

# Příprava liposomů s obsahem kosmeceutik

Bc. Aneta Marušáková

---

Diplomová práce  
2021



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Aneta Marušáková**  
Osobní číslo: **T19406**  
Studijní program: **N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**  
Studijní obor: **Biomateriály a kosmetika**  
Forma studia: **Kombinovaná**  
Téma práce: **Příprava liposomů s obsahem kosmeceutik**

### Zásady pro vypracování

#### I. Teoretická část

1. Zpracujte literární rešerši na zadané téma.
2. Popište liposomy jejich složení, vlastnosti a metody přípravy.
3. Věnujte se rovněž kosmeceutikům jako slibné kategorii kosmetických surovin, stručně charakterizujete jednotlivé skupiny těchto látek včetně jejich funkce v kosmetických formulacích.

#### II. Praktická část

1. Připravte liposomy s různým složením lipidové membrány a obsahem vybraných kosmeceutik.
2. Vhodnými technikami stanovte jejich fyzikálně-chemické charakteristiky.
3. Sledujte vztah mezi složením a vlastnostmi připravených liposomů.
4. Získané výsledky zpracujte a formulujte závěry práce.

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

**Seznam doporučené literatury:**

- [1] MARSH D. Handbook of Lipid Bilayers, 2nd Edition. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2013. ISBN 13: 978-1-4200-8833-5.
- [2] GREGORIADIS G. Liposome Technology, Volume I: Liposome Preparation and Related Techniques. Informa Healthcare, 2007, ISBN: 10: 0-8493-8821-X.
- [3] RIDEAU, E.; DIMOVA, R.; SCHWILLE, P.; et al. Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking. CHEMICAL SOCIETY REVIEWS, 47, 23, 2018, 8505–8970.
- [4] TRAN V. V.; MOON J. Y.; LEE Y. C. Liposomes for delivery of antioxidants in cosmeceuticals: Challenges and development strategies. JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, 300, 2019, 114-140.
- [5] BONECHI, C.; DONATI, A.; TAMASI, G.; et al. Protective effect of quercetin and rutin encapsulated liposomes on induced oxidative stress. BIOPHYSICAL CHEMISTRY, 233, 2018, 55-63.

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

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2021**  
Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

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

Ve Zlíně dne 20. února 2021

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

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

### **Prohlašuji,**

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce se zabývá přípravou liposomů s obsahem kosmeceutik a věnuje se proto kosmetickým nosičům, liposomům, jejich složení, vlastnostem a metodám přípravy, jako i jednotlivým skupinám kosmeceutik, která jsou používána jako součást kosmetických formulací. Praktická část se zaměřuje na přípravu liposomů ve čtyřech formulacích s různým složením lipidové membrány a obsahem acetátu vitamínu E jako aktivní látky. Liposomy připravené metodou hydratace suchého lipidového filmu byly charakterizovány vhodnými technikami (dynamický rozptyl světla, mikroskopie) a byly stanoveny jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, morfologie, stabilita, enkapsulační a antioxidační účinnost. V závěru práce bylo zhodnoceno složení jednotlivých formulací v souvislosti s jejich vlastnostmi.

Klíčová slova: liposomy, kosmetická vehikula, kosmeceutika, vitamín E acetát

## **ABSTRACT**

The master thesis deals with the preparation of liposomes containing cosmeceuticals, and describes cosmetic carriers, liposomes, their composition, properties and methods of preparation, as well as on different groups of cosmeceuticals used as part of cosmetic formulations. The experimental part focuses on the preparation of liposomes in four formulations with different composition of the lipid membrane containing vitamin E acetate as the active substance. Liposomes prepared using the procedure of dry-lipid-film hydration were characterized using suitable techniques (dynamic light scattering, microscopy) and their physicochemical properties, morphology, stability, encapsulation and antioxidant efficiency were determined. At the end of the work, the correlation between composition of individual formulations and their properties was evaluated.

Keywords: liposomes, cosmetic vehicles, cosmeceuticals, vitamin E acetate

Poděkování patří vedoucí mé diplomové práce paní doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc. za trpělivé vedení, poskytnuté materiály, odborné rady, podněty a její čas, který mi v celém průběhu psaní práce věnovala.

Ráda bych poděkovala i svému manželovi, který mi byl oporou a rodině, která mě během psaní práce podporovala.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>1 KOSMETICKÁ VEHIKULA ČÁSTICOVÉHO CHARAKTERU</b> .....	<b>11</b>
<b>2 LIPOSOMY</b> .....	<b>13</b>
2.1 SLOŽENÍ .....	13
2.2 KLASIFIKACE.....	14
2.3 PŘÍPRAVA.....	15
2.3.1 Metoda suchého lipidového filmu.....	16
2.3.2 Metody zmenšení velikosti liposomů a počtu jejich lamel .....	16
2.3.3 Další metody přípravy liposomů .....	17
2.4 VLASTNOSTI LIPOSOMŮ .....	19
2.4.1 Fyzikálně- chemické vlastnosti .....	19
2.5 STABILITA .....	20
2.6 POUŽITÍ LIPOSOMŮ .....	21
2.6.1 Liposomy ve farmacii .....	22
2.6.2 Liposomy v potravinářství .....	22
2.6.3 Liposomy v kosmetice .....	22
<b>3 KOSMECEUTIKA</b> .....	<b>24</b>
3.1 TYPY KOSMECEUTIK.....	24
3.1.1 Hydroxykyseliny .....	25
3.1.2 Bioaktivní peptidy .....	26
3.1.3 Vitamíny .....	28
<b>4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>33</b>
<b>5 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>35</b>
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>36</b>
<b>6 POUŽITÝ MATERIÁL</b> .....	<b>37</b>
6.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	37
6.2 PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	37
<b>7 METODIKA</b> .....	<b>39</b>
7.1 PŘÍPRAVA LIPOSOMŮ .....	39
7.2 STANOVENÍ VELIKOSTI LIPOSOMŮ A JEJICH ZETA POTENCIÁLU.....	40
7.3 CHARAKTERIZACE LIPOSOMŮ POMOCÍ MIKROSKOPIE .....	40
7.4 STANOVENÍ ENKAPSULAČNÍ ÚČINNOSTI .....	41
7.5 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY .....	41
7.6 LYOFILIZACE A ZPĚTNÁ REKONSTITUCE LIPOSOMŮ .....	42

7.7	STANOVENÍ STABILITY LIPOSOMŮ .....	42
7.8	MORFOLOGIE LYOFILIZOVANÉHO KOLÁČE .....	43
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>44</b>
8.1	PŘÍPRAVA LIPOSOMŮ .....	44
8.2	STANOVENÍ VELIKOSTI LIPOSOMŮ A JEJICH ZETA POTENCIÁLU .....	45
8.3	CHARAKTERIZACE LIPOSOMŮ POMOCÍ MIKROSKOPIE .....	47
8.4	STANOVENÍ ENKAPSULAČNÍ ÚČINNOSTI .....	49
8.5	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY .....	51
8.6	STANOVENÍ STABILITY LIPOSOMŮ .....	52
8.7	MORFOLOGIE LYOFILIZOVANÉHO KOLÁČE .....	54
8.8	LYOFILIZACE A ZPĚTNÁ REKONSTITUCE LIPOSOMŮ .....	58
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>64</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>66</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>81</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>82</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>84</b>



## ÚVOD

Přípravky péče o pleť jsou od pradávna používány ženami různých věkových kategorií. Při jejich aplikaci je kladen velký důraz na kvalitu a účinky, které ženy od kosmetických přípravků očekávají [1, s. 375]. Kosmetické firmy proto vynakládají nemalé částky na vývoj nových kosmetických formulací a přípravků. Významnou součástí moderní kosmetiky jsou kosmeceutika, látky, které udržují pleť v dobré kondici, potlačují známky stárnutí a napomáhají jejímu zdraví. Mezi hlavní skupiny kosmeceutik se řadí např. hydroxykyseliny, bioaktivní peptidy a vitamíny. Kosmeceutika, nebo jiné aktivní složky obsažené v přípravcích, musí být rovněž vhodným způsobem dopraveny k určenému cíli. K tomuto účelu jsou využívány různé nosiče, které aktivní látku ochrání před nechtěnými vnějšími vlivy a dopraví ji do místa určení. K hlavním skupinám nosičů aktivních látek v kosmetice patří micelární systémy, mikroemulze, emulze, hydrogely a liposomy. Liposomy byly nejprve využívány ve farmaceutickém průmyslu a součástí kosmetiky se staly až později [2, s. 33-40], [3, s. 479-494], [4, s. 11]. Tato diplomová práce se zabývá právě problematikou liposomových nosičů s enkapsulovaným kosmeceutikem, acetátem vitamínu E, který má pozitivní účinky na pleť.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 KOSMETICKÁ VEHIKULA ČÁSTICOVÉHO CHARAKTERU

Pokročilé typy nosičů aktivních látek jsou v poslední době předmětem zájmu kosmetického, potravinářského i farmaceutického průmyslu. Jedná se o koloidní disperze nebo mikročástice, které mají za cíl aktivní látku enkapsulovat, ochránit před vnějšími vlivy a dopravit ji ke správnému cílovému místu. Těmito aktivními látkami mohou být léčiva, antioxidanty, vitamíny, antimikrobiální látky či nutraceutika [5, s. 1964-1980], [6, s. 50-57], [7], [8, s. 3-15], [9, s. 184].

Jako kosmetická vehikula jsou označovány nosiče aktivních látek, které tyto látky dopraví do cílových míst. Mohou být využity pouze v případě, že nedochází k jejich systémovému, fyziologickému či farmakologickému účinku, a pokud je výrobek, jako celek, bezpečný. Doprava a dodávání aktivních látek vyžaduje formulaci, ve které je aktivní látka přítomna v dostatečné koncentraci, aby došlo k optimálně rychlému uvolňování a žádané distribuci aktivní látky mezi vehikulem a cílovým místem. Z toho plyne, že dané vehikulum by mělo proniknout do *stratum corneum* a následně uvolnit aktivní látku v místě, kde má být dosaženo potřebného účinku [10, s. 3-15].

Konkrétní typ vehikula, jeho složení a mechanismus účinku přímo ovlivňují jeho účinnost v dermatologických i kosmetických přípravcích. Jeho hodný výběr hraje i podstatnou roli při vývoji konkrétního produktu. Mezi nejdůležitější kritéria při jeho výběru patří účinek vehikula na pokožku, snadná formulace, fyzikální a chemická stabilita. Přes velkou snahu v oblasti vývoje kosmetických vehikul však zatím nebyl identifikován universální nosič, který by byl funkční ve všech typech kosmetických přípravků. Každá účinná látka potřebuje pro optimální účinek jiný typ vehikula [11, s. 157-160]. Literární zdroje poukazují na několik typů těchto nosičů, které je možné klasifikovat dle různých principů. Nicméně kosmetické přípravky patří mezi složité systémy, a proto je pro ně náročné stanovit univerzální klasifikační systém. Podle vzhledu rozdělujeme nosiče na pevné, kapalné a polotuhé systémy. Hlavním zástupcem pevných jsou práškové systémy. Mezi kapalné patří vodné roztoky, micelární systémy, emulze a mikro a nanoemulze. Do skupiny pevných nosičů jsou řazeny např. hydrogely, lipogely, oleogely, krémy, niosomy a liposomy [12], [13, s. 1049].

Vehikula lze klasifikovat i dle funkce jejich použití a místa aplikace. Konkrétně vehikula použitá pro ošetření vlasů (šampony, barviva na vlasy atd.), nehtů (laky), pokožky (tělové mléko, deodorant atd.) či dutiny ústní (zubní pasta). Při vývoji kosmetických formulací je kladen důraz především na fyzikálně-chemický klasifikační systém, který podává základní

informace o vlastnostech a charakteru daného vehikula. Pro fyzikálně-chemický systém klasifikace se používají různá kritéria: polarita, skupenství, velikost a rozměr rozpuštěných částic, reologie a rozpustnost [10, s. 3-15].

Tento krátký souhrn poukazuje na širokou škálu klasifikací a typů systémů, které mohou být zvoleny pro konkrétní dopravu účinných látek. Tato práce se věnuje jednomu z možných typů vehikul používaných v kosmetických přípravcích, liposomům a jejich využití jako nosičů aktivních látek s charakterem kosmeceutik.

## 2 LIPOSOMY

Název liposomy vychází z řeckého slova “Lipos” znamenající tuk a “Soma“ tělo. Poprvé byly popsány britským hematologem A. Banghemem a R. W. Hornem během testování nového typu elektronového mikroskopu, kdy vznikly přidáním vodného roztoku barviva k suchým fosfolipidům. Vědci zjistili, že fosfolipidy za přítomnosti vody tvoří kulovité útvary – liposomy [14, s. 381], [15, s. 275-285], [16, s. 436], [17, s. 1197-1198], [18, s. 12], [19, s. 1-16].

Liposomy jsou sférické vezikuly, které se skládají z jedné, či více koncentrických lamel. Ty jsou tvořeny dvojvrstvou amfipatických lipidů [19, s. 1-16]. Nejčastěji jsou tyto vezikuly složeny z fosfolipidové dvojvrstvy, podobné buněčné membráně, a mají průměr 50 až 1000 nm. Fosfolipidy jsou pak složeny z dlouhých hydrofobních řetězců nazývaných ocásek (tail) a polární hydrofilní hlavy (head). Ve vodném prostředí se hydrofobní konce seskupují a vzniká dvojvrstva, ve které jsou hydrofilní hlavy obráceny k vodnému prostředí. Vytvořená dvojvrstva fosfolipidů ve svém středu uzavírá vodnou fázi, stejně jako buněčná membrána [14, s. 381], [18, s. 12], [19, s. 1-16].

Díky své struktuře, velikosti, biokompatibilitě a charakteru mohou být liposomy použity jako vhodné nosiče aktivních sloučenin [14, s. 381-383]. Právě vnitřní prostor liposomů může sloužit jako vhodný prostor pro uložení aktivní látky. Tato jedinečná struktura umožňuje do liposomů enkapsulovat látky různého charakteru, fyzikálních vlastností, od nízkomolekulárních až po velké proteiny [20, s. 323]. Struktura lipidové dvojvrstvy umožňuje snazší uvolňování obsahu, proto jsou liposomy velmi užitečné pro lékařské, farmaceutické, potravinářské, zemědělské nebo kosmetické aplikace [16, s. 437-438], [21, s. 617-619]. Jedním z důvodů pro kosmetické použití liposomů je jejich snadná příprava a schopnost zlepšovat absorpci účinných složek pokožkou [21, s. 618], [22, s. 40-41]. Významnou vlastností je také možnost současného začlenění a uvolnění dvou materiálů s různou rozpustností, jak uvádí Maherani a kolektiv kolektiv [16, s. 437-438], [23, s. 1-2], [24], [25, s. 49-54], [26].

### 2.1 Složení

Liposomy mohou být tvořeny celou škálou strukturních složek. Nejvýznamnější skupinou jsou fosfolipidy [16, s. 438-439], [26]. Fosfolipidy patří mezi hlavní složky strukturních membrán a představují více než 50 % celkové hmotnosti lipidů v membránách. Jde o deriváty kyseliny fosfatidové. Hlavními skupinami fosfolipidů jsou glycerofosfolipidy a

sfingolipidy. Nejběžněji využívaným fosfolipidem pro přípravu liposomů je fosfatidylcholin. Mezi další a hojně používané fosfolipidy lze řadit například: fosfatidyletanolamin, fosfatidylserin, fosfatidylinositol a fosfatidylglycerol [14, s. 381-382].

Jednou z dalších složek liposomů je cholesterol, který se podílí na stavbě dvojvrstvy a ovlivňuje míru tuhosti jejich membrány, napomáhá udržovat lipidovou vrstvu fluidní a stabilizovat její neuspořádanost. Použitím cholesterolu jako stabilizátoru membrány se zabývala řada studií. Jeho přítomnost v liposomech ovlivňuje snížení permeability dvojvrstev, zlepšení odolnosti vezikuly vůči agregaci i míru sbalení fosfolipidových molekul [27, s. 231-232]. Nicméně sám o sobě netvoří dvojvrstvou strukturu, protože jeho polární část je malá. Cholesterol je možné zahrnout do fosfolipidových membrán ve vysokých koncentracích například 1:1 nebo až 2:1 molárního poměru cholesterolu k fosfatidylcholinu [14, s. 381-382], [18, s. 12-13], [27, s. 231], [28, s. 402-413], [29, s. 125-126].

Konkrétní poměry složek liposomů souvisí s tím, k jakým účelům jsou liposomy využívány. Zda jsou použity v medicíně, kde se využívají k transportu a uvolňování bioaktivní látky na konkrétním místě v těle nebo v kosmetice, kde je možné liposomy využít k přísunu látek do buněk za účelem například regenerace pokožky [14, s. 384], [21, s. 618-619], [27, s. 231].

## 2.2 Klasifikace

Nejhojněji využívanou metodou pro přípravu liposomů je hydratace suchého lipidového filmu. Nejprve je v baňce rozpuštěn fosfolipid v chloroformu (nebo ve směsi chloroformu a methanolu). Poté je baňka s roztokem fosfolipidu v chloroformu připevněna na rotační odparku. Na stěnách baňky vzniká odpařením rozpouštědla tenký fosfolipidový film. Pak je film hydratován vodnou fází a třepáním převeden na heterogenní suspenzi multilamelárních vezikul. Velikost vezikuly je možné upravit dalšími kroky, jako je například vysokotlaká homogenizace, sonikace, extruze a další techniky (viz dále) [29, s. 123-140], [31, s. 2-3], [32, s. 1181-1191], [33, s. 297-305].

### 1. Unilamelární vezikuly (UV, unilamellar vesicles)

Ty je možné rozdělit do dalších 3 podskupin:

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

Jde o vezikuly, které jsou větší než 100 nm a jsou tvořeny jednou lipidovou dvojvrstvou. Jsou velmi často používané jako nosiče pro hydrofilní látky, zejména díky tomu, že mají větší stabilitu a menší membránové napětí.

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

GUV vezikuly mají velikost okolo 1  $\mu\text{m}$  a nejsou vhodné pro transport látek, jelikož dosahují nízké stability.

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

Jde o nejmenší vezikuly, které dosahují velikosti 20-100 nm. Proto jsou vhodné pro transport léčiv do tkání. Dokážou prostupovat cévními stěnami. Jsou však značně nestabilní [18, s. 14], [34, s. 297-315].

2. Multilamelární vezikuly (MLV, multilamellar large vesicles)

Multilamelární vezikuly jsou tvořeny z více dvojvrstev, které umožňují pomalé uvolňování jejich obsahu. Dosahují velikosti 0,1 – 1  $\mu\text{m}$ . Jejich příprava je snadná a zůstávají dlouho stabilní [31, s. 2-3], [32].

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

Oligolamelární vezikuly jsou hojně využívány v klinické praxi, jelikož jejich membrány obsahují větší množství lipidů, a proto pomaleji uvolňují svůj obsah. Tímto způsobem může být prodlužován jejich terapeutický efekt [16, s. 436], [18, s. 14], [30, s. 40], [31, s. 2-3].

Kromě nejběžnějšího dělení liposomů z hlediska velikosti a počtu lamel literatura zmiňuje i klasifikaci liposomů dle aplikace. Z tohoto hlediska lze liposomy například dělit na: konvenční (konvenční mechanismus liposomů byl prvním, který se využívá ve farmacii), pH sensitivní, imunoliposomy nebo dlouhodobě cirkulující [33, s. 297-305], [35], [36], [37], [38], [39, s. 660-668].

## 2.3 Příprava

Pro přípravu liposomů existuje široká škála technik. Všechny typy těchto technik vyžadují, aby lipidy, použité k přípravě liposomů, byly kombinovány s vodnou fází [16, s. 439-441], [40, s. 798-809]. Proto lze obecný způsob přípravy liposomů shrnout do čtyř základních kroků:

1. Sušení lipidů z organického rozpouštědla
2. Rozptýlení lipidu ve vodném prostředí
3. Čištění připravených liposomů
4. Analýza konečného produktu [18, s. 15-16], [31, s. 3-6]

### 2.3.1 Metoda suchého lipidového filmu

Nejhojněji využívanou metodou pro přípravu liposomů je hydratace suchého lipidového filmu. Nejprve je v baňce rozpuštěn fosfolipid v chloroformu (nebo ve směsi chloroformu a methanolu). Poté je baňka s roztokem fosfolipidu v chloroformu připevněna na rotační odparku. Na stěnách baňky vzniká odpařením rozpouštědla tenký fosfolipidový film. Pak je film hydratován vodnou fází a třepáním převeden na heterogenní suspenzi multilamelárních vezikul. Velikost vezikuly je možné upravit dalšími kroky jako je například vysokotlaká homogenizace, sonikace, extruze a další techniky (viz dále) [31, s. 3-6].

### 2.3.2 Metody zmenšení velikosti liposomů a počtu jejich lamel

Mezi základní typy mechanických dispergačních metod patří:

- Sonikace;
- French press;
- Zmrazování a rozmrazování;
- Membránová extruze, vytlačování [41, s. 65-77], [42, s. 945-951], [43, s. 269-270]

#### *Sonikace*

Sonikace patří mezi nejrozšířenější metody pro přípravu malých unilamelárních vezikul (SUV). Hydratované lipidy (MLV) je možné sonikovat dvěma typy sonikátoru, sonikační sondou nebo pomocí sonikační lázně. Mezi hlavní nevýhody této metody je řazena nízká účinnost enkapsulace, nežádoucí degradace fosfolipidů a enkapsulovaných sloučenin, možné znečištění disperze kovem ze sonikační sondy a přítomnost MLV spolu s SUV [41, s. 65-77], [43, s. 269-270]. Během sonikace sondou je hrot sondy ponořen přímo do disperze liposomů. Při sonikaci je spotřebováno velké množství energie, která způsobuje zahřívání disperze v oblasti, kde je sonikační sonda ponořena. Z tohoto důvodu je třeba během sonikace disperzi chladit. Při sonikaci v lázni je liposomová disperze umístěna do sonikátoru v relevantní nádobě nebo pod inertní atmosférou. Na rozdíl od sonikace sondou, je v průběhu této metody snazší regulovat teplotu lipidové disperze díky kapalině, kterou je naplněna vana sonikátoru [44, s. 1534-1538].

#### *Extruze*

Během extruze jsou MLV protlačovány přes soustavu filtrů. Tato metoda je využívána ke změně velikosti liposomů a jejich homogenizaci. Je možné připravit oligolamelární nebo



unilamelární liposomy [45]. Při využití extruze závisí vlastnosti konečné lipidové suspenze na velikosti pórů membrány, vodné fázi, složení lipidů a počtu opakování extruze, při které se tvoří uni či oligolamelární liposomy v důsledku ztráty lamel [18, s. 15-16], [31, s. 3], [43, s. 269-270].

#### *French press*

Při přípravě liposomů pomocí French press metody jsou MLV vytlačovány malým otvorem za vysokého tlaku, což způsobuje jejich rozrušení [41, s. 65-77]. Díky tomuto mechanickému rozrušení vznikají fragmenty vezikul, které pomocí hydrofobních interakcí spontánně tvoří středně velké vezikuly. Oproti sonikační metodě má French Press několik výhod [46, s. 354], [47, s. 1-16]. Výsledné liposomy jsou větší než SUV připravené sonikací a koncentrace lipidů v disperzi může být vysoká. Nevýhodou této metody jsou ale poměrně malé objemy (maximálně asi 50 ml) připravených disperzí [41, s.65-77], [42, s. 945-951].

#### *Zmrazování a rozmrazování*

Malé unilamelární vesikuly jsou rychle zmrazeny a pomalu rozmrazovány. Při rychlém zmrazení SUV prasknou a při zahřátí dojde k jejich fúzi a zvětšení vnitřního objemu [48], [49], [50, s. 409-421]. Během této metody je tedy dosaženo zvýšení enkapsulační účinnosti liposomů z 20 na 30 % [49, s. 3945-3952].

### **2.3.3 Další metody přípravy liposomů**

Mezi tyto metody řadíme:

#### *1. Metody vstřikování rozpouštědla*

Roztok lipidů, které jsou rozpuštěny ve směsi diethyletheru, etheru a methanolu, je postupně vstřikován do vodného roztoku látky, která má být enkapsulována. Je vhodné pracovat za sníženého tlaku nebo při teplotě 55 až 65 °C. K tvorbě liposomů vede následné odstranění organického rozpouštědla. Jednou z hlavních nevýhod této metody je, že populace liposomů je heterogenní (70 až 200 nm), a sloučeniny, které mají být enkapsulovány, nemusí snést expozici organickým rozpouštědly při zvýšené teplotě [51, s. 629-634], [52, s. 137-153]. Obdobně lze k přípravě liposomů využít i vstřikování roztoku lipidů v ethanolu do velkého přebytku pufru nebo vody s enkapsulovanou látkou. Mezi hlavní nevýhody této techniky patří již výše zmíněná heterogenita vytvořené liposomové populace, dále pak velké zředění liposomů a obtížné odstranění veškerého ethanolu, jelikož tvoří azeotropní směs s vodou.

Poslední nevýhodou je, že některé biologicky aktivní molekuly mohou být deaktivovány kvůli zbytkovému množství ethanolu, který nebyl odstraněn [53, s. 1015-1019].

### *2. Metody odpařování reverzní fáze*

Tato metoda je založena na tvorbě obrácených (reverzních) micel. Tyto obrácené micely se připraví sonikací směsi pufrované vodní fáze, která obsahuje aktivní látku a organické fáze, která obsahuje rozpuštěné fosfolipidy. Postupné odstraňování organického rozpouštědla vede k přeměně obrácených micel do viskózní gelové formy. V kritickém bodě procesu jsou některé z obrácených micel rozrušeny (uvolní se fosfolipidy) a gelový stav se zhroutí. Liposomy se pak vytvoří díky přítomnosti volných fosfolipidů, které vytvoří dvojvrstvu kolem zbývajících micel. Objem prostoru pro enkapsulovanou látku je v těchto liposomech až čtyřnásobně větší než u multilamelárních liposomů nebo liposomů vyráběných protřepáním [42, s. 945-951], [44]. Pomocí této metody lze docílit vysoké účinnosti enkapsulace (až 65 % v prostředí s nízkou iontovou silou 0,01 M NaCl). Tato technika je využívána k enkapsulaci malých, velkých molekul i makromolekul. Nevýhodou této metody je kontakt enkapsulovaných materiálů s organickým rozpouštědlem, které může způsobit jejich poškození [54, s. 4194-4198]. Handa et al. představili upravenou verzi metody odpařování na reverzní fázi. Tato úprava měla za následek zvýšenou účinnost liposomální enkapsulace až na 80 % [55, s. 261-266].

### *3. Metody solubilizace detergentem*

Při tomto postupu je suchý lipidový film nejprve hydratován pufrém obsahujícím detergent. Detergent spolu s přítomnými fosfolipidy začne vytvářet smíšené micely. V následném kroku se detergent z roztoku odstraní a micely se začnou spojovat za vytvoření lipidové dvojvrstvy a malých unilamelárních vezikul. Jako detergenty se používají v jejich kritických micelární koncentracích např. dodecylsulfát sodný nebo Triton X-100. V okamžiku, kdy se detergent oddělí, micely jsou pak více obohacovány o fosfolipidy, což vede ke vzniku LUV. Pro odstranění detergentu lze využít gelovou chromatografii nebo dialýzu [56], [57, s. 19-27], [58, s. 295].

### *Gelová permeační chromatografie*

Při této technice je detergent odstraňován pomocí speciální chromatografické separace. Nejčastěji jsou používány kolony s náplní Sephacryl S200-S1000 (General Electric Company, Teherán, Írán) a Sephadex G-50, Sephadex G-1 00 (Sigma-Aldrich, MO, USA),

Sepharose 2B-6B. Liposomy pronikají meziprostory gelu a při nízkých rychlostech toku je jejich separace od detergentů velmi dobrá [31, s. 4-5].

### *Dialýza*

Jednou z dalších možností odstraňování detergentů jsou komerčně dostupná zařízení LipoPrep. Dialýzu je možné provádět v dialyzačních membránách ponořených do pufrů, jak uvádí Shaheen a kolektiv [32, s. 1181-1191].

### *Adsorpce*

Odstranění detergentu pomocí adsorpce lze dosáhnout protřepáním směsi micelárního roztoku a organického adsorbéru. Při této technice jsou využívány především absorbéry na bázi organického polysterenu-XAD-2 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo) a Bio-beads SM2 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA). Největší výhodou použití adsorbentů detergentů je především jejich schopnost eliminace detergentů s nízkou kritickou micelární koncentrací [31, s. 4]

## **2.4 Vlastnosti liposomů**

Vlastnosti liposomů jsou závislé na jejich složení a určují jejich využití. Mezi typické vlastnosti liposomů řadíme jejich amfipatický charakter, biodegradabilitu, biokompatibilitu, možnost cíleného transportu, uvolňování a enkapsulace materiálů s různými vlastnostmi a rozpustností. Díky těmto vlastnostem lze pomocí liposomů zvýšit účinnost enkapsulovaných látek a optimalizovat jejich dávkování. Jedinečné vlastnosti liposomů umožňují řadu aplikací, od základních studií použití v kosmetice a potravinářství až po transport genů nebo léčiv [16, s. 441-444], [18, s. 12], [59].

### **2.4.1 Fyzikálně- chemické vlastnosti**

Míra uspořádanosti lipidových struktur je funkcí teploty a hydratace. Uspořádání fosfolipidů je ovlivněno mnoha faktory, které závisí na van der Waalsových interakcích mezi uhlovodíkovými řetězci, na délce acylového řetězce mastné kyseliny a její nasycenosti. [Article-5] K základním fyzikálním vlastnostem liposomů patří teplota fázového přechodu, která ovlivňuje změnu jejich stabilní, pevné struktury na strukturu fluidní. Mezi teplotou fázového přechodu, délkou uhlovodíkového řetězce a počtem dvojných vazeb existuje souvislost. Čím více dvojných vazeb a kratších uhlovodíkových řetězců mastných kyselin struktura obsahuje, tím je teplota fázového přechodu nižší [18, s. 12], [61].

Fázové přechody liposomů mohou být prakticky využity jako spouštěcí mechanismy pro uvolnění enkapsulované látky. Lipidové vrstvy, které při nízké teplotě existují v pevné uspořádané fázi a nad určitou teplotou ve fázi fluidní (propustné), mohou tak zahřátím uvolnit enkapsulované léčivo do cílového místa.

Jak již bylo uvedeno výše, lamelární dvojvrstvu fosfolipidů mohou tvořit fosfolipidy, sfingolipidy a steroly. Fosfolipidy jsou nejčastějším lipidem membrán. Možná dvojná *cis* vazba v acylu mastné kyseliny zapříčiňuje zalomení řetězce a větší volný objem kvůli horšímu vzájemnému bližšímu uspořádání acylových řetězců. Tato část fosfolipidu je nazývána *ld* (liquid-disordered) a charakterizována nízkou mírou uspořádání hydrofobního řetězce [61], [62, s. 40].

Další fáze je pojmenována jako kompaktní gelová s omezenou fluiditou *so* (solid-ordered). Je tvořena lipidy, které mají vyšší teplotu fázového přechodu, jelikož hydrofobní část nasycených mastných kyselin je uspořádána těsněji kvůli silnějším nevazebným interakcím a je potřeba větší energie k rozrušení její struktury [62, s. 40].

## 2.5 Stabilita

Stabilita liposomů je jedním z hlavních faktorů ovlivňujících jejich aplikaci. Závisí na mnoha okolnostech, jako je např. velikost liposomů či jejich chemické složení [16]. Stabilitu liposomů lze posuzovat z několika hledisek a obvykle ji klasifikujeme podle čtyř hlavních skupin: fyzikální, chemická, koloidní stabilita a někteří autoři uvádějí i biologickou stabilitu [16, s. 444-445], [18, s. 13-14], [63, s. 71].

Fyzikální stabilita je důležitá především pro *in vivo* aplikace, jelikož ovlivňuje interakce liposomů s buňkami a jinými strukturami lidského těla. Je ovlivněna složením fosfolipidů, morfologií a zejména zeta potenciálem, který je mírou vzájemných interakcí mezi liposomy. Měřením zeta potenciálu je možné získat informace o jejich dispergaci, flokulaci nebo agregaci. Liposomy jsou obvykle považovány za stabilní, pokud je hodnota zeta potenciálu vyšší než 30 mV nebo nižší než -30 mV [18, s. 13-14].

Chemická stabilita reprezentuje schopnost liposomu udržovat konkrétní míru enkapsulace s ohledem na vnější změny pH, koncentraci oxidačních činidel, složení elektrolytu a přítomnost povrchově aktivních látek [16, s. 444-445].

Koloidní stabilita pak znamená schopnost liposomů zachovat si svou velikost za různých podmínek skladování [64]. Je jednou z nejdůležitějších vlastností liposomů. Stabilita je dána

vzájemnými odpudivými a přitažlivými interakcemi mezi vezikulami. Čím větší jsou odpudivé síly mezi vezikulami, tím vyšší je stabilita daného systému [63, s. 71]. Mezi hlavní způsoby stabilizace koloidních systémů patří elektrostatická a sterická stabilizace. U první, elektrostatické stabilizace, je uplatňován princip vysoké hustoty povrchového náboje vezikul, mezi kterými převládají odpudivé elektrostatické síly nad přitažlivými van der Waalsovými silami [65, s. 69] Největším problémem této stabilizace je značná závislost vlastností liposomů na podmínkách a složení disperzní fáze. Sterická stabilizace naopak nezávisí na složení disperzního prostředí a je zároveň účinná v polárním i nepolárním prostředí [66]. Základním principem tohoto typu stabilizace je adsorpce stabilizujícího polymeru na povrch liposomu, kdy při dostatečném přiblížení působí mezi hydrofilními řetězci jednotlivých vezikul odpudivé síly [18, s. 13-14].

Jako velká část jiných biomolekul podléhají lipidy degradačním procesům [18, s. 13-14]. Jejich fyzikální a biologickou stabilitu nejčastěji zhoršují chemické reakce. Zhoršení fyzikální stability může v důsledku způsobit shlukování liposomů, či únik aktivní látky a tím omezit účinnost liposomu [16, s. 444]. Mezi nejčastější degradační procesy probíhající v lipidech patří oxidace a hydrolýza. Oxidace působí především na hydrofobních řetězcích nenasycených mastných kyselin fosfolipidů. Může ji vyvolávat například expozice světlu nebo přítomnost kovových iontů, které kontaminují médium. Je možné ji částečně zamezit skladováním liposomů za nízkých teplot, používáním čistých chemikálií, znemožnění styku s kyslíkem a světlem nebo dodáním konzervantu [18, s. 14]. Hydrolýza je rozkladná reakce, kdy reakčním činidlem je voda [67]. Hydrolýza probíhá v molekulách fosfolipidů v místě esterové vazby. V první fázi jsou odštěpeny mastné kyseliny z hlavního fosfolipidového řetězce, které dávají vznik lysofosfolipidům. V druhé fázi dochází k další hydrolýze a vzniku glycerolfosfátů. Hydrolýze lze předejít především dobře zvolenou teplotou skladování a vhodným pH [63, s. 71].

## 2.6 Použití liposomů

V současnosti jsou liposomy využívány v řadě odvětví. Lze jmenovat například biofyziku (studium buněčných membrán), chemii (katalýza), koloidní chemii či biochemii. Setkáme se s nimi i ve farmacii, potravinářství a kosmetice.

### 2.6.1 Liposomy ve farmacii

Liposomy jsou dnes důležitou součástí biologického, farmaceutického i lékařského výzkumu. Slouží jako modelové membrány a nosiče pro dodávání nukleových kyselin, hormonů, enzymů a léčiv. Mezi další aplikace liposomů patří enkapsulace kontrastních látek pro využití v diagnostickém rentgenovém a NMR zobrazení [68], [69], [70, s. 939-945], [71, s. 704-710], [72, s. 373-376], [73, s. 333-345].

Díky svým unikátním vlastnostem, které plynou z jejich struktury, jsou liposomy ideálními nosiči aktivních látek. Při vývoji léčiv nebo lékových formulací je kladen důraz hlavně na minimalizaci nežádoucích účinků a zvýšení terapeutické účinnosti. Za tímto účelem jsou testovány různé alternativní postupy pro podávání léčiv. Mezi ně je řazeno i podávání léčiva, které je enkapsulováno v liposomech [14], [34], [59].

Další využití liposomů je uplatňováno při léčbě kožních onemocnění, která je založena na podobnosti dvojvrstvé struktury liposomu a buněčných membrán. V souvislosti s lipidovým složením mohou liposomy měnit fluiditu buněčných membrán, a tak snadněji transportovat aktivní složky k cílovým místům [74, s. 55-71], [75, s. 44-54].

### 2.6.2 Liposomy v potravinářství

Liposomy mají široké využití i v oblasti potravinářského průmyslu. Jsou využívány během vývoje nových příchutí či aromat, při řízení uvolňování vůní v potravinách nebo za účelem zlepšování barvy a struktury potravin. Jsou schopny zvyšovat vstřebávání a biologickou dostupnost nutričních potravinových doplňků a podílet se na zvýšení účinnosti antimikrobiálních látkách. Kromě toho mohou být lipidové vezikuly využity k výrobě a navrhování nových materiálů pro potravinářské obaly s lepšími bariérovými a antimikrobiálními vlastnostmi, nebo také jako nanosenzory pro sledování stavu potravin během přepravy a skladování. Liposomy mohou rovněž poskytovat ochranu aktivních látek před enzymatickými či chemickými změnami. Zároveň jsou nosiči nutričně cenných složek [76, s. 241-258], [77, s. 309-327], [78, s. 25-31].

### 2.6.3 Liposomy v kosmetice

Největší zájem o používání liposomů v kosmetice směřuje k jejich aplikaci v pleťových krémech a gelech. Fosfolipidy jsou v kosmetice a dermatologii aplikovány kvůli vysokému obsahu esenciálních mastných kyselin, zejména kyseliny linolové, která má schopnost zvýšit a podpořit bariérovou funkci pokožky. Zároveň je tato mastná kyselina schopna snižovat

ztrátu vody z pokožky [21], [79]. Do liposomů lze enkapsulovat látky, které napomáhají zlepšení stavu pokožky. Tyto aktivní látky mohou například pokožku změkčovat, regenerovat, nebo zvlhčovat, či jinak pozitivně ovlivňovat [80, s. 361-365], [81, s. 361-366]. Liposomy jsou používány také v krémech proti stárnutí nebo ve vlasových přípravcích, např. při léčbě vypadávání vlasů [21], [82, s. 531-534], [83, s. 364-366].

Nově objevující se skupinou kosmetických přípravků je nutriční kosmetika, která pro udržení dobrého stavu a vzhledu pokožky kombinuje liposomy a byliny. Byliny jsou využívány pro své antimikrobiální a antioxidační účinky, schopnost pokožku zvlhčovat, potlačovat účinky proti stárnutí a mnoho dalších [84, s. 89-95]. Technologie využívání liposomů nabízí řadu příležitostí pro přípravu nových kosmetických formulací a přípravků [21], [82, s. 531-534].

### 3 KOSMECEUTIKA

Termín kosmeceutika (cosmeceuticals) použil v roce 1993 Albert Kligman, který se odkazoval na výrobky v péči o pleť. Dle definice a vlastností jsou to látky/produkty na pomezí kosmetiky a farmacie. Pojem kosmeceutika je nejčastěji používán k označení produktů péče o pleť, které obsahují aktivní složky prospěšné pro zlepšení vzhledu pokožky a podporují její zdraví [2], [3], [4, s. 1-6]. Avšak tento pojem není legislativně ošetřen a neexistují právní normy, které by prokazovaly, že tyto produkty splňují konkrétní požadavky, které jsou na ně kladeny. Prozatím neexistují ani žádná jednoznačná kritéria na základě, kterých by bylo možné produkty do této kategorie zařadit [85], [86, s. 59-65], [87, s. 155-159].

Dále je tento termín využíván i k označení dalších produktů, od opalovacích krémů až po retinoidy na lékařský předpis. Dokonce i zvlhčovače a hydratační krémy lze označit za kosmeceutika, jelikož mají příznivý účinek na fyziologii kůže. Nicméně ve většině případů je pojem vyhrazen pro prostředky zlepšující hydrataci a obsahující aktivní složky, které mají i další výhody pro pokožku. Tyto produkty spotřebitelům poskytují výhody nad rámec kosmetiky a jsou jimi velmi vyhledávány [2], [3], [4], [88, s. 62-69]. Kosmeceutika jsou v současnosti snadno dostupná za rozumnou cenu. Patří mezi nejrychleji rostoucí segmenty na trhu přípravků osobní péče. Spotřebitelé je nejčastěji volí při prevenci proti stárnutí nebo při problémech pleti jako je akné, růžovka, strie, vypadávání vlasů či melasma (hyperpigmentace). Často je zkouší jako alternativní metodu před vyhledáním odborné pomoci. Terapeutické výhody kosmeceutik využívají i lékaři v kombinaci s léčbou. Běžně jsou i nedílnou součástí estetické medicíny. Díky vysoké poptávce investují farmaceutické a kosmetické firmy do jejich vývoje a výzkumu značné úsilí i prostředky [89, s. 906-914], [90, s. 141-143] [91, s. 15-16], [92, s. 187-190], [93].

#### 3.1 Typy kosmeceutik

V dnešní době je na trhu velké množství látek, které lze do kategorie kosmeceutik zařadit. Ale jen pro některá z nich jsou publikovány klinické studie, které by potvrzovaly jejich pozitivní účinek na kůži s cílem zlepšení jejího vzhledu. V následující části práce jsou některé tyto látky představeny [4], [90, s. 141-143], [92, s. 192-193].



### 3.1.1 Hydroxykyseliny

Hydroxykyseliny byly popsány Van Scottem a Yu před čtyřmi desetiletími při zkoumání poruch kůže onemocněním ichtyózou. Pojmenovány byly jako  $\alpha$ -hydroxykyseliny (AHA kyseliny). Nejprve bylo odhaleno, že mají pozitivní vliv na keratinizaci a exfoliaci *stratum corneum*. Pozdější výzkum prokázal, že AHA kyseliny hrají významnou roli při tvorbě dermální matrice a mohou tak působit proti stárnutí. Dodnes jsou AHA kyseliny podstatnou součástí přípravků pro péči o pleť. Následně byly objeveny další typy hydroxykyselin např.: polyhydroxykyseliny (PHA) a bionické kyseliny (BA), jejichž benefity jsou využívány k terapeutickým účinkům při řešení kožních onemocnění. Hydroxykyseliny je možné klasifikovat do tří skupin: AHA, PHA a BA kyseliny [4, s. 69-70], [91, s. 35], [92, s. 190].

Velké množství AHA kyselin je zastoupeno v potravinách a ovoci, proto nesou i název ovocné kyseliny. Jsou to karboxylové kyseliny, které mají jednu hydroxylovou skupinu připojenou k alfa poloze karboxylové skupiny na alifatické nebo alicyklické molekule. Mezi nejhojněji využívané AHA kyseliny se řadí kyselina glykolová, mléčná a citrónová. Kyselina citrónová patří mezi silné antioxidanty a nachází se v citrusových plodech. Vyskytuje se také přirozeně v kůži a hraje významnou roli v Krebsově cyklu. Některé AHA kyseliny mohou obsahovat fenylovou skupinu jako substituent na postranním řetězci. Mění se tak rozpustnost molekuly a zvyšuje její lipofilita, proto je lze použít do kosmetických formulací a pro akné a mastnou pleť. Mezi ně patří např.: kyseliny mandlová (fenylglykolová) [4, s. 69-70], [94], [95].

Polyhydroxykyseliny (PHA) jsou nazývány AHA kyselinami druhé generace. Ve své struktuře se podobají AHA kyselinám, nicméně obsahují dvě nebo více hydroxylových skupin. Velké množství PHA kyselin se vyskytuje přirozeně v lidském těle např.: kyselina glukózová a glukonolakton jsou významnými metabolity v pentózo-fosfátové cestě. Glukonolakton vykazuje velmi podobné účinky jako kyselina glykolová. Klinické studie prokázaly jeho kompatibilitu s citlivou pokožkou, včetně atopické dermatitidy a růžovky. Tato kompatibilita může být vyvolána jeho hydratačním účinkem a schopností zvyšovat bariérovou funkci pokožky. Studie prokazují, že opakovaná aplikace glukonolaktonu (8% krém, pH = 3,8) dvakrát denně pod dobu 30 dnů významně ovlivnila bariérovou funkci pokožky a zvýšila se její odolnost vůči chemickým látkám. Proto jsou PHA využívány pro citlivou pokožku jako doplňková péče v kombinaci s potenciálně dráždivými medikamenty při léčbě. Například při léčbě růžovky jsou používány kombinace přípravků

obsahující kyselinu azelainovou a glukonolakton, kdy tato kombinace zvyšuje terapeutické účinky. Publikovaný výzkum také prokázal účinek glukonolaktonu proti akné, který spočívá v jeho exfoliačním účinku a snížení dráždivého účinku benzoylperoxidu používaného při léčbě akné. PHA kyseliny vykazují kompatibilitu s retinoidy, které jsou při léčbě akné rovněž využívány [4, s. 69-70] [96].

Bionické kyseliny (bionic acid, BA) jsou třetí generací AHA kyselin. Jsou složeny z polyhydroxykyseliny navázané na cukr; např. kyselina laktobionová se skládá z glukonové kyseliny připojené na galaktózu prostřednictvím etherové vazby. Jednou z jejích významných vlastností je hygroskopická povaha, díky více hydroxylovým skupinám v molekule. BA snadno zadržují a přitahují molekuly vody, proto mohou vytvářet gelovou matici. Významným přínosem těchto kyselin je šetrnost vůči pokožce a jejich nedráždivost. Proto jsou využívány k ošetření citlivé pokožky, či po kožních procedurách [4, s. 69-70].

### 3.1.2 Bioaktivní peptidy

Přírozeně se vyskytující se peptidy (vazopresin, oxytocin) byly popsány již před řadou let. Po klinickém vývoji přípravků pro hojení ran a antimikrobiálních peptidů následovala identifikace a aplikace peptidů jako terapeutek při léčbě kožních onemocnění. Nicméně nebyl vyvinut žádný peptid, který by byl schválen jako léčivo na dermatologická onemocnění. Další vývoj peptidů byl kromě farmacie směřován i do oblasti kosmetického průmyslu. Mezi první peptidy, které byly použity v kosmetických formulacích, patří Matrixyl a Cu peptid GHK-Cu. Jejich účinek se zaměřil na podporu tvorby extracelulární matrix (např. tvorby kolagenu) a proliferace buněk. Od počátku roku 2000 pak byla vyvinuta široká škála peptidů, které nabízejí využití v kosmetických formulacích [3], [4, s. 142], [97], [98], [99, s. 9-18], [100, s. 427-345], [101].

Peptidy jsou krátké polymery tvořené aminokyselinami spojenými peptidovou vazbou. Peptidové vazby jsou relativně odolné vůči teplu, světlu a pH, jsou však degradovány proteázami, které se vyskytují ve všech organismech a katalyzují hydrolyzu této vazby. Některé typy proteáz odštěpují z peptidového řetězce koncovou aminoskupinu, jiné zase napadají vnitřní peptidové vazby [4, s. 142].

Protože se v lidském organismu přirozeně vyskytuje 21 aminokyselin a každá z nich má svoji specifickou chemickou strukturu i reaktivitu, je možné vytvořit řadu různých peptidových sekvencí. Každou pozici v peptidovém řetězci může totiž obsadit kterákoliv

z 21 aminokyselin. Tato rozmanitost ve struktuře umožňuje modifikaci peptidů s cílem upravit jejich bioaktivitu i biologickou dostupnost [3], [4, s. 142].

V kůži nalezneme dva typy primárních zdrojů peptidů. Prvním zdrojem je syntéza molekul peptidů určených pro konkrétní využití. Z nich jsou nejvýznamnější antimikrobiální peptidy, někdy nazývané obranné peptidy. U savců a vyšších organismů byly vyvinuty proto, aby chránily exponované povrchy organismu, např. oči nebo kůži. Tato kategorie peptidů s vrozenou imunitou přispívá např. v boji proti patogenům, při hojení ran a regulaci zánětu. Některá z kožních onemocnění mohou obměňovat projev zmiňovaných peptidů nebo naopak peptidy mohou být příčinou stavu kůže či onemocnění. Například je známo, že cathelicidiny a lidské beta-defensiny jsou přítomny v psoriatických lézích ve stejné míře, jako kdyby docházelo k poranění kůže. U růžovky bylo zvýšení hladiny katahelicidinu LL-37 spojeno se zánětem a předpokládá se, že tento protein může přispívat k tomuto patologickému stavu [4, s. 151], [92, s. 197-198].

Druhý zdroj peptidů pochází z rozpadu větších peptidů či proteinů, který byl vyvolán fyziologickými procesy, např. stresem, UV zářením, zánětlivým onemocněním, poraněním atd. Během tohoto procesu jsou peptidy tvořeny proteolytickým štěpením proteinů z extracelulární matrix. Tyto peptidové fragmenty pak stimulují celkový průběh hojení a přestavby extracelulární matrix. Mezi tyto peptidy nazývané matrikiny patří např.: hexapeptid VGVAPG vzniklý hydrolýzou elastinu elastázou, pentapeptid KTTKS vzniklý proteolýzou prokolagenu a tripeptid GHK odvozený od kolagenu I. Metodami *in vitro* bylo prokázáno, že zavedení těchto peptidů do extracelulární matrix spouští zvýšení migrace keratinocytů pro hojení ran, podporu chemotaxe a mitogeneze [4, s. 151], [97], [98].

Mezi výhody použití peptidů v kosmetických formulacích patří jejich různorodá škála účinků na pleť. Jejich využití jako kosmeceutické a topické přísady má velký význam, protože po aplikaci nevyvolávají imunitní reakci, jsou založeny na krátkých přirozeně se vyskytujících sekvencích aminokyselin a díky této biologické povaze snižují možnost výskytu dráždivé reakce či vedlejších účinků. Cílené kombinace aminokyselin tak umožňují vytvářet nové typy aktivních látek vhodných pro péči o pleť [98], [99, s. 9-18], [100, s. 327-345].

Naopak nevýhodou peptidů může být způsob jejich dodání do kůže a prostupnost k cíli působení. Přítomnost proteázy v kůži a její fyzikální povaha způsobují, že je velmi obtížné dodat molekulu s molekulovou hmotností vyšší než 500 g/mol přes vnější vrstvy kůže. Proto je zapotřebí použít zesilovače penetrace, jako je např. působení elektrického proudu, injekční

podání nebo cílené dodání nosiči, jako jsou liposomy nebo nanočástice. Další nevýhodou mohou být relativně vysoké náklady na syntézu peptidů [4, s. 151], [100, s. 327-345], [101].

### 3.1.3 Vitamíny

Nejhojněji využívanými vitamíny pro kosmeceutické formulace jsou vitamín A, C a E. V některých článcích je uváděn i vitamín B. Jelikož pro tuto diplomovou práci byl pro enkapsulaci vybrán vitamín E, bude o něm detailněji pojednáno v závěru této kapitoly.

#### *Vitamín C*

Je ve vodě rozpustný vitamín, přirozeně se vyskytující antioxidant a nezbytný pro lidské tělo, které si jej neumí syntetizovat (chybí enzym L-gulono-gama-lakton oxidáza) a musí plně spoléhat na zdroje stravy. Citrusové plody a tmavá listová zelenina obsahuje vysoké množství vitamínu C, jsou tedy jeho skvělým zdrojem pro lidský organismus. Jako systémový antioxidant zabraňuje vitamín C skorbutu, syndromu, který je charakterizován jako nežádoucí změny v kostech, na sliznici a kůži. Určité dávky vitamínu C se ve střevě dobře vstřebávají. Nicméně co se týče perorální suplementace, tak vysokými dávkami vitamínu C se nezvyšuje jeho absorbované množství v těle, ani v pokožce. Nejlepším způsobem, jak zajistit dostatek tohoto vitamínu v pokožce, je jeho aplikace v konkrétní kosmetické formulaci přímo na pokožku. Kosmeceutika s obsahem vitamínu C byla první, která vstoupila na trh. Mezi spotřebiteli byly tyto výrobky velmi žádané, nicméně původní kosmeceutické formulace obsahovaly aktivní formu vitamínu C (kyselinu L-askorbovou) a časem se prokázalo, že se zabarvují do žluta v důsledku oxidace kyseliny L-askorbové na kyselinu dehydroaskorbovou. Novější formulace obsahují stabilnější modifikované formy kyseliny askorbové získané esterifikací její hydroxylové skupiny. Mezi tyto formy patří např.: askorbylfosforečnan hořečnatý (MAP), askorbylfosfát sodný, askorbyl-6-palmitát a askorbyl tetraisopalmitát (ATIP). Díky své stabilitě jsou upřednostňovány chemiky při tvorbě kosmetických formulací. Pinell a kolektiv prokázali, že lze připravit formulaci, která zajistí nejenom vysokou stabilitu vitamínu C, ale i jeho penetraci do pokožky. V jejich studiích byla denně aplikována 15% kyselina L-askorbová o pH 3,2, přičemž po třech dnech byla pokožka dvacetinásobně nasycená. Po tomto nasycení zůstala kyselina v tkáni s poločasem rozpadu 4 dny. Proti tomu lokální aplikace 1M kyseliny dehydroaskorbové, 13% MAP a 10% askorbyl-6-palmitátu hladinu vitamínu C nezvýšily. V dnešní době jsou k transportu vitamínu C do pokožky nejčastěji využívány různé dodávací

systemy, mezi něž patří např. mikroemulze nebo nanosuspenze [4. s. 95-96], [92, s. 193], [102, s. 437-438], [103, s. 330-337].

Vitamín C je nejhojněji se vyskytujícím antioxidantem v kůži. Spolu s antioxidantními enzymy a ostatními antioxidanty, jako jsou vitamín E, ubichinon, kyselina alfa-lipoová, glutathion, pomáhá kontrolovat volné radikály a chrání tak buňky před poškozením. I když opalovací krémy zůstávají základním přípravkem ochrany pleti proti UV záření, větší pozornost je věnována i používání lokálních antioxidantů ve spojení s opalovacími krémy. Ve studiích bylo prokázáno, že opalovací krémy zabraňují oxidačnímu stresu jen z části, i když jsou účinné ve snižování tvorby erytémů. Studie rovněž dokazují, že opalovací krém je schopen pleť ochránit pouze před 55 % volných radikálů indukovaných UVA zářením. Kosmetické přípravky s obsahem antioxidantů jsou pokládány jako doplňkové k opalovacím krémům, vzhledem k jejich dodatečné ochraně před tvorbou volných radikálů. Kyselina L-askorobová vykazuje i fotoprotektivní účinky, ale nepůsobí stejným mechanismem jako doplňky k opalovacím krémům a neabsorbuje záření ve vlnových délkách nad 295 nm. Ve studiích, které hodnotily fotoprotektivní účinky vitamínu C, byla kyselina L-askorobová (10% roztok) aplikována dvakrát denně na prasečí kůži po tři dny před expozicí UV záření. Ošetření kyselinou L-askorobovou vyvolalo 40% snížení počtu spálených buněk a 52% snížení erytému způsobeného UVB zářením oproti pokožce ošetřené pouze opalovacím prostředkem. Studie na lidské pokožce prokazují fotoprotektivní benefity aplikace vitamínu C přímo na pokožku. Roztok kyseliny L-askorobové, (10%) který byl použit k aplikaci na lidských dobrovolnících po dobu 5 dní před ozařováním UVB podstatně snížil minimální dávku erytémovou dávku (MED) v porovnání s 5% roztokem, který takový účinek nevykazoval. Studie dále prokázaly, že kombinací antioxidantů lze docílit synergického účinku. Správnou souhrou antioxidantů je možné zmírnit chronické i akutní účinky poškození UV zářením. Nicméně topické antioxidanty musejí být aplikovány dostatečně dlouho před vystavením UV záření [4 s. 96-97], [102, s. 437-438], [103, s. 330-337], [104], [105], [106].

Kromě toho, že má vitamín C antioxidantní účinky, slouží jako kofaktor pro enzymy, které jsou nezbytné pro syntézu kolagenu. Ve studiích bylo dále prokázáno, že vitamín C slouží pro uchování dermálního kolagenu, jelikož zvyšuje jeho stabilitu a snižuje citlivost vůči teple [4 s. 96-97], [103, s. 330-337].

Další výzkumy poukazují na protizánětlivé účinky vitamínu C. S ohledem na tyto vlastnosti bylo navrženo použití vitamínu C při léčbě zánětlivých onemocnění, jako je akné.

Antioxidanty mohou rovněž bránit oxidaci kožního mazu a zamezovat komedogenitě (ucpávání pórů) pleti [4 s. 96-97], [103, s. 330-337], [104], [105], [106].

Mezi aktuálně nejpoužívanější přípravky s obsahem vitamínu C patří séra, krémy a lotiony. Ve většině přípravku bývá tento vitamín v kombinaci s dalšími antioxidanty. Jak už bylo výše zmiňováno, vitamín C slouží nejčastěji ke zvýšení fotoprotekce, snížení viditelných známek stárnutí pleti, zlepšení hyperpigmentace a léčbě zánětlivých stavů [4, s. 101-102], [92, s. 193].

#### *Vitamín A*

Vitamín A neboli retinol patří mezi vitamíny rozpustné v tucích. Bývá dostupný v kosmeceutických přípravcích, které jsou volně prodejné. Koncentrace retinolu v jednotlivých přípravcích bývá různá, od 0,1 do 1%. I když existuje mnoho klinických studií přípravků s různými koncentracemi retinolu, které dokazují klinické zlepšení pleti, chybí studie stanovující zvýšení množství kolagenu, které toto zlepšení doprovází. Není tak známo, zda retinol v koncentracích obsažených v dostupných kosmetických přípravcích zvýšení množství kolagenu způsobuje. Dalším problémem bývá degradace samotného retinolu a jeho problematické uvolňování z vehikula. Bylo však zjištěno, že 0,1 % retinolu zlepšuje jemné linky, vrásky způsobené slunečním zářením a tón pleti v laterální periorbitální oblasti. Ve studii, kdy byl pacientům pokročilejšího věku aplikován 0,04% retinol na sluncem chráněnou pokožku, byla významně zvýšena exprese glykosaminoglykanu ve srovnání s vehikulem a současně u probandů zaznamenáno pouze mírné podráždění pokožky [4, s. 86], [91, s. 107, 111-112], [102, s. 435-436].

Od vitamínu A jsou odvozeny další látky, které se používají jako kosmeceutika. Například retinoidy jsou využívány k prevenci proti stárnutí pokožky už po desetiletí. Z odborné literatury je rovněž známo, že retinoidy výrazně ovlivňují i léčbu akné. Pacientům, kteří používali retinoidy lokálně při léčbě akné, se zlepšil vzhled pokožky poté, co se akné zhojilo. Tento poznatek vedl k dalšímu zkoumání retinoidů a jejich lokální aplikaci na stárnoucí pokožku či při léčbě kožních onemocnění [4, s. 81], [91, s. 107, 113], [102, s. 435-436].

Dnešní využití retinoidů je součástí běžné kosmetické terapie proti stárnutí pokožky. Nejpodstatnější složkou přípravků je obvykle kyselina retinová, která reaguje přímo s intranukleárními retinoidními receptory, což vede k transkripci proteinů, které ovlivňují stav pleti. Jelikož aplikace retinoidů je úzce spjata s možným podrážděním

pokožky, jsou další studie látek odvozených od retinoidů velmi žádoucí [4, s. 92-93], [91, s. 116].

#### *Vitamín B*

Vitamín B, také kyselina listová či folacin, patří mezi vitamíny rozpustné ve vodě a hraje významnou roli při udržování přirozeně krásné a zdravé pokožky. Dostupné studie poukazují i na jeho regenerační vlastnosti [92, s. 194], [102, s. 436-437], [107], [108]. Možnosti jeho využití v kosmetických přípravcích pro denní použití i proti stárnutí studovali např. Debowska a kolektiv [107]. Za účasti 30 dobrovolníků byla ve studii měřena vlhkost pokožky, sekrece kožního mazu, pružnost pokožky, transepidermální ztráta vody a mikrotopografie předloktí a obličeje. V závislosti na koncentraci zlepšila aplikace vitamínu B životaschopnost primárních fibroblastů a podnítila jejich proliferaci. Buňky ošetřené vitamínem B měly i vysokou reprodukční schopnost. Bylo zjištěno, že jeho aplikace zvýšila rychlost opravy poškození DNA způsobené UV zářením. Další testy *in vivo* prokázaly, že každodenní aplikace krému s obsahem vitamínu B po dobu 30 dnů zlepšila vlhkost pokožky, snížila transepidermální ztrátu vody, a to bez významné změny sekrece kožního mazu. Po používání krému byla elasticita pokožky dvakrát vyšší a analýza mikrotopografie poukázala na snížení drsnosti pokožky, jejich nepravidelností a indexu deskvamace [107].

#### *Vitamín E*

Vitamín E ( tokoferol) patří mezi důležité antioxidanty. Lidský organismus si jej neumí syntetizovat, proto musí být přijímán stravou. Existuje osm typů vit. E ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - a  $\sigma$ - tokoferoly a jejich příbuzné odpovídající tokotrienoly). Tokoferol je v dermatologii používán už více než 50 let. Jako antioxidant zachytává volné radikály a chrání tak pokožku před oxidačním stresem a nežádoucími účinky vnějších vlivů, např. před UV zářením. Princip epidermální ochrany před oxidačním stresem je založen na skutečnosti, že hladiny  $\gamma$ -tokoferolu v lidské kůži převyšují hladiny  $\alpha$ -tokoferolu, které inhibují produkci PEG2 a oxidu dusnatého, dále zabraňují peroxidaci lipidů, tvorbě buněk reagujících na popálení, a erytému vzniklému po působení UVB záření. Podstatnou roli hraje i při tvorbě fotoaduktů a imunosupresi [92, s. 193], [102, s. 438], [109, s. 1-8].

Experimentální studie uvádějí, že vitamín E má protinádorové a fotoprotektivní účinky. Přestože bylo publikováno mnoho kazuistik, stále není dostatek kontrolovaných klinických studií, které by jednoznačně identifikovaly klinické indikace a doporučily jeho dávkování. Co se týče stability vitamínu E, je závislá na formě, ve které se vitamín vyskytuje.

Nejstabilnější formou je DL- $\alpha$ -tokoferol. Stabilita aplikovaného vitamínu E na pokožku může být zvyšována i použitím jeho konjugátů. Jedná se o estery tokoferolu odolné vůči oxidaci a zároveň dobře pronikající do pokožky. Mnoho kosmetických přípravků obsahuje kombinaci vitamínů E a C. Nicméně jen malý zlomek z nich má skutečné účinky při topické aplikaci. Pokud však stabilní formulace obsahuje vysoké množství neesterifikovaného a vhodného izomeru antioxidantu, jsou vitamíny C a E vynikajícími inhibitory akutního poškození UV zářením i stárnutí kůže v důsledku UV záření [92, s. 193], [102, s. 438], [109, s. 1-8].

V některých studiích je uváděn rovněž příznivý účinek vitamínu E při terapii subkorneálních pustulárních dermatóz, u kterých nebyla uspokojivá reakce na konvenční léky. Dále jsou uváděny dermatologické indikace, pro které použití vitamínu E není tolik účinné. Jedná se o atopickou dermatitidu, psoriázu, melasmu, sklerodermii, akné, hojení ran, prevenci proti rakovině kůže a kožní vředy [92, s. 193], [102, s. 438].



## 4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Antioxidanty, včetně vitamínů s antioxidačními vlastnostmi, hrají důležitou roli v ochraně zdraví a jsou součástí mnoha kosmetických přípravků. Nicméně většina z nich vykazuje nestabilitu a špatnou rozpustnost v žádaných formulacích. Jedním z neúčinnějších postupů, jak se těmto problémům vyhnout, je použití liposomů, které antioxidanty mohou chránit a dopravit do cílového místa působení. Bez ohledu na výhody použití liposomů, představují tyto nosiče řadu výzev při jejich výrobě a aplikaci. Mezi nejpodstatnější výzvy v oblasti přípravy a využití liposomů se řadí techniky jejich přípravy, účinnost enkapsulace, možná ztráta jejich ochranné funkce vůči antioxidantům a relativně nízká propustnost kůží. Při vývoji nosičů pro dodání antioxidantů se pro praktické aplikace kosmetického přípravku využívají rovněž pokročilejší typy liposomálních formulací [110, s. 114-140], [111], [112, s. 217-230].

Přípravou liposomů s obsahem vitamínu E se zabývala řada studií. V jedné ze studií byla zkoumána možnost stanovit množství enkapsulované látky v liposomech pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC). Ve studii byly použity tři různé lipofilní sloučeniny, jmenovitě testosteron, vitamín E acetát a kyselina retinová, které byly enkapsulovány do multilamelárních liposomů z dipalmitoyl fosfatidylcholinu. Množství enkapsulované látky bylo stanoveno pomocí dialýzy a centrifugace a srovnáno s metodou DSC. Dialýza byla prováděna na liposomech v různých časových intervalech, po 3, 6, 9 a 12 hod. Trvání procesu dialýzy silně ovlivnilo kvantifikaci testosteronu obsaženého v liposomech, naopak stanovení enkapsulovaného množství acetátu vitamínu E a kyseliny retinové bylo ovlivněno jen mírně. Centrifugace byla prováděna při různých otáčkách (6000, 9000 a 12000 ot./min), a v těchto vzorcích nebyl zaznamenán významný rozdíl získaných hodnot enkapsulovaného množství studovaných látek. Poté byly porovnávány hodnoty získané centrifugací a dialýzou s hodnotami účinnosti enkapsulace stanovenými pomocí DSC. Mezi výsledky byly pozorovány lineární vztahy. Výsledky ukázaly, že DSC by mohla být vhodnou metodou stanovení množství aktivních látek enkapsulovaných v liposomech [113, s. 191-197].

Další studie představila liposomy s enkapsulovaným acetátem vitamínu E připravené pomocí metody RESS (rapid expansion of supercritical solution) tedy rychlé expanze superkritického roztoku. V tomto případě byly studovány účinky provozních podmínek na enkapsulační účinnost, zeta potenciál a index polydisperzity liposomů. Autoři oznámili, že použitím této metody bylo dosaženo vysoké enkapsulační účinnosti ( $98,63 \pm 0,42$  %)

a distribuce velikosti částic a morfologie liposomů splňovaly očekávané požadavky. Výsledky rovněž ukázaly, že liposomy mají dobrou stabilitu a během experimentu s uvolňováním aktivní látky *in vitro* bylo pozorováno její pomalé a trvalé uvolňování [114, s. 863-875].

Ve studii autorů di Ambro a kol. [115] byl sledován antioxidační účinek několika forem vitamínu E (DL- $\alpha$ -tokoferolu, smíšených tokoferolů, komerčního přípravku Ronoxan MAP a  $\alpha$ -tokoferol-acetátu) a topických formulací obsahujících tyto složky. K tomuto účelu byla použita chemiluminiscence a test zhášení stabilních volných radikálů 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylu (DPPH). Studie prokázala, že DL- $\alpha$ -tokoferol, smíšené tokoferoly a Ronoxan MAP, ať už samostatné nebo ve formulacích, výrazně inhibovaly intenzitu chemiluminiscence a snižovaly absorbanci v DPPH testu zhášení volných radikálů. Tokoferol acetát a formulace obsahující tento derivát však nevykazovaly antioxidační aktivitu ani v jednom testu [115, s. 93-99].

V mnoha zdrojích je uváděno, že v kosmetických přípravcích se používají kombinace několika typů antioxidantů. Následující studie pojednávala o kombinaci vitamínu C a kyseliny listové. Za účelem zlepšení jejich stability byly připraveny a charakterizovány běžné liposomy a liposomy potažené chitosanem. Výsledky ukázaly, že účinnost enkapsulace byla mnohem vyšší u chitosanem pokrytých liposomů ve srovnání s liposomy běžnými. Experimentální výstupy dále ukázaly, že i jejich antioxidační aktivita je vyšší a chitosanový povlak účinně zlepšuje stabilitu liposomů [116, s. 272-280].

Uvedené studie ukazují, že liposomy jsou stále studovanými systémy vhodnými pro dodávání vitamínu E do kosmetických formulací i pro další aplikace

## 5 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo zpracovat literární rešerši na téma příprava liposomů s obsahem kosmeceutik a za tímto účelem se věnovat kosmetickým nosičům, liposomům, jejich složení, vlastnostem a metodám přípravy, jako i jednotlivým skupinám kosmeceutik, která jsou používána jako součást kosmetických formulací.

Praktická část si pak kladla za cíl připravit liposomy ve čtyřech formulacích s různým složením lipidové membrány a obsahem acetátu vitamínu E. Dále si autorka práce vytýčila cíl připravené liposomy vhodnými technikami charakterizovat a stanovit jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, morfologii, stabilitu a enkapsulační a antioxidační účinnost. Důležitým cílem rovněž bylo nalézt vztah mezi složením jednotlivých formulací a jejich vlastnostmi.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 6 POUŽITÝ MATERIÁL

### 6.1 Použité chemikálie

- 1,2-diplamitoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin (DPPC) (Avanti polar lipids)
- 1,2-diplamitoyl-*sn*-glycero-3-fosfo-L-serin (DPPS) (Avanti polar lipids)
- Cholesterol (CH) (Avanti polar lipids)
- Vitamín E acetát 98% (FICHEMA s.r.o.)
- NaCl chlorid sodný p.a. (MiKrochem ČR)
- Chloroform (VWR)
- Demineralizovaná voda z laboratorního zdroje
- 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl (DPPH), MW: 394,32 g/mol (Sigma- Aldrich)
- Ethanol (Ing. Petr Lukeš, ČR)
- D-mannitol (Penta)
- Sacharóza (Lachema)
- Nílská červeň (Sigma Aldrich)

### 6.2 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy (Sartorius, UK)
- Spektrofotometr (Specord, ČR)
- Vakuová odparka (Heidolph, Německo)
- Sonikátor typ UP200St (Heilscher, Německo)
- Analyzátor velikosti částic a zeta potenciálu Zetaseizer Nano ZS 90 (Malvern UK)
- Stříkačkové filtry s membránou 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore, UK)
- Automatické pipety (Eppendorf, Intech)
- Konfokální laserový mikroskop (Olympus Fluoview FV 3000, Japonsko)
- Skenovací elektronový mikroskop (SEM Phenom-World`s Phenom ProX Desktop SEM)

- 
- Laboratorní lyofilizátor Alpha 2-4/LSCbasic (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Německo)
  - Dialyzační membrány Spectra/Por cut off 12-14 kDa (Spectrum Laboratories)
  - Běžné laboratorní sklo, kyvety a pomůcky

## 7 METODIKA

V následujících kapitolách jsou popsány metody, které byly použity pro přípravu liposomů, stanovení jejich velikosti, zeta potenciálu, morfologie, enkapsulační a antioxidační účinnosti. Jsou uvedeny i postupy pro charakterizaci liposomů po jejich lyofilizaci, konkrétně stanovení stability po zpětné rekonstrukci a morfologie lyofilizovaného koláče.

### 7.1 Příprava liposomů

K přípravě liposomů byla použita metoda hydratace lipidového filmu s následnou sonikací vzniklé liposomové disperze.

Liposomy byly připraveny ze dvou typů fosfolipidů a cholesterolu ve čtyřech formulacích. První formulace obsahovala pouze DPPC, druhá DPPC ve směsi s DPPS, třetí DPPC a cholesterol v poměru 7:3 a čtvrtá DPPC s cholesterolem v poměru 5:1. Enkapsulovanou látkou byl vitamín E acetát (VE-A).

Nejprve byly naváženy fosfolipidy tak, aby jejich výsledná koncentrace činila 5 mg/ml. VE-A byl rovněž navážen a jeho koncentrace činila 4 mg/ml. Jako rozpouštědlo byl v obou případech použit chloroform. Množství lipidů pro přípravu 5 ml liposomální disperze je uvedeno v Tab. 1.

Roztoky DPPC (5 ml) a VE-A (2 ml) byly napipetovány do odpařovací baňky a následně byl chloroform odpařen na vakuové odparce při 60 °C a 60 rpm až do vytvoření suchého filmu. Suchý film byl poté hydratován fyziologickým roztokem (9 mg/ml NaCl) při 60 °C a 60 rpm čímž byla připravena liposomová disperze. Velikost liposomů ve vzniklé disperzi byla zmenšena sonikací s pomocí sonikátoru Hielscher třemi pulzy v trvání 30 s (použitá amplituda 60 %). Mezi jednotlivými pulzy byla vždy minutová přestávka. Během sonikace byla kádinka s liposomovou disperzí chlazená studenou vodou, aby nedocházelo k přehřátí liposomů.

Obdobným způsobem byly připraveny liposomy, kde byla olejová fáze barvena nilskou červení. K roztoku lipidů a VE-A v odpařovací baňce bylo pomocí mikropipety přidáno 50 µl ethanického roztoku nilské červeně o koncentraci 0,4 mg/ml. Následně byly liposomy připravovány stejným způsobem, jak je zmíněné výše v této kapitole.

Tab. 1: Množství fosfolipidů (DPPC a DPPS) a cholesterolu (CH) pro přípravu liposomů (na 5 ml liposomové disperze)

Formulace	DPPC [mg]	DPPS [mg]	CH [mg]
DPPC	25,0	–	–
DPPC-DPPS	17,5	7,5	–
DPPC-CH 7:3	17,5	–	7,5
DPPC-CH 5:1	20,8	–	4,2

## 7.2 Stanovení velikosti liposomů a jejich zeta potenciálu

Pro stanovení velikosti a distribuce liposomů byla použita metoda DLS (Dynamic Light Scattering), která umožňuje měření velikosti částic v sub-mikrometrovém rozmezí. Velikost liposomů a jejich zeta potenciál byly měřeny v nativním stavu a po jejich lyofilizaci. Měření zeta potenciálu se používá k hodnocení stability koloidních systémů. Pokud částice vykazují negativní nebo pozitivní zeta potenciál, budou se navzájem odpuzovat a nebude docházet k agregaci. Částice jsou nejstabilnější, pokud je zeta potenciál větší než 30 mV nebo menší než –30 mV. [Article-18].

Měření distribuce velikostí liposomů bylo provedeno v plastových kyvetách s optickou délkou 1 cm při teplotě 25 °C a úhlu 90°. Do kyvety byl pipetován 1 ml filtrované demineralizované vody a 5 µl sonikované disperze liposomů. Pro měření zeta potenciálu byly do speciálních kyvet firmy Malvern pomocí stříkačky aplikovány ředěné liposomy o koncentraci 15 µl disperze liposomů na 4 ml filtrované vody. Měření velikosti i zeta potenciálu bylo prováděno na stejném přístroji Zetaseizer Nano. Velikost liposomů byla stanovena jako intenzitně vážený z-avergae (průměr) jejich velikostí. Každá z formulací byla měřena třikrát a výsledky jsou uvedeny jako průměr těchto stanovení a jeho směrodatná odchylka.

## 7.3 Charakterizace liposomů pomocí mikroskopie

Morfologie liposomů byla pozorována na vzorcích, pro jejichž přípravu byla použita olejová fáze barvená nilskou červení. Jednotlivé disperze liposomů byly pozorovány pomocí konfokálního mikroskopu Fluoview FV3000. Na podložní sklíčko bylo kápnuto 10 µl



vzorku a překryto krycím sklíčkem. Liposomy byly pozorovány při zvětšení 40x jak v konfokálním tak transmisním módu. Fotografie byly pořízeny a zpracovány softwarem Olympus FV31S.

## 7.4 Stanovení enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost byla stanovena pro zjištění množství VE-A v liposomech. Tuto znalost je možné využít při další přípravě formulací pro kosmetické přípravky.

Pro zjištění enkapsulační aktivity bylo použito spektroskopické stanovení pomocí UV-Vis spektroskopie. Nejprve byla navržena a sestrojena kalibrační řada roztoků VE-A v ethanolu. Kalibrační roztoky byly připraveny ředěním základního roztoku o koncentraci 4 mg/ml, který vznikl navážením 0,1 g VE-A do 25 ml odměrné baňky a doplněním ethanolom. Koncentrační rozmezí kalibračních roztoků činilo 0,01 – 0,2 mg/ml. Touto koncentrační řadou bylo zajištěno stanovení možné koncentrace VE-A v liposomech. Hodnoty absorbance byly měřeny v křemenných kyvetách při vlnové délce  $\lambda = 284$  nm, která byla zjištěna z absorpčního spektra VE-A stanoveného v rozmezí 200 – 400 nm.

Neenkapsulovaný VE-A byl z liposomových disperzí odstraněn dialýzou. Dialýza je separační metoda, při níž dochází k separaci analytů/částic přes polopropustnou membránu až do vyrovnání koncentrací mezi dialyzovaným vzorkem a dialyzačním médiem. Pro dialýzu byly 2 ml liposomové disperze napipetovány do dialyzační membrány Spectra/Por cut off 12-14 kDa a dialyzovány proti 450 ml fyziologického roztoku za intenzivního míchání po dobu 5 hodin.

Z dialyzovaných liposomů byl VE-A uvolněn přidáním ethanolu v poměru 1:4 (liposomy:ethanol) a půlhodinovou sonikací v lázni. Následně byla změřena absorbance těchto roztoků proti ethanolu. Koncentrace VE-A v dialyzovaných liposomech byla stanovena z kalibrační přímky a použita k určení enkapsulační účinnosti (EE) jednotlivých formulací podle rovnice:  $EE = C_{LIP}/C_{CELK} \times 100$  (%), kde  $C_{LIP}$  je koncentrace VE-A v dialyzovaných liposomech a  $C_{CELK}$  je jeho celková koncentrace použitá pro přípravu.

## 7.5 Stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační účinnost liposomů s enkapsulovaným VE-A byla stanovena pomocí metody eliminace stabilních radikálů 1,1-difenyl-2-pikryl hydrazylu (DPPH). Zásobní roztok radikálů byl připraven navážením 12,5 mg DPPH a doplněním ethanolom do 50ml odměrné baňky. Dále byl ze zásobního roztoku připraven pracovní roztok smícháním 10 ml zásobního

roztoku DPPH• a 45 ml ethanolu. Pomocí spektrofotometru byla následně měřena absorbance tohoto pracovního roztoku při vlnové délce 518 nm proti čistému ethanolu. Pro analýzu antioxidační účinnosti bylo pipetováno 7 ml pracovního roztoku DPPH• a 500 µl liposomové disperze. Poté byl tento roztok promíchán, umístěn do tmy a ponechán reagovat. Úbytek absorbance způsobený přítomností VE-A v liposomech byl měřen při stejné vlnové délce 515 nm v časových intervalech 15, 30 a 60 min od smíchání roztoku radikálů s liposomy. Antioxidační aktivita (AO) byla stanovena pomocí úbytku absorbance ( $A_T$ ) v daném časovém intervalu po smíchání DPPH• s liposomy z následující rovnice:  $AO = A_T/A_{START} \times 100$  (%), kde  $A_{START}$  je počáteční absorbance roztoku před přidáním liposomů.

## 7.6 Lyofilizace a zpětná rekonstituce liposomů

Pro lyofilizaci byly nejprve připraveny disperze liposomů obsahující 10 % sacharózy a obdobně disperze liposomů v 10 % roztoku D-mannitolu. Takto připravené disperze s kryoprotektantem byly nejprve zmrazeny na teplotu  $-20$  °C, následně na  $-80$  °C a vloženy do lyofilizátoru. Po dosažení teploty lyofilizátoru  $-80$  °C byla při tlaku 0.06 mbar zahájena hlavní fáze sušení (main drying), která trvala 30 hodin. První sušící fáze pak automaticky přešla do konečné fáze sušení (final drying) probíhající při tlaku 0.001 mbar po dobu 14 hod. Po ukončení lyofilizace byly vzorky pečlivě uzavřeny a uloženy v chladničce k dalším analýzám.

Lyofilizované liposomy byly zpětně rekonstituovány do liposomální disperze přidáním 1,5 ml demineralizované vody. Za hodinu po přidání vody byla rekonstituovaná disperze liposomů jemně promíchána a charakterizována pomocí DLS pro určení velikosti, distribuce a zeta potenciálu liposomů po lyofilizaci. Za tímto účelem byl použit postup popsáný v části 7.2 této práce.

## 7.7 Stanovení stability liposomů

U liposomů byla hodnocena změna jejich velikosti a distribuce i zeta potenciálu po 3, 10 a 19 dnech skladování při teplotě  $4$  °C. Dále byla měřena i změna těchto parametrů po lyofylizaci a zpětné rekonstituci liposomů. Toto hodnocení probíhalo dle postupu popsaneho v kap. 7.2.

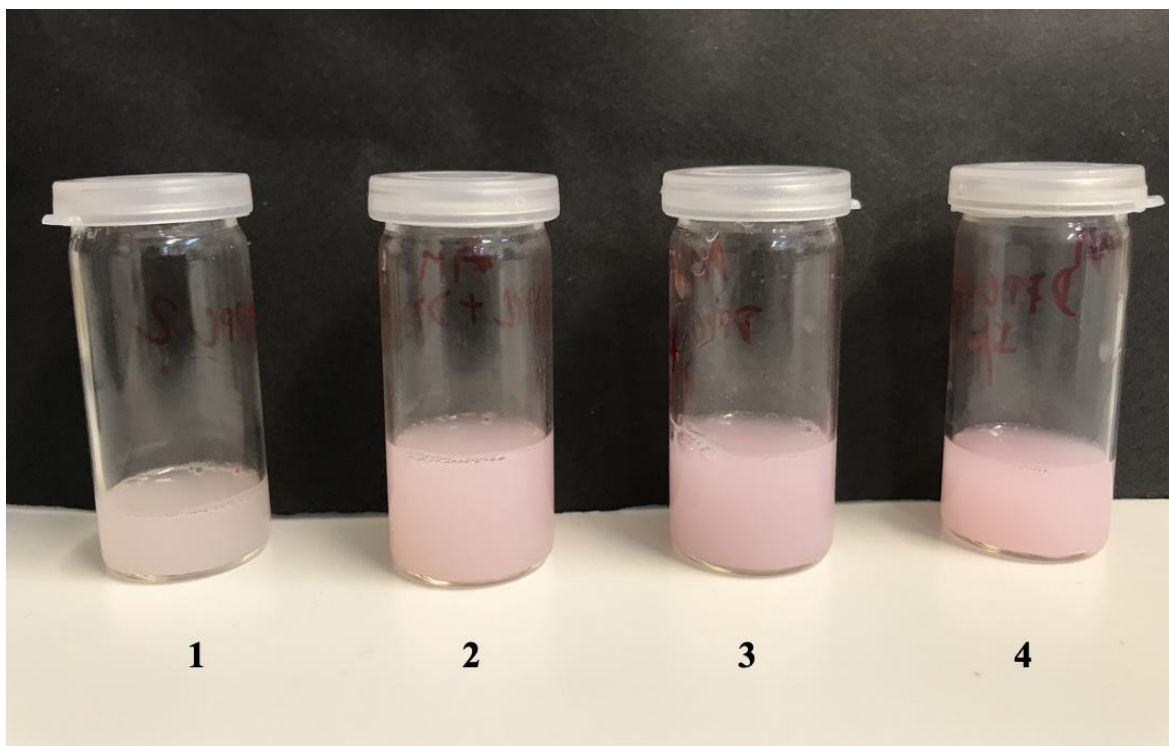
## 7.8 Morfologie lyofilizovaného koláče

Vzorky lyofilizovaného koláče jednotlivých formulací byly pozorovány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) Phenom Pro X. Část lyofilizovaného koláče byla umístěna na uhlíkovou pásku na terčíku a její přebytek byl odstraněn proudem vzduchu bez toho, aby byly pokryty vrstvou zlata. Urychlovací napětí činilo 10 kV.

## 8 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 8.1 Příprava liposomů

Pro diplomovou práci byly připraveny 4 typy liposomálních formulací pomocí metody hydratace lipidového filmu, do nichž byl enkapsulován VE-A. U jedné sady vzorků byla olejová fáze obarvena nilskou červení pro lepší vizualizaci mikroskopickými technikami. Během přípravy vykazovaly jednotlivé formulace rozdílné chování v souvislosti s rychlostí odpařování na odparce i hydratací lipidového filmu; např. směs DPPC-DPPS tvořila na stěnách baňky rovnoměrný souvislý film, naopak DPPC s obsahem cholesterolu po vysušení vytvořil na stěnách baňky nerovnoměrné vrstvy. Lipidové filmy byly vizuálně odlišné a díky jejich odlišné tloušťce na stěnách baňky byl pozorován i rozdílný vzhled liposomových disperzí po hydrataci. V disperzích DPPC s obsahem cholesterolu byly liposomy vizuálně větší. Liposomální disperze byly postupně sonikovány. Na Obr. 1 je snímek jednotlivých sonikovaných formulací obarvených nilskou červení. Všechny vzorky vykazovaly turbiditu a díky nilské červení růžovou barvu. Nejsvětlejší odstín byl pozorován u liposomů s DPPC.



Obr. 1: Sonikované liposomy; 1) DPPC, 2) DPPC-DPPS, 3) DPPC-CH 7:3, 4) DPPC-CH

## 8.2 Stanovení velikosti liposomů a jejich zeta potenciálu

Měření velikosti (z-průměr), indexu polydispersity (PDI) a distribuce liposomů probíhalo ve třech opakováních. Na stejném přístroji byl měřen i zeta potenciál. Výsledky těchto stanovení jsou uvedeny jako průměrné hodnoty a jejich směrodatné odchylky v Tab. 2.

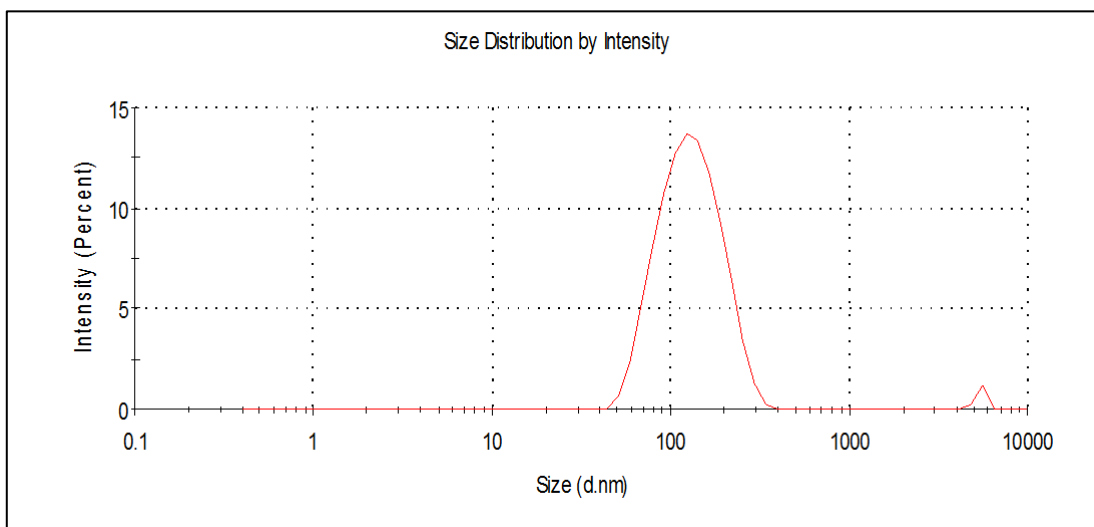
Během měření distribuce velikosti částic liposomů bylo zjištěno, že připravené formulace tvoří poměrně homogenní populace liposomů. Nicméně velikost liposomů byla rozdílná v důsledku rozdílného složení lipidové membrány. Velikost liposomů (Tab. 2) se pohybovala od  $132 \pm 1$  nm (DPPC-DPPS) do  $287 \pm 28$  nm (DPPC-CH 7:3). Různá velikost liposomů byla stanovena i u obou formulací DPPC s obsahem cholesterolu v poměru 5:1 a 7:3.

Na složení lipidové membrány závisí rovněž hodnoty zeta potenciálu liposomů. Nejnižší hodnotu  $-51,1 \pm 4,1$  mV vykazovala formulace s fosfatidylserinem, negativně nabitým fosfolipidem, který díky svému zápornému náboji bude mít nejnižší hodnotu mezi všemi připravenými formulacemi. Nejvyšší hodnotu zeta potenciálu měla formulace s DPPC, a to  $-0,9 \pm 0,7$  mV, jelikož fosfatidylcholin sám je neutrální. Další dvě formulace s cholesterolem měly rovněž nízké hodnoty zeta potenciálu právě díky jeho přítomnosti. Liposomy jsou obvykle považovány za stabilní, pokud je hodnota zeta potenciálu vyšší než 30 mV nebo nižší než  $-30$  mV. Nejstabilnějšími připravenými formulacemi tak byly liposomy DPPC s obsahem fosfatidylserinu a DPPC s cholesterolem v poměru 7:3. (Tab. 2)

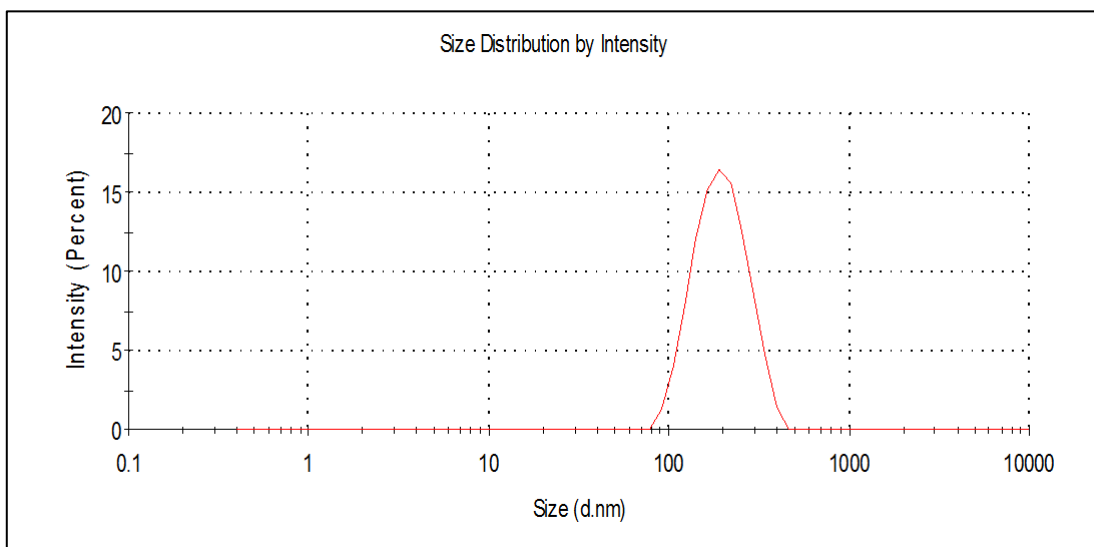
Tab. 2: Velikost (z-průměr), index polydispersity a zeta potenciál připravených liposomů

Vzorek	z-průměr [nm]	PDI	Zeta potenciál [mV]
DPPC	$233 \pm 9$	$0,4 \pm 0,1$	$-9,0 \pm 0,7$
DPPC-DPPS	$132 \pm 1$	$0,2 \pm 0,1$	$-51,1 \pm 4,1$
DPPC-CH 7:3	$287 \pm 28$	$0,4 \pm 0,1$	$-39,8 \pm 2,8$
DPPC-CH 5:1	$224 \pm 5$	$0,4 \pm 0,0$	$-23,0 \pm 0,6$

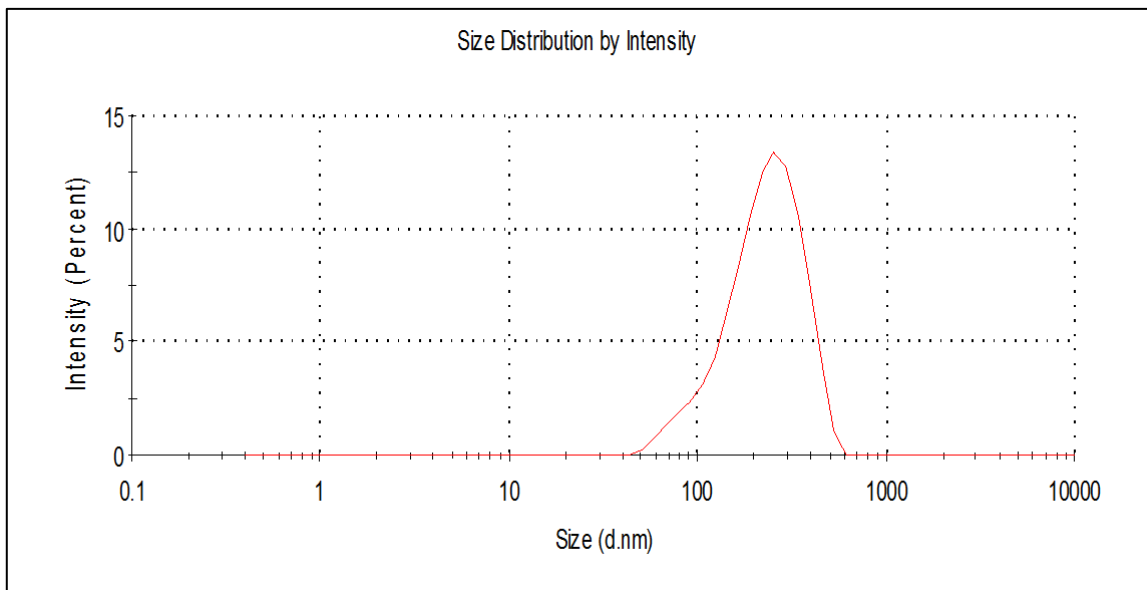
Na Obr. 2 až 5 jsou zobrazeny distribuční křivky jednotlivých liposomálních formulací. Křivky ukazují, že všechny formulace měly monomodální distribuce a obsahovaly tedy jedinou populaci liposomů. U liposomů z DPPC a DPPC-CH 5:1 je na distribuční křivce přítomna ještě jedna populace s velikostí větší než 3  $\mu\text{m}$ . Ta naznačuje přítomnost větších liposomů nebo agregátů ve vzorku. Podrobnější charakterizace této populace není možná, protože její velikost leží nad limitem velikostí, které lze pomocí techniky DLS měřit.



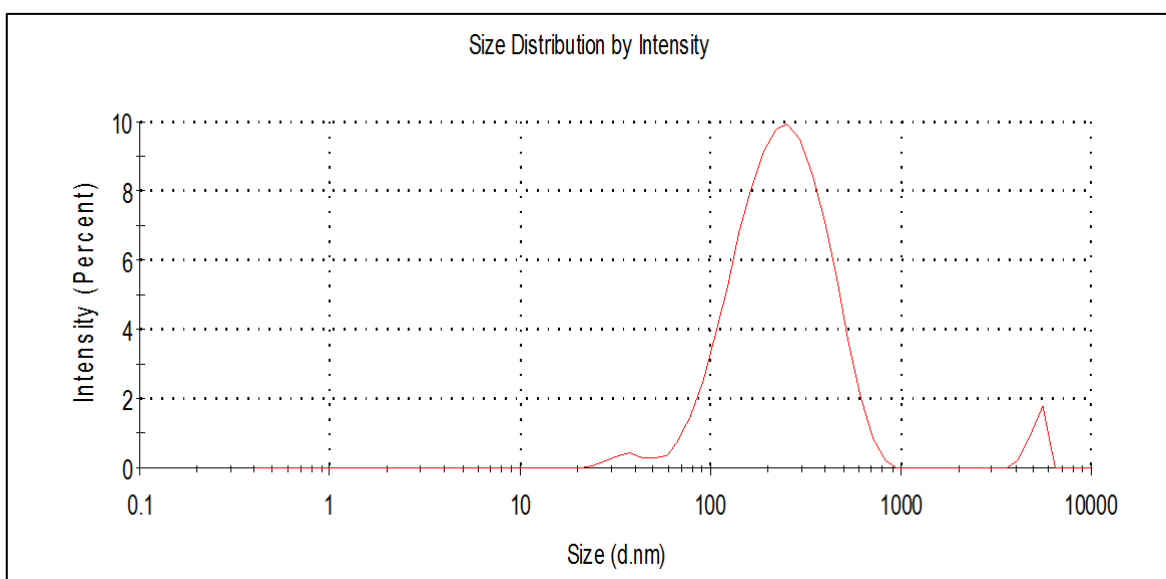
Obr. 2 Distribuce velikosti liposomů DPPC po přípravě



Obr. 3 Distribuce velikosti liposomů DPPC-DPPS po přípravě



Obr. 4 Distribuce velikosti liposomů DPPC-CH 7:3 po přípravě

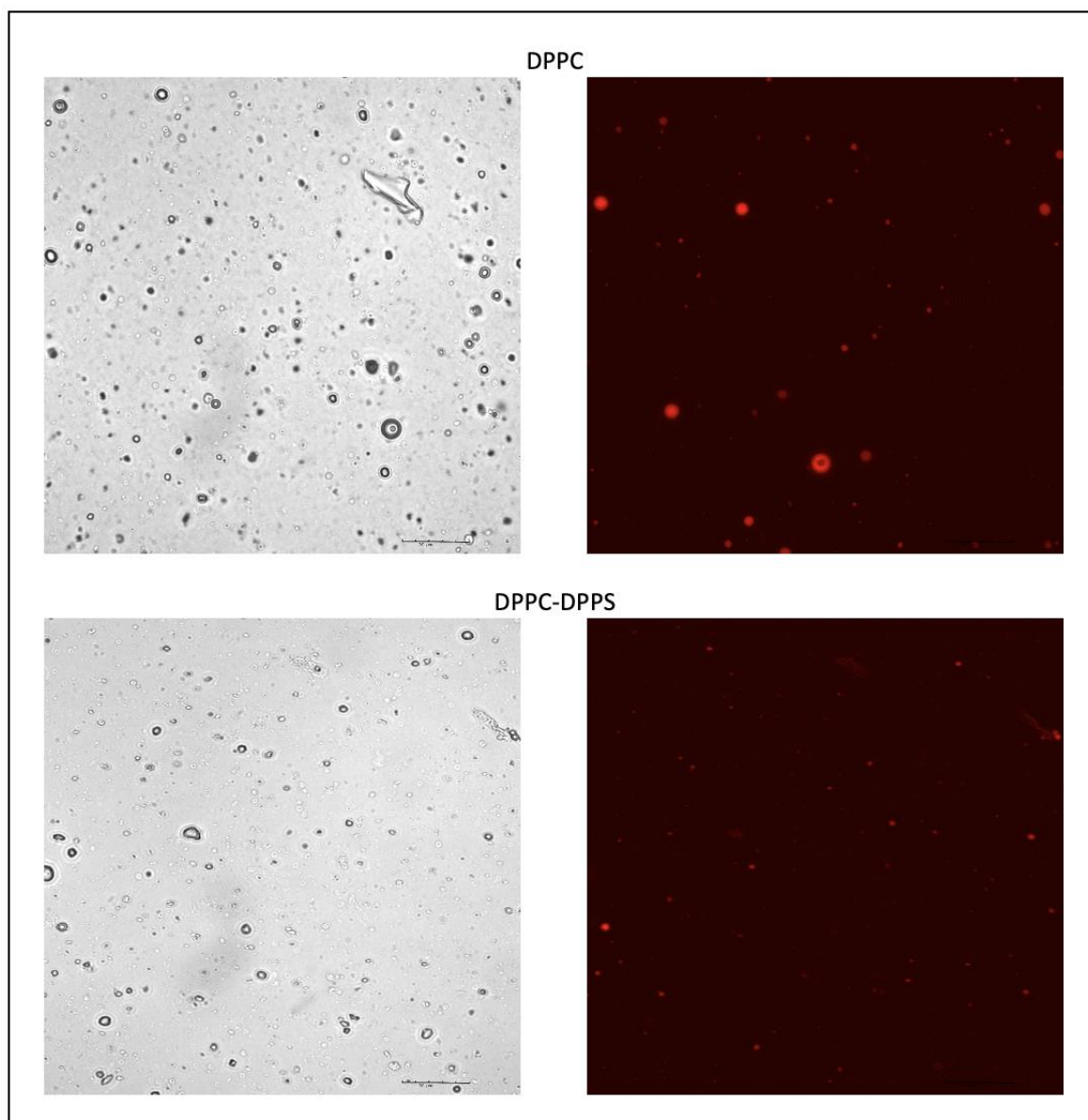


Obr. 5 Distribuce velikosti liposomů DPPC-CH 5:1 po přípravě

### 8.3 Charakterizace liposomů pomocí mikroskopie

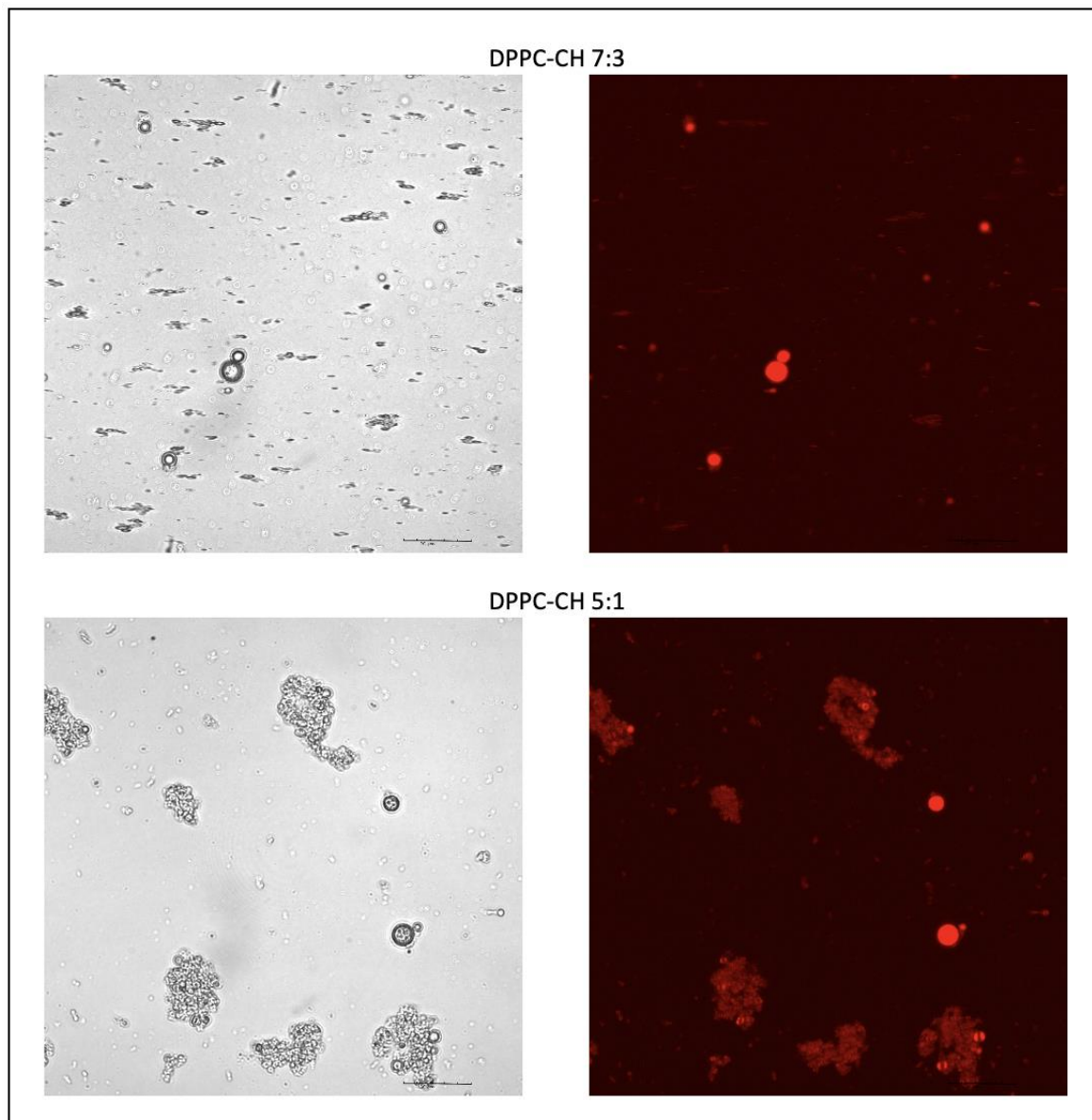
Morfologie jednotlivých formulací liposomů byla pozorována dle postupu uvedeného v kapitole 7.3. Na Obr. 6 a 7 jsou zobrazeny, pomocí konfokálního mikroskopu, morfologie jednotlivých formulací liposomů. Zobrazení bylo provedeno jak v transmisním, tak konfokálním módu, kde jsou liposomy zřetelně viditelné díky olejové fázi barvené nilskou

červení. V disperzi liposomů připravených z DPPC (Obr. 6 horní část) se vyskytovaly větší částice než u DPPC s fosfatidylserinem, což bylo prokázáno i měřením jednotlivých částic pomocí Zeta seizeru (Tab. 2). Velké liposomy a jejich shluky byly pozorovány v obou formulacích s cholesterolem, přičemž nejvíce patrná byla jejich přítomnost u vzorku DPPC s cholesterolem 5:1 (Obr. 7). To koresponduje s informací získanou z distribučních křivek, kde tento vzorek DPPC-CH vykazoval druhou populaci liposomů/aglomerátů s velikostí větší než 3  $\mu\text{m}$ .



Obr. 6 Morfologie DPPC a DPPC-DPPS liposomů. Levý sloupec obsahuje vždy zobrazení v transmisním a pravý v konfokálním módu.

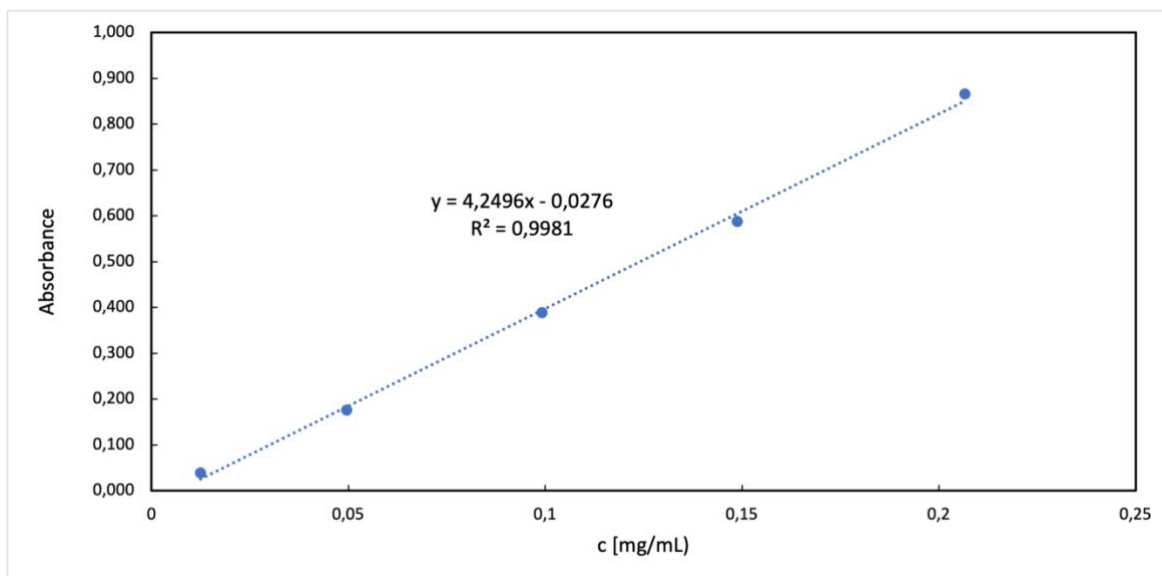




*Obr. 7 Morfologie DPPC-CH 7:3 a DPPC-CH 5:1 liposomů. Levý sloupec obsahuje vždy zobrazení v transmisičním a pravý v konfokálním módu.*

#### **8.4 Stanovení enkapsulační účinnosti**

Po naměření hodnot absorbancí roztoků z kalibrační řady VE-A rozpuštěného v ethanolu byly stejným způsobem měřeny jednotlivé formulace lipidů dle postupu v kapitole 7.3. Z hodnot absorbancí kalibračních roztoků pak byla sestrojena kalibrační přímka (Obr. 8). Na základě hodnot absorbancí roztoků VE-A uvolněného z liposomů byla pomocí této kalibrační přímky spočítána koncentrace VE-A v jednotlivých formulacích, která je uvedena v Tab. 3.



Obr. 8 Kalibrační přímka pro stanovení enkapsulovaného množství VE-A v liposomech

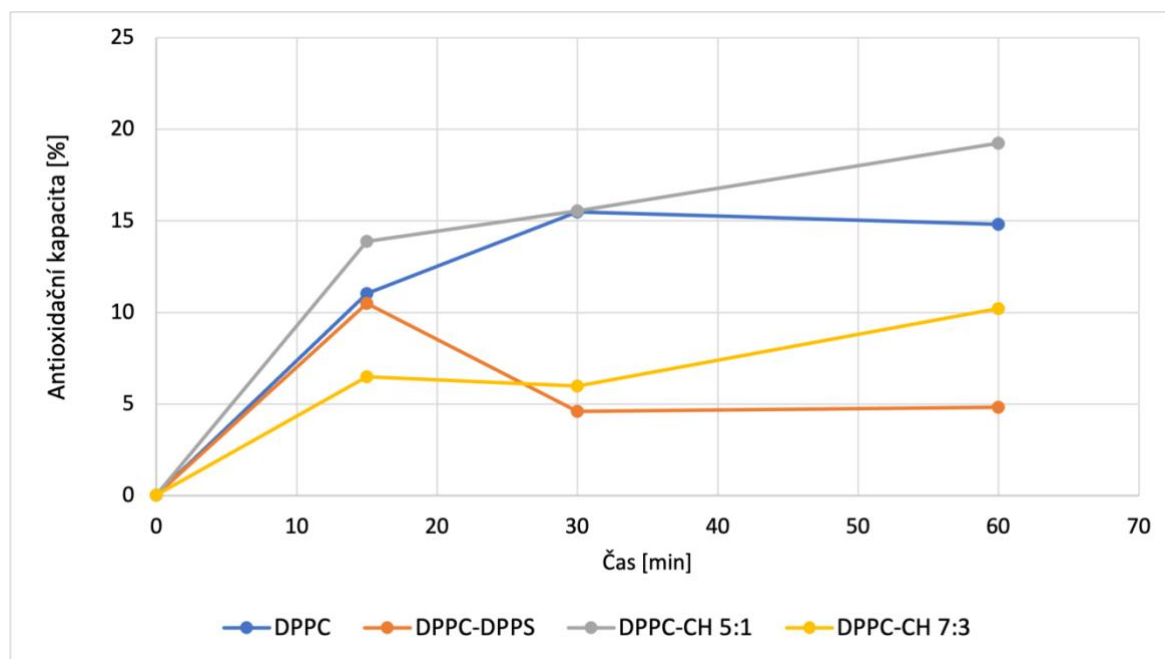
Tab. 3: Enkapsulační účinnost liposomů stanovená pomocí absorpčního měření

Vzorek	c [mg/ml]	Enkapsulační účinnost [%]
DPPC	0,19	48
DPPC-DPPS	0,18	46
DPPC-CH 7:3	0,07	18
DPPC-CH 5:1	0,12	29

Hodnoty enkapsulační účinnosti stanovené pro jednotlivé formulace byly rozdílné. Efektivněji VE-A enkapsulovaly formulace DPPC a DPPC s fosfatidylserinem, kde jej bylo enkapsulováno téměř 50 %. Nejvyšší účinnost enkapsulace pak byla stanovena pro DPPC liposomy. To je nepřímou patrné i z Obr. 1, kde jsou zobrazeny liposomové disperze, z nichž je červená barva nejméně intenzivní právě pro DPPC liposomy. To svědčí o skutečnosti, že nejvíce oleje s nízkou červení je enkapsulováno uvnitř liposomů. Na rozdíl od těchto vzorků, fosfolipidy s cholesterolem v poměru 5:1 a 7:3 enkapsulovaly pouze 29 a 18 % VE-A, z nichž vyšší hodnotu enkapsulační účinnosti vykazoval vzorek, kde byly fosfolipidy a cholesterol v poměru 5:1, v níž bylo zapouzdřeno 29 % vitamínu E. Nižší enkapsulační účinnost mohla být zapříčiněna několika faktory, např. složením fosfolipidové membrány, postupem přípravy (aglomerace menších liposomů do větších celků) či technikou dialýzy.

## 8.5 Stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační účinnost liposomů s enkapsulovaným VE-A byla stanovena pomocí metody eliminace stabilních radikálů 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylu (DPPH). Antioxidanty vychytávají volné radikály, snižují pravděpodobnost jejich vzniku nebo je přeměňují do méně reaktivních stavů. Pomocí spektrofotometru byla naměřena absorbance pracovního roztoku DPPH• při vlnové délce 518 nm, která sloužila jako referenční hodnota. Dále byl měřen úbytek absorbance jednotlivých vzorků po smíchání roztoku DPPH• a liposomů při stejné vlnové délce 518 nm v časových intervalech 15, 30 a 60 min (kapitola 7.4). Reakce antioxidačních látek a DPPH radikálů mění barvu roztoku, a tedy i jeho absorbanci. Čím nižší je absorbance daného vzorku, tím vyšší je antioxidační účinnost testované látky. Na Obr. 9 je znázorněna antioxidační účinnost liposomů v závislosti na době kontaktu s DPPH• stanovená podle rovnice uvedené v kap. 7.5 této práce.



Obr. 9 Antioxidační aktivita liposomálních formulací

Všechny čtyři formulace po 15 minutách kontaktu s DPPH• vykazovaly zvyšující se antioxidační účinnost. Nejvyšší antioxidační kapacitu téměř 15 % vykazoval DPPC s obsahem cholesterolu. Po patnácti minutách antioxidační účinnost rostla pouze u dvou ze čtyř formulací, konkrétně DPPC a DPPC s cholesterolem v poměru 5:1. Vzorky DPPC

s cholesterolem v poměru 7:3 a fosfatidylserinem po 15 min vykazovaly snižující se antioxidační kapacitu. Od třicáté minuty se antioxidační kapacita již příliš neměnila. Obecně lze konstatovat, že antioxidační stabilita připravených liposomů s VE-A byla nízká. Důvod lze najít v samotné nízké účinnosti VE-A. Liposomovou formulaci s VE-A studovali i autoři di Ambro a kol, kteří připravili liposomy s různými formami vitamínu E (d- $\alpha$ -tokoferol, smíšené tokoferoly, Ronoxan MAP a tokoferolacetát) Za použití chemiluminiscence a testů s DPPH• zjistili, že tokoferolacetát a formulace obsahující tento vitamín vykazovaly jen zanedbatelnou antioxidační aktivitu [115, s. 93-99].

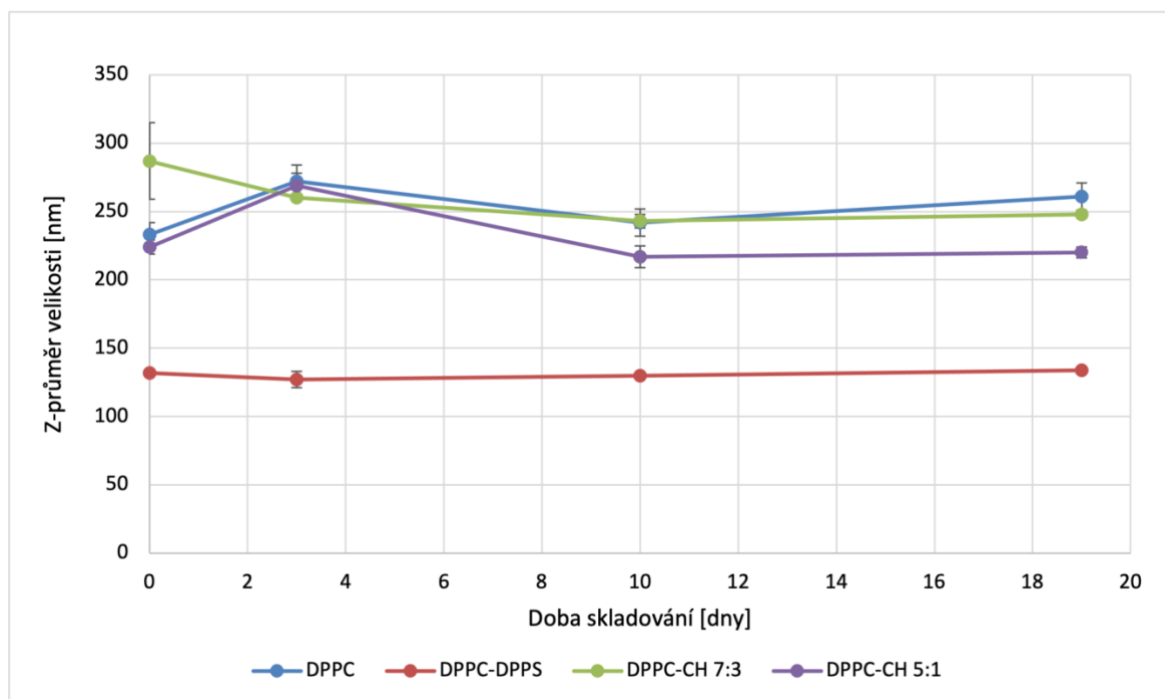
## 8.6 Stanovení stability liposomů

Stabilita liposomů je důležitým faktorem při jejich aplikaci. Závisí na mnoha okolnostech, jako je např. velikost liposomů či jejich chemické složení.

Stabilita jednotlivých formulací liposomů byla hodnocena pomocí měření jejich velikosti a zeta potenciálu v časových intervalech po 3, 10 a 19 dnech po jejich přípravě. Vzorky byly skladovány při 4 °C. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 4 a na Obr. 10 (velikost liposomů) a Tab. 5 a Obr. 11 (zeta potenciál).

Tab. 4: Stabilita liposomů v čase hodnocená ze změn jejich velikosti stanovené ihned po přípravě, po 3, 10 a 19 dnech skladování při 4 °C

Vzorek	Doba skladování [dny]			
	0	3	10	19
	z-průměr velikosti [nm]			
DPPC	233 ± 9	272 ± 12	242 ± 10	261 ± 10
DPPC-DPPS	132 ± 1	127 ± 6	130 ± 1	134 ± 2
DPPC-CH 7:3	287 ± 28	260 ± 2	243 ± 5	248 ± 2
DPPC-CH 5:1	224 ± 5	269 ± 9	217 ± 8	220 ± 4

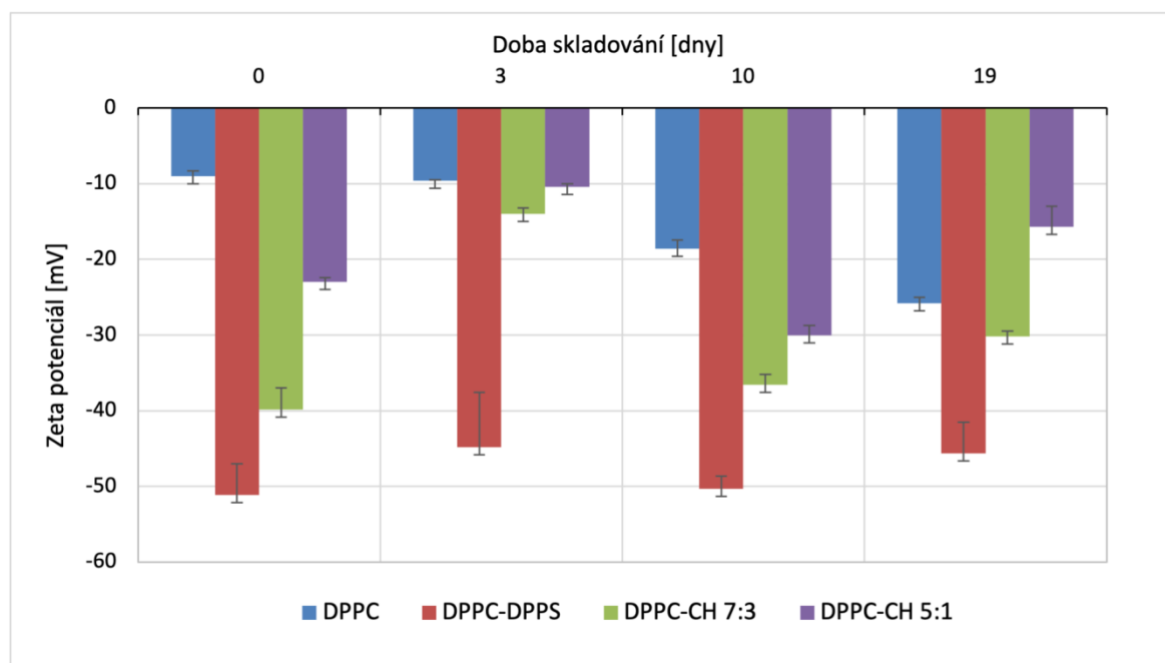


Obr. 10 Grafické znázornění stability liposomů v čase-změny jejich velikosti stanovené po 3, 10 a 19 dnech ode dne přípravy

V průběhu času docházelo u některých formulací k růstu velikosti jednotlivých liposomů. U formulací DPPC a DPPC s cholesterolem 5:1 byly po 3 dnech pozorovány větší liposomy. Nicméně při druhém měření po 10 dnech byl z-průměr liposomů nižší. Vzorky s DPPC vykazovaly po 10 dnech z-průměr velikostí  $242 \pm 10$  nm (původní  $233 \pm 9$  nm) a DPPC s cholesterolem 5:1  $217 \pm 8$  nm (původní  $224 \pm 5$  nm). U formulace DPPC s cholesterolem 7:3 (počáteční velikost činila  $287 \pm 28$  nm) se velikost liposomů snížila a po 19 dnech se ustálila na  $248 \pm 2$  nm. Nejstabilnější formulací tak byl vzorek DPPC s fosfatidylserinem, kdy se velikost liposomů v průběhu celé stabilitní studie pohybovala okolo 130 nm. Stejně jako se měnila velikost liposomů, docházelo i ke změně zeta potenciálu. Nejnižší potenciál a prokazatelné nejlepší stabilitu vykazovala formulace DPPC-DPPS, což souhlasí s výsledky měření velikosti liposomů. Liposomy připravené z DPPC zase naopak v průběhu 19 dnů vykazovaly stále klesající hodnotu zeta potenciálu, který na počátku činil  $-9 \pm 0,7$  mV a po devatenácti dnech  $-25,8 \pm 0,8$  mV. To je překvapivé, protože DPPC liposomy jsou považovány, vzhledem k neutrálnímu náboji fosfatidylcholinu, za poměrně nestabilní. Pro obě formulace liposomů s cholesterolem hodnoty zeta potenciálu značně kolísaly, což mohlo být způsobeno tvorbou/rozpadem aglomerátů, které byly v těchto vzorcích přítomny.

Tab. 5: Stabilita liposomů v čase hodnocená ze změn jejich zeta potenciálů stanovené ihned po přípravě, po 3,10 a 19 dnech skladování 4 °C

Vzorek	Doba skladování [dny]			
	0	3	10	19
	Zeta potenciál [mV]			
DPPC	$-9,0 \pm 0,7$	$-9,6 \pm 0,1$	$-18,6 \pm 1,2$	$-25,8 \pm 0,8$
DPPC-DPPS	$-51,1 \pm 4,1$	$-44,8 \pm 7,2$	$-50,3 \pm 1,7$	$-45,6 \pm 4,1$
DPPC-CH 7:3	$-39,8 \pm 2,8$	$-14,0 \pm 0,8$	$-36,6 \pm 1,4$	$-30,2 \pm 0,7$
DPPC-CH 5:1	$-23,0 \pm 0,6$	$-10,4 \pm 0,4$	$-30,0 \pm 1,3$	$-15,7 \pm 2,7$

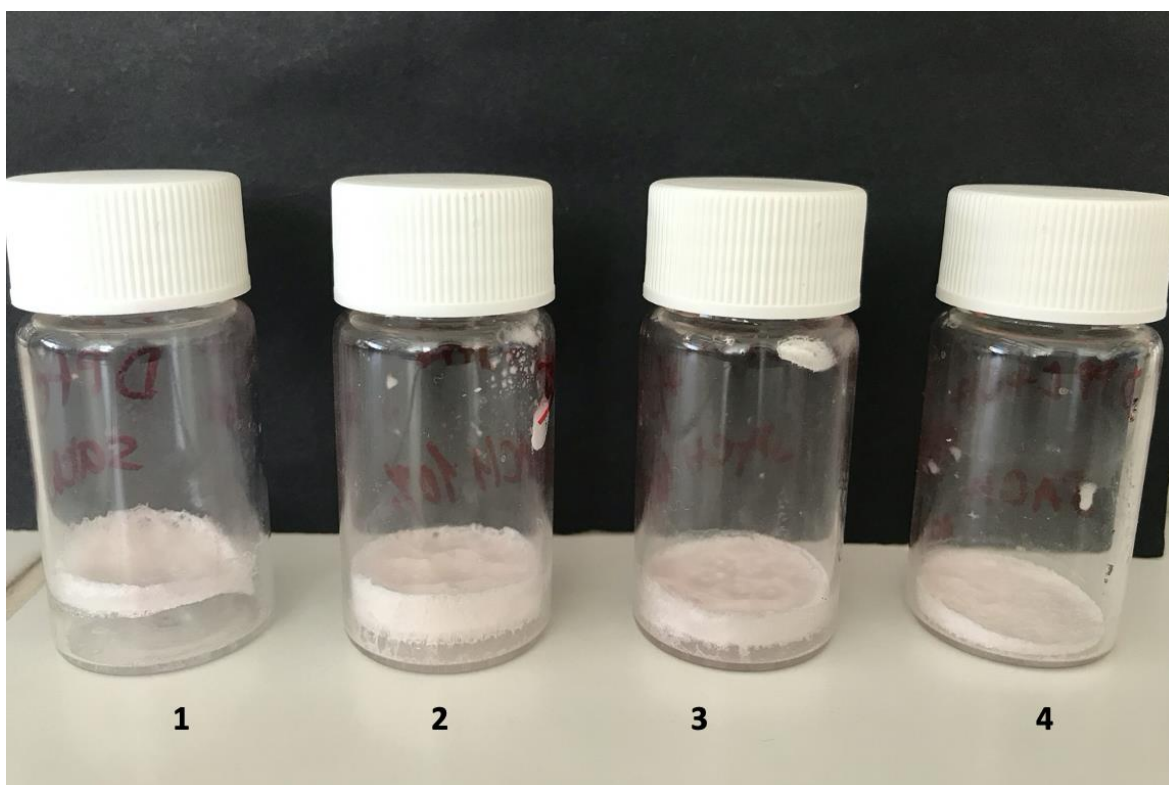


Obr. 11 Stabilita liposomů v čase hodnocená ze změn jejich zeta potenciálů stanovené ihned po přípravě, po 3,10 a 19 dnech

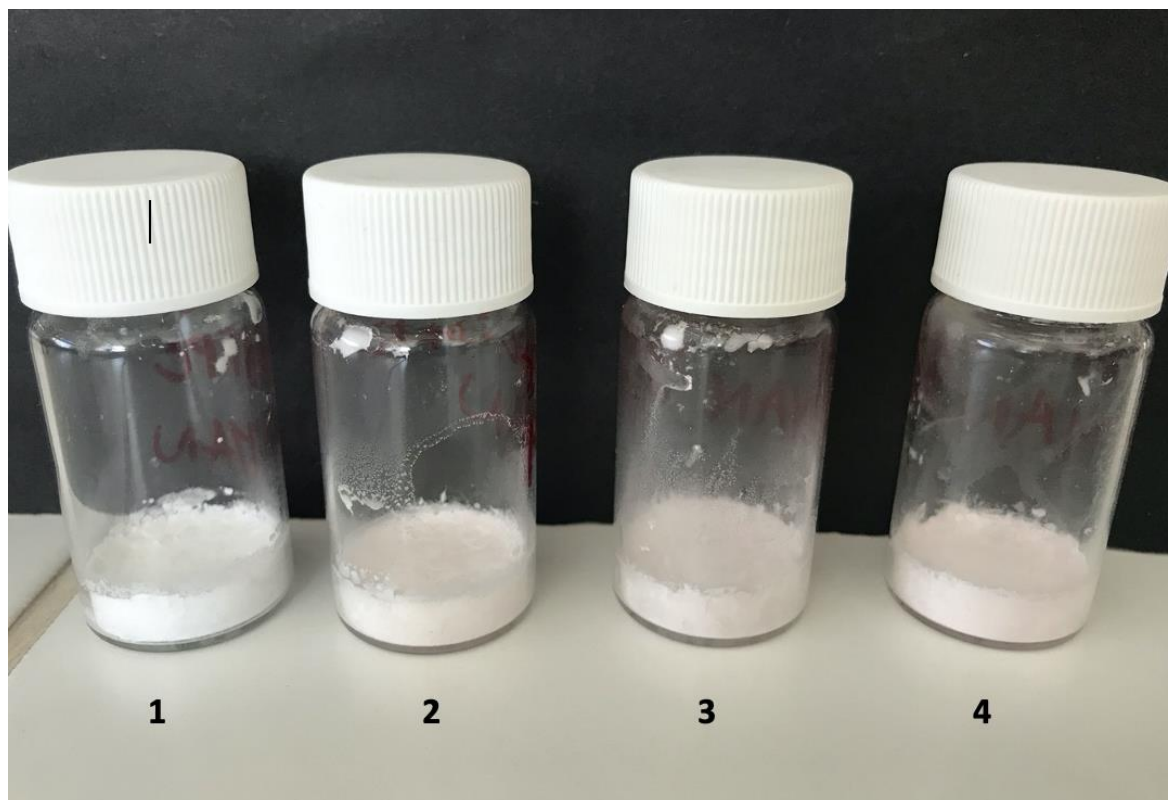
## 8.7 Morfologie lyofilizovaného koláče

Lyofilizace neboli sušení mrazem je jedním z možných způsobů zajištění dlouhodobé stability liposomů. V řadě studií zabývajících se touto problematikou byly navrženy různé kryoprotektivní mechanismy. Parametry kryoprotektivních mechanismů jsou diskutovány

s ohledem na několik aspektů: a to 1) formulační faktory (složení lipidové dvojvrstvy, velikost vezikul, výběr protektantů, poměr protektantu k lipidu), 2) technologické faktory (podmínky skladování, zmrazovací a sušící postupy) a 3) další faktory ovlivňující stabilitu lyofilizovaných koláčů [117, s. 299-311]. Efektivními kryoprotektanty zajišťujícím stabilitu liposomů během lyofilizace jsou sacharidy. Proto byly pro tuto diplomovou práci zvoleny sacharóza a D-mannitol. Koncentrace kryoprotektantů (10 %) byla zvolena na základě předběžného testu provedeného s liposomy připravenými z DPPC a oběma kryoprotektanty o koncentraci 5 a 10 %. Hmotnostní poměr lipid: kryoprotektant při použité 10% koncentraci sacharidů činí 1:20.



*Obr. 12 Lyofilizovaný koláč liposomových formulací s kryoprotektantem sacharózou;  
1) DPPC, 2) DPPC-DPPS, 3) DPPC-CH 7:3, 4) DPPC-CH 5:1*

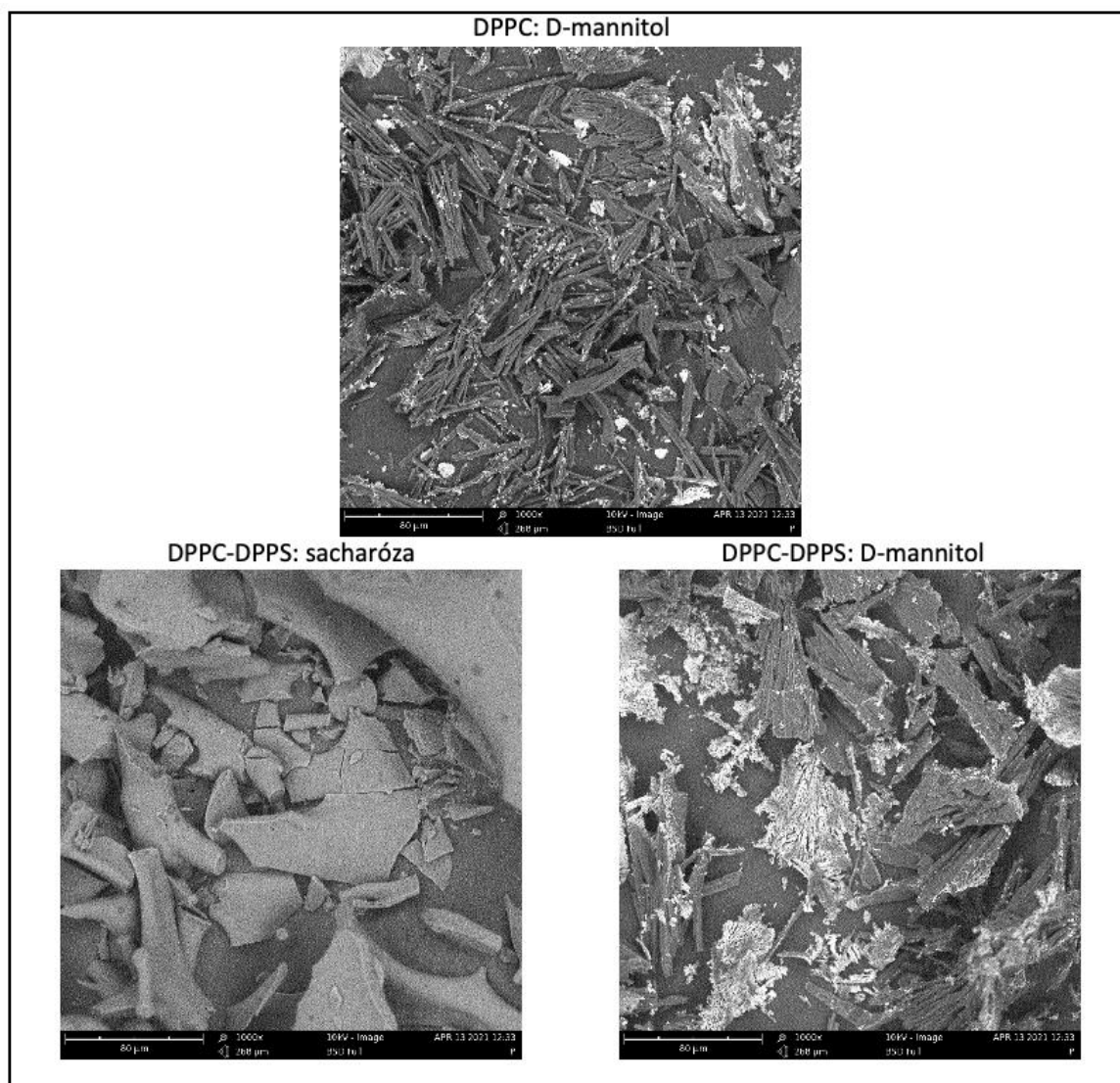


Obr. 13 Lyofilizovaný koláč liposomových fomulací s kryoprotektantem D-mannitolem;  
1) DPPC, 2) DPPC-DPPS, 3) DPPC-CH 7:3, 4) DPPC-CH 5:1

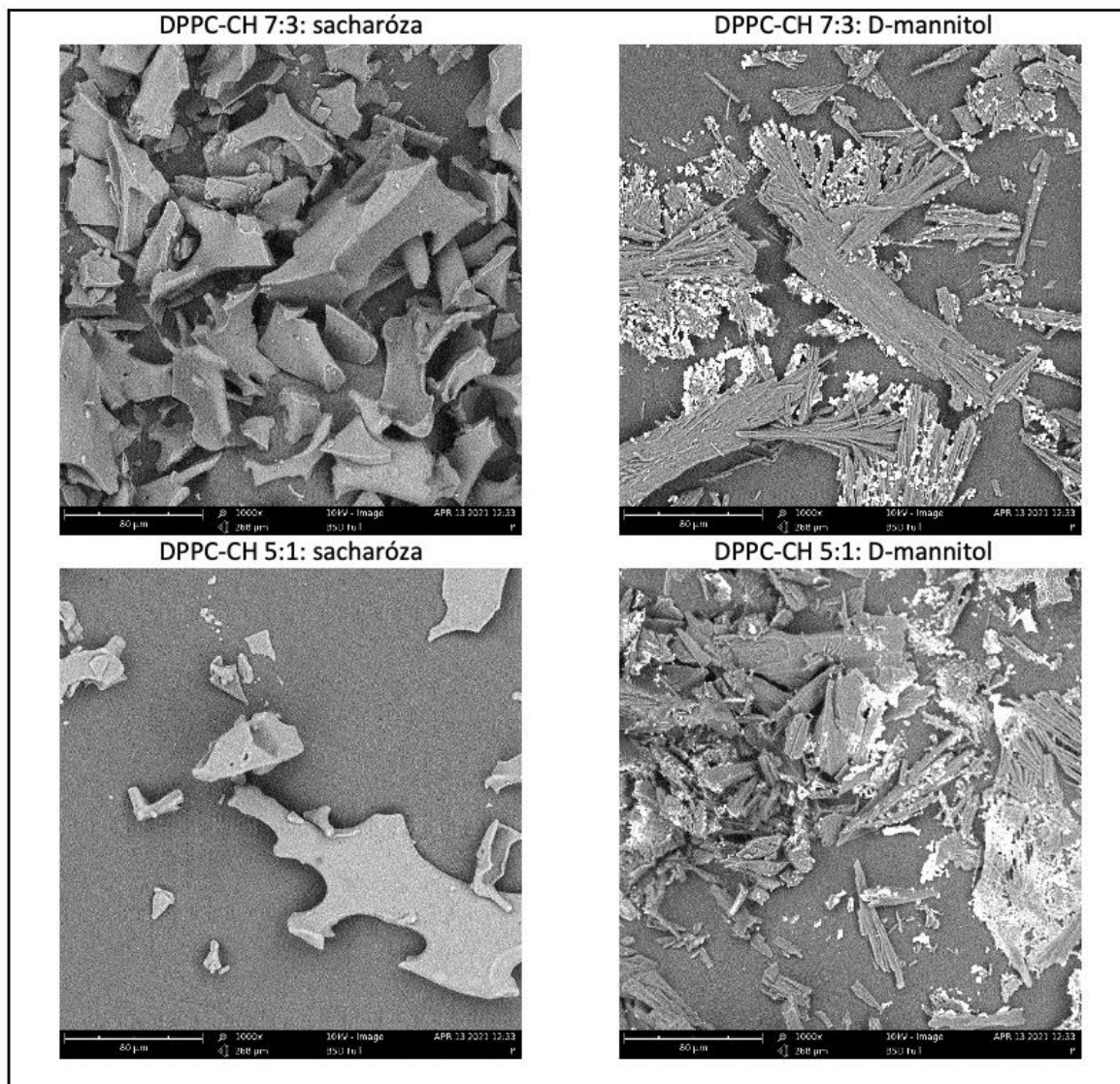
Po lyofilizaci byl vzhled jednotlivých liposomálních formulací popsán pomocí jednoduchého vizuálního pozorování. Vzorky lyofilizované v přítomnosti sacharózy (Obr. 12) byly v porovnání s těmi, co obsahovaly D-mannitol, vizuálně „bělejší“ a kompaktnější. Naopak lyofilizované liposomy, kde byl kryoprotektantem D-mannitol byly méně narůžovělé (horší viditelnost nilské červeně) a více sypké (Obr. 13).

Dále byly lyofilizované vzorky pozorovány pomocí elektronového mikroskopu, dle postupu v kapitole 7.8. Na Obr. 14 až 15 jsou představeny jednotlivé lyofilizované liposomy v přítomnosti použitých kryoprotektantů, sacharózy a D-mannitolu. U vzorku liposomů s membránou z DPPC lyofilizovaných se sacharózou nebylo možné zhotovit snímek, jelikož lyofilizovaný koláč zvlhnul. Snímky z elektronového mikroskopu potvrdily, že díky menším a jemnějším krystalům jsou formulace s obsahem D-mannitolu jemnější a více sypké. Naopak lyofilizovaný koláč jednotlivých formulací s přídatkem sacharózy byl kompaktnější, hladší a tužší, což bylo pozorováno i při přípravě vzorků pro SEM (Obr. 14 a 15).





Obr. 14 Lyofilizované liposomy; nahoře DPPC s D-mannitolem, dole vlevo DPPC-DPPS se sacharózou, dole vpravo DPPC-DPPS s D-mannitolem



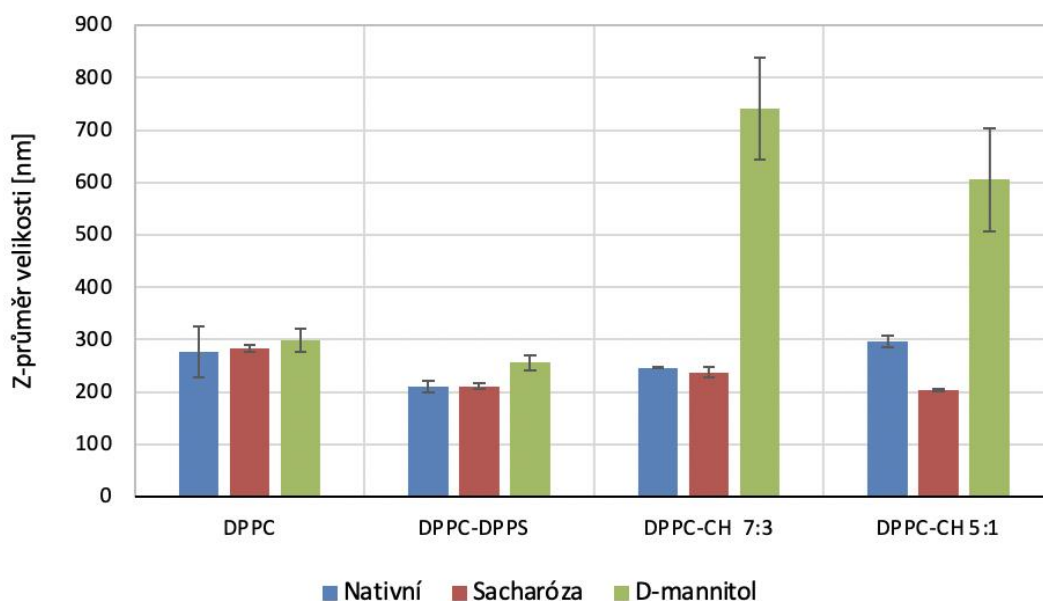
*Obr. 15 Lyofilizované liposomy; nahoře vlevo DPP-CH 7:3 se sacharózou, nahoře vpravo DPPC-CH 7:3 s D-mannitolem, dole vlevo DPPC-CH 5:1 se sacharózou, dole vpravo DPPC-CH 5:1 s D-mannitolem*

## 8.8 Lyofilizace a zpětná rekonstituce liposomů

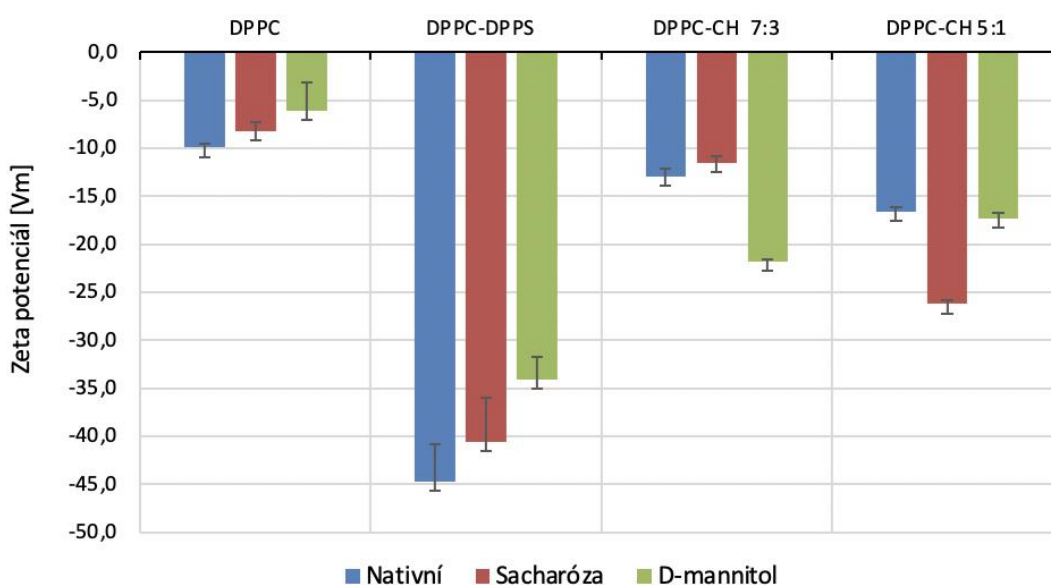
Na Obr. 16 je znázorněn graf změny velikostí liposomů jednotlivých lyofilizovaných formulací po zpětné rekonstituci (přidání vody) a ve dvou variantách s různými kryoprotektanty v porovnání s liposomy před lyofilizací (nativní forma).

Lyofilizované liposomální disperze byly charakterizovány měřením velikostí liposomů a zeta potenciálu. Velikosti liposomů připravených z DPPC a DPPC s obsahem fosfatidylserinu se po zpětné rekonstituci výrazně nezměnily. Po lyofilizaci s oběma

kryoprotektanty (sacharózou i D-mannitolem) byl nárůst velikostí liposomů o 10 až 50 nm, kde větší velikosti byly zaznamenány u vzorků s D-mannitolem. Naopak změna velikostí po rekonstituci u liposomů s obsahem cholesterolu byla nejvíc viditelná u vzorků s kryoprotektantem D-mannitolem. U formulace DPPC-CH 7:3 došlo ke zvětšení liposomů téměř o trojnásobek na hodnotu  $\sim 750$  nm (původní  $246 \pm 2$  nm), u DPPC-CH 5:1 pak došlo k navýšení velikosti liposomů po zpětné rekonstituci na dvojnásobek, z  $297 \pm 11$  nm na  $\sim 600$  nm. V přítomnosti sacharózy k tak výrazným změnám nedošlo a ve vzorku DPPC-CH 7:3 se velikost liposomů nezměnila lyofilizací vůbec. Změna zeta potenciálu po lyofilizaci byla pozorována u všech liposomálních formulací (Obr. 17). U vzorků s kryoprotektantem sacharózou došlo lyofilizací ke zvýšení zeta potenciálu, kromě formulace DPPC-CH5:1, kdy se zeta potenciál po lyofilizaci a zpětné rekonstituci snížil téměř o 10 mV. U vzorků s obsahem D-mannitolu, na rozdíl od sacharózy, došlo k výraznějším poklesům a růstům zeta potenciálu, které byly závislé na typu fosfolipidové membrány v dané formulaci. Výsledky měření vedou k závěru, že sacharóza je při lyofilizaci lepším kryoprotektantem, což potvrdila např. i studie autorů Guimaraes a kol. Tento sacharid účinně zabraňuje fúzi nebo agregaci liposomální formulace a chrání integritu lyofilizovaných liposomů. Po lyofilizaci vykazovaly liposomy s léčivou vysokou stabilitu. Zmíněná zjištění poukazují na to, že sacharóza je dobrým kandidátem na lyofilizaci liposomů s obsahem aktivních látek umístěných v lipidové dvojvrstvě [118]. Lepší účinky sacharózy jako kryoprotektantu mohou být přisuzovány také jejímu složení. Jedná se o stabilní disacharid složený z glukózy a fruktózy.



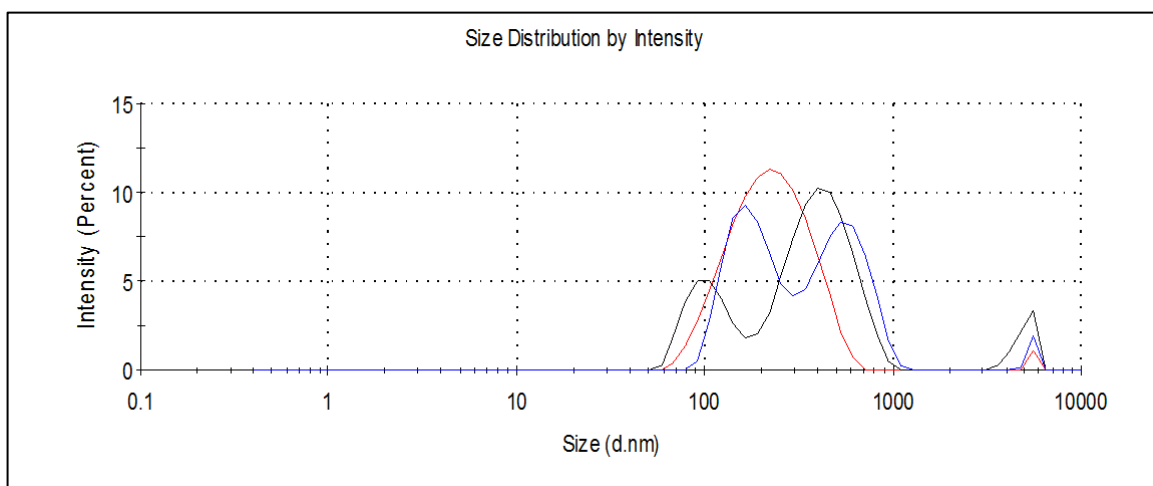
Obr. 16 Lyofilizované liposomy se sacharózou nebo D-mannitolem jako kryoprotektanty. Změny jejich velikosti po zpětné rekonstrukci do liposomové disperze



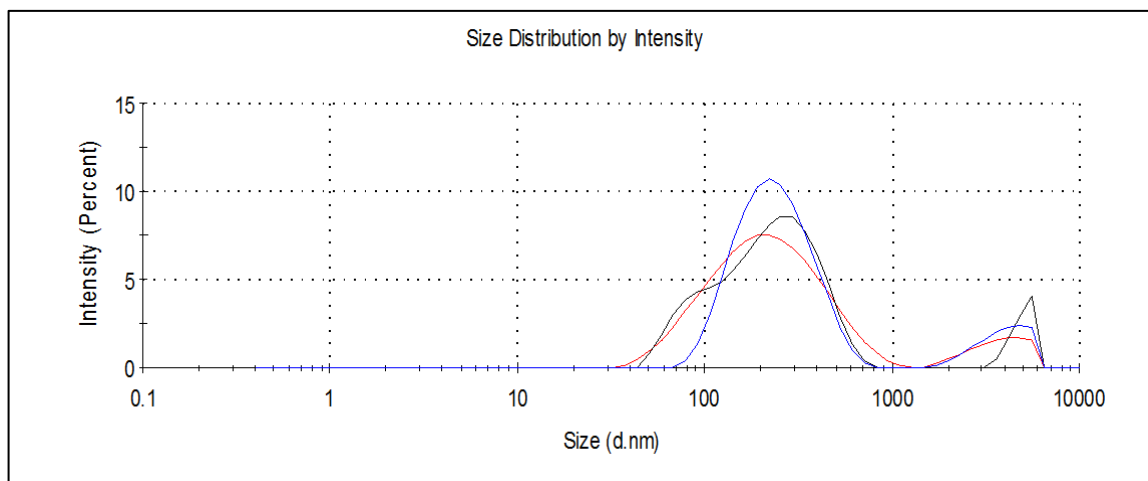
Obr. 17 Lyofilizované liposomy se sacharózou nebo D-mannitolem jako kryoprotektanty. Změny jejich zeta potenciálu po zpětné rekonstrukci do liposomové disperze.

Změny v distribučních křivkách liposomů po lyofilizaci jsou uvedeny na Obr. 18 až 21. Distribuční křivky popisují změny v liposomech lépe, než průměrné hodnoty jejich velikosti, protože znázorňují celou populaci liposomů přítomných ve vzorku. Z obrázků je zřejmé, že

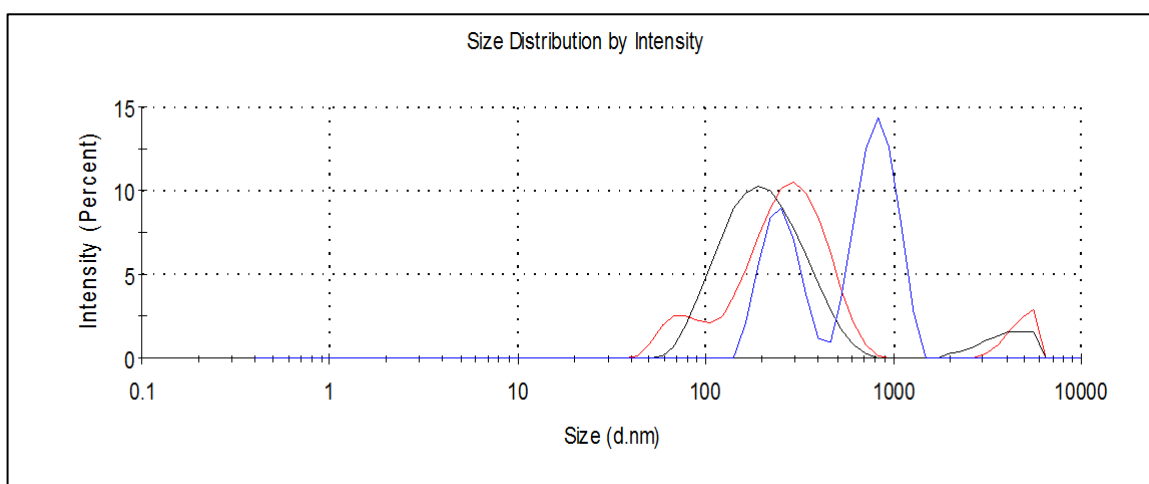
distribuční křivky liposomů po lyofilizaci měnily svůj charakter. K nejmenším změnám došlo u vzorku DPPC-DPPS (Obr. 19), kdy původně monomodální distribuce liposomů po jejich lyofilizaci monomodální zůstala, a to v přítomnosti obou kryoprotektantů. U liposomů připravených z DPPC pak lyofilizací došlo ke vzniku bimodální distribuce se dvěma populacemi liposomů, avšak jejich celková průměrná velikost se výrazně nezměnila (Obr. 18). Distribuční křivky obou formulací s obsahem cholesterolu názorně ilustrují vliv kryoprotektantu na změnu liposomů po lyofilizaci. U obou formulací zůstala distribuce liposomů lyofilizovaných se sacharózou monomodální, avšak v přítomnosti D-mannitolu došlo k její změně na bimodální (DPPC-CH 7:3, Obr. 20), nebo k výraznému posunu do oblastí s většími liposomy (DPPC-CH 5:1, Obr. 21). Všechny vzorky rovněž obsahovaly frakci liposomů/agregátů s mikrometrovou velikostí, což je na obrázcích distribučních křivek jasně viditelné.



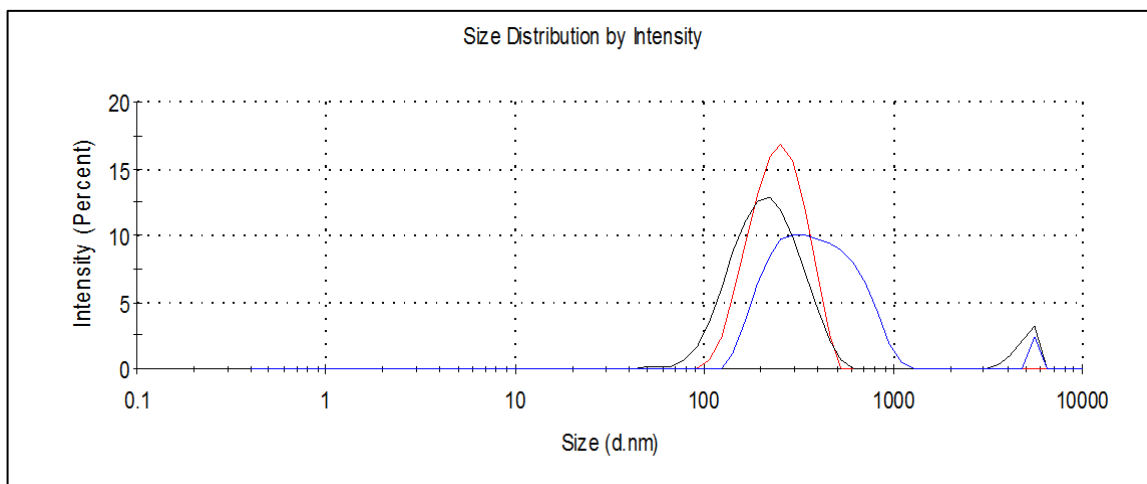
Obr. 18 Distribuce velikosti liposomů DPPC; červená před lyofilizací, černá po lyofilizaci se sacharózou, modrá po lyofilizaci s D-mannitolem



Obr. 19 Distribuce velikosti liposomů DPPC-DPPS; červená před lyofilizací, černá po lyofilizaci se sacharózou, modrá po lyofilizaci s D-mannitolem



Obr. 20 Distribuce velikosti liposomů DPPC-CH 7:3; červená před lyofilizací, černá po lyofilizaci se sacharózou, modrá po lyofilizaci s D-mannitolem



Obr. 21 Distribuce velikosti liposomů DPPC-CH 5:1; červená před lyofilizací, černá po lyofilizaci se sacharózou, modrá po lyofilizaci s D-mannitolem

## ZÁVĚR

Diplomová práce se věnuje tématu přípravy liposomů s obsahem kosmeceutik, kosmetickým nosičům, liposomům, jejich složení, vlastnostem a metodám přípravy, jako i jednotlivým skupinám kosmeceutik, která jsou používána jako součást kosmetických formulací.

Praktická část práce se zabývá přípravou liposomů ve čtyřech formulacích s různým složením lipidové membrány (DPPC, DPPC-DPPS, DPPC-CH 7:3, DPPC-CH 5:1) a obsahem acetátu vitamínu E. Dále byly připravené liposomy charakterizovány a byly stanoveny jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, morfologie, stabilita, enkapsulační a antioxidační účinnost. Z výsledků bylo zjištěno, že vlastnosti liposomů závisí na jejich složení. Velikosti liposomů v jednotlivých formulacích se ihned po přípravě pohybovaly mezi 132 až 287 nm. Nejmenší liposomy byly připraveny z kombinace DPPC a negativně nabitého DPPS. U obou formulací s cholesterolem pak bylo pozorováno, že liposomy tvoří agregáty, které byly nejvíce viditelné ve vzorku DPPC s cholesterolem 5:1. Dle hodnot zeta potenciálu byly jako nejstabilnější formulace vyhodnoceny DPPC s obsahem fosfatidylserinu a DPPC s cholesterolem v poměru 7:3, kdy jejich zeta potenciál dosahoval hodnot  $-51,1$  a  $-39,8$  mV. Liposomy byly rovněž charakterizovány pomocí konfokálního mikroskopu. Stabilita jednotlivých formulací v čase, stanovená měřením velikosti liposomů a jejich zeta potenciálu skladovaných při  $4$  °C, byla poměrně dobrá a závisela na jejich složení. Nejstabilnější formulací byla DPPC-DPPS, a to díky malé velikosti liposomů a negativnímu náboji fosfatidylserinu, který brání jejich agregaci. Zde byla velikost liposomů neměnná po dobu 19 dnů skladování. Nejvyšší enkapsulační účinnost vykazovaly formulace DPPC a DPPC s fosfatidylserinem.

Antioxidační účinnost připravených vzorků, stanovená pomocí testu zhášení volných radikálů DPPH, byla nízká, což bylo způsobeno nízkou účinností enkapsulovaného acetátu vitamínu E. Tato skutečnost byla potvrzena i výsledky již publikovaných studií.

Možnost lyofilizace liposomových formulací byla studována v přítomnosti dvou kryoprotektantů, a to sacharózy a D-mannitolu (obě v koncentraci 10%). Z výsledků vyplývá, že vhodnějším kryoprotektantem pro lyofilizaci studovaných vzorků je sacharóza. V její přítomnosti nedošlo po lyofilizaci a zpětné rekonstituci k významné změně velikosti ani jedné z liposomových formulací. Lepší účinky sacharózy jsou přisuzovány jejímu složení a stabilní struktuře.



Diplomová práce prokázala, že metodou hydratace lipidového filmu lze připravit stabilní formulace liposomů s enkapsulovaným kosmeceutikem a dobrou enkapsulační činností. Tyto formulace lze také účinně lyofilizovat v přítomnosti 10% roztoku sacharózy, která zachovává velikost liposomů bez podstatných změn.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] BAKI, Gabriella a Kenneth S. ALEXANDER, *Intorduction to cosmetic formulation and technology*, Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons. 2015, [cit. 2021-4-25]. ISBN 978-1-118-76378-0
- [2] COMSTOCK, J. Michael H.GOLD. *Cosmeceuticals*. Hartford: Karger, Aesthetic dermatology (Series) [online]. 2021, vol. 5, [cit. 2021-4-25]. Dostupné z: <https://www.scirbd.com/read/496135130/Cosmeceuticals>
- [3] DREALOS, Z.D. *Cosmeceuticals*. In: Alam M. (eds) Evidence- Based Procedural Dermatology [online]. Springer, Chan, 2019, [cit. 2021-4-25]. ISBN 978-3-030-02023-1
- [4] FARRIS, Patricia K. *Cosmeceuticals and Cosmetic Practice*, Wiley Blackwell, New Orleans: John Wiley & Sons, 2014, [cit. 2021-4-25]. ISBN 978-1-118-38483-1
- [5] VELIKOV, K.P., PELAN, E. Collooidal delivery systems for micronutrients a nutraceuticals. *Soft matter*. [online]. 2008, vol. 4, [cit. 2021-4-25]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/B804854A>
- [6] HUANG, Q.R., YU, H.L., RU, Q.M. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *J. Food Sci.* [online]. 2010, vol. 75, vol. 4, [cit- 2021-4-25]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01457.x>
- [7] MASON, T.G., WILKING, J.N., MELESON, K. CHANG, C.B., GRAVES, S.M. Nanoemulsions: formation, structure and physical properties. *J. Phys.: Condens. Matter*. [online]. 2006, vol. 18, [cit. 2021-4-25]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/0953-8984/19/7/079001>
- [8] ACOSTA, E. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* [online]. 2009, vol. 14, [cit. 2021-4-25]. Dostupné z: <https://doi.org/10/1016/j.cocis.2008.01.002>
- [9] SHAKEEL, F., RAMADAN, W., FAISAL, M.S., RIZWAN, M., FAIYAZUDDIN, M., MUSTAFA, G. A SHAFIQ, S. *Transdermal and topical delivery of anti-inflammatory agents using nanoemulsion/microemulsion: an updated review*. Current nano science [online]. 2010, vol. 6, [cit. 2021-4-25]. Dostupné z: [https://fac.ksu.edu.sa/sites/default/files/paper-4\\_0.pdf](https://fac.ksu.edu.sa/sites/default/files/paper-4_0.pdf)
- [10] PAYE, M., BAREL, A.O. MAIBACH, H.I. *Handbook of science and technology*. [online]. 2014, vol. 4, [cit. 2021-4-25]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1201/b16716>

- [11] SURBER, C., SMITH, E.W. The mystical effects of dermatological vehicles. *Dermatology*. [online]. 2005, vol. 210, [cit. 2021-4-25]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000082572>
- [12] BURLANDO, B., VEROTTA, R., CORNARA, L., BOTTINI MASSA, E. *Herbal principles on cosmetics: Properties and mechanisms of action*. Taylor and Francis. 2010, [cit. 2021-4-25]. ISBN 978-1-439-81214-3
- [13] REIGER, M. *Cosmetics and their relation to drugs*, in *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, SWARBRICK, J., BOYLAN, J.C., Informa Healthcare. New York, [online]. 2007, [cit. 2021-4-25]. Dostupné z: [https://www.academia.edu/36511267/Encyclopedia\\_of\\_Pharmaceutical\\_Technology\\_Third\\_Edition](https://www.academia.edu/36511267/Encyclopedia_of_Pharmaceutical_Technology_Third_Edition)
- [14] DARAEI, H., ETEMADI, A., KOUHI, M., ALIMIRAZILU, S., AKBARZADEH, A. *Application of liposomes in medicine and drug delivery*. *Artificial Cells, Nanomedicine*. [online]. 2016, [cit. 2021-4-25]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.953633>
- [15] BANGHAM, A.D. *Liposomes: the Braham connection*. *Them Phys Lipids*. [online]. 1993, vol. 64, [cit. 2021-1-10]. Dostupné z: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/000930849390071A?token=DC4B4B2898140F1B977D433C77FC20A7E70E26A31E0FEC538AF739E45BB8EC6DA1A16E1E8A149DF772309CD642F046E9&originRegion=eu-west-1&originCreation=20210509123241>
- [16] MAHERANI, B., ARAB-TEHRANY, E., MOZAFARI, M. R., GAIANI, C., LINDER, M. *Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies*, *Current Nanoscience*. [online]. 2011, vol. 7, [cit. 2021-1-10]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/profile/Behnoush\\_Maherani/publication/52012554\\_Liposomes\\_A\\_Review\\_of\\_Manufacturing\\_Techniques\\_and\\_Targeting\\_Strategies/links/5ce6f702458515712ebda663/Liposomes-A-Review-of-Manufacturing-Techniques-and-Targeting-Strategies.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Behnoush_Maherani/publication/52012554_Liposomes_A_Review_of_Manufacturing_Techniques_and_Targeting_Strategies/links/5ce6f702458515712ebda663/Liposomes-A-Review-of-Manufacturing-Techniques-and-Targeting-Strategies.pdf)
- [17] BANGHAM, A. *A Correlation between Surface Charge and Coagulant Action of Phospholipids*. *Nature* 192. [online]. 1978, [cit. 2021-1-10]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/1921197a0>
- [18] VOCETKOVÁ, K. MÍČKOVÁ, A., JAROŠÍKOVÁ, T., ROSINA, J., HANDL, M., AMLER, E. Review article: *Liposomy, jejich charakterizace, příprava a inkorporace*

do nanovlákonových nosičů. Ústav biofyziky, 2. lékařská fakulta UK v Praze [online]. 2014. Dostupné z: <https://doi.org/10.14311/CTJ.2014.2.%25x>

[19] SCHROEDER, AVI, YECHEZKEL, J a B. *Ultrasound, liposomes and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes*. Chemistry and Physics of Lipids, [online]. 2009, [cit. 2021-1-10]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/26763603\\_Ultrasound\\_liposomes\\_and\\_drug\\_delivery\\_Principles\\_for\\_using\\_ultrasound\\_to\\_control\\_the\\_release\\_of\\_drugs\\_from\\_liposomes/link/5a18078eaca272df0808ee04/download](https://www.researchgate.net/publication/26763603_Ultrasound_liposomes_and_drug_delivery_Principles_for_using_ultrasound_to_control_the_release_of_drugs_from_liposomes/link/5a18078eaca272df0808ee04/download)

[20] HOŘANOVÁ, H., GAJZIOK, J. A VETCHÝ, D. *Typy a příprava lipozomálních přípravků pro plicní podání*, Chemické listy, s. 322-328, [online]. 2020, vol. 114, [cit. 2021-1-10]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3599/3545>

[21] SUNDARI, P. ANUSHREE, H. *Novel delivery systems: Current trend in cosmetic industry*. European Journal of Pharmaceutical and medical research, [online]. 2017, [cit. 2021-1-10]. Dostupné z: [https://storage.googleapis.com/journal-uploads/ejpmr/article\\_issue/1501822746.pdf](https://storage.googleapis.com/journal-uploads/ejpmr/article_issue/1501822746.pdf)

[22] PRAJAPATI, G. B., PATEL, N. K., PANCHAL, M. M., PATEL, R. P. *Topical Liposomes in Drug Delivery: A Review*, [online]. 2012, vol. 4. [cit. 2021-1-10]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/291103079\\_Topical\\_Liposomes\\_in\\_Drug\\_Delivery\\_A\\_Review](https://www.researchgate.net/publication/291103079_Topical_Liposomes_in_Drug_Delivery_A_Review)

[23] KUMAR, A., BADDE, S., KAMBLE, R., POKHARBAR, V. *Development and characterisation of liposomes drug delivery systems for nimesulide*. Int J. Pharm Sci. [online]. 2010, [cit. 2021-1-10]. Dostupné z: <https://www.saap.org.in/journals/index.php/herbsanddrugs/article/view/116/113>

[24] PAPAHDIOPOULOS, D. *Liposomes and Their Uses in Biology and Medicine*. 308. ed. New York: Academy of science. 1978, [cit. 2021-1-10]. ISBN 978-0-890-72063-9

[25] PAPHADIOPOULOS, D., WILSON, T. & Taber, R. *Liposomes as vehicles for cellular incorporation of biologically active macromolecules*. In Vitro 16. [online]. 1980, [cit. 2021-1-10]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF02618199>

- [26] MOZAFARI, M.R., MORTAZAVI, M. S. *Nanoliposomes: From Fundamentals to Recent Developments*, Trafford Publishing Ltd: UK, 2005, [cit. 2021-1-10]. ISBN 978-1-412-05545-1
- [27] BRIUGLIA, M. L., ROTELLA, CH., MCFARLANE, A., LAMPROU, D. A. *Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release*, Drug Deliver. And Transl. Res., [online]. 2015, vol. 5, [cit. 2021-1-10]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13346-015-0220-8>
- [28] YADAV, A. V., MURTHY, M. S., SHETE, A. S., SAKHARE, S. *Stability Aspects of Liposomes*, Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, [online]. 2011, [cit. 2021-1-10]. Dostupné z: [http://www.ijper.org/sites/default/files/IJPER\\_45\\_4\\_13.pdf](http://www.ijper.org/sites/default/files/IJPER_45_4_13.pdf)
- [29] SHARMA, A., SHARMA, U. S. *Liposomes in drug delivery: progress and limitations*, International Journal of Pharmaceutics, [online]. 1997, vol. 154, [cit. 2021-1-10]. Dostupné z: <https://nanobiotec.iqm.unicamp.br/download/Liposome%20delivery%201.pdf>
- [30] ŠKOPKOVÁ, J. *Transportní systémy využívané v kosmetických přípravcích*, [bakalářská práce]. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008, s. 39
- [31] AKBARZADEH, A., REZAEI-SAFABADY, R., DAVARAN, S., WOO JOO, S., ZARGHAMI, N., HANIFEHPOUR, Y., SAMIEI, M., KOUHI, M., NEJATI-KOSHKO, K. *Liposome: classification, preparation and applications*, Nanoscale Research Letters, [online]. 2013, vol. 8, [cit. 2021-1-10]. Dostupné z: <https://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-8-102>
- [32] SHAHEEN, S. M., SHAKI AHMED, F. R., HOSSSEN, M. N., AHMED, M., AMRAN, M. S., UI-ISLAM, M. A. *Liposome as carrier for advanced drug delivery*, Pak J Biol Sci, [online]. 2006, vol. 9, [cit. 2021-1-10]. Dostupné z: <https://scialert.net/abstract/?doi=pjbs.2006.1181.1191>
- [33] SULTANA, Y., SAMAD, A., AQIL, M. *Liposomal Drug Delivery Systems: An Update Review*. Current Drug Delivery, [online]. 2007, vol. 4, [cit. 2021-1-20]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/5866301\\_Liposomal\\_Drug\\_Delivery\\_Systems\\_An\\_Update\\_Review](https://www.researchgate.net/publication/5866301_Liposomal_Drug_Delivery_Systems_An_Update_Review)
- [34] IMMORDINO, M. L., DOSIO, F., CATTEL, L. *Stealth liposomes: Review of the basic science, rationale and clinical applications, existing and potential*, International Journal of Nanomedicine, [online]. 2006, [cit. 2021-1-20]. Dostupné

z: [https://www.researchgate.net/publication/6122045\\_Stealth\\_Liposomes\\_Review\\_of\\_the\\_Basic\\_Science\\_Rationale\\_and\\_Clinical\\_Applications\\_Existing\\_and\\_Potential](https://www.researchgate.net/publication/6122045_Stealth_Liposomes_Review_of_the_Basic_Science_Rationale_and_Clinical_Applications_Existing_and_Potential)

[35] MÍČKOVÁ, A., BUZGO, M. *Nanotechnologie v biomedicině*. [prezentace]. 2011, [cit. 2021-1-20]. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta

[36] HOUŠŤ, J. *Příprava a charakterizace kationických liposomů nesoucích nové imunoadjuvans*. [online]. Praha, 2018, [cit. 2021-1-20]. Diplomová práce, Univerzita Karlova, přírodovědecká fakulta. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/98110>

[37] VEMURI, S., RHODES, C. T. *Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review*. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, [online]. 1995, vol. 70, [cit. 2021-1-20]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/269410520\\_Liposome-based\\_carrier\\_systems\\_and\\_devices\\_used\\_for\\_pulmonary\\_drug\\_delivery](https://www.researchgate.net/publication/269410520_Liposome-based_carrier_systems_and_devices_used_for_pulmonary_drug_delivery)

[38] TORCHILLIN, P. V., WEISSIG, V. *Liposomes: A practical Approach*. New York, Oxford University Press, [online]. 1990, vol. 2, [cit. 2021-1-20]. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=CIEJI4FIzrIC&oi=fnd&pg=PR13&dq=New+R.+R.+C.:+Liposomes:+a+Practical+Approach.+New+York,+Oxford+University+Press+1990.&ots=43eDVA\\_3j4&sig=E-dvIfX9Pn400Dalse7ukz9bIx4&redir\\_esc=y#v=onepage&q=New%20R.%20R.%20C.%3A%20Liposomes%3A%20a%20Practical%20Approach.%20New%20York%2C%20Oxford%20University%20Press%201990.&f=false](https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=CIEJI4FIzrIC&oi=fnd&pg=PR13&dq=New+R.+R.+C.:+Liposomes:+a+Practical+Approach.+New+York,+Oxford+University+Press+1990.&ots=43eDVA_3j4&sig=E-dvIfX9Pn400Dalse7ukz9bIx4&redir_esc=y#v=onepage&q=New%20R.%20R.%20C.%3A%20Liposomes%3A%20a%20Practical%20Approach.%20New%20York%2C%20Oxford%20University%20Press%201990.&f=false)

[39] BANGHAM, A. D., HORNE, R. W. *Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope*. *Journal of Molecular Biology*, [online]. 1964, vol. 8, [cit. 2021-1-20]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022283664801157>

[40] MEURE, L. A., FOSTER, N. R., DEGHANI, F. *Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: A review*. *AAPS Pharm. Sci. Tech*, [online]. 2008, vol. 9, [cit. 2021-1-20]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1208/s12249-008-9097-x>

[41] RIAZ, M. *Liposomes preparation methods*. *Pak Journal Pharmaceutical Science*, [online]. 1996, vol. 9, [cit. 2021-1-20]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16414777/>

- [42] HIMANSHU, A., PATEL, S. S., SINGHAI, A. K. *Liposome-as Drug Carriers*. IJPLS, [online]. 2011, vol. 2, [cit. 2021-1-25]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/282811783\\_Liposome-as\\_Drug\\_Carriers](https://www.researchgate.net/publication/282811783_Liposome-as_Drug_Carriers)
- [43] SHERRY, M., CHARCOSSET, C., GREIGE-GERGES, H. F. a H. G. *Essential oils encapsulated in liposomes: a review*, Journal of Liposome Research, [online]. 2013, [cit. 2021-1-25]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23879218/>
- [44] KATARIA, S., SANDHU, P. S., BILANDI, A. AKANKSHA, M., KAPOOR, B. SETH, G. L., BIHANI, S. D. *Stealth liposomes: a review*, IJLPS, [online]. 2011, [cit. 2021-1-25]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/266225913\\_Stealth\\_liposomes\\_a\\_review](https://www.researchgate.net/publication/266225913_Stealth_liposomes_a_review)
- [45] ŠTENCLOVÁ, T. *Příprava a charakterizace liposomů s obsahem bioaktivních látek*. [online]. Zlín, 2019, [cit. 2021-1-25]. Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Dostupné z: <https://digilib.k.utb.cz/handle/10563/45619>
- [46] SONG, H., GENG, H. Q., RUAN, J., WANG, K., BAO, C. C., WANG, J., PENG, X., ZHANG, X. Q., CUI, D. X. *Development of polysorbate 80/phospholipid mixed micellat formation for docetaxel and assessment of its in vivo distribution in animal models*. Nanoscale Res. Lett. [online]. 2011, vol. 6, [cit. 2021-1-28]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21711889/>
- [47] ZHANG, Y. *Relations between size and function of substance particles*. Nano Biomed Eng. [online]. 2011, vol. 3, [cit. 2021-1-28]. Dostupné z: [http://nanobe.org/Assets/userfiles/sys\\_eb538c1c-65ff-4e82-8e6a-a1ef01127fed/files/3\(1\)\\_p1-16.pdf](http://nanobe.org/Assets/userfiles/sys_eb538c1c-65ff-4e82-8e6a-a1ef01127fed/files/3(1)_p1-16.pdf)
- [48] PICK, U. *Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures*. Arch Biochem Biophys. [online]. 1981, vol. 212, [cit. 2021-1-28]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7197900/>
- [49] OHSAWA, T. MIURA, H., HARADA, K. *Improvement of encapsulation efficiency of water-soluble drugs in liposomes formed by the freeze-thawing method*. Chem Pharm Bull. [online]. 1985, vol. 33, [cit. 2021-1-28]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4092294/>

- [50] LIU, L. YONETAINI, T. *Preparation and characterization of liposome-encapsulated heamoglobin by a freeze-thaw method*. J Microencapsulation. [online]. 1994, vol 11, [cit. 2021-1-28]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7931940/>
- [51] DEAMER, D., BANGHAM, A. D. *Large volume liposomes by an ether vaporization method*. Biochim Biophys Acta. [online]. 1976, vol. 443, [cit. 2021-1-28]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/963074/>
- [52] SCHIEREN, H. RUDOLP, S., FINDELSTEIN, M. COLEMAN, P. WEISSMANN, G. *Comparison of large unilamellar vesicles prepared by a petroleum ether vaporization method with multilamellar vesicles: ESR, diffusion and entrapment analyses*. Biochim Biophys Acta. [online]. 1978, vol. 542, [cit. 2021-1-28]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/208648/>
- [53] BATZRI, S. KORN, E. D. *Single bilayer liposomes prepared without sonication*. Biochim Biophys Acta. [online]. 1973, vol. 298, [cit. 2021-1-28]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0005273673904082>
- [54] SZOKA, F. J., PAPAHAADJOPOULOS, D. *Procedur efor preparation of liposomes with large internalk aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation*. Proc Natl Acad Sci USA. [online]. 1978, vol. 75, [cit. 2021-1-28]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC336078/>
- [55] HANDA, T., NAITO, S., HIRAMATSU, M., TSUBOIM M. *Thermal SiO and H<sup>13</sup>CO<sup>+</sup> line observations of the dense molecular cloud G0. 11-0.11 in the Galactic Centre Region*. Astrophys J. [online]. 2006, vol. 636, [cit. 2021-1-28]. Dostupné z: <https://iopscience.iop.org/article/10.1086/497881>
- [56] DAEMEN, T. HOFSTEDE, G., TEN KATE, M. T., BAKKER-WOUDENBERG, I. A. J. M., SCHERPHOF, G. L. *Liposomal doxorubicin induced toxicity: depletion and impairment og phagocytic aktivty of liver macrophages*. Int Cancer. [online]. 1995, vol. 6, [cit. 2021-1-28]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7768646/>
- [57] KIRBY, C. J., GREGORIADIS, G. *A simple procedure for preparing liposomes capable og high encapsulation efficiency under mild conditions*. In Liposome Technology. [online]. 1984, vol. 1, [cit. 2021-2-2]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/341346850\\_A\\_Simple\\_Procedure\\_for\\_Prepari ng\\_Liposomes\\_Capable\\_of\\_High\\_Encapsulation\\_Efficiency\\_Under\\_Mild\\_Conditions](https://www.researchgate.net/publication/341346850_A_Simple_Procedure_for_Prepari ng_Liposomes_Capable_of_High_Encapsulation_Efficiency_Under_Mild_Conditions)



- [58] ALPES, HALLMANN, K., PLATTERN, H., REICHERT, J., RICK, R., SCHULZ, S. *Formation of large unilamellar vesicles using alkyl maltoside detergents*. *Biochim Biophys Acta*. [online]. 1986, vol. 862, [cit. 2021-2-2]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23008845/>
- [59] AMLER, E. *Nové trendy v regenerativní medicíně*. Technická univerzita v Liberci, Fakulta textilní. [online]. 2010, [cit. 2021-2-2]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/11000264-Nove-trendy-v-regenerativni-medicine-doc-rndr-evzen-amler-csc.html>
- [60] MURRAY, R. K. a kolektiv. *Harper's Illustrated Biochemistry*. Lange Medical Publications. [online]. 2003, [cit. 2021-2-2]. Dostupné z: [https://www.academia.edu/28679067/Harpers\\_illustrated\\_biochemistry\\_26th\\_ed\\_2003\\_pdf](https://www.academia.edu/28679067/Harpers_illustrated_biochemistry_26th_ed_2003_pdf)
- [61] BRUCE, A. a kolektiv. *Molecular Biology of The Cell Fifth Edition*. Garland Science, New York City. [online]. 2008, [cit. 2021-2-2]. Dostupné z: [https://www.academia.edu/36686286/Molecular\\_Biology\\_of\\_the\\_Cell\\_6th\\_Edition\\_Copy\\_11\\_32\\_40\\_PM](https://www.academia.edu/36686286/Molecular_Biology_of_the_Cell_6th_Edition_Copy_11_32_40_PM)
- [62] VOSOLSOBĚ, S. *Fluidita plazmatické membrány a lipidové rafty u rostlin*. [online]. Praha: Univerzita Karlová, Přírodovědecká fakulta. [bakalářská práce]. 2008, [cit. 2021-2-2]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~vosolsob/rafty.pdf>
- [63] BERGRSTRAND, N. *Liposomes of Drug Delivery*. [online]. Uppsala: Uppsala Univerzity, Faculty of Science and Technology. [disertační práce]. 2003, [cit. 2021-2-2]. Dostupné z: <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:162632/fulltext01.pdf>
- [64] ACOSTA, E. In: *Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals*. Woodhead Publishing Limited: USA [online]. 2008, [cit. 2021-2-2]. Dostupné z: <https://www.elsevier.com/books/delivery-and-controlled-release-of-bioactives-in-foods-and-nutraceuticals/garti/978-1-84569-145-5>
- [65] MARKUS, J. *Sterically Stabilised Liposomes and Related Lipid Aggregates*. [online]. Uppsala: Uppsala Univerzity, Faculty of Science and Technology. [disertační práce]. 2003, [cit. 2021-2-2]. Dostupné z: <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:167878/FULLTEXT01.pdf>

- [66] BARTOVSKÁ, L., ŠIŠKOVÁ, M. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. [online]. Praha: VŠCHT, 2005, [cit. 2021-2-10]. Dostupné z: [http://147.33.74.135/knihy/uid\\_isbn-80-7080-579-X/pages-img/001.html](http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-img/001.html)
- [67] KODÍČEK, M. *Biochemické pojmy (výkladový slovník)*. [online]. Praha: VŠCHT, 2007, [cit. 2021-2-10]. Dostupné z: [http://147.33.74.135/knihy/uid\\_es-002/](http://147.33.74.135/knihy/uid_es-002/)
- [68] SHAH, S. P., MISRA, A. *Liposomal amikacin dry powder inhaler: effect of fines on in vitro performance*. AAPS PharmSciTech. [online]. 2004, vol. 5, [cit. 2021-2-20]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1208/pt050465#citeas>
- [69] MÜLLER, T., SELHORTS, T. SCHUSTER, P., VOS, A., WENZEL, U., NEUBERT, A. *Kinetics of maternal immunity against rabies in fox cubs*. BLMC Infectious Diseases. [online]. 2002, [cit. 2021-2-20]. Dostupné z: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-2-10>
- [70] BERESTEIN LOPEZ, G., MEHTA, R., HOPFER, R. L. *Treatment and prophylaxis of disseminated infection due to Candida albicans in mice with liposome encapsulated amphotericin*, The Journal of Infectious Diseases. [online]. 1983, vol. 147, [cit. 2021-2-20]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jid/article-abstract/147/5/939/788705?redirectedFrom=fulltext>
- [71] LOPEZ-BERESTEIN, G., FAINSTEIN, V. HOPFER, R. *Liposomal amphotericin B for the treatment of systemic fungal infections in patients with cancer: A preliminary study*. J. Infect. Dis. [online]. 1985, vol. 151, [cit. 2021-2-20]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jid/article-abstract/151/4/704/942282?redirectedFrom=fulltext>
- [72] FOUNTAIN, M. W., DEES, C., SCHULTZ, R. D. *Enhanced intracellular killing of Staphylococcus aureus by canine monocytes treated with liposomes containing amikacin, gentamicin, kanamycin and tobramycin*. Curr. Microbiol. [online]. 1981, vol. 6, [cit. 2021-3-1]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01567014>
- [73] MAYER, L. D., BALLY, M. B., HOPE, M. J., CULLIS, P. R. *Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes*. Chem. Phys. Lipids. [online]. 1986, vol. 40, [cit. 2021-3-1]. Dostupné z: <http://www.liposomes.ca/publications/1980s/Mayer%20et%20al%201986%20-%20Techniques%20for%20encapsulating%20bioactive%20agents%20into%20liposomes.pdf>

- [74] FANG, J. Y., HWANG, T. L., HUANG, Y. L., *Liposomes as vehicles for enhancing drug delivery via skin routes*. Curr. Nanosci. [online]. 2006, vol. 2, [cit. 2021-3-2]. Dostupné z: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cnano/2006/00000002/00000001/art00006>
- [75] BETZ, G., AEPPLI, A., MENSCHUTINA, N., LEUENBERGER, H. *In vivo comparison of various liposome formulations for cosmetic application*. Int. J. Pharm. [online]. 2005, vol. 296, [cit. 2021-3-10]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/7856598\\_In\\_vivo\\_comparison\\_of\\_various\\_liposome\\_formulations\\_for\\_cosmetic\\_application](https://www.researchgate.net/publication/7856598_In_vivo_comparison_of_various_liposome_formulations_for_cosmetic_application)
- [76] CHAUDHRY, Q., SCOTTER, M., BUCKBURN, J., ROSS, B., BOXALL, A., CASTLE, L. AITKEN, R., WATKINS, R. *Applications and implications of nanotechnologies for the food sector*. Food Addit. Contam. [online]. 2008, vol. 25, [cit. 2021-3-22]. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02652030701744538>
- [77] MOZAFARI, M. R., JOHNSON, C., HATZIANTONIOU, S., DEMETZOS, C. *Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology*. J. Liposome Res. [online]. 2008, vol. 18, [cit. 2021-3-28]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/23414561\\_Nanoliposomes\\_and\\_Their\\_Applications\\_in\\_Food\\_Nanotechnology](https://www.researchgate.net/publication/23414561_Nanoliposomes_and_Their_Applications_in_Food_Nanotechnology)
- [78] KELLER, B. C. *Liposomes in nutrition*. Trend. Food. Sci. Tech. [online]. 2001, vol. 12, [cit. 2021-3-22]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224401000449>
- [79] EGBARIA, K., WEINER, N. *Liposomes as a topical drug delivery system*. Advanced Drug Delivery Reviews. [online]. 1990, vol. 5, [cit. 2021-3-28]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0169409X9090021J?via%3Dihub>
- [80] MOUSSAOUI, N., CANCELL, M., DANZIOT, A. *Marinosomes A, marine lipid-based liposomes: Physical characterization and potential application in cosmetics*. Inter. J. Pharm. [online]. 2002, vol. 242, [cit. 2021-4-5]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12176280/>
- [81] ZIBOH, V. A., MILLER, C. C., CHO, Y. *Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites*. Am. J. Clin. Nutr. [online]. 2000, vol. 71, [cit. 2021-4-5]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10617998/>

- [82] LAUTENSCHLAGER, H. RODING, J. GHYCZY, M., The use of liposomes from soya phospholipids in cosmetics. [online]. 1988, vol. 14/88, [cit. 2021-3-28]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2095134/>
- [83] GIACOMONI, P. U. *Advancement in skin aging: the future cosmeceuticals*. Clin. Dermatol. [online]. 2008, vol. 26, [cit. 2021-3-28]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/23160196\\_Advancement\\_in\\_skin\\_aging\\_the\\_future\\_cosmeceuticals](https://www.researchgate.net/publication/23160196_Advancement_in_skin_aging_the_future_cosmeceuticals)
- [84] CHANCHAL, D. SWARNLATA, S. *Novel approaches in herbal cosmetics*. J. Cosmet. Dermatol. [online]. 2008, vol. 7, [cit. 2021-3-28]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1473-2165.2008.00369.x>
- [85] KAUL, S., GULATI, N., DEEPALI, V., SODDHARTHA, M., UPENDRA, N. *Role of Nanotechnology in Cosmeceuticals: A Review of Recent Advance*. [online]. 2018, [cit. 2021-3-28]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5892223/>
- [86] SHARMA, R. *Cosmeceuticals and herbal drugs: practical uses*. International Journal of Pharmaceutical Science and Research. [online]. 2012, [cit. 2021-4-5]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/266892323\\_Cosmeceuticals\\_and\\_herbal\\_drugs\\_Practical\\_uses](https://www.researchgate.net/publication/266892323_Cosmeceuticals_and_herbal_drugs_Practical_uses)
- [87] DUREJA, H., KAUSHIK, D., GUPTA, M., KUMAR, V., LATHER, V. *Cosmeceuticals: an emerging concept*. Indian Journal of Pharmacology. [online]. 2005, vol. 37, [cit. 2021-4-5]. Dostupné z: <https://www.ijp-online.com/article.asp?issn=0253-7613;year=2005;volume=37;issue=3;spage=155;epage=159;aulast=Dureja>
- [88] MUKTA, S., ADAM, F. *Cosmeceuticals in day-to-day clinical practice*. Journal of Drugs in Dermatology. [online]. 2010, vol. 9, [cit. 2021-4-5]. Dostupné z: <https://europepmc.org/article/med/20518363>
- [89] SRINIVAS, K. *The current role of nanomaterials in cosmetics*. [online]. 2016, vol. 8, [cit. 2021-4-15]. Dostupné z:
- [90] BRANDT, F. S., CAZZANIGA, A., HANN, M. *Cosmeceuticals: current trends and market analysis*. [online]. 2011, vol. 30, [cit. 2021-4-5]. Dostupné z: [https://cdn.mdedge.com/files/s3fs-public/issues/articles/Vol30\\_i3\\_Brandt.pdf](https://cdn.mdedge.com/files/s3fs-public/issues/articles/Vol30_i3_Brandt.pdf)
- [91] MAIBACH, H. I., ELSNER, P. *Cosmeceuticals Drugs vs. Cosmetics*. Cosmetoc Science and Technology. [online]. 2000, vol. 23, [cit. 2021-4-25]. Dostupné

z: <https://www.anme.com.mx/libros/Cosmeceuticals%20-%20Drugs%20vs.%20Cosmetics.pdf>

[92] DRAELOS, Z. D., THAMAN, L. A. *Formulation of Skin Care Products*. Cosmetic Science and Technology. [online]. 2006, [cit. 2021-4-25]. Dostupné z: <https://www.anme.com.mx/libros/Cosmetic%20Formulation%20of%20Skin%20Care%20Products.pdf>

[93] ORICHA, B. S. *Cosmeceuticals: A review*. African Joournal pf Pharmacy and Pharmacology. [online]. 2010, vol. 4, [cit. 2021-4-25]. Dostupné z: [https://academicjournals.org/article/article1380807394\\_Oricha.pdf](https://academicjournals.org/article/article1380807394_Oricha.pdf)

[94] TANG, S. CH., YANG, J. H. *Dual Effects of Alfa-Hydroxy Acids on the Skin*. Molecules. [online]. 2018, vol. 23, [cit. 2021-5-1]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6017965/>

[95] SAN KIM, M. D., HWANG, S. M., EUNG HO CHOI, M. D., SUNG KU AHN, M. D. SEUNG HUN LEE, M. D. *The Effect of Bentonite and Glycolic Acid on the Stratum corenum*. Department of Dermatology, College of Medicine, Korea. [online]. 2018, vol. 23, [cit. 2021-5-1]. Dostupné z: <https://anndermatol.org/pdf/10.5021/ad.2001.13.4.205>

[96] BRENDA, L. E., GREEN, B. A., WILDNAUER, R. H., SIGLER, M. L. *A polyhydroxy acid skin care regimen provides antiaging effects comparable to an alpha-hydroxyacid regimen*. Clinical Trial. [online]. 2004, vol. 73, [cit. 2021-5-1]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15002657/>

[97] ZHANG. L., FALLA, T. J. *Cosmeceuticals and peptides*. Clinics in Dermatology. [online]. 2009, vol. 27, [cit. 2021-5-1]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0738081X0900128X>

[98] SCHAGEN, S. K. *Topical Peptide Treatments with Effective Anti-Aging Result*. Cosmetics. [online]. 2016, [cit. 2021-5-1]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/317120448\\_Topical\\_Peptide\\_Treatments\\_with\\_Effective\\_Anti-Aging\\_Results](https://www.researchgate.net/publication/317120448_Topical_Peptide_Treatments_with_Effective_Anti-Aging_Results)

[99] PAI, V. V., BHANDARI, P. SHUKLA, P. *Topical peptides as cosmeceuticals*. Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol. [online]. 2017, vol. 83 [cit. 2021-5-1]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27451932/>

- [100] GOROUHI, F. MIBACH, H. *Role of topical peptides in preventing or treating aged skin*. Int. J. Cosmet. Sci. [online]. 2009, vol. 31 [cit. 2021-5-1]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19570099/>
- [101] FIELDS, K. FALLA, T. J., RODAN, K. BUSH, L. *Bioactive peptides: Signaling the future*. J. Cosmet. Dermatol. [online]. 2008, vol. 8 [cit. 2021-5-1]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1473-2165.2009.00416.x>
- [102] BISSETT, D. L. *Common cosmeceuticals*. Clinics in Dermatology. [online]. 2009, vol. 27 [cit. 2021-5-1]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19695474/>
- [103] ZHOU, W., LIU, W., ZOU, L., LIU, W., CHEGMEI, L., LIANG, R., CHEN, J. *Storage stability and skin permeation of vitamine C liposomes improved by pectin coating*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. [online]. 2014, [cit. 2021-5-10]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24681045/>
- [104] LIU, N., PARK, H. J. *Factors effects on the loading efficiency od Vitamin C loaded chitosan-coated nanoliposomes*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. [online]. 2010, vol. 76, [cit. 2021-5-10]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927776509004743>
- [105] ABBAS, S., WEI, CH. D., HAYAT, K., XIAOMING, Z. *Ascorbic Acid: Microencapsulation Techniques and Trends-A Review*. Food Reviews International. [online]. 2012, vol. 28, [cit. 2021-5-10]. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/87559129.2011.635390>
- [106] WECHTERSACH, L., ULRICH, N. P., CIGIĆ, B. *Liposomas stabilization of ascorbic acid in model systems and in food matrices*. Food Science and Technology. [online]. 2012, vol. 45, [cit. 2021-5-10]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S002364381100226X>
- [107] DEBOWSKA, R. M., ROGIEWICZ, K., IWANENKO, T., KRUSZEWSKI, M. *Follic acid (folacin)- New application of cosmetic ingredient*. Kosmetische Medizin. [online]. 2005, vol. 26, [cit. 2021-5-10]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/289046433\\_Folic\\_acid\\_folacin\\_-\\_New\\_application\\_of\\_a\\_cosmetic\\_ingredient](https://www.researchgate.net/publication/289046433_Folic_acid_folacin_-_New_application_of_a_cosmetic_ingredient)

- [108] FISCHER, F., ACHTERBERG, V. a kolektiv. *Folic acid and creatine improve the firmness of human skin in vivo*. J. Cosmet. Dermatol. [online]. 2011, vol. 10, [cit. 2021-5-10]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21332911/>
- [109] NADA, A. H., ZAGHLOUL, A., HEDAYA, M., KHATTAB, I. S. *Stability of vitamin E and vitamin E acetate containing cosmetic preparations*. Journal of Global Pharma Technology. [online]. 2012, vol. 4, [cit. 2021-5-10]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/235999198\\_Stability\\_of\\_vitamin\\_E\\_and\\_vitamin\\_E\\_acetate\\_containing\\_cosmetic\\_preparations](https://www.researchgate.net/publication/235999198_Stability_of_vitamin_E_and_vitamin_E_acetate_containing_cosmetic_preparations)
- [110] TRAN, V. V., MOON, J. Y., LEE, Y. CH. *Liposomes for delivery of antioxidants in cosmeceuticals: Challenges and development strategies*. Journal of Controlled Release. [online]. 2019, vol. 300, [cit. 2021-5-10]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168365919301415>
- [111] SUNTRES, Z. E. *Liposomal Antioxidants for Protection against Oxidant-Induced Damage*. Journal of Toxicology. [online]. 2011, [cit. 2021-5-10]. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/jt/2011/152474/>
- [112] STONE, W. L., SMITH, M. *Therapeutic uses of antioxidants liposomes*. Molecular Biotechnology. [online]. 2004, [cit. 2021-5-10]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1385/MB:27:3:217>
- [113] MONTENEGRO, L., PANICO, A. M., BONINA, F. *Quantitative determination of hydrophobic compound entrapment in dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes by differential scanning calorimetry*. International Journal of Pharmaceutics. [online]. 2004, [cit. 2021-5-10]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378517396045462>
- [114] JIAO, Z., HAN, S., WANG, W., SONG, J., CHENG, J. *Preparation and optimization of Vitamin E acetate liposomes using a modified RESS process combined with response surface methodology*. Particulate Science and Technology. [online]. 2019, [cit. 2021-5-10]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/334309717\\_Preparation\\_and\\_optimization\\_of\\_Vitamin\\_E\\_acetate\\_liposomes\\_using\\_a\\_modified\\_RESS\\_process\\_combined\\_with\\_response\\_surface\\_methodology](https://www.researchgate.net/publication/334309717_Preparation_and_optimization_of_Vitamin_E_acetate_liposomes_using_a_modified_RESS_process_combined_with_response_surface_methodology)
- [115] MAMBRO, V. D., LUSICANO-VAIL, Y. M., AZZOLINI, A. E. C. S., FONSECA, M. V. *Comparison of antioxidant activities of tocopherols alone and in pharmaceutical*

*formulations*. International Journal of Pharmaceutics. [online]. 2003, [cit. 2021-5-10]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12927391/>

[116] JIAO, Z., WANG, X., YIN, Y., XIA, J., MEI, Y. *Preparation and evaluation of a chitosan-coated antioxidant liposome containing vitamin C and folic acid*. Journal of microencapsulation. [online]. 2018, vol. 35, [cit. 2021-5-10]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29671362/>

[117] CHEN, CH., HAN, D., CAI, C., TANG, X. *An overview of liposome lyophilization and its future potential*. Journal of Controlled Release. [online]. 2010, vol. 142, [cit. 2021-5-10]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168365909007366>

[118] GUIMARAES, D., SILVA, C., NORO, J., CAVACO-PAULO, A. *Protective Effects of Saccharides on Freeze-Dried Liposomes Encapsulating Drugs*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. [online]. 2019, [cit. 2021-5-10]. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00424/full>



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

DPPC 1,2-diplamitoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin

DPPS 2-diplamitoyl-*sn*-glycero-3-fosfo-L-serin

CH cholesterol

DPPH 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl

VE-A vitamín E acetát

DLS Dynamic Light Scattering

EE enkapsulační účinnost

AO antioxidační aktivita

SEM skenovací elektronový mikroskop

PDI index polydisperzity

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 Sonikované liposomy: 1) DPPC 2) DPPC-DPPS, 3) DPPC-CH 7:3, 4) DPPC-CH 5:1.....	44
Obrázek 2 Distribuce velikosti liposomů DPPC po přípravě .....	46
Obrázek 3 Distribuce velikosti liposomů DPPC-DPPS po přípravě .....	46
Obrázek 4 Distribuce velikosti liposomů DPPC-CH 7:3 po přípravě .....	47
Obrázek 5 Distribuce velikosti liposomů DPPC-CH 5:1 po přípravě .....	47
Obrázek 6 Morfologie DPPC a DPPC-DPPS liposomů. Levý sloupec obsahuje vždy zobrazení v transmisním a pravý v konfokálním módu .....	48
Obrázek 7 Morfologie DPPC-CH 7:3 a DPPC-CH 5:1 liposomů. Levý sloupec obsahuje vždy zobrazení v transmisním a pravý v konfokálním módu .....	49
Obrázek 8 Kalibrační přímka pro stanovení enkapsulovaného množství VE-A v liposomech .....	50
Obrázek 9 Antioxidační aktivita liposomálních formulací .....	51
Obrázek 10 Grafické znázornění stability liposomů v čase - změny jejich velikosti stanovené po 3,10 a 19 dnech ode dne přípravy .....	53
Obrázek 11 Stabilita liposomů v čase hodnocená ze změn jejich zeta potenciálů stanovené ihned po přípravě, po 3, 10 a 19 dnech .....	54
Obrázek 12 Lyofilizovaný koláč liposomových formulací s kryoprotektantem se sacharózou; 1) DPPC, 2) DPPC-DPPS, 3) DPPC-CH 7:3, 4) DPPC-CH 5:1 .....	55
Obrázek 13 Lyofilizovaný koláč liposomových formulací s kryoprotektantem D-mannitolem; 1) DPPC, 2) DPPC-DPPS, 3) DPPC-CH 7:3, 4) DPPC-CH 5:1 .....	56
Obrázek 14 Lyofilizované liposomy: nahoře DPPC s D-mannitolem, dole vlevo DPPC-DPPS se sacharózou, dole vpravo DPPC-DPPS s D-mannitolem .....	57
Obrázek 15 Lyofilizované liposomy: nahoře vlevo DPPC-CH 7:3 se sacharózou, nahoře vpravo DPPC-CH 7:3 s D-mannitolem, dole vlevo DPPC-CH 5:1 se sacharózou, dole vpravo DPPC-CH 5:1 s D-mannitolem .....	58
Obrázek 16 Lyofilizované liposomy se sacharózou nebo D-mannitolem jako kryoprotektanty. Změny jejich velikosti po zpětné rekonstituci do liposomové disperze...	60

Obrázek 17 Lyofilizované liposomy se sacharózou nebo D-mannitolem jako kryoprotektanty. Změny jejich zeta potenciálů po zpětné rekonstituci do liposomové disperze .....	60
Obrázek 18 Distribuce velikosti liposomů DPPC; červená před lyofilizací, černá po lyofilizaci se sacharózou, modrá po lyofilizaci s D-mannitolem.....	61
Obrázek 19 Distribuce velikosti liposomů DPPC-DPPS; červená před lyofilizací, černá po lyofilizaci se sacharózou, modrá po lyofilizaci s D-mannitolem .....	62
Obrázek 20 Distribuce velikosti liposomů DPPC-CH 7:3; červená před lyofilizací, černá po lyofilizaci se sacharózou, modrá po lyofilizaci s D-mannitolem .....	62
Obrázek 21 Distribuce velikosti liposomů DPPC-CH 5:1; červená před lyofilizací, černá po lyofilizaci se sacharózou, modrá po lyofilizaci s D-mannitolem .....	63

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Množství fosfolipidů (DPPC a DPPS) a cholesterolu (CH) pro přípravu liposomů (na 5 ml liposomové disperze) .....	40
Tabulka 2 Velikost (z-průměr), index polydisperzity a zeta potenciál připravených liposomů .....	45
Tabulka 3 Enkapsulační účinnost liposomů stanovená pomocí absorpčního měření .....	50
Tabulka 4 Stabilita liposomů v čase hodnocená ze změn jejich velikosti stanovené ihned po přípravě, po 3, 10 a 19 dnech při 4 °C .....	52
Tabulka 5 Stabilita liposomů v čase hodnocená ze změn jejich zeta potenciálů stanovené ihned po přípravě, po 3, 10 a 19 dnech při skladování 4 °C .....	54

