparation. Avanti Polar Lipids, Inc. [online]. Alabama, ©2016 [cit. 2016-10-09]. Dostupné z: <https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/>
- [27] Protocol for Liposome Preparation Through Thin-film Hydration. In: *Consum Chinese medicines research centre for renal diseases* [online]. Kowloon Tong, Kowloon, ©2015 [cit. 2016-10-09]. Dostupné z: <http://ccrd.hkbu.edu.hk/images/20130629/13724927885156.pdf>
- [28] ARAJO LOPES, Svía Caldeira de, Cristiane dos SANTOS GIUBERTI, Talita Guieiro RIBEIRO, Digo dos SANTOS FERREIRA, Elaine AMARAL LEITE a Mnica CRISTINA. Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs. *Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches* [online]. InTech, 2013, 85-124 [cit. 2016-10-09]. DOI: 10.5772/55290. ISBN 978-953-51-1098-9. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/cancer-treatment-conventional-and-innovative-approaches/liposomes-as-carriers-of-anticancer-drugs>
- [29] TORCHILIN, V. P. a Volkmar. WEISSIG. *Liposomes: a practical approach*. 2nd ed.. New York: Oxford University Press, c2003. ISBN 01-996-3654-0.
- [30] AFZAL, Arshad a Kwang-Yong KIM. Three-objective optimization of a staggered herringbone micromixer. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2014, 192(3), 350-360 [cit. 2017-02-05]. DOI: 10.1016/j.snb.2013.10.109. ISBN 10.1016/j.snb.2013.10.109. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400513013117>
- [31] MEIJER, Han E. H., M. K. SINGH, T. G. KANG, J. M. J. TOONDER a P. D. ANDERSON. *Passive and Active Mixing in Microfluidic Devices*. In: *HarvardKey* [online]. The Netherlands, 2011 [cit. 2017-02-05]. Dostupné z: http://isites.harvard.edu/fs/docs/icb.topic860667.files/Active_PAssive_review.pdf
- [32] FOGED, Camilla, Thomas RADES, Yvonne PERRIE a Sarah HOOK. *Subunit vaccine delivery*. 1. New York: Springer, c2015. ISBN 978-1-4939-1417-3.
- [33] WILLIAMS, Manda S., Kenneth J. LONGMUIR a Paul YAGER. A practical guide to the staggered herringbone mixer. *Lab on a Chip* [online]. 2008, 8(7), 1121- [cit. 2017-02-21]. DOI: 10.1039/b802562b. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2792635/>

- [34] HOSSAIN, Shakhawat, Afzal HUSAIN a Kwang-Yong KIM. Shape optimization of a micromixer with staggered-herringbone grooves patterned on opposite walls. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2010, 162(2), 730-737 [cit. 2017-02-21]. DOI: 10.1016/j.cej.2010.05.056. ISSN 13858947. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385894710005115>
- [35] STROOCK, A. D. Chaotic Mixer for Microchannels. *Science*. 2002, 295(5555), 647-651. DOI: 10.1126/science.1066238. ISSN 00368075. Dostupné také z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1066238>
- [36] KASTNER, Elisabeth, Randip KAUR, Deborah LOWRY, Behfar MOGHADDAM, Alexander WILKINSON a Yvonne PERRIE. High-throughput manufacturing of size-tuned liposomes by a new microfluidics method using enhanced statistical tools for characterization. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2014, 477(1-2), 361-368 [cit. 2017-02-21]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.10.030. ISSN 03785173. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517314007534>
- [37] GUIMARÃES SÁ CORREIA, Mariana, Maria L. BRIUGLIA, Fabio NIOSI a Dimitrios A. LAMPROU. Microfluidic manufacturing of phospholipid nanoparticles: Stability, encapsulation efficacy, and drug release. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2017, 516(1-2), 91-99 [cit. 2017-02-21]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.11.025. ISSN 03785173. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517316310778>
- [38] ZHENG, Mengxiu. Properties of vesicles containing natural and synthetic lipids formed by microfluidic mixing. In: *University of Victoria / Libraries* [online]. Waterloo: University of Waterloo, 2013 [cit. 2017-02-22]. Dostupné z: https://dspace.library.uvic.ca/bitstream/handle/1828/6922/Zheng_Mengxiu_MSc_2015.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [39] The NanoAssemblr™ Benchtop. In: *Precision NanoSystems* [online]. Vancouver, ©2016 [cit. 2017-02-22]. Dostupné z: <https://www.precisionnanosystems.com/wp-content/uploads/2016/07/Benchtop-Brochure.pdf>
- [40] MUI, Barbara, Laurie CHOW a Michael J HOPE. Extrusion Technique to Generate Liposomes of Defined Size. Elsevier Inc. [online]. 2003, (367), 3 [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1016/S0076-6879(03)67001-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687903670011>
- [41] MAYER, L.D., M.J. HOPE a P.R. CULLIS. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*

- [online]. 1986, 858(1), 161-168 [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1016/0005-2736(86)90302-0. ISSN 00052736.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0005273686903020>
- [42] **Manual Operation of Liposome Hand-Extruder. In: Genizer [online]. California, USA: Genizer, ©2009 [cit. 2017-02-26].**
Dostupné z: http://www.genizer.com/upload/file/Liposome_HandExtruder.pdf
- [43] LiposoFast-Basic. AVESTIN, Inc. and AVESTIN Europe GmbH [online]. Germany: Avestin, 2009 [cit. 2017-02-26].
Dostupné z: <http://www.avestin.com/lf.html>
- [44] Reduction of liposome size and preparation of unilamellar vesicles by extrusion techniques. HOPE, Michael J., Rajiv NAYAR, Lawrence D. MAYER a Pieter R. CULLIS. Liposome technology. 2nd ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, c1993, s. 123-139. ISBN 0849367093.
- [45] SUPAPORN, Sriwongsitanont. Effect of Freeze-Thawing Process on the Size and Lamellarity of PEG-Lipid Liposomes. The Open Colloid Science Journal [online]. 2011, 4(1), 1-8 [cit. 2017-02-27]. DOI: 10.2174/1876530001104010001. ISSN 18765300. Dostupné z: <http://benthamopen.com/ABSTRACT/TOCOLLSJ-4-1>
- [46] CASTILE, Jonathan D a Kevin M.G TAYLOR. Factors affecting the size distribution of liposomes produced by freeze–thaw extrusion. International Journal of Pharmaceutics [online]. 1999, 188(1), 87-95 [cit. 2017-02-27]. DOI: 10.1016/S0378-5173(99)00207-0. ISSN 03785173.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517399002070>
- [47] ARAJO LOPES, Svía Caldeira de, Cristiane dos SANTOS GIUBERTI, Talita Guieiro RIBEIRO, Digo dos SANTOS FERREIRA, Elaine AMARAL LEITE a Mnica CRISTINA. Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs. In: Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches [online]. InTech, 2013 [cit. 2017-02-27]. DOI: 10.5772/55290. ISBN 978-953-51-1098-9. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/cancer-treatment-conventional-and-innovative-approaches/liposomes-as-carriers-of-anticancer-drugs>
- [48] SNOWMAN, John a Mizrahi AVSHALOM. Downstream processes: equipment and techniques: Lyophilization: Freeze-Drying. New York: A. Liss, 1988, s. 315-351. ISBN 0845132075.
- [49] Sublimace: Lyofilizace. In: Vyšší odborná škola zdravotnická a Střední zdravotnická škola Hradec Králové: Laboratorní technika [online]. [cit. 2014-02-24]. Dostupné z: <http://lat.zshk.cz/vyuka/sublimace.aspx>

- [50] Magnetická rezonance - MR. Fakultní nemocnice Brno [online]. Brno: Fakultní nemocnice Brno, ©2016 [cit. 2016-12-04]. Dostupné z: <http://www.fnbrno.cz/nemocnice-bohunice/radiologicka-klinika/magneticka-rezonance-mr/t4353>
- [51] POPA, Igor a Radka NOVOTNÁ. Základy NMR spektroskopie. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2012. ISBN 978-80-244-2991-5.
- [52] HOLÍK, Miroslav. NMR spektroskopie pro chemiky. 2. rozšíř. vyd. Brno: Univerzita J.E. Purkyně, 1975. č. 55-042-75.
- [53] Princip MRI. fMRI Brno, Výzkumná skupina při LF MU v Brně [online]. Brno: fMRI Team Brno, 2008 [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: http://fmri.mchmi.com/main_index.php?strana=13
- [54] VÁLEK, Vlastimil a Jan ŽIŽKA. Moderní diagnostické metody: Magnetická rezonance, III. díl. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1996. ISBN 80-701-3225-6.
- [55] DOLNÍČEK, P., J. SOBEK a P. VYCHODIL. Technologie zpracování obrazů při perfúzním zobrazení: Perfúzní zobrazení. In: Access server [online]. Vysoké učení technické v Brně: České vysoké učení technické v Praze, 2014 [cit. 2016-12-07]. Dostupné z: <http://access.fel.cvut.cz/view.php?nazevclanku=technologie-zpracovani-obrazu-pri-perfuznim-zobrazeni&cislocclanku=2014030001>
- [56] AYYAGARI, Ananta Laxmi, Xiaodong ZHANG, Ketan B. GHAGHADA, Ananth ANNAPRAGADA, Xiaoping HU a Ravi V. BELLAMKONDA. Long-circulating liposomal contrast agents for magnetic resonance imaging. *Magnetic Resonance in Medicine* [online]. 2006, 55(5), 1023-1029 [cit. 2016-12-12]. DOI: 10.1002/mrm.20846. ISSN 0740-3194. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mrm.20846>
- [57] LIU, Yongjun a Na ZHANG. Gadolinium loaded nanoparticles in theranostic magnetic resonance imaging. *Biomaterials*. 2012, 33(21), 5363-5375. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.03.084. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961212003973>
- [58] LEVY, Jason. MRI: Magnetic resonance imaging; Nuclear magnetic resonance (NMR) imaging. In: Keck Medicine of USC [online]. USA: Keck Medicine of USC, 2016 [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: <http://keckmedicine.adam.com/content.aspx?productId=117&pid=1&gid=003335>

- [59] TURÁNEK, Jaroslav. Prezentace AZV2016, Nanoliposomal systems for rapid diagnosis of thrombi by MRI: Focused on Liposomal Theranostics for Treatment and Imaging of Thrombi. Brno, 2016.
- [60] 8A Liposomy. Vybrané instrumentální úlohy z aplikované biochemie. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013, s. 150-158. ISBN 978-80-214-4788-2.
- [61] 9. Charakterizační techniky. Cvičení ze základů nanomateriálové chemie. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2013, s. 59-60. ISBN 978-80-244-3752-1.
- [62] Chemické listy: Stanovení velikostní distribuce částic anorganických disperzí metodou dynamického rozptylu světla. 1998, 92(11). ISSN 1213-7103.
- [63] Dynamický rozptyl světla. Krystalografická společnost Czech and Slovak Crystallographic Association (CSCA) [online]. Praha: CSCA, 2008 [cit. 2017-01-12]. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/dls.htm>
- [64] Dynamic Light Scattering as a Method for Understanding the Colloidal Stability of Protein Therapeutics. In: AZo Materials [online]. USA: AZoM.com, ©2000-2017 [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: <http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=11173>
- [65] Zeta potenciál zeta. Krystalografická společnost Czech and Slovak Crystallographic Association (CSCA) [online]. Praha: CSCA, 2008 [cit. 2017-02-01]. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>
- [66] LIBOR, Kvítek. Metody studia koloidních soustav. In: Elektronická skripta: PřF UP Olomouc [online]. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2006 [cit. 2017-02-01]. Dostupné z: <http://chemikalie.upol.cz/skripta/msk/msk.pdf>
- [67] Dynamic light scattering e potenziale zeta. In: ALFATEST- Strumentazione scientifica [online]. Itálie: Alfatest Srl, c2017 [cit. 2017-04-02]. Dostupné z: <http://www.alfatest.it/pagina.php?p=67>
- [68] CARR, Bob a Matthew WRIGHT. Nanoparticle Tracking Analysis: A Review of Applications and Usage in the Analysis of Exosomes and Microvesicles. In: Samedan ltd, Pharmaceutical publishers [online]. United Kingdom: Samedan ltd, Pharmaceutical publishers, ©2000-2011 [cit. 2017-02-01]. Dostupné z: http://www.samedanltd.com/uploads/pdf/white_paper/cbe887d261c4e69e93dcfb43fc43edfa.pdf

- [69] Nanoparticle Tracking Analysis: Visualize and measure particle size and concentration. Malvern Instruments [online]. United Kingdom: Malvern Instruments, ©2017 [cit. 2017-02-01].
Dostupné z: <http://www.malvern.com/en/products/technology/nanoparticle-tracking-analysis/>
- [70] Nanoparticle Tracking Analysis. Innova Biosciences [online]. United Kingdom: Innova Biosciences, ©2016 [cit. 2017-02-01]. Dostupné z: <https://www.innovabiosciences.com/applications/nanoparticle-tracking-analysis.html>
- [71] Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES). In: Chemiasoft [online]. Chemiasoft, c2004-2015 [cit. 2017-03-12]. Dostupné z: <http://www.chemiasoft.com/chemd/node/52>
- [72] SCHMIEDT, Lukáš. Úvod do fyziky plazmatu. Fyzikální sekce Matematicko-fyzikální fakulty UK [online]. Praha: MFF UK, 2014, 8.5.2014 [cit. 2017-03-12]. Dostupné z: <http://physics.mff.cuni.cz/kfpp/s4r/plazma/>
- [73] BOSS, Charles B. a Kenneth J. FREDEEN. Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. In: PerkinElmer [online]. Waltham: PerkinElmer, ©1998-2017 [cit. 2017-03-12]. Dostupné z: https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/GDE_Concepts-of-ICP-OES-Booklet.pdf
- [74] RAMANAJI, M. ICP-OES. In: RoHS Testing Laboratory [online]. India: C-MET, RoHS Division, ©2014 [cit. 2017-03-12]. Dostupné z: <http://www.rohs-cmet.in/content/icp-oes>
- [75] JÄGER, A. a V. GÄRTNEROVÁ. Elektronovým mikroskopem do nitra materiálů aneb jak vypadá jejich struktura. In: Fyzikální ústav, Akademie věd ČR, v. v. i. [online]. Praha: Fyzikální ústav AV ČR, ©2008-2014 [cit. 2017-03-02]. Dostupné z: <http://www.fzu.cz/popularizace/elektronovym-mikroskopem-do-nitra-materialu-aneb-jak-vypada-jejich-struktura>
- [76] KARLÍK, Miroslav. Úvod do transmisní elektronové mikroskopie. Praha: České vysoké učení technické v Praze, 2011. ISBN 978-80-0104-729-3.
- [77] Transmisní elektronová mikroskopie. In: Laboratoř mikroskopie atomárních sil - Regionálního centra pokročilých technologií a materiálů Univerzity Palackého v Olomouci. [online]. Olomouc: UPOL, 2008 [cit. 2017-03-02]. Dostupné z: <http://atmilab.upol.cz/texty/TEM-teorie.pdf>

- [78] Basic principle of transmission electron microscope. In: Physics world [online]. HKSAR: Education Bureau, HKSAR, c2000 [cit. 2017-03-03]. Dostupné z: http://www.hk-physics.org/atomic_world/tem/tem02_e.html
- [79] KARLÍK, Miroslav. Transmisní elektronová mikroskopie: pohled do nitra materiálů. In: Nano[studijní]materiály, Technická univerzita v Liberci [online]. Praha: Katedra materiálů FJFI ČVUT, 2005 [cit. 2017-03-02]. Dostupné z: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/603/mod_resource/content/1/TEM_05_Karlik.pdf
- [80] NEBESÁŘOVÁ, Jana a Marie VANCOVÁ. Elektronová mikroskopie pro biology. In: Parazitologický ústav, Biologické centrum AV ČR, v. v. i. [online]. České Budějovice: Biologické centrum AV ČR, 2002 [cit. 2017-03-02]. Dostupné z: <http://triton.paru.cas.cz/old-lem/book/Podkap/1.0.html>
- [81] BOROVEC, Zdeněk. Elektronová mikroskopie a elektronová difrakce. 1. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, n. p., Praha 1, 1985.
- [82] CAIS, Jaromír. Elektronová mikroskopie. Metalografie: Metodická příručka. 1. Praha: Centrum pro studium vysokého školství, v.v.i, 2015. ISBN 978-80-86302-67-6.
- [83] KUBÍNEK, Roman, Klára ŠAFÁŘOVÁ a Milan VŮJTEK. Elektronová mikroskopie. In: Portál moderní fyziky [online]. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011 [cit. 2017-03-06]. Dostupné z: <https://fyzika.upol.cz/cs/system/files/download/vujtek/granty/elmikro.pdf>
- [84] Light microscopes electron microscopes. Optics & Binoculars [online]. 2013 [cit. 2017-03-06]. Dostupné z: <http://binoculars.net/light-microscopes-electron-microscopes/>
- [85] MILNE, Jacqueline L. S., Mario J. BORGNIA, Alberto BARTESAGHI, et al. Cryo-electron microscopy - a primer for the non-microscopist. FEBS Journal. 2013, 280(1), 28-45. DOI: 10.1111/febs.12078. ISSN 1742464x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/febs.12078>
- [86] An Introduction to Electron Microscopy booklet. 1. Oregon (USA): FEI part of Thermo Finisher Scientific, ©2010, 40 s. ISBN 978-0-578-06276-1. Dostupné také z: <https://www.fei.com/documents/introduction-to-microscopy-document/>
- [87] Products: bis(18:0 PE)-DTPA (Gd) | 791299. In: Avanti Polar Lipids, Inc. [online]. USA: Avanti Polar Lipids, c2017 [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <https://avantilipids.com/product/791299/>

- [88] Products: 16:0 Cyanur Cap PE | 870275. In: Avanti Polar Lipids, Inc. [online]. USA: Avanti Polar Lipids, c2017 [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <https://wwwbeta.avantilipids.com/product/870275/>
- [89] Ethylenediaminetetraacetic acid. Sigma-Aldrich Co. LLC [online]. USA: Sigma-Aldrich, c2017 [cit. 2017-04-18]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=EDTA&interface=All&N=0+&mode=partialmax&lang=en@ion=CZ&focus=product&.=>
- [90] Products: 18:0 PE-DTPA (Gd) | 791275. In: Avanti Lipids Polar, Inc [online]. USA: Avanti Lipids Polar, c2017 [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: <https://avantilipids.com/product/791275/>
- [91] Products: DSPE-PEG(2000) Cyanur | 880122. In: Avanti Lipids Polar, Inc [online]. USA: Avanti Lipids Polar, c2017 [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: <https://avantilipids.com/product/880122/>
- [92] Protocol 2, The Stewart assay for determination of phospholipids. Liposomes: a practical approach. 2nd ed. /. New York: Oxford University Press, c2003, s. 35. ISBN 0199636559.
- [93] Karl Fischer titration for water determination. In: Mettler-Toled [online]. USA: Mettler-Toledo International [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: http://www.mt.com/cz/cs/home/library/know-how/lab-analytical-instruments/moisture_determination_by_karl_fischer.html
- [94] CARUGO, Dario, Elisabetta BOTTARO, Joshua OWEN, Eleanor STRIDE a Claudio NASTRUZZI. Liposome production by microfluidics: potential and limiting factors. *Scientific Reports*. 2016, 6(1), -. DOI: 10.1038/srep25876. ISSN 2045-2322. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/srep25876>
- [95] The NanoAssemblr™ Benchtop: “Limit size” Liposomes are dictated by the Flow Rate Ratio. In: Precision Nanosystems [online]. Kanada: Precision Nanosystems, c2016 [cit. 2017-04-26]. Dostupné z: <https://www.precisionnanosystems.com/wp-content/uploads/2016/07/Benchtop-Brochure.pdf>
- [96] JOSHI, Sameer, Maryam T. HUSSAIN, Carla B. ROCES, Giulia ANDERLUZZI, Elisabeth KASTNER, Stefano SALMASO, Daniel J. KIRBY a Yvonne PERRIE. Microfluidics based manufacture of liposomes simultaneously entrapping hydrophilic and lipophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016, 514(1), 160-168. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.09.027. ISSN 03785173. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517316308481>

- [97] ZOOK, Justin M. a Wyatt N. VREELAND. Effects of temperature, acyl chain length, and flow-rate ratio on liposome formation and size in a microfluidic hydrodynamic focusing device. DOI: 10.1039/B923299K. ISBN 10.1039/b923299k. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b923299k>
- [98] PATHAK, Sarvesh Kumar, Roli MISHRA, Sapan KUMAR a Gyan PRAKASH. Effect of cholesterol concentration on size of liposome. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences* [online]. 2012, 1(1), 50-53 [cit. 2017-04-09]. ISSN 2278-3008. Dostupné z: <http://www.iosrjournals.org/iosr-jpbs/papers/vol11-issue1/G0115053.pdf?id=4589>
- [99] LIU, Rong an editor. *Water-insoluble drug formation*. 1. Denver: Interpharm Press, 2000. ISBN 15-749-1105-8.
- [100] BRIUGLIA, Maria-Lucia, Chiara ROTELLA, Amber MCFARLANE a Dimitrios A. LAMPROU. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Delivery and Translational Research*. 2015, 5(3), 231-242. DOI: 10.1007/s13346-015-0220-8. ISSN 2190-393x. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s13346-015-0220-8>
- [101] KOUDELKA, Štěpán, Josef MAŠEK, Jiri NEUZIL a Jaroslav TURÁNEK. Lyophilised liposome-based formulations of α -tocopheryl succinate: Preparation and physico-chemical characterisation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010, 99(5), 2434-2443. DOI: 10.1002/jps.22002. ISSN 00223549. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915326472>
- [102] Relaxivity: What is meant by the relaxivity of a contrast agent? How is it measured? In: *Questions and Answers in MRI* [online]. USA: AD Elster, 2005 [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: <http://mri-q.com/what-is-relaxivity.html>