

# **Transferosomy – vezikulární nosiče pro farmacii a kosmetiku**

Bc. Adam Srnec

---

Diplomová práce  
2022

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

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

Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Adam Srnec**  
Osobní číslo: **T20139**  
Studijní program: **N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Transferosomy – vezikulární nosiče pro farmacii a kosmetiku**

## Zásady pro vypracování

### I. Teoretická část

Zpracujte literární rešerši na zadané téma. Charakterizujte transferosomy jejich složení, vlastnosti a metody přípravy. Věnujte se rovněž aktivním látkám s antioxidační aktivitou vhodným pro enkapsulaci do transferosomů.

### II. Praktická část

V praktické části práce připravte transferosomy s různým složením membrány a ve formulační studii vyberte vhodné složení membrány pro přípravu formulace s enkapsulovaným antioxidantem. Vhodnými technikami stanovte fyzikálně-chemické charakteristiky připravených transferosomů. Sledujte vztah mezi složením a vlastnostmi studovaných formulací. Získané výsledky zpracujte a formulujte závěry práce.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Fernández-García R. et al. Transferosomes as nanocarriers for drugs across the skin: Quality by design from lab to industrial scale. *International Journal of Pharmaceutics* (2020), 573, 118817
- [2] Benson H. A. E. Elastic Liposomes for Topical and Transdermal Drug Delivery. *LIPOSOMES: METHODS AND PROTOCOLS, VOL 1: PHARMACEUTICAL NANOCARRIERS* Book Series: &#x200f; Methods in Molecular Biology, 605, 2010, 77-86. &#x200f;DOI: 10.1007/978-1-60327-360-2\_4
- [3] Opatha S. A. T; et al. Transfersomes: A Promising Nanoencapsulation Technique for Transdermal Drug Delivery. *PHARMACEUTICS* (2020), 12 Article Number: 855
- [4] Sapkota, Rachana; Dash, Alekha K. Liposomes and transferosomes: a breakthrough in topical and transdermal delivery. *THERAPEUTIC DELIVERY* (2021), 12 (2), 145-158

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

Datum zadání diplomové práce: **25. února 2022**  
Termín odevzdání diplomové práce: **13. května 2022**

L.S.

---

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

---

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

## **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

Volba vhodného nosiče je jedním ze základních předpokladů pro efektivní a cílené dodání účinných látek do organismu. Transferosomy jsou specifickým typem lipidových vezikulárních nosičů, jejichž membrána je díky přítomnosti povrchově aktivních molekul mimořádně deformovatelná. To těmto vezikulám umožňuje nejen účinně enkapsulovat širokou škálu hydrofobních a hydrofilních látek, ale zejména pronikat do hlubokých vrstev kůže.

Práce se blíže zabývá formulací a přípravou transferosomů s obsahem bioaktivního antioxidantu astaxanthinu metodou hydratace tenkého filmu s následnou sonikací. Fyzikálně-chemické vlastnosti připravených transferosomů, včetně velikosti a distribuce vezikul, enkapsulační účinnosti a schopnosti zhášet radikály DPPH jsou stanoveny, diskutovány a korelovány se složením transferosomů. V neposlední řadě bylo provedeno i *in vitro* zhodnocení cytotoxicity připravených formulací.

Klíčová slova: transferosom, astaxanthin, zhášení radikálů DPPH

## ABSTRACT

The selection of a suitable carrier is one of the basic requirements for effective drug delivery. Transferosomes are a specific type of lipid vesicular carriers which, due to the presence of surface-active molecules in their modified membrane, can be characterized by extraordinary deformability allowing these vesicles not only to effectively encapsulate a wide range of hydrophobic and hydrophilic active substances, but especially to penetrate into deep layers of the skin.

The thesis deals with the formulation and preparation of transferosomes containing bioactive antioxidant astaxanthin by the method of thin film hydration followed by sonication. Physicochemical properties of the prepared transferosomes, including vesicle size and distribution, encapsulation efficacy and ability to scavenge DPPH radicals, are determined, discussed and correlated with transferosome composition. Finally, *in vitro* evaluation of cytotoxicity of the prepared formulations was performed.

Keywords: transferosome, astaxanthin, DPPH radical scavenging

Rád bych poděkoval paní doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc. za příkladné vedení diplomové práce, cenné rady, připomínky a vstřícný přístup při konzultacích. Dále mé poděkování patří paní Ing. Lucii Urbánkové, Ph.D., paní Ing. Martině Martínkové a panu Ing. Lukáši Münsterovi, Ph.D. za pomoc v rámci experimentální části práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/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 NOSIČE AKTIVNÍCH LÁTEK</b> .....	<b>11</b>
1.1 VEZIKULÁRNÍ NOSIČE.....	11
<b>2 TRANSFEROSOMY</b> .....	<b>13</b>
2.1 SLOŽENÍ TRANSFEROSOMŮ.....	14
2.1.1 Fosfolipidy .....	14
2.1.2 Aktivátory hran .....	17
2.1.3 Hydratační médium .....	19
2.2 MECHANISMUS TRANSDERMÁLNÍ PERMEACE TRANSFEROSOMŮ.....	19
2.3 STABILITA TRANSFEROSOMŮ.....	21
2.3.1 Fyzikální stabilita .....	22
2.3.2 Chemická stabilita .....	22
2.4 METODY PŘÍPRAVY TRANSFEROSOMŮ.....	24
2.4.1 Metoda hydratace tenkého lipidového filmu.....	24
2.4.2 Metoda ručního protřepávání .....	25
2.4.3 Metoda přímé sonikace .....	25
2.4.4 Metoda vstříkávání z ethanolu .....	25
2.4.5 Extruzní a homogenizační metody .....	26
2.4.6 Metoda odpařování reverzní fáze.....	26
<b>3 AKTIVNÍ LÁTKY S ANTIOXIDAČNÍM ÚČINKEM</b> .....	<b>27</b>
3.1 KAROTENOIDY .....	27
3.1.1 Astaxanthin .....	28
<b>4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>32</b>
<b>5 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE</b> .....	<b>34</b>
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>35</b>
<b>6 POUŽITÉ MATERIÁLY</b> .....	<b>36</b>
6.1 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A PRACOVNÍ POMŮCKY.....	36
6.2 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY.....	37
6.3 BUNĚČNÉ LINIE .....	37
<b>7 METODIKA</b> .....	<b>38</b>
7.1 PŘÍPRAVA TRANSFEROSOMŮ .....	38
7.2 STANOVENÍ DISTRIBUCE VELIKOSTÍ A ELEKTROKINETICKÉHO POTENCIÁLU .....	41
7.3 STANOVENÍ MORFOLOGIE.....	42
7.4 STANOVENÍ ENKAPSULAČNÍ ÚČINNOSTI .....	43
7.5 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ ÚČINNOSTI <i>IN VITRO</i> .....	44

7.6	STANOVENÍ CYTOTOXICITY <i>IN VITRO</i> .....	45
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>47</b>
8.1	PŘÍPRAVA TRANSFEROSOMŮ .....	47
8.2	STANOVENÍ DISTRIBUCE VELIKOSTI A ZETA POTENCIÁLU VEZIKUL .....	48
8.3	MORFOLOGIE TRANSFEROSOMŮ .....	51
8.4	VYHODNOCENÍ ENKAPSULAČNÍ ÚČINNOSTI .....	54
8.5	VYHODNOCENÍ ANTIOXIDAČNÍ ÚČINNOSTI <i>IN VITRO</i> .....	57
8.6	VYHODNOCENÍ CYTOTOXICITY <i>IN VITRO</i> .....	60
8.7	STANOVENÍ STABILITY TRANSFEROSOMŮ .....	62
	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>66</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>68</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>87</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>90</b>
	<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>92</b>



## ÚVOD

Efektivní mechanismus prostupu pokožkou je jedním ze základních předpokladů pro dosažení požadovaného farmaceutického či kosmetického účinku topicky aplikovaných přípravků, kterého lze dosáhnout, mimo jiné, i použitím vhodných nosičů aktivních látek. Transferosomy jsou typem nanostrukturovaných vezikul, jejichž modifikovaná membrána usnadňuje proces transdermální absorpce a umožňuje tak proniknout jejich enkapsulovanému obsahu na místo určení. Ve srovnání s konvenčními liposomy jsou transferosomy schopné lépe překonávat kožní rohovou bariéru a dosahovat hlubokých vrstev kůže.

Negativní dopad oxidačního stresu na organismus je velmi dobře znám. Nadměrná produkce volných radikálů způsobuje narušení přirozených buněčných procesů a vede k vývoji patologických změn – především oxidačním modifikacím biomolekul, které tak ztrácí svou funkci. Z dlouhodobého hlediska je oxidační stres jednou z hlavních příčin procesu vnitřního i vnějšího stárnutí organismu, kůži nevyjímaje. Látky s antioxidačním účinkem jsou schopny s volnými radikály reagovat, eliminovat je a zamezovat dalším nežádoucím oxidačním řetězovým reakcím.

Karotenoidy jsou přírodní antioxidanty představující rozsáhlou skupinu lipofilních látek ze skupiny tetraterpenoidů, přičemž za jednoho z jejich nejvíce potentních zástupců je považován astaxanthin (ASTX) – temně červené barvivo pocházející z mořského světa, jež je známo svými mimořádnými antioxidačními schopnostmi. Jeho nízká rozpustnost v polárním prostředí, omezená chemická stabilita a biodostupnost nicméně představují hlavní překážky pro širší aplikace tohoto potentního antioxidantu v kosmetickém a farmaceutickém sektoru. Enkapsulace ASTX do nosičových systémů tak může představovat vhodnou strategii pro překonání zmíněných nedostatků.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 NOSIČE AKTIVNÍCH LÁTEK

Enkapsulace bioaktivních látek nabývá, v rámci kosmetického průmyslu, stále většího významu. Kosmetické formulace dnes velmi často obsahují celou řadu biologicky aktivních složek se širokým spektrem účinků. Tyto látky jsou však zpravidla velice citlivé na působení teploty, pH prostředí, světla či oxidačního stresu a mohou tak podléhat nežádoucím degra-dačním procesům, jež vedou ke snížení nebo ztrátě jejich účinnosti [1].

Pro topickou aplikaci formulací s obsahem kosmeticky a farmakologicky účinných látek je rovněž jednou z největších výzev překonání svrchní rohové vrstvy *epidermis* – *stratum corneum* (SC). Za běžných podmínek jsou totiž schopny rohovou vrstvou pokožky prostu-povat ve větší míře pouze lipofilní látky o molekulové hmotnosti nižší než  $500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  a s hodnotou rozdělovacího koeficientu oktanol/voda Log P v rozmezí 1 až 3 [2, 3, 4].

Z těchto důvodů jsou dnes stále vyvíjeny nové technologie, jejichž cílem je enkapsulovat bioaktivní látky do vhodných nosičových systémů umožňujících zvýšení stability, účinnosti a biologické dostupnosti bioaktivních látek. Zároveň by nosiče měly těmto látkám umožňo-vat kontrolované a cílené uvolňování a případně i korigovat jejich nežádoucí vlastnosti (zejména ve vztahu k sensorickým vlastnostem finální formulace) [1].

### 1.1 Vezikulární nosiče

Vezikuly můžeme charakterizovat jako uzavřené membránové útvary složené z dvojvrstev, které mohou být tvořeny různými lipidy, surfaktanty či jejich kombinacemi. Inkorporace účinných látek do vezikulárních systémů je jedním z potenciálních způsobů, jak čelit pro-blémům při překonávání SC, jelikož tyto systémy usnadňují vstup hydrofilním a biomak-romolekulárním látkám, které by samy o sobě nebyly schopny svrchní rohovou bariéru pře-konat [2, 3].

Liposomy představují nejstarší skupinu vezikulárních nosičů. Tyto sférické vezikuly tvořené jednou či více lipidovými dvojvrstvami obklopujícími vnitřní jádro tvořené vodnou fází byly poprvé popsány ve 60. letech 20. století Banghamem a Hornem [5]. Membrána liposomů (tzv. lamela) je tvořena molekulami fosfolipidů, které se ve vodném prostředí díky své am-fipatické struktuře samovolně asociují do lipidových dvojvrstev, z nichž se mohou dále tvo-řit právě vezikulární útvary. Dle počtu přítomných lamel rozlišujeme liposomy unilamelární a multilamelární [6]. Pro zvýšení stability liposomálních membrán se často přistupuje k je-

jich kombinacím s dalšími složkami, např. cholesterolem. Konkrétní vlastnosti liposomů vycházejí zejména ze struktury použitých lipidů, jejich obecnou nevýhodou je nicméně fakt, že po depozici na kůži jsou schopny efektivně prostupovat pouze do nejsvrchnějších vrstev *epidermis* [7, 8]. Mezi další omezení patří limitovaná enkapsulační účinnost zejména hydrofilních látek, snížená stabilita membrány, která vede k předčasnému uvolňování vnitřního obsahu, a krátký poločas rozpadu [9]. Tyto skutečnosti proto vedly k vývoji nových nosičových systémů, které se snaží zmíněné nedostatky řešit. Mezi takovéto systémy řadíme např. niosomy, ethosomy či transferosomy.

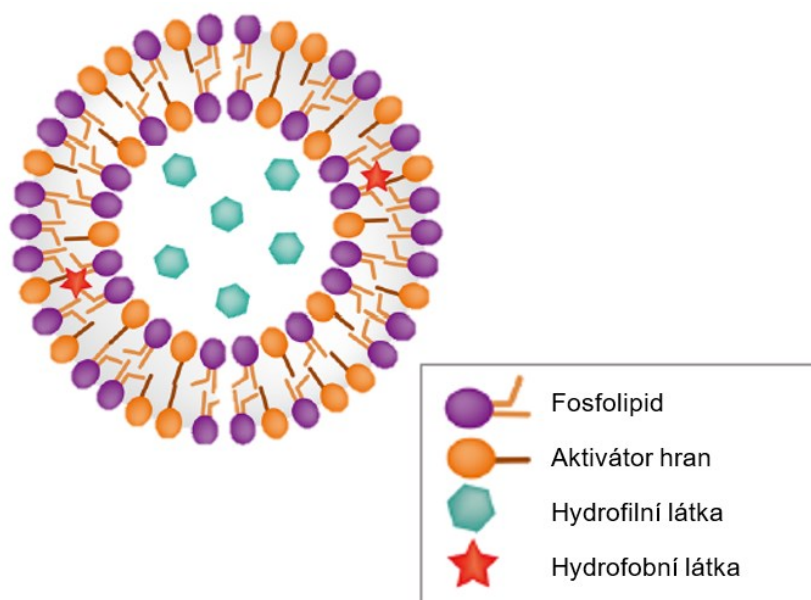
Niosomy byly vyvinuty společností L'Oréal v polovině 70. letech 20. století. Membrána niosomů je, na rozdíl od liposomů, tvořena molekulami neionických jednořetězcových povrchově aktivních látek (PAL). Nejčastěji se jedná o estery mastných kyselin a sorbitolu (sorbitany), popřípadě jejich ethoxylované deriváty (polysorbáty). Vlastnosti niosomální membrány mohou být taktéž dále modifikovány molekulami cholesterolu či jinými amfifilními látkami. Ve srovnání s liposomy jsou niosomy, díky absenci fosfolipidů, stabilnější vůči působení oxidačního stresu [10, 11, 12].

Ethosomy jsou fosfolipidové vezikuly s vysokým obsahem alkoholu (20 až 45 %), zpravidla ethanolu či isopropanolu. Přítomnost alkoholu umožňuje fluidizaci lipidové membrány ethosomů, což vezikulám uděluje poměrně značnou flexibilitu a umožňuje jim dosahovat vyšší permeační účinnosti, než je tomu v případě konvenčních liposomů [13].

Transferosomy jsou specifickým typem vezikulárních nosičů s vysoce deformovatelnou a flexibilní membránou tvořenou molekulami fosfolipidů a surfaktantů, kdy tato kombinace přispívá k zabezpečení velmi vysoké enkapsulační efektivity a schopnosti transdermální absorpce [2, 3, 14].

## 2 TRANSFEROSOMY

Označení „transferosom“ je registrovanou obchodní značkou německé společnosti IDEA AG. Samotné slovo je odvozeno z latinského slova *transfere* znamenající přenášet na druhou stranu a z řeckého slova *soma*, neboli tělo [3, 14]. Transferosomy (Obr. 1) můžeme fakticky charakterizovat jako ultradeformovatelné vezikuly skládající se z modifikované lipidové dvojvrstvy, jež obklopuje vnitřní jádro tvořené vodnou fází. Membrána transferosomů je tvořena zpravidla dvojvrstvou fosfolipidů, do které jsou vmezeřeny molekuly aktivátorů hran – PAL. Díky jejich přítomnosti je membrána mimořádně deformovatelná, stresresponzivní a pružná [2, 3, 8, 14].



Obr. 1. Schématické znázornění struktury transferosomu [upraveno dle 15]

Transferosomy jsou vhodné pro enkapsulaci širokého spektra lipofilních i hydrofilních účinných látek. V závislosti na polaritě se inkorporovaná látka může stát součástí samotné fosfolipidové dvojvrstvy (lipofilní látky), nebo se může koncentrovat ve vodném jádře (hydrofilní látky). Transferosomy jsou schopny penetrovat skrz *SC* a dále permeovat do hlubokých vrstev *epidermis*. Penetrační schopnosti nicméně závisí na deformovatelnosti transferosomální membrány, a tedy na konkrétním složení vezikuly [16]. Proto je třeba určit co možná nejvhodnější formulaci prostřednictvím individuálně navržených experimentálních postupů, a to pro každou účinnou látku tak, aby bylo možné získat bezpečný, obecně dobře přijímaný nosič s optimální deformovatelností, stabilitou a enkapsulační účinností [3, 8, 14].

## 2.1 Složení transferosomů

Transferosomy se skládají z několika komponent. Základní složku představují molekuly amfipatických fosfolipidů, které mohou být využívány samostatně nebo ve směsích s dalšími lipidickými látkami. Důležitou složkou formulace jsou dále molekuly aktivátorů hran, jejichž přítomnost je zásadní pro funkční vlastnosti membrány [2, 17, 18]. Jako hydratační médium je využívána deionizovaná voda nebo pufované fyziologické roztoky o příslušné hodnotě pH. V případě pomocných rozpouštědel se uplatňují nejčastěji nízkomolekulární alkoholy, např. ethanol či methanol [19].

### 2.1.1 Fosfolipidy

Fosfolipidy představují typické zástupce heterolipidů. Přítomnost hydrofilních skupin ve struktuře těchto lipidů se projevuje v jejich amfipatickém charakteru. Jak již bylo zmíněno, ve vodném prostředí jsou fosfolipidy schopny asociace za vzniku nadmolekulárních útvarů. V závislosti na obsaženém alkoholu rozlišujeme dvě základní skupiny fosfolipidů – glycerofosfolipidy a sfingofosfolipidy. Glycerofosfolipidy obsahují ve své struktuře molekulu trojsytného alkoholu glycerolu, zatímco sfingofosfolipidy obsahují molekulu nenasyceného aminoalkoholu s 18 atomy uhlíku – sfingosinu.

Z chemického hlediska glycerofosfolipidy vychází z 3-fosforylglycerolu, jehož acylací dvěma molekulami mastných kyselin vzniká molekula kyseliny fosfatidové. V případě, že poloha *sn-1* či *sn-2* není esterifikována, hovoříme o tzv. lysofosfolipidech. Fosfátová skupina glycerofosfolipidů v poloze *sn-3* umožňuje případnou vazbu dalších hydrofilních funkčních skupin, což vede ke vzniku různých derivátů. Jedná se např. o fosfatidylethanolamin (PE), fosfatidylserin (PS) či fosfatidylcholin (PC). Všechny přirozeně se vyskytující glycerofosfolipidy zaujímají  $\alpha$ -strukturu s L-konfigurací [6].

Glycerofosfolipidy využívané pro formulaci vezikulárních nosičů mohou být přírodního, či syntetického původu. Z hlediska složení se ve struktuře přírodního PC vyskytují zejména středně dlouhé nenasycené mastné kyseliny se 16 až 18 atomy uhlíku. Díky přibližně stejné délce mastných kyselin v poloze *sn-1* a *sn-2* je molekula PC víceméně symetrická [6, 20].

Mezi nejběžnější přírodní fosfolipidy patří směsný vaječný či sójový PC. Pro vaječný fosfatidylcholin (EPC) je typická přítomnost *n-6* a *n-3* polynenasycených mastných kyselin s dlouhými řetězci, jmenovitě se jedná o kyselinu arachidonovou a kyselinu dokosahehexaenovou; sójový fosfatidylcholin (SPC) je bohatý na kyselinu linolovou. V případě synteticky

připravovaných fosfolipidů mohou být využívány např. 1,2-dimyristoyl fosfatidylcholin (DMPC), 1,2-dipalmitoyl fosfatidylcholin (DPPC) či 1,2-dipalmitoyl fosfatidylglycerol (DPPG) [2, 6, 21].

Výběr konkrétního fosfolipidu má zásadní dopad na vlastnosti dvojvrstvy, zejména na její stabilitu a fluiditu. Velmi důležitým faktorem je například míra nenasycenosti vázaných mastných kyselin. Pro fosfolipidy izolované z vaječného žloutku je typické zastoupení nasycené mastné kyseliny v poloze *sn-1* a nenasycené mastné kyseliny v poloze *sn-2*, obecně tak dávají vzniku propustnějším a méně stabilním dvojvrstvám. Naopak syntetické fosfolipidy bohaté na dlouhé nasycené acylové řetězce, např. DMPC a DPPC, vytvářejí poměrně tuhoun, spíše nepropustnou strukturu dvojvrstvy [22].

Zastoupení konkrétních typů mastných kyselin ve struktuře fosfolipidu se projevuje v teplotě fázového přechodu fosfolipidu  $T_c$ . Hodnota  $T_c$  představuje teplotu, při které dochází k přechodu fosfolipidu z gelové struktury do kapalně krystalické fáze, přičemž na výsledné hodnotě se podílí celá řada faktorů, a to zejména délka a nenasycenost vázaného acylu, povaha vázané polární skupiny a čistota samotného fosfolipidu [6, 23]. Souhrn hodnot  $T_c$  pro vybrané fosfolipidy je uveden v Tab. 1.

Rostoucí délka uhlovodíkového řetězce vázaného ve struktuře fosfolipidu přispívá ke zvýšení hodnoty  $T_c$ . Dalším výrazným faktorem je nenasycenost přítomných acylů – při zachování stejné délky alifatického řetězce a stejného typu polární skupiny dochází se zvyšující se nenasyceností řetězců k výraznému poklesu hodnoty  $T_c$ . Například hodnota  $T_c$  v případě 1,2-distearoyl fosfatidylcholinu (DSPC) dosahuje 55 °C, zatímco u 1,2-dioleoyl fosfatidylcholinu (DOPC) tato hodnota klesá až na -20 °C. Povaha polární skupiny taktéž výrazně ovlivňuje hodnotu  $T_c$ . Přítomnost ethanolaminu ve struktuře 1,2-dipalmitoyl ethanolaminu (DPPE) zvyšuje hodnotu  $T_c$  na 63 °C, zatímco u běžného DPPC dosahuje hodnot výrazně nižších 41 °C. Možným vysvětlením tohoto zvýšení  $T_c$  v případě DPPE může být existence silnějších interakcí polárních skupin, než je tomu u DPPC [6].

Jelikož je pro přírodní fosfolipidy typická přítomnost směsných molekul s různě dlouhými vázanými acyly, k fázovým přechodům dochází u těchto fosfolipidů za obecně hůře definovaných podmínek, tedy v širším teplotním intervalu. Přírodní fosfolipidy izolované ze sójových bobů se, ve srovnání s fosfolipidy vaječného žloutku, vyznačují vyšší variabilitou vá-

zaných acylů. To se projevuje v širším intervalu  $T_c$  sójových fosfolipidů. Synteticky připravené fosfolipidy s přesně definovaným složením se naopak vyznačují velmi úzkými teplotními intervaly  $T_c$  [23].

Tab. 1. Přehled hodnot  $T_c$  pro vybrané fosfolipidy [6, 21, 23, 24]

Fosfolipid	Zkratka	$T_c$ [°C]
Sójový fosfatidylcholin	SPC	-20 až -30
Hydrogenovaný sójový fosfatidylcholin	HSPC	52
Vaječný sfingomyelin	ESM	40
Vaječný fosfatidylcholin	EPC	-5 až -15
Dilauroyl fosfatidylcholin	DLPC	-20
Dimyristoyl fosfatidylcholin	DMPC	23
Dipalmitoyl fosfatidylcholin	DPPC	41
Dioleoyl fosfatidylcholin	DOPC	-22
Distearoyl fosfatidylcholin	DSPC	55
Dimyristoyl fosfatidylglycerol	DMPG	23
Dipalmitoyl fosfatidylglycerol	DPPG	41
Dioleoyl fosfatidylglycerol	DOPG	-18
Distearoyl fosfatidylglycerol	DSPG	55
Dimyristoyl fosfatidylethanolamin	DMPE	50
Dipalmitoyl fosfatidylethanolamin	DPPE	60
Dioleoyl fosfatidylethanolamin	DOPE	-16
Dimyristoyl fosfatidylserin	DMPS	38
Dipalmitoyl fosfatidylserin	DPPS	51
Dioleoyl fosfatidylserin	DOPS	-10



Důležitým kritériem pro přípravu vezikulárních systémů na bázi lipidů je používání surovin ve farmaceutické kvalitě, což značně zvyšuje finanční náročnost těchto systémů. Přírodní fosfolipidy jsou ve srovnání se syntetickými fosfolipidy cenově dostupnější, nedosahují však čistoty synteticky připravovaných fosfolipidů a jsou náchylnější k projevům hydrolytické nestability, která vede ke vzniku lysofosfolipidů. I přesto obsahuje většina transferosomálních formulací jako hlavní složku své lipidové frakce směsný PC přírodního původu, jenž je výborně snášen kůží, čímž je eliminováno riziko nežádoucích reakcí [3, 6, 25, 26].

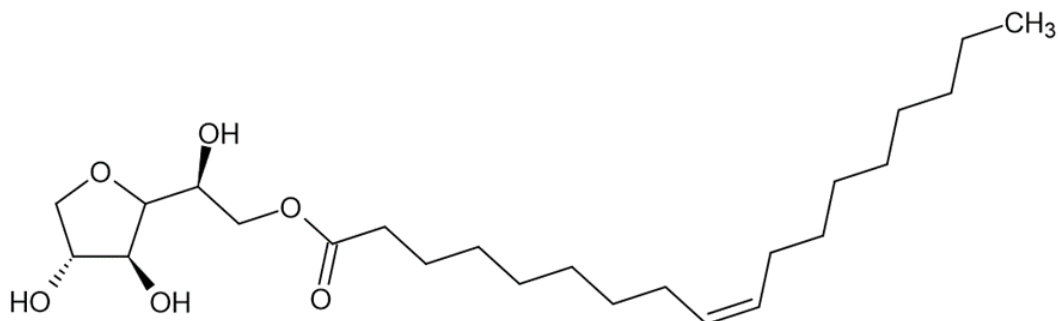
### 2.1.2 Aktivátory hran

Aktivátory hran představují skupinu biokompatibilních surfaktantů, jež primárně umožňují změkčení fosfolipidové dvojvrstvy vmezeřením se do její struktury. Nejčastěji se jako aktivátory hran uplatňují jednořetězcové PAL z řad anionických a neionických tenzidů. Okrajově však mohou být využívány i některé další látky, např. monoterpenické uhlovodíky [27, 28]. Základní lipidová membrána je v důsledku přítomnosti molekul aktivátorů destabilizovaná a mimořádně flexibilní [29]. Přítomnost těchto látek v transferosomálních formulacích může dále usnadňovat solubilizaci hydrofobních účinných látek, čímž je podpořena enkapsulační účinnost vezikul [30]. Přispívají rovněž ke zvýšení tekutosti kožních lipidů, fungují tedy jako urychlovače (enhancery) transdermální absorpce [2, 15, 31].

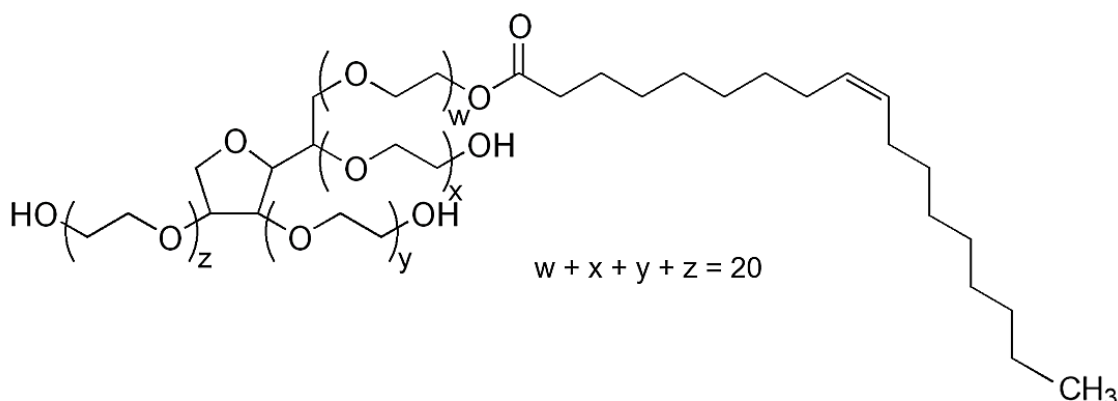
Neionické surfaktanty vykazují ve srovnání se surfaktanty anionickými obecně nižší hodnoty iritačního potenciálu, jsou považovány za méně toxické a méně hemolytické; navíc mají tendenci v roztoku udržovat fyziologické pH [15]. Specifickou funkcí neionických PAL je např. i inhibice P-glykoproteinů, čehož je s výhodou využíváno pro zlepšení absorpce léčiv a pro zacílení na konkrétní tkáň [32]. Důležitým parametrem v případě neionických surfaktantů je hodnota hydrofilně-lipofilní rovnováhy (HLB – Hydrophilic Lipophilic Balance). Hodnota HLB má vliv na velikost částic v systému, čímž nižší hodnotu HLB neionický surfaktant vykazuje, tím větší vezikuly mají tendenci vznikat [33]. Hodnota HLB neionického surfaktantu ovlivňuje i enkapsulační účinnost vezikul. Použití tenzidu s nízkým HLB zvyšuje účinnost zachycení lipofilní účinné látky [34].

Sodium cholát a sodium deoxycholát jsou typickými zástupci anionických aktivátorů hran. Mezi nejčastěji využívané neionické aktivátory řadíme sorbitany a jejich ethoxylované deriváty polysorbáty. Konkrétně se velmi často využívají sorbitan monooleát (Span® 80) a polyoxyethylen-80-sorbitan monooleát (Tween® 80), jelikož délka řetězce kyseliny olejové,

kteřá je jejich strukturální součástí, je optimální pro interkalaci mezi řetězce mastných kyselin SPC či EPC [2, 8, 14]. Struktury zmiňovaných neionických surfaktantů jsou vyobrazeny na Obr. 2 a 3.



Obr. 2. Sorbitan monooleát (Span® 80)



Obr. 3. Polyoxyethylen-80-sorbitan monooleát (Tween® 80)

Celkové množství surfaktantů použitých při přípravě transferosomů představuje důležitý faktor vzhledem k pružnosti vezikuly a minimalizaci rizika její ruptury při průchodu kožními vrstvami [29]. Optimální množství PAL použité ve formulaci závisí na hustotě sbalení použitého fosfolipidu a vzájemné interakci PAL-fosfolipid [35]. V ideálním případě by se koncentrace surfaktantu měla pohybovat v hodnotách, které nejsou schopny způsobit destrukci vezikul. Koncentrace aktivátoru hran ovlivňuje také index polydisperzity systému (PDI). Vyšší koncentrace PAL přispívá ke snížení PDI. Nízké hodnoty PDI se projevují konzistentní distribucí velikostí připravených vezikul, která je považována za důležitý faktor pro zajištění homogenní formulace. Zvýšená koncentrace PAL dále zvyšuje náboj vezikul (v případě anionických surfaktantů), což vede ke snížení míry agregace vezikul a zvýšení stability systému [2, 3, 34].

Typické koncentrace aktivátoru hran se pohybují v rozmezí 5 až 20 %. Ačkoliv zvyšování koncentrace surfaktantu obecně přispívá ke snížení velikosti vezikul, velmi vysoké koncentrace neionických tenzidů mohou podporovat vznik vezikul s větší průměrnou velikostí. Jelikož jsou penetrační schopnosti formulace úzce propojeny s velikostí samotných vezikul, použití anionického aktivátoru hran má pozitivní vliv na zvýšení schopnosti transferosomů prostupovat do hlubokých vrstev kůže vzhledem k jejich menší výsledné velikosti. Možným vysvětlením tohoto jevu je větší objem polární hlavy neionických surfaktantů a vyšší míra vmezeření anionického tenzidu do fosfolipidové dvojvrstvy vedoucí ke zvýšení poloměru zakřivení vezikuly [3].

Koncentrace aktivátoru hran má vliv i na účinnost zachycení aktivní látky. Zvýšené účinnosti enkapsulace je, ve většině případů, dosaženo s koncentrací surfaktantu nad 10 %. Naopak při příliš vysokých koncentracích se může u některých systémů účinnost zachycení snižovat. Jedním z důvodů může být přílišné narušení integrity fosfolipidové dvojvrstvy a s tím spojený vznik pórů. To může mít za následek únik vnitřní vodné fáze obsahující hydrofilní účinnou látku. Dalším rizikem vyšších koncentrací PAL je možnost tvorby smíšených micelárních agregátů, což vede k potlačení enkapsulace samotnými transferosomy, a to kvůli částečnému zachycení látky micelami PAL [3, 35, 36, 37].

### 2.1.3 Hydratační médium

Hydratační médium by mělo být voleno s ohledem na povahu celého systému. Zpravidla se využívají fosfátem pufované fyziologické roztoky s hodnotou pH 6,5–7,2. Nastavení optimální hodnoty pH je zásadní pro zajištění rovnováhy mezi vlastnostmi formulace, zamýšlenou biologickou aplikací i způsobem administrace výsledného produktu. Pro efektivní intracelulární (transcelulární) prostup látek zachycených do transferosomů je např. nutné nastavit hodnotu pH systému tak, aby účinné látky zůstaly po dobu dodávání neionizované, jelikož ionizace molekul znemožňuje jejich dodání intracelulární cestou [16, 38].

## 2.2 Mechanismus transdermální permeace transferosomů

Úspěšná penetrace a permeace transferosomů závisí na dvou základních předpokladech. Tím prvním je optimální velikost vezikul, která by neměla být vyšší než 300 nm, druhým je aplikace za neokluzivních podmínek, kdy je zachován tzv. transepidermální osmotický gradient, jenž je podstatou transportu látek skrz SC do hlubokých vrstev kůže. Gradient vzniká v důsledku rozdílné koncentrace vody mezi SC a živými vrstvami *epidermis*. Zatímco poměrně

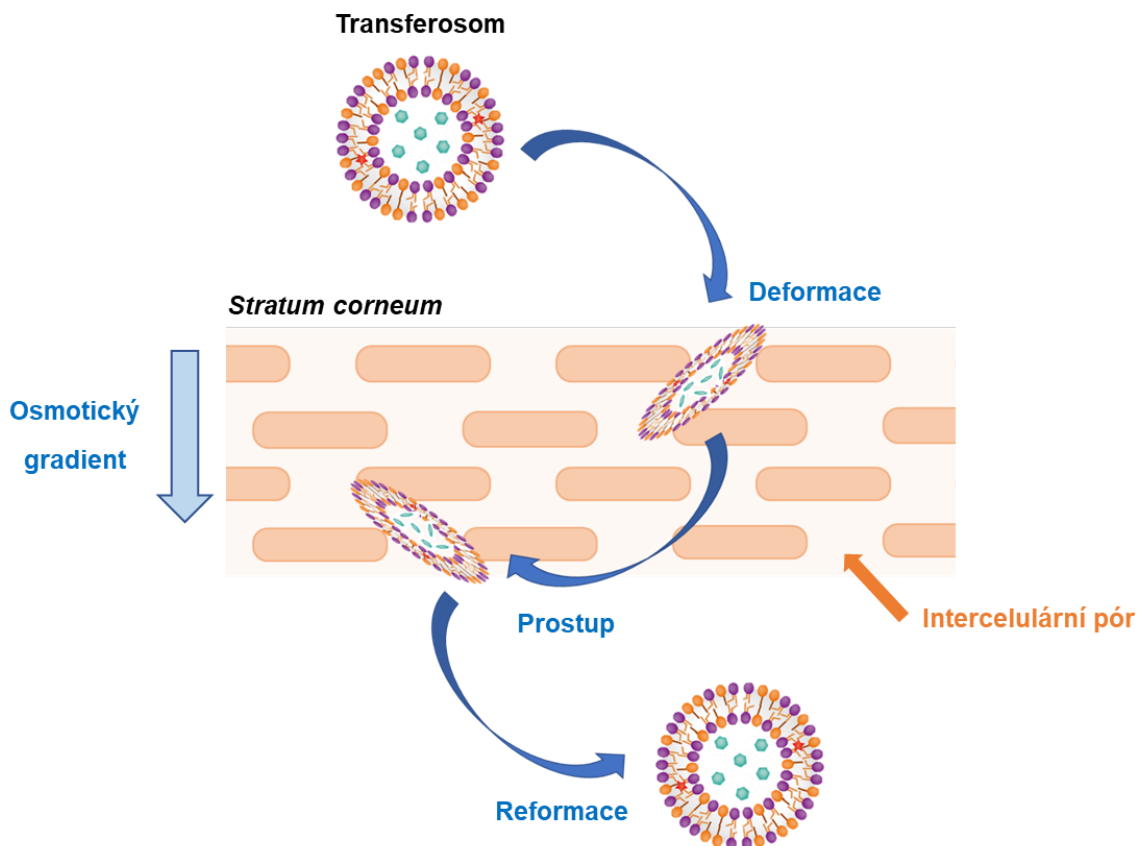
dehydratovaný kožní povrch obsahuje pouze cca 15 % vody, v případě hydratovaných živých vrstev *epidermis* je to až 75 % [2, 8, 14]. Mechanismus permeace transferosomů je tím pádem založen na hydrotaxi [39]. Jelikož u transferosomů dochází k odpařování tekutiny, pro zamezení úplné dehydratace se vezikuly deformují, penetrují skrz *SC* a putují směrem k hlubším a na vodu bohatším vrstvám *epidermis*, kde je jim umožněna opětovná rehydratace a návrat k původnímu tvaru. Rozdíl ve vodní aktivitě různých kožních vrstev je tak poměrně silnou hnací silou, která působí na kůži prostřednictvím vezikul transferosomů, jež si vynucují rozšíření intercelulárních pórů a tvorbu kanálů o šířce přibližně 20 až 30 nm. Tyto kanály umožňují přenos ultradeformovatelných vezikul napříč jednotlivými vrstvami kůže v důsledku existujícího gradientu [2, 3, 8, 14]. Schéma prostupu transferosomu skrze rohovou vrstvu *epidermis* je znázorněn na Obr. 4.

V této souvislosti hraje aktivátor hran důležitou roli, jelikož vezikule poskytuje vysoký poloměr zakřivení. To přispívá ke značné adaptabilitě membrány, která je schopna měnit tvar a ovlivnit relativní velikost vezikuly v závislosti na působení okolního mechanického stresu, aniž by docházelo k její úplné ruptuře při průchodu *SC*. Právě proto jsou transferosomy schopny prostupovat póry mnohem menšími, než je jejich vlastní průměr, což těmto nosičům umožňuje úspěšně transportovat kůži i látky s poměrně vysokou molekulovou hmotností. Tuto skutečnost dokumentuje na příkladu vitamínu B12 ( $1\,355,58\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) i studie Guillota a kol. [40].

Pronikání vezikul do kůže závisí i na vzájemné interakci lokálního složení extracelulární lipidové matrice a vezikulární dvojvrstvy, díky čemuž se vezikula sama reguluje a optimalizuje. Pro docílení těchto vlastností je nicméně nutné, aby byly základní stavební složky membrány transferosomů, tj. fosfolipidy a aktivátory hran, použity v optimálním poměru [2, 3, 8, 14].

Ačkoliv se transferosomy při prostupu kůži deformují, nedochází u nich ke zásadním změnám vnitřního zadržovaného obsahu a rozpustnost enkapsulované účinné látky by se tedy neměla nijak významně měnit, k menším únikům enkapsulovaného obsahu nicméně docházet může. V rámci studie Omara a kol. [41] bylo např. zjištěno, že během prvních hodin po podání byl u transferosomů pozorován nárazový účinek (tzv. „burst effect“), po kterém následovala fáze pomalého uvolňování. Teoretickým vysvětlením tohoto jevu může být existence drobných ruptur lipidové dvojvrstvy vzniklých při permeaci v důsledku deformace vezikul, která vede ke zrychlenému uvolňování vnitřního obsahu na počátku permeace.

Panwar a kol. [42] uvádějí, že povrchová modifikace transferosomů pomocí molekul polyethylenglykolu (PEG) přispěla k řešení tohoto problému a vedla k postupnému uvolňování léčiva z vezikul během delšího časového období.



Obr. 4. Schéma prostupu transferosomu skrze SC

### 2.3 Stabilita transferosomů

Otázka fyzikální a zejména chemické stability lipidových vezikulárních nosičů je jedním z hlavních omezení jejich praktického použití. V případě, že povrchová stabilizace částic není dostatečná, dochází k nežádoucímu shlukování, případně až ke koalescenci vezikul. Tyto projevy nestability mají za následek zvýšení heterogenity systému a únik enkapsulovaného obsahu [7]. U lipidových složek nosičů mohou probíhat také degradační reakce oxidačního či hydrolytického charakteru [43]. Ve srovnání s liposomy a niosomy jsou však transferosomy ve vodných roztocích obecně odolnější vůči projevům agregátní nestability [44]. Dle výsledků Hadidi a kol. [45] vykazovaly transferosomy s obsahem neionického Tweenu® 80 dobrou stabilitu bez známek agregace i po třech měsících skladování jak

při 4 °C, tak 25 °C, zatímco u niosomů a liposomů byly za stejných podmínek pozorovány výrazné projevy agregátní nestability [46].

### 2.3.1 Fyzikální stabilita

Fyzikální stabilita vezikul je dána konkrétním složení formulace. Při volbě vhodných fosfolipidů řadíme mezi důležité faktory hodnotu  $T_c$  fosfolipidu, která souvisí s délkou a stupněm nenasycenosti mastných kyselin přítomných ve struktuře, a dále velikost, polaritu a případný náboj hydrofilních funkčních skupin vázaných na fosfátovou skupinu.

Dostatečně vysoký povrchový náboj významně přispívá k eliminaci agregátní nestability vezikul, proto je vhodné využívat pro formulace lipidových nosičů zejména glycerofosfolipidy s kladně či záporně nabitými funkčními skupinami – PC a PS [6]. Snížení iontové síly prostředí vede k dalšímu zvýšení elektrokinetické stabilizace, jelikož jsou tak podpořeny repulzivní elektrostatické interakce mezi souhlasně nabitými částicemi [47].

Další možností, jak zvýšit stabilitu částic, je kombinace elektrostatické stabilizace se stabilizací stérickou, které lze docílit dodatečnou modifikací povrchu, např. již zmíněnými molekulami PEG, jež díky svým dlouhým, objemným řetězcům, udržují vezikuly v dostatečné vzdálenosti. Proto je s výhodou pro formulace transferosomů využíván Tween® 80. Další možností je využití fosfolipidů s roubovanými řetězci PEG [27, 42, 48].

### 2.3.2 Chemická stabilita

Chemická nestabilita transferosomů představuje jeden z jejich hlavních nedostatků a týká se především jejich fosfolipidové membrány. Esterové vazby ve struktuře fosfolipidů mohou být ve vodném prostředí hydrolyzovány a v případě fosfolipidů, jež ve své struktuře obsahují nenasycené acylové řetězce, může docházet k jejich oxidační degradaci.

Oxidační namáhání fosfolipidů vychází z obecných principů radikálové lipoperoxidace a probíhá radikálovým mechanismem ve třech dílčích fázích – iniciace, propagace a terminace. V nenasycených acylových řetězcích lipidů vykazují vodíkové atomy na methylenových skupinách allylového, resp. diallylového uspořádání (vodíkové atomy bezprostředně sousedící s dvojnými vazbami), nízkou energii vazby uhlík-vodík. V důsledku iniciační fáze lipoperoxidace, způsobené nejčastěji světelným zářením či stopovým množstvím prooxidačních iontů kovů, dochází k relativně snadnému odštěpení vodíkového radikálu právě z methylenových skupin nenasycených řetězců za vzniku volných radikálových forem výchozích

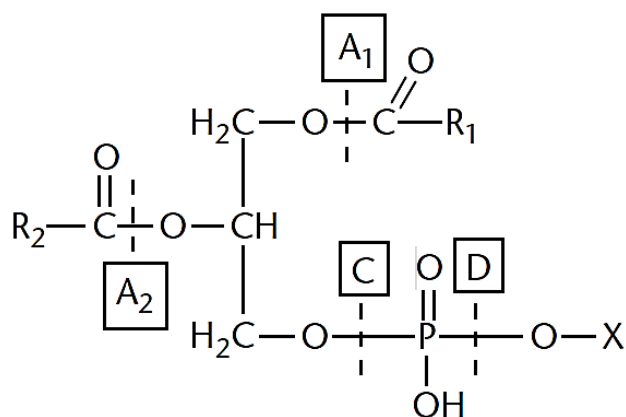
fosfolipidů. Tyto volné radikály pak reagují s molekulárním kyslíkem a iniciují vznik peroxylového radikálu. V rámci propagační fáze peroxylové radikály reagují s dalšími molekulami fosfolipidů za vzniku primárních oxidačních produktů – hydroperoxidů. Oxidační pochody v konečném důsledku vedou ke vzniku těkavých, senzoricke aktivních sekundárních oxidačních produktů, jež výrazně snižují kvalitu a stabilitu systému [49].

Na oxidační stabilitu lipidických vezikul má vliv i metoda použitá pro jejich přípravu, jelikož ta ovlivňuje charakteristiky vzniklých útvarů, zejména jejich velikost a lamelaritu. Multilamelární vezikuly vykazují obecně odlišnou kinetiku oxidačních pochodů než vezikuly unilamelární, a to díky rozdílné míře přístupnosti fosfolipidových vrstev k oxidantům přítomným ve vodné fázi. V případě liposomálních systémů bylo např. zjištěno, že malé unilamelární vezikuly podléhají oxidaci snadněji než velké unilamelární vezikuly. Vyšší tendence malých unilamelárních vezikul podléhat oxidační degradaci je přikládána většímu poloměru zakřivení vezikul a volněji uspořádaným polárním doménám molekul fosfolipidů, což umožňuje větší průnik ve vodě rozpustných radikálů a následnou oxidaci [49].

Oxidaci transferosomů lze výrazně snížit, pokud je vodné prostředí odplyněno a pročištěno inertními plyny, jako jsou např. dusík či argon. Ke zlepšení oxidační stability je vhodné formulace skladovat za nízkých teplot, chránit je před světlem nebo zvážit využití dalších anti-oxidačních přísad či látek schopných vytvářet s ionty kovů komplexy. Popřípadě je možné využít doplňkových operací, prostřednictvím kterých jsou upraveny již připravené vezikuly, jedná se např. o lyofilizaci nebo sprejové sušení [2, 18].

Hydrolytická degradace fosfolipidů probíhá jak na úrovni karboxylových, tak fosfátových esterů. Esterové vazby karboxylových kyselin podléhají hydrolýze zpravidla rychleji a dávají tak vzniknout volným mastným kyselinám a lysofosfolipidům, u nichž mohou probíhat další hydrolytické reakce. V případě, že dochází i k hydrolýze fosfátového esteru, je výsledným produktem degradace kyselina glycerofosforečná [50, 51].

Hydrolytický rozklad fosfolipidů může být způsoben i enzymatickou aktivitou fosfolipáz. Tyto hydrolytické enzymy štěpí esterové vazby fosfolipidů v konkrétních polohách a jsou tak rozlišovány čtyři základní typy – fosfolipázy A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, C a D (Obr. 5). Fosfolipáza A<sub>1</sub> hydrolyzuje esterovou vazbu v poloze *sn-1*, fosfolipáza A<sub>2</sub> poté v poloze *sn-2*. Fosfolipáza C hydrolyzuje esterovou vazbu v poloze *sn-3* za vzniku diacylglycerolu a fosforylované báze (např. fosfocholinu). Fosfolipáza D štěpí esterovou vazbu mezi kyselinou fosfatidovou a polárním substituentem, jenž byl navázán na fosfát (např. cholin) [50].



Obr. 5. Polohy působení jednotlivých typů fosfolipáz [50]

## 2.4 Metody přípravy transferosomů

### 2.4.1 Metoda hydratace tenkého lipidového filmu

V laboratorním měřítku se jedná o pravděpodobně nejčastěji využívanou metodu přípravy transferosomů. Fosfolipidy jsou společně s aktivátorem hran (surfaktantem) nejprve rozpuštěny ve směsi těkavých organických rozpouštědel (např. chloroform a methanol ve vhodném poměru) v baňce s kulatým dnem. V tomto kroku mohou být do formulace zakomponovány lipofilní aktivní látky. Vytvoření tenkého lipidového filmu na vnitřní stěně baňky je založeno na odpaření organických rozpouštědel za sníženého tlaku pomocí rotační vakuové odparky, kdy je systém temperován na vhodnou teplotu. Proces by měl být obecně prováděn při teplotách nad  $T_c$  použitých lipidů po dostatečně dlouhou dobu. Vytvořená tenká vrstva suchého lipidového filmu se poté opětovně hydratuje při konkrétní teplotě pomocí roztoku pufru o definované hodnotě pH, do kterého může být eventuálně přimíchána hydrofilní aktivní látka. Výsledkem hydratace je botnání vezikul a vznik primární disperze transferosomů [2, 52].

Pro dosažení požadované velikosti připravených vezikul a pro snížení PDI je nutné přistoupit k dalším doplňkovým metodám, které následují po hydrataci lipidového filmu. Jedná se např. o ultrazvukovou sonikaci či extruzní protlačování přes polykarbonátové membrány s definovanou velikostí pórů. Výsledné vezikuly transferosomů dosahují typické velikosti v rozmezí 100 až 200 nm [2, 52, 53].

Za předpokladu dodržení vhodného poměru mezi základními složkami formulace je hlavní výhodou této techniky vysoká enkapsulační účinnost a relativně vysoký výtěžek připrave-



ných vezikul [3]. Technika má však svá omezení, mezi která patří především relativně obtížná škálovatelnost (tj. převod do průmyslového měřítka), jež souvisí zejména se skutečností, že velikost částic formulace je velmi závislá na objemové kapacitě výrobního zařízení a na energii dodané pro tvorbu vezikul v průběhu procesu jejich přípravy. Dalším potenciálním problémem je úplné odstranění zbytků organických rozpouštědel a nucený kontakt aktivních látek s rozpouštědly vedoucí k jejich případné deaktivaci [54].

#### 2.4.2 Metoda ručního protřepávání

Metoda ručního protřepávání je zjednodušenou analogií k metodě hydratace tenkého filmu. Organické rozpouštědlo se neodstraňuje pomocí rotační vakuové odparky, ale pouhým ručním protřepáváním, kdy je baňka s kulatým dnem v mezechase ponechávána ve vodní lázni udržované při zvýšené teplotě. Na povrchu její vnitřní stěny se postupně vytváří tenký lipidový film, který je v další fázi opětovně hydratován vhodným pufrem za mírného třepání při teplotě vyšší než  $T_c$  lipidů [2, 55].

#### 2.4.3 Metoda přímé sonikace

V případě metody přímé sonikace jsou fosfolipidy společně se surfaktantem a účinnými látkami rozmíchány ve fosfátovém pufru. Tato směs je následně homogenizována pomocí vortexu až do vzniku mléčné primární disperze, která je v následujícím kroku podrobena sonikaci [56, 57]. Ačkoliv může být metoda přímé sonikace využita k přípravě samotných transferosomálních vezikul, zpravidla se jedná o doplňkovou metodu, jejímž cílem je získání systému o nižší velikosti částic a s nižší hodnotou PDI. Hlavní nevýhodou metody je však problematická průmyslová škálovatelnost popisovaného postupu vzhledem k zabezpečení dostatečného sonikačního účinku ve velkoobjemovém měřítku [3].

#### 2.4.4 Metoda vstřikování z ethanolu

Metoda spočívá v přípravě ethanolickeho roztoku fosfolipidů, aktivátorů hran a lipofilních aktivních složek a jeho následovném vstřikování do vodné fáze za stálého míchání. Oba roztoky jsou před samotným vstřikováním zpravidla zahřáty na teplotu 45 až 50 °C. Vstřikování ethanolickeho roztoku lipidové fáze do pufru vede ke precipitaci molekul lipidů, vytváří se tak dvouvrstvé planární fragmenty, z nichž mohou dále vznikat samostatné lipidové vezikuly. Výhodou metody je použití ethanolu jako poměrně netoxického rozpouštědla. Metodu lze navíc snadno škálovat pouhým zvětšením objemu reakčních nádob. Vzniklé vezikuly jsou pak obvykle stabilní, s poměrně vysokou mírou zachycení aktivních složek,

ale značně heterogenní. Dalším problémem je velké zředění připravené disperze vezikul, která vyžaduje odstranění veškerého alkoholu. To je poměrně obtížné, jelikož ethanol společně s vodou vytváří azeotropní směs [58]. Velikost částic lze optimalizovat především úpravou samotné formulace transferosomů (zejména změnou koncentrace PAL), ale rovněž změnou technologických parametrů procesu, např. úpravou průměru vstřikovací trysky, tlaku vstřikování a rychlosti průtoku vodné fáze [34, 53, 59].

#### 2.4.5 Extruzní a homogenizační metody

Při extruzních technikách jsou primární disperze místo sonikace protlačovány pod tlakem membránami o různé definované velikosti pórů. Případně mohou být disperze nejprve vystaveny konstantním změnám tlaků tak, aby došlo k rozpadu multilamelárních vezikul. Při prostupu vezikul póry membrány dochází k jejich mechanickému narušení, které vede ke vzniku zmenšených unilamelárních transferosomů. Postup je méně agresivní než sonikace a umožňuje vysokou reprodukovatelnost, jedná se nicméně o poměrně finančně nevýhodný postup, jelikož je časově a materiálově náročný [53]. V případě vysokotlaké homogenizace je po smíchání všech výchozích složek kapalná směs vystavena přerušovaným ultrazvukovým vlnám a následně podrobena homogenizaci ve vysokotlakém homogenizátoru [60].

#### 2.4.6 Metoda odpařování reverzní fáze

Principem metody odpařování reverzní fáze je tvorba reverzních micel fosfolipidů. Konvenčně připravený film je solubilizován v organické fázi tvořené isopropyletherem, diethyletherem či jejich směsí. Do organické fáze je poté přidán i roztok pufru potenciálně obsahující hydrofilní aktivní látku, čímž dochází ke vzniku dvoufázového systému. Systém je v dalším kroku podroben homogenizaci prostřednictvím sonikace, přičemž při procesu dochází ke tvorbě reverzních micel. Vzniká tak v podstatě homogenní emulze typu voda v oleji. Organické rozpouštědlo je poté postupně odpařováno na vakuové odparce, což iniciuje přeměnu inverzních micel na viskózní gel. Kritickým momentem procesu je zhroucení gelu za současného narušení struktury inverzních micel, systém se tak přeměňuje na vezikulární suspenzi samotných transferosomů. Velkou předností této metody je dosažení velmi vysoké účinnosti enkapsulace [61, 62, 63].

### 3 AKTIVNÍ LÁTKY S ANTIOXIDAČNÍM ÚČINKEM

Antioxidanty jsou látky schopné snižovat aktivitu různých forem volných radikálů a přispívat tak k omezení či úplnému potlačení procesu oxidace. Volné radikály představují vysoce reaktivní, nestabilní částice s nepárovým počtem elektronů a jejich tvorba ve formě tzv. reaktivních forem kyslíku (Reactive Oxygen Species, ROS) je nedílnou součástí aerobního metabolismu. Ačkoliv je lidský organismus vybaven řadou ochranných mechanismů, jež se podílejí na udržení rovnováhy mezi působením ROS a endogenní antioxidační ochranou, nárůst oxidačního stresu může být iniciován řadou vnitřních a vnějších faktorů. Ultrafialové (UV) záření je jednou z hlavních příčin vnějšího stárnutí, jelikož iniciuje vznik ROS přímo v kůži. V důsledku jejich nadbytku dochází k deregulaci buněčných procesů, k oxidačnímu poškození proteinů, nukleových kyselin a lipoperoxidaci [64].

Inkorporace antioxidantů do topických přípravků je jedna z možných cest, jak potlačit negativní dopad oxidačního stresu na kůži. Vzhledem k současným trendům jsou předmětem dnešních výzkumných záměrů zejména přírodní antioxidanty získávané z rostlinných extraktů, např. fenolické kyseliny, flavanoidy, stlibeny, kumaríny, lingany, taniny a karotenoidy [64, 65].

#### 3.1 Karotenoidy

Karotenoidy představují početnou skupinu organických lipofilních látek spadajících do skupiny tetraterpenoidů – oligomerů isoprenu skládajících se konkrétně z osmi isoprenových jednotek, a tedy ze 40 atomů uhlíku. Základní polyenový alifatický řetězec může být zakončen jedním nebo dvěma pěti-, resp. šestičlennými cykly. Díky přítomnosti systému konjugovaných dvojných vazeb jsou karotenoidy schopny pohlcovat světelné záření, jedná se tedy o barevné sloučeniny typicky žlutých, oranžových nebo červených odstínů. Dvojně vazby ve struktuře základního řetězce dále umožňují geometrickou isomerii. Vzhledem ke skutečnosti, že *cis*-izomery jsou z termodynamického hlediska méně výhodné, většina přírodních karotenoidů se vyskytuje ve formě *trans*-isomerů [66, 67].

Nenasycený terpenický řetězec karotenoidů přispívá k vysoké antioxidační kapacitě těchto barviv, jelikož poskytuje elektrony, které mohou vstupovat do reakcí s volnými radikály a přeměňovat je na méně reaktivní, stabilnější produkty, čímž dochází k potlačení dalších radikálových řetězových reakcí [68].

Karotenoidy jsou přirozeně produkovány buňkami fotosyntetizujících rostlin, řas, ale i vybraných bakterií a hub, v nichž zastávají funkci pomocných fotosyntetických barviv (slouží jako doprovodné sběrače fotonů světelného záření). V rostlinných buňkách jsou nejčastěji shromažďovány do tzv. chromoplastů – fotosynteticky neaktivních plastidů, mohou se však nacházet i na vnitřní membráně samotných chloroplastů a na membráně thylakoidů. Karotenoidy se prostřednictvím potravy dostávají i do těl živočichů, kde se mohou akumulovat v tukových tkáních [67, 69].

Karotenoidy je možné rozlišovat na dvě základní skupiny – karoteny a xantofyly. Hlavním klasifikačním kritériem je přítomnost molekul kyslíku, xantofyly jsou na rozdíl od karotenů kyslíkatými sloučeninami. Pravděpodobně nejznámějším zástupcem karotenů je  $\beta$ -karoten, který je významným prekurzorem vitamínu A. Mezi typické xantofyly řadíme např. lutein, zeaxantin, kantaxanthin, kryptoxanthin nebo ASTX [67, 69].

### 3.1.1 Astaxanthin

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- $\beta,\beta'$ -karoten-4,4'-dion) je přírodní karotenoidní barvivo spadající do skupiny kyslíkatých xantofylů. Jedná se o temně červenou pevnou látku, jež je velmi dobře rozpustná v tucích – hodnota rozdělovacího koeficientu oktanol/voda Log P dosahuje hodnoty 13,27. Molekulová hmotnost ASTX je  $596,85 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  [70, 71].

Molekula ASTX (Obr. 6) obsahuje dva asymetrické atomy uhlíků v pozicích 3 a 3'. Právě díky přítomnosti dvou chirálních center může ASTX kromě geometrických isomerů vytvářet i tři konfigurační isomery, dva enantiomery 3R, 3'R a 3S, 3'S a jeden mesoisomer 3R, 3'S. V přírodě se ASTX vyskytuje nejčastěji ve formě enantiomerů 3S, 3'S nebo 3R, 3'R, přičemž prvně zmíněný vykazuje také nejvyšší antioxidační kapacitu [68, 72].

Přítomnost hydroxylových funkčních skupin umožňuje molekule ASTX vstupovat do esterifikačních reakcí. Kromě formy volné se tak ASTX vyskytuje častěji právě ve formě mono- či diesterů mastných kyselin, které jsou oproti volné formě méně citlivé vůči působení oxidace [72, 73, 74]. Dle závěrů Yanga a kol. [75] stabilita ASTX roste se zvyšujícím se stupněm esterifikace a s rostoucí délkou a nasyceností řetězce vázané mastné kyseliny, tyto modifikace však mají negativní dopad na biodostupnost molekuly, která je nejvyšší u neesterifikované formy. Astaxanthin může dále vytvářet chemické komplexy s proteiny a lipoproteiny [76].



Pro průmyslové aplikace je ASTX získáván především biotechnologickou produkcí založenou nejčastěji na kultivaci *Hematococcus pluvialis*, jež je schopna akumulovat ASTX ve vysokých množstvích a je obecně považována za bezpečný zdroj tohoto karotenoidu pro člověka [76, 80]. Takto syntetizovaný ASTX je tvořen 3S, 3'S isomerem a přibližně 70 % se nachází ve formě monoesteru, 25 % ve formě diesteru a zbývajících 5 % je tvořeno volnou formou [75, 81]. Synteticky připravený ASTX se skládá ze směsi všech tří isomerů 3S, 3'S; 3R, 3'R v poměru 1 : 2 : 1, nicméně ve srovnání s přírodními variantami je jeho antioxidační aktivita 20 až 50krát nižší [72, 82].

Astaxanthin je schopen vstupovat do signálních drah zánětu, oxidačního stresu a apoptózy eliminací ROS vznikajících při těchto procesech [83, 84]. Zvýšená produkce ROS stimuluje syntézu proteolytických enzymů z řad matricových metaloproteináz (MMP). Tyto vápník dependentní, zinek obsahující endopeptidázy se podílejí na procesech remodelace tkání a způsobují degradaci extracelulární matrice. Dle závěrů Suganuma a kol. [85] ASTX tlumí UVA-indukovanou up-regulaci kolagenázy a elastázy u lidských dermálních fibroblastů.

Iniciace buněčného antioxidačního obranného systému molekulou ASTX spočívá v modulaci signální dráhy řízené komplexem transkripčního faktoru Nrf2 a jeho represoru Keap1. Za běžných podmínek je většina molekul Nrf2 faktoru v cytoplazmě vázána k molekulám represivního proteinu Keap1. Oxidační stres snižuje míru represe faktoru Nrf2 alternací specifických, na cystein bohatých domén Keap1. To vede k translokaci Nrf2 faktoru do jádra, kde zvyšuje expresi cytoprotektivních genů kódujících endogenní antioxidační enzymy a indukuje tak jejich produkci [86, 87]. Mezi tyto enzymy patří např. superoxid dismutáza, kataláza či peroxiredoxin [88]. Astaxanthin se podílí na zvýšení exprese faktoru Nrf2 a zároveň snižuje expresi proteinu Keap1, dále pak inhibuje uvolňování prozánětlivých interleukinů a jaderného faktoru NF-κB [89].

V posledních letech se zájem o ASTX v kosmetických a dermatologických aplikacích zvýšil nejen díky jeho silným antioxidačním vlastnostem, ale taktéž pozitivním účinkům na stav kůže a protektivním vlastnostem vůči UV záření [90, 91]. V rámci studie Yamashita a kol. [92] byly skupině 49 žen ve věku 45 až 50 let podávány denně 4 mg ASTX po dobu šesti týdnů. U více než 50 % žen došlo ke zvýšení míry hydratace a elasticity kůže. Topickými účinky ASTX se zabývali Tominaga a kol. [93]. Jejich studie provedená na 30 ženách po dobu osmi týdnů spočívala v kombinaci denní perorální suplementace 6 mg ASTX a denní topické aplikaci 2 ml jeho 78,9 μM roztoku. Na konci experimentu bylo pozorováno

snížení hloubky vrásek a velikosti pigmentových skvrn, dále došlo ke zlepšení textury pleti a nárůstu její elasticity.

Astaxanthin zabraňuje akumulaci volných radikálů, čímž působí preventivně ve vztahu k poškození DNA. Ve své studii Lyons a O'Brien [94] uvedli, že syntetický ASTX brání UVA-indukovanému poškození DNA lidských melanocytů a střevních Caco-2 buněk. Vlastnosti ASTX byly rovněž zkoumány v řadě *in vitro* i *in vivo* studií s cílem zhodnotit jeho možné využití ve tkáňovém inženýrství a v systémech pro hojení ran. Například Veeruraj a kol. [95] hodnotili *in vivo* účinnost kolagenových filmů s obsahem ASTX – filmy významně zlepšovaly a urychlovaly proces hojení oproti kontrolním vzorkům o více než 50 %

Stabilita ASTX je ovlivněna podmínkami při jeho skladování. Vzhledem k vysoce nenasyčené povaze vede dlouhodobé působení vzdušného kyslíku, světelného záření a zvýšené teploty k jeho postupné degradaci a ke ztrátě antioxidační aktivity. Astaxanthin je tak z těchto důvodů vhodné uchovávat v tmavých nádobách pod ochrannou atmosférou a při nízkých teplotách [96].

## 4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Ačkoliv od prvního použití pojmu „transferosom“ uplynulo již třicet let, může být tento nanovezikulární systém i dnes považován za relativně nový, jelikož množství transferosomálních formulací uvedených do klinické praxe je stále poměrně omezené. Vývoj v této oblasti nicméně neustále pokračuje, a proto je možné předpokládat, že v následujících letech dojde ke komercializaci dalších systémů využívající transferosomální nosiče [3].

V rámci farmaceutického výzkumu byly transferosomy využity pro enkapsulaci široké řady farmaceuticky aktivních látek s cílem nejen charakterizovat připravené vezikuly z hlediska velikosti a stability, enkapsulační účinnosti a biologických vlastností, ale především zlepšit dostupnost těchto látek pro organismus. Velmi často je v odborných publikacích diskutován typ a koncentrace použitého aktivátoru hran, které výrazně ovlivňují vlastnosti výsledných vezikul.

Ahad a kol. [97] využili nanotransferosomy pro enkapsulaci antihypertenziva – mesylátové soli eprostanu. Připravené vezikuly s 25% zastoupením anionického sodium deoxycholátu o průměrné velikosti  $108,53 \pm 0,06$  nm dosahovaly enkapsulační účinnosti  $63,00 \pm 2,76$  % a umožňovaly zlepšení transdermálního toku farmaka – koeficient zesílení prostupu dosahoval ve srovnání s konvenčními liposomy hodnoty 16,80. Ultradeformovatelné vezikuly byly studovány také ve vztahu k topickému dodávání tretioninu – kyseliny *all-trans*-retinové, jež je využívána pro léčbu středně těžkých forem *acne vulgaris*. Výsledkem studie publikované Ascensem a kol. [98] bylo doporučení použít tyto ultradeformovatelné vezikuly jako vhodné nosiče tretioninu se schopností snižovat jeho iritační potenciál.

V odborné literatuře jsou dokumentovány i kombinované systémy na bázi transferosomů s obsahem bioaktivních alkaloidů, konkrétně paklitaxelu, jež byly připraveny v rámci výzkumu provedeného Jiangem a kol. [17]. Studie se zaměřila na lokální chemoterapii kožních melanomů pomocí oligopeptidových hydrogelů s transferosomy paklitaxelu. Transferosomy byly dále využity pro enkapsulaci antipsychotik (risperidon) [99], nesteroidních protizánětlivých léků (diclofenac) [46], antibiotik (vankomycin-hydrochlorid) [100], blokátorů kalciových kanálů (cilnidipin) [101] nebo betablokátorů (carvedilol) [102].

Transferosomy mohou plnit roli nosičů pro zvýšení stability, biodostupnosti a efektivity látek nacházejících své uplatnění v kosmetických přípravcích. Obecně jsou často předmětem enkapsulace fenolické látky s antioxidačním potenciálem. V roce 2017 Avadhani a kol. [103] připravili transferosomy obsahující polyfenolický epigalokatechin-3-gallát a kyselinu



hyaluronovou pomocí modifikované metody hydratace tenkého filmu v kombinaci s vysokotlakou homogenizací. Optimalizované vezikuly efektivně snižovaly proces lipoperoxidace v buněčné linii typu HaCaT. Manca a kol. [104] využili modifikované hyalo-transferosomy pro přípravu vezikul obsahující fytokomplexy extrahované ze semen a stonků červené vinné révy (*Vitis vinifera*). Podobnou tematikou se zabývali rovněž Pandit a kol. [105], kteří do transferosomů enkapsulovali rostlinný fytoestrogen – quercetin. Vezikuly byly po přípravě zakomponovány do chitosanových filmů a v rámci *ex vivo* stanovení na krysích kožních štěpech bylo dosaženo téměř 90% transdermálního prostupu. V další zajímavé studii vedly transferosomy s katechinem ke zvýšení permeability tohoto flavanolu o 85 % a byly schopny *in vivo* potlačovat aktivitu enzymu tyrozinázy a bránit tak UV-indukované pigmentaci [106].

Výše uvedené stručné shrnutí jen potvrzuje, že transferosomy jsou slibnými nosiči s širokým aplikačním potenciálem.

## 5 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo vypracování literární rešerše zabývající se složením, vlastnostmi a metodami přípravy transferosomů. Práce se blíže zaměřuje na stavební složky těchto systémů, popisuje proces transdermální permeace transferosomů a rovněž zmiňuje současný stav poznání a konkrétní výzkumné aplikace. Teoretická část se dále věnuje látkám s antioxidačním účinkem, pozornost je věnována karotenoidům a podrobněji se zaměřuje na charakterizaci ASTX, jakožto látky vhodné pro enkapsulaci do transferosomů.

V rámci experimentální části práce bylo cílem připravit transferosomy s obsahem ASTX s různým složením membrány a s využitím optimalizovaných postupů tyto systémy charakterizovat z hlediska velikosti a morfologie vezikul, polydisperzity, účinnosti enkapsulace, antioxidačních vlastností a *in vitro* cytotoxicity.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 6 POUŽITÉ MATERIÁLY

### 6.1 Přístrojové vybavení a pracovní pomůcky

- Analytické váhy (Sartorius)
- Vakuová rotační odparka Hei-VAP (Heidolph)
- Sonikátor UP400St (Hielscher)
- Analyzátor velikosti částic Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern)
- Sonikační vana K-10LE (Kraintek)
- Stolní centrifuga EBA 20 (Hettich)
- Spektrofotometr V-750 (Jasco)
- Automatické pipety (Eppendorf)
- Sestava vysokoúčinné kapalinové chromatografie 600E (Waters)
- Detektor UV200 (Watrex)
- pH metr inoLab pH 7110 (WTW)
- Elektroda HC 103 (Theta 90)
- Konfokální mikroskop Fluoview FV3000 (Olympus)
- Elektronový mikroskop JEM-2100F (Jeol)
- Flow box (Alpina)
- Multidetekční reader Infinite 200 PRO (Tecan)
- Aparatura generující doutnavý výboj (Pelco)
- Měděné sítky (300 mesh) s formavarovou vrstvou (Electron Microscopy Sciences)
- Plastové zkumavky a mikrozukavky s víčkem
- Plastové kyvety s optickou dráhou 1 cm
- Kyvety pro měření elektrokinetického potenciálu (Malvern)
- Injekční stříkačky a jehly
- Stříkačkové filtry s membránou 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore)
- Běžné laboratorní sklo

## 6.2 Chemikálie a roztoky

- Sójový L- $\alpha$ -fosfatidylcholin 95% (SPC) (Avanti polar lipids)
- 1,2-oleoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin (DOPC) (Avanti polar lipids)
- Cholesterol (z ovčí vlny) 98% (CH) (Avanti polar lipids)
- Polyoxyethylen-80-sorbitan monooleát – Tween® 80 (TW) (Carl Roth)
- Sorbitan monooleát – Span® 80 (SP) (Sigma)
- Astaxanthin  $\geq 97\%$  z *Blakeslea trispora* (Sigma Aldrich)
- Fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS) (BioSera)
- DMEM médium (BioSera)
- Demineralizovaná voda z laboratorního zdroje
- Chloroform (VWR)
- Methanol (VWR)
- Methanol  $\geq 99,5\%$  (Sigma Aldrich)
- Ethanol 96% (Penta)
- Diethylether (Penta)
- Aceton (Penta)
- Petrolether (Penta)
- Dimethylsulfoxid  $\geq 99\%$  (DMSO) (VWR)
- 2,2-difenyyl-1-pikryl hydrazyl (DPPH) (Sigma Aldrich)
- 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-difenyyl-2H-tetrazoliumbromid (MTT) (Sigma Aldrich)
- MTT cell proliferation assay kit (Duchefa Biochemie)

## 6.3 Buněčné linie

- Myší embryonální fibroblasty ATCC-CRL-1658 NIH/3T3

## 7 METODIKA

### 7.1 Příprava transferosomů

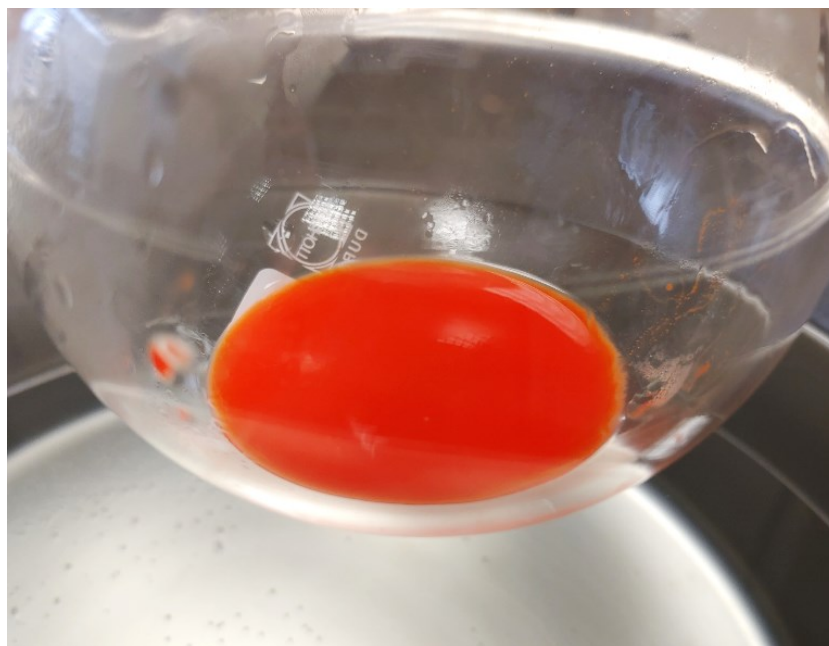
Disperze transferosomů byly nejprve připraveny bez obsahu ASTX metodou hydratace tenkého filmu. Za výchozí lipid byl zvolen SPC, který byl kombinován se dvěma typy neionických aktivátorů hran – Spanem® 80 (SP), resp. Tweenem® 80 (TW) ve fixním poměru fosfolipid : aktivátor (90 : 10, w/w). Celkové množství membránotvorných složek bylo nastaveno na 500 mg (450 mg fosfolipid, 50 mg surfaktant). Fosfolipid byl společně s konkrétním surfaktantem rozpuštěn v 10 ml organické fáze tvořené směsí chloroformu a methanolu v poměru 7 : 3, v/v. Po převedení směsi do baňky s kulatým dnem byla pomocná rozpouštědla odpařena na rotační vakuové odparce (Heidolph) při 40 °C a 100 rpm po dobu 40 min za vzniku tenkého filmu, jenž byl v dalším kroku za stejných výchozích podmínek hydratován 10 ml PBS o hodnotě pH 7,4 (Biosera). Připravené primární disperze byly sonikovány pomocí ultrazvukového sonikátoru UP400St (Hielscher) po dobu 120 s (80% amplituda, cyklování 50 : 50) za kontinuálního chlazení v ledové lázni.

Po úspěšné zkušební přípravě transferosomů bez obsahu ASTX bylo přistoupeno k samotné enkapsulaci ASTX, jež spočívala v nadávkování 4 mg ASTX rozpuštěného v chloroformu (2 ml roztoku o koncentraci 2 mg·ml<sup>-1</sup>) do organické fáze při zachování výchozích poměrů lipid : surfaktant a podmínek přípravy. Koncentrace ASTX v transferosomální disperzi tak byla nastavena na 0,4 mg·ml<sup>-1</sup>. Postup přípravy je dokumentován na Obr. 7 a 8.

Jako alternativa k metodě hydratace lipidového filmu byla zvolena metoda odpařování reverzní fáze. Připravené filmy (SPC : TW = 90 : 10, w/w) byly rozpuštěny v 10 ml diethyletheru a smíchány s 10 ml PBS za vzniku dvoufázového systému, který byl následně sonikován 120 s (80% amplituda, cyklování 50 : 50) za vzniku obrácené emulze. Převedení systému na vezikulární disperzi bylo provedeno odpařením diethyletheru (40 °C, 100 rpm, 20 min) na vakuové rotační odparce (Heidolph).



*Obr. 7. Odpaření organické fáze a tvorba tenkého filmu*



*Obr. 8. Hydratovaná primární disperze transferosomů s obsahem ASTX*

Pro zhodnocení vlivu koncentrace aktivátoru hran, resp. poměru lipid : aktivátor byly dále připraveny formulace s dvěma dalšími poměry SPC : TW (95 : 5 a 85 : 15, w/w), přičemž metodika jejich přípravy byla totožná s výše uvedenými postupy.

Na základě zkušeností z přípravy těchto nosičů bylo na závěr připraveno celkem šest finálních formulací transferosomů se shodnou koncentrací ASTX ( $0,4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a s využitím

třech různých systémů lipidů (SPC, DOPC a směs SPC s CH v poměru 5 : 1, w/w) v kombinaci se SP či TW, vždy ve fixním poměru 90 : 10, w/w. Příslušná množství jednotlivých složek pro přípravu 5 ml transferosomálních disperzí jsou uvedena v Tab. 2.

Všech šest formulací bylo připraveno metodou hydratace filmu za optimalizovaných podmínek – 250 mg membránotvorných komponent bylo rozpuštěno v 15 ml směsi chloroform : methanol (7 : 3, v/v) společně s 1 ml roztoku ASTX (2 mg·ml<sup>-1</sup>). Směs byla odpařována 40 min při 45 °C a 100 rpm. Vzniklý suchý film byl kondicionován pod vakuem další hodinu (pro dodatečné vytěkání organické fáze) a následně hydratován 5 ml PBS při dodržení výchozích podmínek. Velikost vezikul primárních disperzí byla snížena sonikací na ultrazvukovém sonikátoru (Hielscher) po dobu 120 s (80% amplituda, cyklování 50 : 50). Připravené formulace byly chráněny před světlem a skladovány v chladničce při 4 °C.

Tab. 2. Navážky ingrediencí pro přípravu 5 ml transferosomálních disperzí

Formulace	SPC [mg]	DOPC [mg]	CH [mg]	TW [mg]	SP [mg]
TF1 (SPC-TW)	225	–	–	25	–
TF2 (SPC-SP)	225	–	–	–	25
TF3 (DOPC-TW)	–	225	–	25	–
TF4 (DOPC-SP)	–	225	–	–	25
TF5 (SPC/CH-TW)	187,5	–	37,5	25	–
TF6 (SPC/CH-SP)	187,5	–	37,5	–	25



## 7.2 Stanovení distribuce velikostí a elektrokinetického potenciálu

Stanovení velikosti částic submikronových disperzí je zpravidla založeno na metodě dynamického rozptylu světla (DLS – Dynamic Light Scattering), jež vychází z měření Brownova pohybu, resp. měření kolísání intenzity rozptýleného světelného záření laserového zdroje okolo její průměrné hodnoty v roztoku analytu. Fluktuace intenzity je spojena s interferenčním zeslabováním a zesilováním záření, ke kterému dochází na nestacionárních částicích disperze v důsledku právě Brownova pohybu. Změna intenzity záření je úměrná Brownovu pohybu a závisí tedy přímo na velikosti částic – čím jsou částice menší, tím intenzivněji se pohybují a tím rychleji se mění i intenzita rozptýleného světla. Velikost Brownova pohybu je kvantifikována prostřednictvím translačního difúzního koeficientu  $D$ .

Fluktuace intenzity záření laseru je snímána fotodetektorem pod úhlem  $90^\circ$ . Samotný výpočet velikosti částic vychází ze Stokes-Einsteinovy rovnice (1) vyjadřující vztah mezi hodnotou hydrodynamického průměru částice  $d(H)$  a hodnotou translačního difúzního koeficientu  $D$ , kde  $k$  je Boltzmannova konstanta,  $T$  je absolutní teplota prostředí a  $\eta$  je viskozita disperzního prostředí [107, 108, 109].

$$d(H) = \frac{k \cdot T}{3\pi \cdot \eta \cdot D} \quad (1)$$

Pro praktický význam stanovení je nutné znát hodnotu indexu lomu částic a rozpouštědla, přičemž by se tyto hodnoty měly navzájem lišit. V průběhu měření rozptylu by rovněž nemělo docházet ke změnám termodynamických podmínek. Metoda DLS umožňuje měřit velikost částic disperze v rozmezí několika nanometrů až nízkých jednotek mikrometrů, zároveň je schopná systém charakterizovat i z hlediska polydisperzity (PDI).

Existence elektrického náboje na povrchu částic ovlivňuje distribuci opačně nabitých iontů v roztoku, kolem každé povrchově nabitě částice se tak formuje elektrická dvojvrstva. Ta se obecně skládá ze dvou částí – vnitřní kompaktní vrstvy protiiontů těsně přiléhajících k povrchu částice – tzv. Sternovy vrstvy a vrstvy difúzní, jež je tvořena zbývající částí opačně nabitých iontů. V rámci difúzní vrstvy rozlišujeme dále tzv. rovinu skluzu ohraničující vrstvu iontů, které se při pohybu nabitě částice pohybují společně s ní a přispívají tak k jejím povrchovým vlastnostem [110].

Rozdíl potenciálů ve vzdálenosti pohybového rozhraní, jež se ustavuje při pohybu částice s elektrickou dvojvrstvou vůči roztoku, se označuje jako elektrokinetický potenciál (zeta po-

tenciál) a je jednou ze základních veličin pro hodnocení stability koloidních systémů. Při dodržení předpokladu, že veškeré částice systému vykazují dostatečně vysoký kladný či záporný zeta potenciál (vyšší než +30 mV a nižší než -30 mV), je možné systém díky existenci dostatečně silné elektrostatické repulze mezi souhlasně nabitými ionty považovat za stabilní. Stanovení elektrokinetického potenciálu je možné provést prostřednictvím metody elektroforetického rozptylu světla (ELS – Electrophoretic Light Scattering), jež je založena na elektroforetické pohyblivosti částic v roztoku, na kterých dochází k rozptylu světelného záření. Pro výpočet hodnoty elektrokinetického potenciálu je poté vycházeno ze Smoluchowskiho rovnice [111, 112].

Měření distribuce velikosti a zeta potenciálu transferosomů bylo provedeno na přístroji Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern) při 25 °C. V případě stanovení distribuce velikosti bylo 10 µl vzorku transferosomů smícháno s 1 ml demineralizované vody (pH 7,0 ± 0,2) a pro měření byly využívány plastové kyvety s optickou délkou 1 cm. Pro stanovení zeta potenciálu bylo 15 µl vzorku naředěno 4 ml demineralizované vody a roztok byl stříkačkou převeden do speciálních kyvet společnosti Malvern.

Stanovení obou parametrů probíhalo u každého vzorku celkem ve třech opakováních složených průměrně ze 12 až 18 cyklů při stanovení velikosti a z méně než 100 cyklů v případě zeta potenciálu. Z naměřených dat byly vypočítány průměrné hodnoty včetně směrodatné odchylky. V případě velikosti se jedná o intenzitně vážený průměr velikosti transferosomů (z-average).

### 7.3 Stanovení morfologie

Morfologie vezikul byla pozorována s využitím dvou typů mikroskopických technik – transmisní elektronové mikroskopie (TEM) a konfokální mikroskopie. Pro metodu TEM byly vzorky transferosomů 20krát naředěny, naneseny na hydrofilizované měděné síťky (300 mesh) pokryté tenkou formavarovou vrstvou a následně šetrně vysušeny při 45 °C. Zobrazení bylo zprostředkováno mikroskopem JEM-2100F (Jeol) s urychlovacím napětím 160 kV. V případě pozorování konfokálním mikroskopem Fluoview FV3000 (Olympus) bylo 10 µl vzorku transferosomů aplikováno na podložní sklíčko a následně překryto krycím sklem. Vezikuly byly pozorovány při 60násobném zvětšení.

## 7.4 Stanovení enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost (EE – Encapsulation Efficiency) je jednou ze základních charakteristik vyjadřujících procentuální úspěšnost zachycení aktivní látky daným nosičem. V případě nepřímého postupu je hodnocení EE založeno na stanovení koncentrace aktivní látky, která nebyla nosičem zachycena, a je ji tak možné izolovat a kvantifikovat. Výchozí metodou pro stanovení koncentrace nezachyceného ASTX byla zvolena spektrofotometrie. V počátcích experimentu však nebylo snadné nalézt vhodnou izolační metodu, která by vedla k efektivní izolaci volného ASTX. Hlavním problémem byla přítomnost reziduálních fosfolipidů a surfaktantů, což vedlo ke zkreslení spektrálních charakteristik vzorků.

Jako alternativa pro stanovení obsahu ASTX v extraktech byla uvažována možnost využití vysokoúčinnosti kapalinové chromatografie s detekcí při 474 nm. Měření bylo provedeno na kapalinovém chromatografu Waters, a to izokratickou metodou na koloně XSelect® CSH C-18 (5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 $\times$ 250 mm) při laboratorní teplotě. Průtok mobilní fáze tvořené směsí methanolu a vody v poměru 97 : 3, v/v byl nastaven na 0,8 ml·min<sup>-1</sup>. Pro účely vyhodnocení byla sestrojena kalibrační přímka ze série roztoků ASTX v acetonu (0 až 16  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

Vzhledem k problémům při separaci vzorků na koloně však metoda kapalinové chromatografie nebyla pro daný účel vyhodnocena jako vyhovující. Z časových důvodů proto nebyla metoda dále optimalizována a pro stanovení koncentrace neenkapsulovaného ASTX bylo použito spektrofotometrického stanovení dle modifikované metodiky uvedené v publikaci Pana a kol. [113]: 400  $\mu\text{l}$  vzorku transferosomů bylo v plastové zkumavce s víčkem smícháno s 5 ml petroletheru a tato směs byla sonikována v ultrazvukové vaně (Kraintek) při 37 °C po dobu 15 min. Následně byl vzorek odstředěn při 3000 rpm po dobu 5 min pomocí stolní centrifugy (Hettich) a odstředěný supernatant odsát injekční stříkačkou. Celý postup byl poté ještě jednou zopakován. Oba podíly supernatantu byly následně spojeny a převedeny do baňky s kulatým dnem, ze které byl petrolether odpařen na vakuové odparce (Heidolph) při 40 °C. Zbytek po odpařování byl rozpuštěn v 10 ml acetonu. U každého vzorku byla extrakce provedena dvakrát vedle sebe.

V další fázi experimentu byla proměřena absorbance série kalibračních roztoků ASTX v acetonu při vlnové délce absorpčního maxima ASTX v acetonu 474 nm. Jako blank byl využit čistý aceton a každý vzorek byl proměřen celkem třikrát. Ze získaných dat byly po dosazení do rovnice kalibrační přímky vypočteny hodnoty koncentrace ASTX v extraktech,

které byly dále použity pro výpočet EE (rovnice 2), kde  $C_{Max}$  je maximální teoretická koncentrace ASTX v extraktech ( $16 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a  $C_{Ext}$  je stanovená koncentrace ASTX.

$$EE = \frac{C_{Max} - C_{Ext}}{C_{Max}} \cdot 100 [\%] \quad (2)$$

Výsledné hodnoty EE pak byly po vyloučení odlehlých hodnot pro každý vzorek zprůměrovány a byla vypočtena jejich směrodatná odchylka.

## 7.5 Stanovení antioxidační účinnosti *in vitro*

Stanovení antioxidační účinnosti (AE – Antioxidant Efficiency) transferosomů s obsahem ASTX bylo provedeno metodou zhášení stabilních radikálů 2,2-difenyl-1-pikryl hydrazylu (DPPH). Tato metoda představuje jednu ze základních metodik pro zhodnocení antiradikálové aktivity látek *in vitro*. Při reakci primárních antioxidantů s DPPH• dochází v důsledku odštěpení atomu H z molekuly antioxidantu ke vzniku 2,2-difenyl-1-pikryl hydrazinu (DPPH-H), což se projevuje typickým poklesem absorbance při 517 nm [114].

Při samotném experimentu byla použita modifikovaná metodika Sheikha a kol. [115]. Zásobní roztok DPPH• připravený rozpuštěním 24 mg DPPH ve 100 ml ethanolu byl pro účely stanovení 10krát naředěn a 3,9 ml tohoto pracovního roztoku bylo smícháno se 100  $\mu\text{l}$  příslušného vzorku transferosomů s ASTX, v případě kontroly se 100  $\mu\text{l}$  PBS. Pro srovnávací účely byla AE hodnocena rovněž u roztoku neenkapsulovaného ASTX v DMSO, jehož koncentrace se rovnala teoretické maximální koncentraci ASTX v připravených transferosomech ( $0,4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Všechny vzorky byly poté ponechány reagovat při laboratorní teplotě v temnu. Hodnoty absorbancí byly postupně stanovovány po 1, 2, 4, 6, 8 a 24 hodinách.

Vzhledem ke skutečnosti, že samotná molekula ASTX absorbuje část záření při vlnové délce absorpčního maxima DPPH•, byla pro výpočet AE zavedena korekce spočívající v odečtení hodnot absorbancí vzorků, které byly připraveny smícháním 100  $\mu\text{l}$  disperze transferosomů (resp. roztoku neenkapsulovaného ASTX v DMSO) s 3,9 ml čistého ethanolu, od hodnot absorbancí roztoků transferosomů s DPPH•. Absolutní hodnoty AE byly vypočteny dle rovnice (3), kde  $A_0$  je hodnota absorbance kontroly,  $A_{Vz}$  je hodnota absorbance příslušného vzorku transferosomů s roztokem DPPH• a  $A_{Kor}$  je hodnota absorbance korekce.

$$AE = \frac{A_0 - (A_{Vz} - A_{Kor})}{A_0} \cdot 100 [\%] \quad (3)$$

## 7.6 Stanovení cytotoxicity *in vitro*

Tetrazoliový test (MTT test) je jednou z nejhojněji využívaných metodik pro hodnocení cytotoxického účinku látek *in vitro*. Toto kolorimetrické stanovení je založeno na schopnosti metabolicky aktivních buněk přeměňovat žlutý, ve vodě rozpustný 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazoliumbromid (zkráceně MTT) na fialový, ve vodě nerozpustný formazan, a to prostřednictvím mitochondriálních dehydrogenáz. Rychlost konverze MTT na formazan vypovídá o aktivitě dýchacího řetězce, odráží tak životaschopnost (viabilitu) buněk. V případě, že se v prostředí buněk vyskytují látky s cytotoxickým účinkem, přeměna MTT na formazan je v jejich důsledku zpomalena či zcela zastavena. Vyhodnocení testu je prováděno spektrofotometricky při 570 nm na základě poklesu hodnoty absorbance ve srovnání s referenčním vzorkem bez obsahu potenciálně cytotoxických substancí [116].

Cytotoxicita připravených transferosomálních formulací byla hodnocena na buněčné linii myších fibroblastů ATCC-CRL-1658 NIH/3T3 a stanovení bylo provedeno dle normy ISO 10993-5. Kultivační médium DMEM (PAA Laboratories) obsahovalo 10 % telecího séra (BioSera) a antibiotikum penicilin/streptomycin (GE Healthcare) v koncentraci 100 U·ml<sup>-1</sup>. Vizuální kontrola buněk byla provedena pozorováním na inverzním fluorescenčním mikroskopu IX 81 (Olympus) metodou fázového kontrastu.

Před samotným provedením MTT testu byly buňky o koncentraci 1·10<sup>5</sup> ml<sup>-1</sup> nasazeny ke 24hodinové předinkubaci (37 °C, 5% atmosféra CO<sub>2</sub>) do 96jamkových mikrotitračních destiček. Další den bylo po odsátí přebytečného média do jamek nadávkováno 100 µl příslušného vzorku disperze transferosomů ředěné na 20, 15, 10, 5 a 1% koncentraci. Pro sterilizaci vzorků bylo přistoupeno k jejich filtraci přes stříkačkový filtr (0,22 µm). V případě referenčních vzorků bylo do jamek napipetováno 100 µl samotného kultivačního média.

Vzorky byly kultivovány po dobu 24 h (37 °C, 5% atmosféra CO<sub>2</sub>), následně bylo médium včetně vzorků odsáto a do jamek bylo dávkováno 100 µl čerstvého média a 10 µl roztoku MTT v kultivačním médiu (5 mg·ml<sup>-1</sup>). Vzorky byly znovu inkubovány 4 h za výchozích podmínek. Na závěr bylo médium včetně roztoku MTT odstraněno a k buňkám bylo napipetováno 80 µl DMSO, které byly ponechány působit 15 min (pro rozpuštění případných krystalků formazanu). Absorbance byla dle metodiky měřena při 570 nm. Všechna stanovení byla provedena v pěti opakováních.

Relativní viabilita buněk (RCV – Relative Cell Viability) byla vypočtena z rovnice (5), kde  $A_{Vz}$  je hodnota absorbance příslušného vzorku transferosomů a  $A_{Ref}$  je průměrná hodnota absorbance referenčního vzorku.

$$RCV = \frac{A_{Vz}}{A_{Ref}} \quad (5)$$

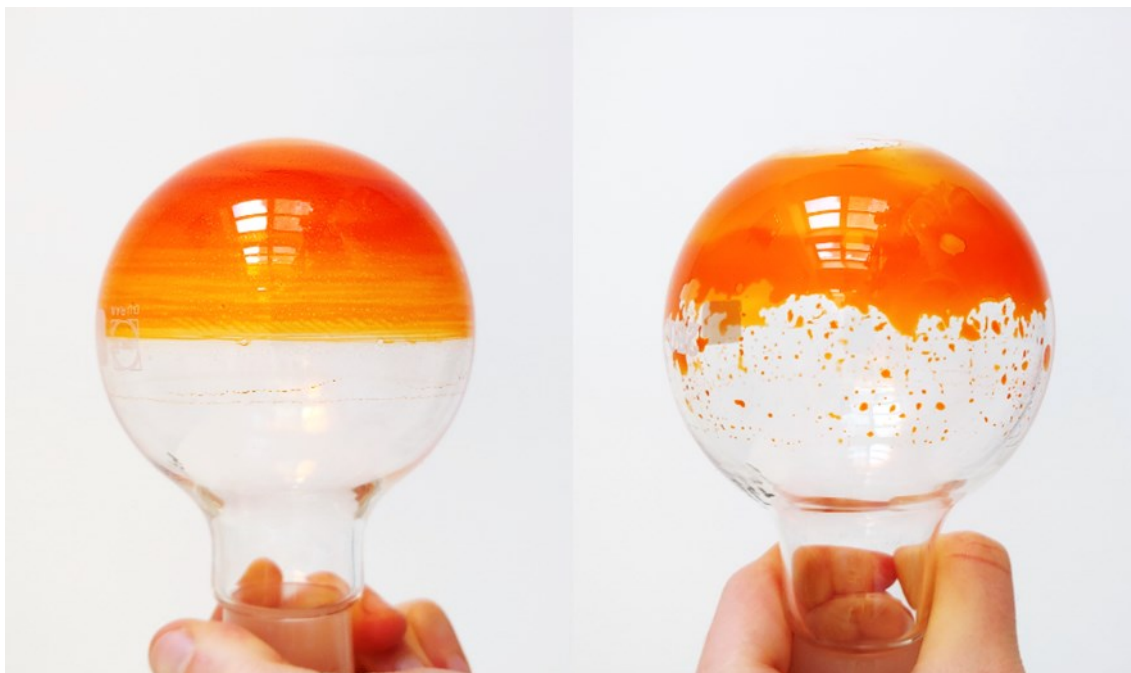
## 7.7 Stanovení stability vezikul

Stabilita transferosomů skladovaných při 4 °C byla hodnocena v týdenních intervalech na základě měření změn velikosti vezikul, PDI a zeta potenciálu dle postupů uvedených v kap. 7.2.

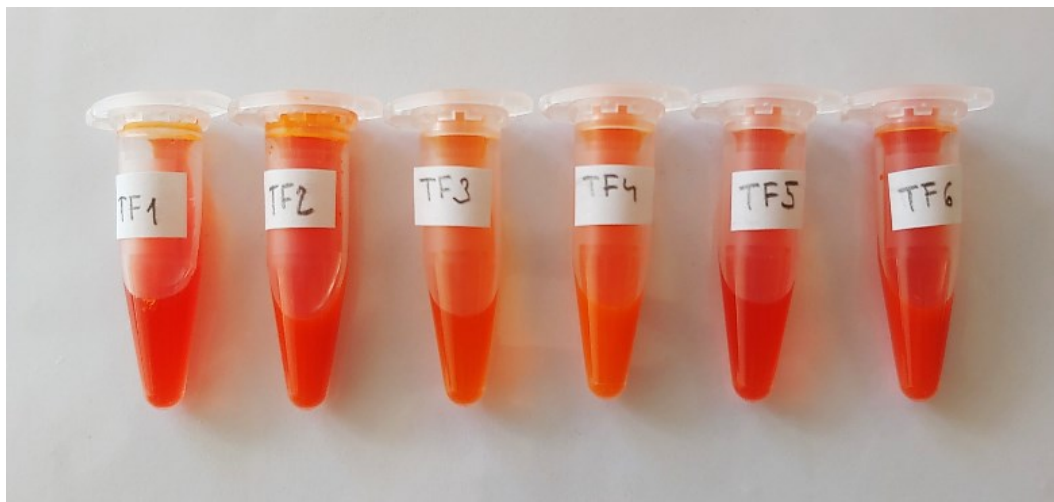
## 8 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 8.1 Příprava transferosomů

Příprava disperzí transferosomů byla provedena dle metodiky popsané v kapitole 7.1. V závislosti na typu použitých lipidů či surfaktantu vykazovaly formulace během přípravy odlišné chování. Rychlost odpařování organické fáze byla při přípravě tenkých filmů s obsahem TW obecně vyšší, filmy byly velmi rovnoměrné a jejich hydratace probíhala, ve srovnání s filmy s SP, taktéž snadněji, což bylo vzhledem k vyšší hydrofilitě TW ( $HLB = 14,9$ ) očekávatelné. Přídavek CH do SPC vedl ke zhoršení homogenity filmů. Ty měly ke konci odpařování tendenci vytvářet na stěnách nerovnoměrné zóny (Obr. 9), které ve výsledku prodlužovaly potřebnou dobu hydratace. Formulace transferosomů s SP vykazovaly vyšší míru turbidity, což ukazovalo na vyšší průměrnou velikost jejich vezikul. Vizuální srovnání šestice finálních formulací bezprostředně po jejich přípravě je zobrazeno na Obr. 10.



Obr. 9. Srovnání připravených tenkých filmů (vlevo SPC-TW, vpravo SPC/CH-TW)



Obr. 10. Vizuelní srovnání finálních formulací transferosomů bezprostředně po přípravě; TF1 (SPC-TW), TF2 (SPC-SP), TF3 (DOPC-TW), TF4 (DOPC-SP), TF5 (SPC/CH-TW) a TF6 (SPC/CH-SP)

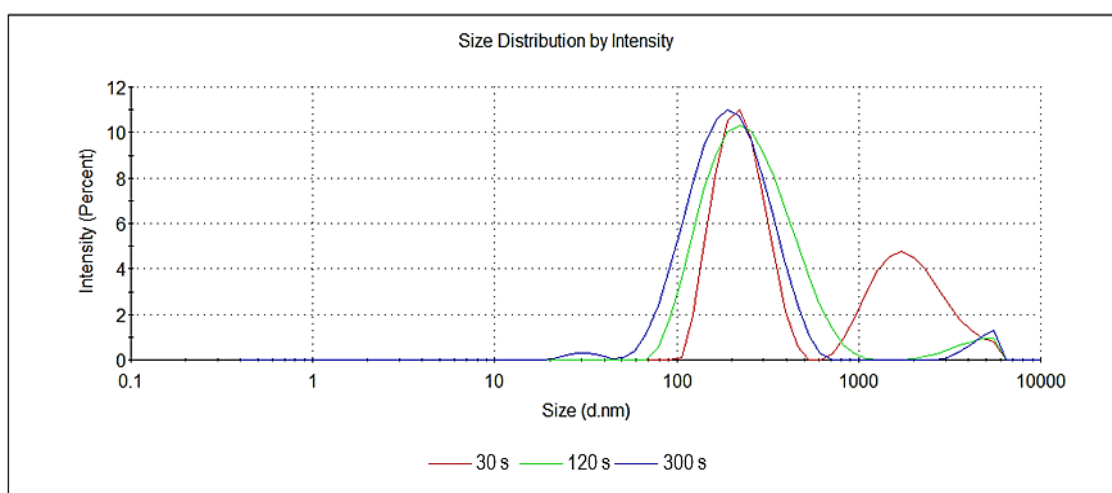
## 8.2 Stanovení distribuce velikosti a zeta potenciálu vezikul

Velikost vezikul a hodnota PDI byly nejprve proměřeny u dvou testovacích formulací bez obsahu ASTX založených na kombinaci SPC a TW, resp. SP v poměru 90 : 10 (w/w) a připravených metodou hydratace tenkého filmu. Po působení 120 s sonikace byly pro vezikuly SPC-TW naměřeny průměrné hodnoty velikosti  $86 \pm 2$  nm a PDI  $0,24 \pm 0,05$ , zatímco transferosomy SPC-SP dosahovaly v průměru více než dvojnásobné velikosti  $200 \pm 8$  nm s hodnotou PDI  $0,29 \pm 0,04$ . Po enkapsulaci molekul ASTX do dvojvrstvy vezikul bylo pozorováno mírné zvýšení průměrné velikosti transferosomů o přibližně 15 až 20 nm. V případě SPC-TW tak velikost vzrostla na  $102 \pm 3$  nm, u SPC-SP na  $223 \pm 6$  nm. Hodnoty PDI se přítomností ASTX výrazně nezměnily. Jako alternativa k metodě hydratace tenkého filmu byly transferosomy s ASTX připraveny rovněž metodou evaporace reverzní fáze, jež je založena na přípravě emulzního systému převráceného typu a jeho přechodu na vezikulární disperzi odpařením organické fáze. Vzhledem k problémům při přípravě vzorku SPC-SP byla metoda úspěšně provedena pouze u výchozí formulace SPC-TW. Průměrná velikost vezikul zde činila  $90,8 \pm 0,7$  nm a hodnota PDI  $0,23 \pm 0,03$ .

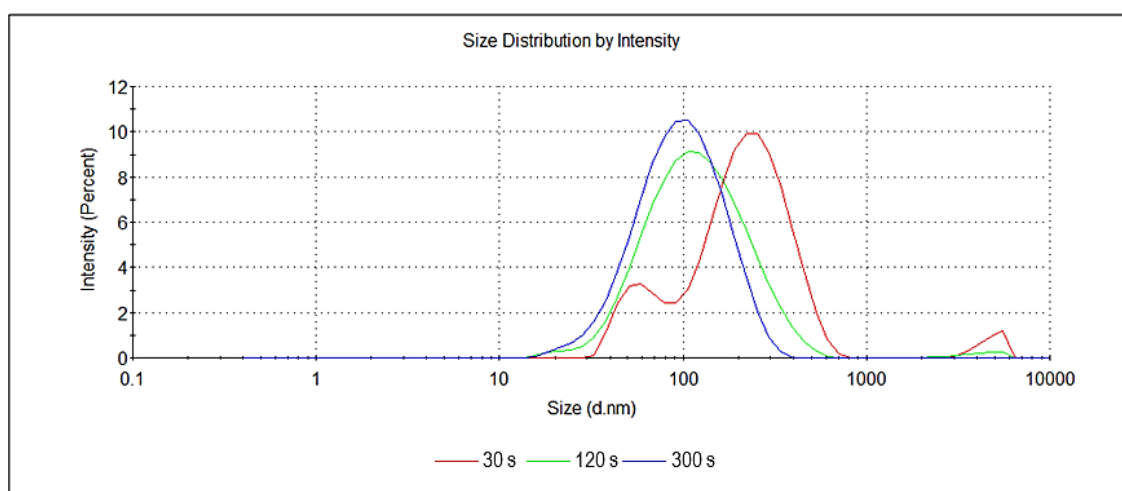
V dalším kroku byl zhodnocen vliv doby sonikace na vlastnosti systému. Primární disperze proto byly sonikovány po definované časové intervaly (30, 120, nebo 300 s) a bezprostředně poté byla stanovena distribuce velikosti sonikovaných vezikul. V případě formulace SPC-SP (Obr. 11) byla ve vzorku i po 30 s sonikace přítomná poměrně výrazná populace, jejíž



velikost se pohybovala nad hranicí 1  $\mu\text{m}$ . Delší sonikační časy vedly k citelnému snížení polydisperzity systému, i přesto však byla ve vzorku SPC-SP po 300 s sonikace detekována frakce vezikul, jejichž velikost byla nad detekční hranici analyzátoru Nano ZS 90 (Malvern), tedy  $\sim 5 \mu\text{m}$ . U formulace SPC-TW (Obr. 12) byla populace vezikul o mikronové velikosti stanovena pouze ve vzorku sonikovaného nejkratší dobu 30 s. Sonikace po dobu 120, resp. 300 s vedla ke vzniku relativně monodisperzních systémů s průměrnou velikostí částic okolo 100 nm. Na základě těchto výsledků byla tak sonikace po dobu 120 s vyhodnocena jako dostatečně efektivní a byla dále použita pro přípravu všech formulací.



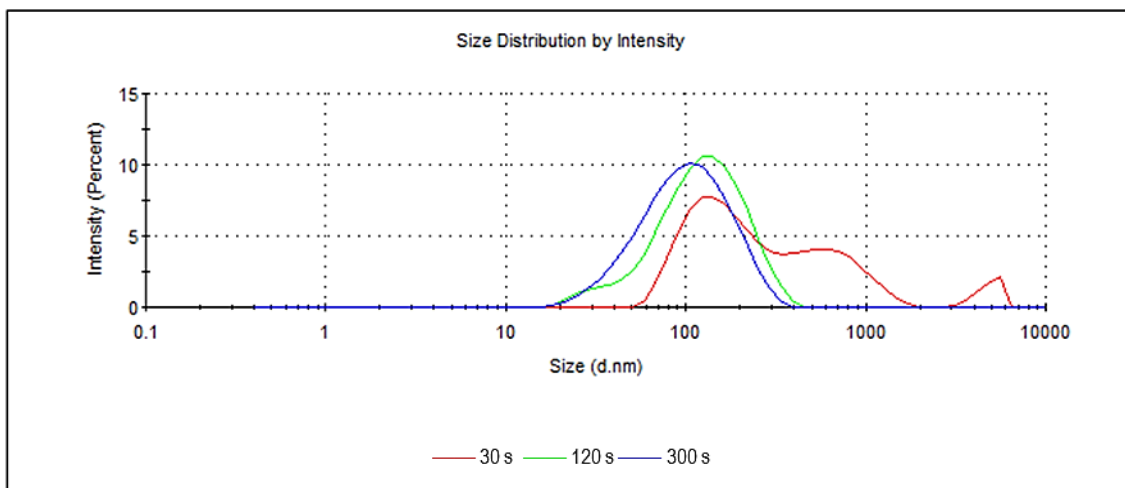
Obr. 11. Vliv doby sonikace na distribuci transferosomů SPC-SP (90 : 10, w/w)



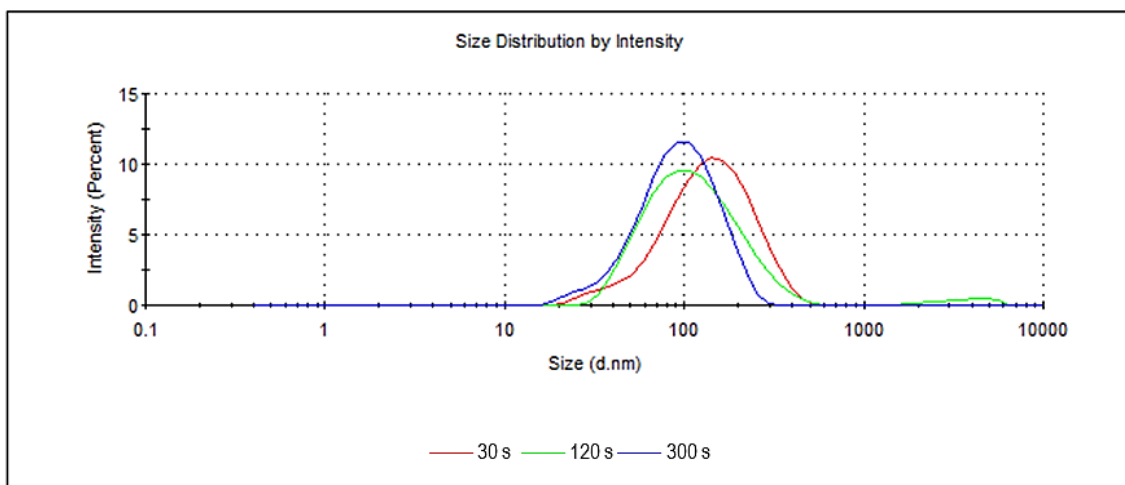
Obr. 12. Vliv doby sonikace na distribuci transferosomů SPC-TW (90 : 10, w/w)

Další sledovanou proměnnou ve vztahu k charakteristikám vezikul byla koncentrace aktivátoru hran, proto byly připraveny formulace s dvěma dalšími poměry SPC : TW (95 : 5 a 85 : 15, w/w). Koncentrace aktivátoru měla vliv na distribuci připravených transferosomů.

Nižší koncentrace surfaktantu vedla ke vzniku vezikul s větší průměrnou velikostí a celková šířka distribuce byla obecně větší než u systému s vyšší koncentrací aktivátoru (Obr. 13). Zvýšení koncentrace aktivátoru hran vedlo k zajištění užší distribuce vezikul již při kratších sonikačních časech (Obr. 14).



Obr. 13. Vliv doby sonikace na distribuci transferosomů SPC-TW (95 : 5, w/w)



Obr. 14. Vliv doby sonikace na distribuci transferosomů SPC-TW (85 : 15, w/w)

Stanovené charakteristiky vezikul finálních formulací transferosomů s obsahem ASTX ( $0,4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) s různým typem membrány a fixním poměrem lipid : aktivátor (90 : 10, w/w) jsou uvedeny v Tab. 3. Z uváděných dat je zřejmé, že všechny formulace, které využívaly jako aktivátor hran TW, obsahovaly vezikuly s menší velikostí. Konkrétně nejmenší vezikuly byly stanoveny u vzorku TF3 (DOPC-TW);  $88 \pm 1 \text{ nm}$ . Naopak největších velikostí dosahovala formulace TF2 (SPC-SP) s průměrnou hodnotou  $218 \pm 6 \text{ nm}$ .

Velikost vezikul byla ovlivněna zejména použitým aktivátorem hran, složení lipidové membrány mělo poměrně malý vliv. K podobným výsledkům dospěli i Khan a kol. [117], kteří se zabývali přípravou transferosomů s různým složením membrány a s obsahem lipofilního kortikosteroidu. Formulace založené na kombinaci SPC s SP dosahovaly, ve srovnání s formulacemi na bázi SPC a TW, taktéž v průměru dvojnásobné velikosti vezikul. Konkrétní typ použitého fosfolipidu neměl na výslednou velikost transferosomů s TW významný vliv, u formulací s SP byly stanovené rozdíly větší. Hodnoty PDI se mezi transferosomy s ASTX se stejným typem aktivátoru hran výrazně nelišily. Všechny připravené formulace vykazovaly záporný zeta potenciál, u žádného vzorku však hodnoty nepřekročily hranici  $-20$  mV. Nejnižší hodnota potenciálu  $-14,0 \pm 1,3$  mV byla naměřena bezprostředně po přípravě pro vzorek formulace TF6 (SPC/CH-SP). Transferosomy s obsahem TW dosahovaly obecně méně záporných hodnot, které se pohybovaly pod  $-10$  mV. Hodnoty elektrokinetického potenciálu se tedy významně nelišily od současných poznatků publikovaných v odborné literatuře [117].

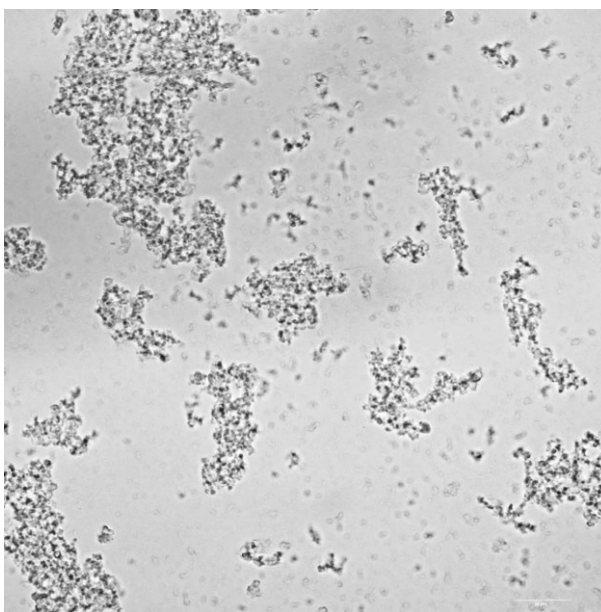
*Tab. 3. Průměrná velikost vezikul, hodnota PDI a zeta potenciálu připravených formulací s fixním poměrem lipid : aktivátor (90 : 10, w/w) po sonikaci (120 s)*

Formulace	Velikost [nm]	PDI [1]	Zeta potenciál [mV]
TF1 (SPC-TW)	$95 \pm 5$	$0,25 \pm 0,04$	$-7,2 \pm 0,3$
TF2 (SPC-SP)	$218 \pm 6$	$0,34 \pm 0,03$	$-11,7 \pm 0,7$
TF3 (DOPC-TW)	$88 \pm 1$	$0,22 \pm 0,03$	$-5,8 \pm 0,1$
TF4 (DOPC-SP)	$192 \pm 2$	$0,35 \pm 0,04$	$-10,3 \pm 0,7$
TF5 (SPC/CH-TW)	$92 \pm 2$	$0,21 \pm 0,02$	$-8,9 \pm 1,0$
TF6 (SPC/CH-SP)	$198 \pm 4$	$0,29 \pm 0,03$	$-14,0 \pm 1,3$

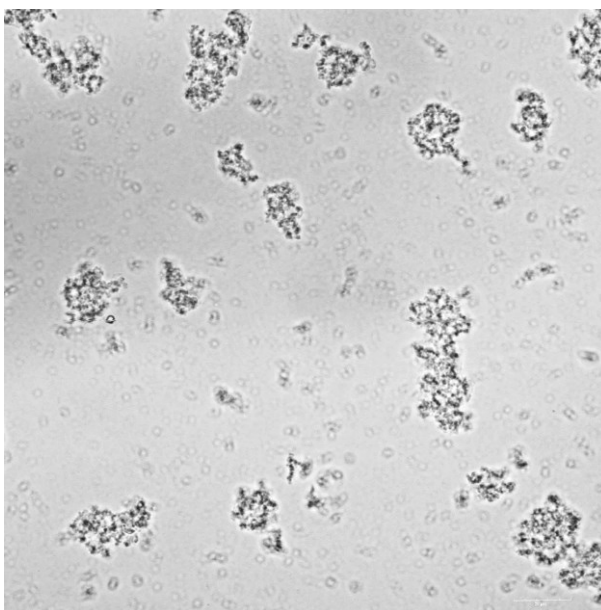
### 8.3 Morfologie transferosomů

Morfologie transferosomů byly sledovány konfokální i elektronovou mikroskopií. Vezikuly formulací připravené s aktivátorem hran SP, tedy TF2 (SPC-SP), TF4 (DOPC-SP) a TF6 (SPC/CH-SP) bylo možné pozorovat, díky jejich zvýšené tendenci ke tvorbě aglome-

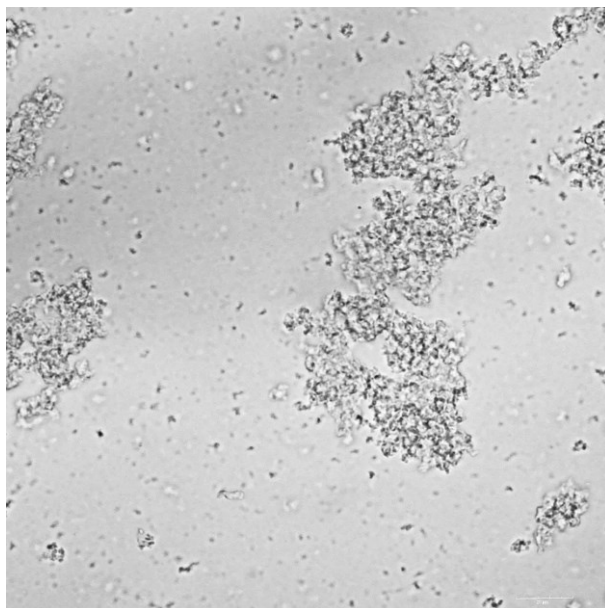
rátů, prostřednictvím konfokálního laserového mikroskopu v transmisním módu při 60násobném zvětšení (Obr. 15, 16 a 17). Transferosomy založené na TW, konkrétně TF1 (SPC-TW), byly sledovány vzhledem k jejich malým, neaglomerovaným vezikulám s průměrnou velikostí okolo 100 nm pouze prostřednictvím metody TEM (Obr. 18 a 19). Velikost zobrazených vezikul pro formulaci s TW odpovídá velikostem stanoveným metodou DLS.



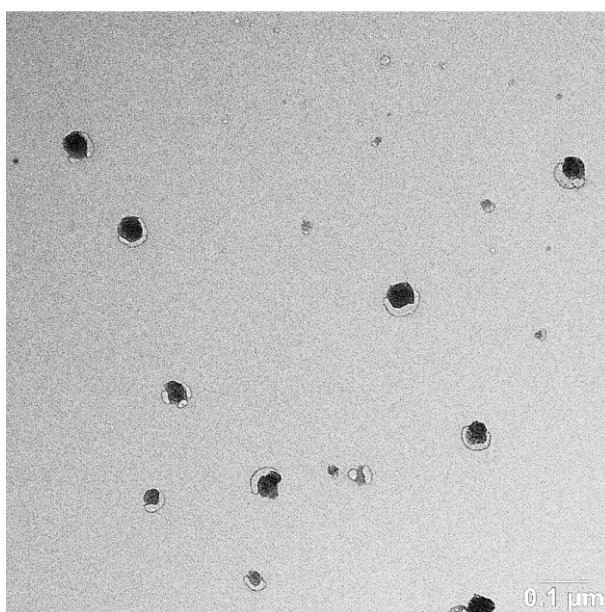
*Obr. 15. Aglomeráty vezikul transferosomů formulace TF2 (SPC-SP) pozorované konfokální mikroskopií v transmisním módu (60× zvětšení)*



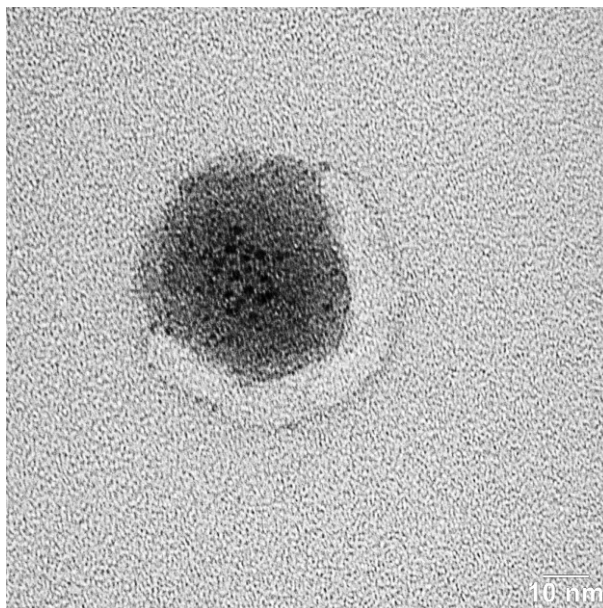
*Obr. 16. Aglomeráty vezikul transferosomů formulace TF4 (DOPC-SP) pozorované konfokální mikroskopií v transmisním módu (60× zvětšení)*



*Obr. 17. Aglomeráty vezikul transferosomů formulace TF6 (SPC/CH-SP) pozorované konfokální mikroskopií v transmisním módu (60× zvětšení)*



*Obr. 18. Vezikuly transferosomů formulace TF1 (SPC-TW) pozorované metodou TEM*

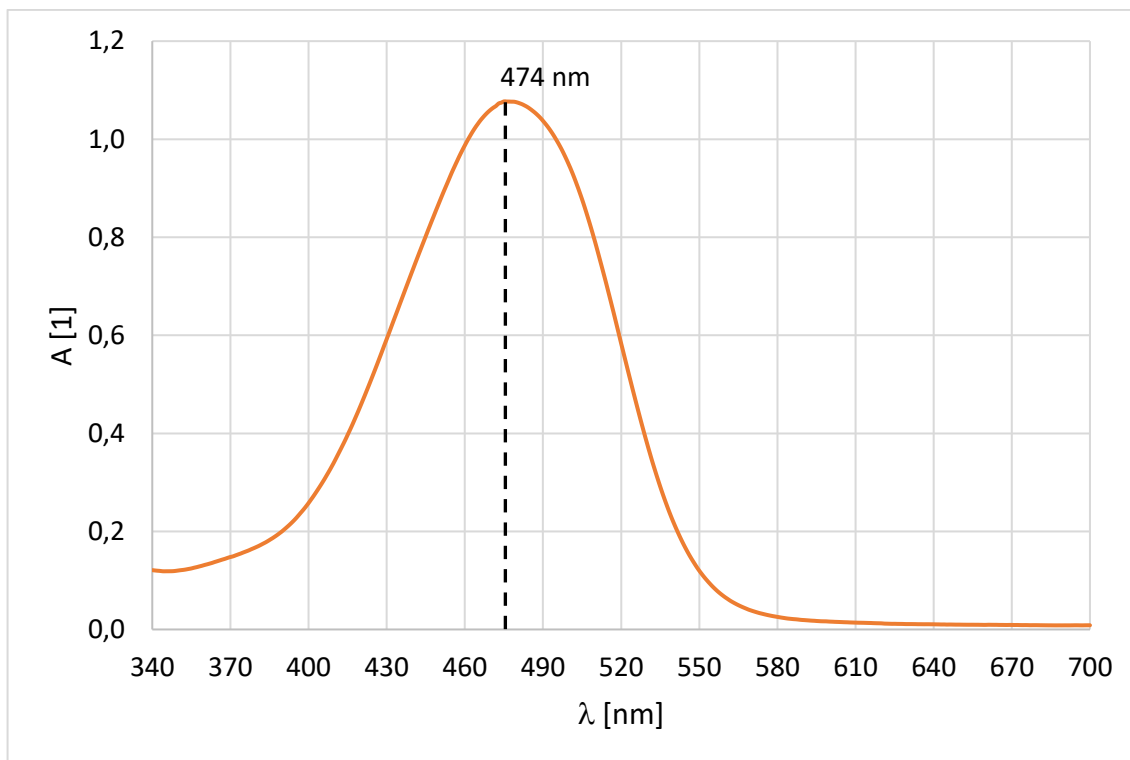


*Obr. 19. Vezikula transferosomu formulace TF1 (SPC-TW) pozorovaná metodou TEM*

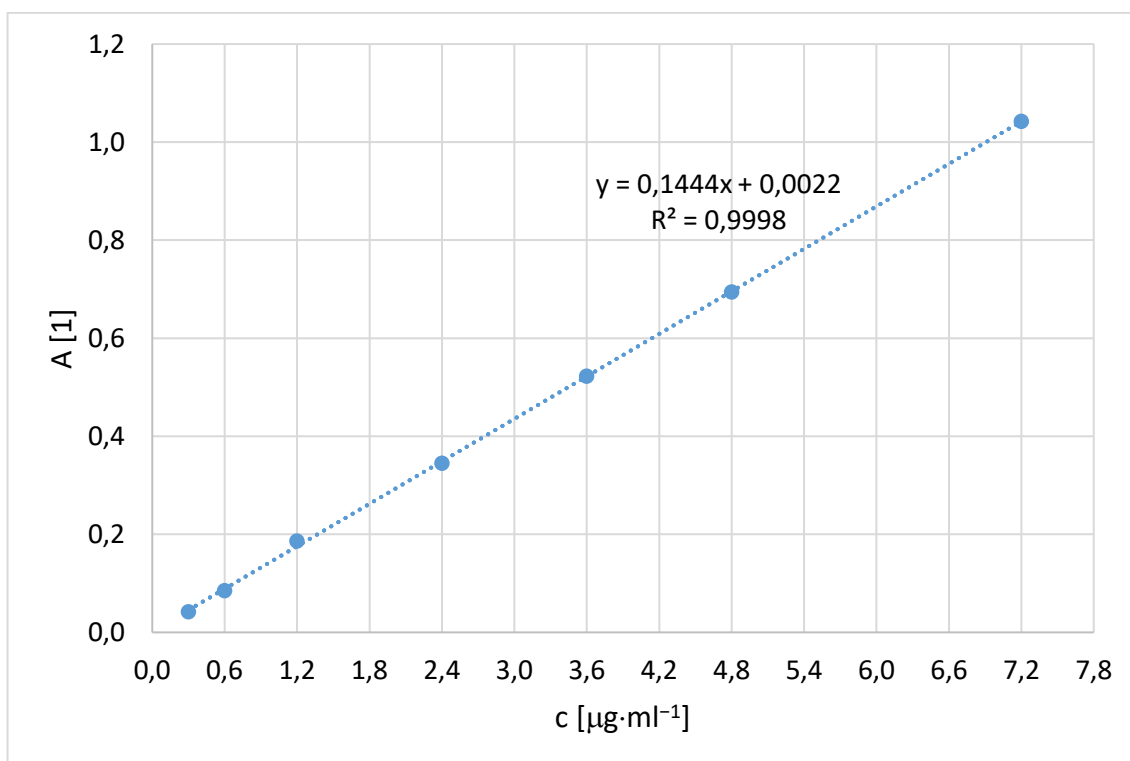
#### **8.4 Vyhodnocení enkapsulační účinnosti**

Enkapsulační účinnost připravených formulací transferosomů byla hodnocena prostřednictvím spektrofotometrického stanovení neenkapsulovaného ASTX v extraktech připravených dle postupu v kapitole 7.4.

V první řadě bylo proměřeno absorpční spektrum ASTX v rozsahu vlnových délek 340 až 700 nm (Obr. 20); hodnota absorpčního maxima byla určena při  $\lambda = 474$  nm. Na základě absorbancí kalibračních roztoků ASTX v koncentračním rozmezí 0 až  $7,2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  byla sestrojena kalibrační přímka (Obr. 21), s pomocí jejíž rovnice byly stanoveny koncentrace ASTX v extraktech ( $C_{\text{Ext}}$ ). Tyto hodnoty byly pak využity pro výpočet EE formulací, jež jsou uvedeny v Tab. 4.



Obr. 20. Absorpční spektrum ASTX v acetonu



Obr. 21. Kalibrační přímka ASTX v acetonu ze spektrofotometrického stanovení

Tab. 4. Průměrné hodnoty enkapsulační účinnosti (EE) připravených formulací transferosomů s obsahem ASTX

Formulace	$C_{Ext}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	EE [%]
TF1 (SPC-TW)	$0,31 \pm 0,04$	$98,1 \pm 0,6$
TF2 (SPC-SP)	$2,81 \pm 0,06$	$82,4 \pm 1,0$
TF3 (DOPC-TW)	$0,40 \pm 0,04$	$97,5 \pm 0,6$
TF4 (DOPC-SP)	$1,34 \pm 0,13$	$91,6 \pm 0,9$
TF5 (SPC/CH-TW)	$0,60 \pm 0,09$	$96,3 \pm 0,6$
TF6 (SPC/CH-SP)	$2,18 \pm 0,09$	$86,4 \pm 0,6$

Stanovené hodnoty účinnosti zachycení ASTX transferosomy jsou v souladu s vysokými hodnotami EE prezentovanými v dosavadních publikacích zabývající se enkapsulací lipofilních látek do těchto nanonosičů [118, 119]. Míra zachycení ASTX do membrány transferosomů byla u všech formulací vyhodnocena jako velmi vysoká – nad 80 %, mezi formulacemi však byly patrné rozdíly. Nejvyšší hodnota EE ( $98,1 \pm 0,6$  %) byla stanovena u formulace TF1 (SPC-TW), naopak formulace TF2 (SPC-SP) byla vyhodnocena jako nejméně efektivní ( $82,4 \pm 1,0$  %).

Typ použitého surfaktantu představoval hlavní faktor ovlivňující výsledné hodnoty EE. Přítomnost TW v membráně transferosomů vedla k vyššímu zachycení ASTX a tyto formulace tak dosahovaly průměrných hodnot EE vyšších než 95 %. Vysoké hodnoty EE u systémů s TW jsou částečně v rozporu s obecným předpokladem, že účinnost zachycení lipofilních látek je vyšší u transferosomů využívající jako aktivátor hran surfaktant s nižší hodnotou HLB a tedy vyšší lipofilitou [30, 34]. Vysoká účinnost zachycení ASTX transferosomy s TW tak může být přikládána lepší solubilizaci a začlenění tohoto nepolárního karotenoidu do membrány vezikul ve vodném prostředí pufru v důsledku vyšší hydrofility TW.

Druh použitých lipidů měl výraznější vliv pouze na hodnoty EE u formulací s obsahem SP. Například zachycení ASTX vzorkem TF4 (DOPC-SP) bylo, ve srovnání se TF2 (SPC-SP), téměř o 10 % vyšší. Inkorporace CH do lipidové dvojvrstvy SPC vedla u transferosomů s SP k mírnému zvýšení EE, v případě vezikul s obsahem TW byl efekt opačný.



## 8.5 Vyhodnocení antioxidační účinnosti *in vitro*

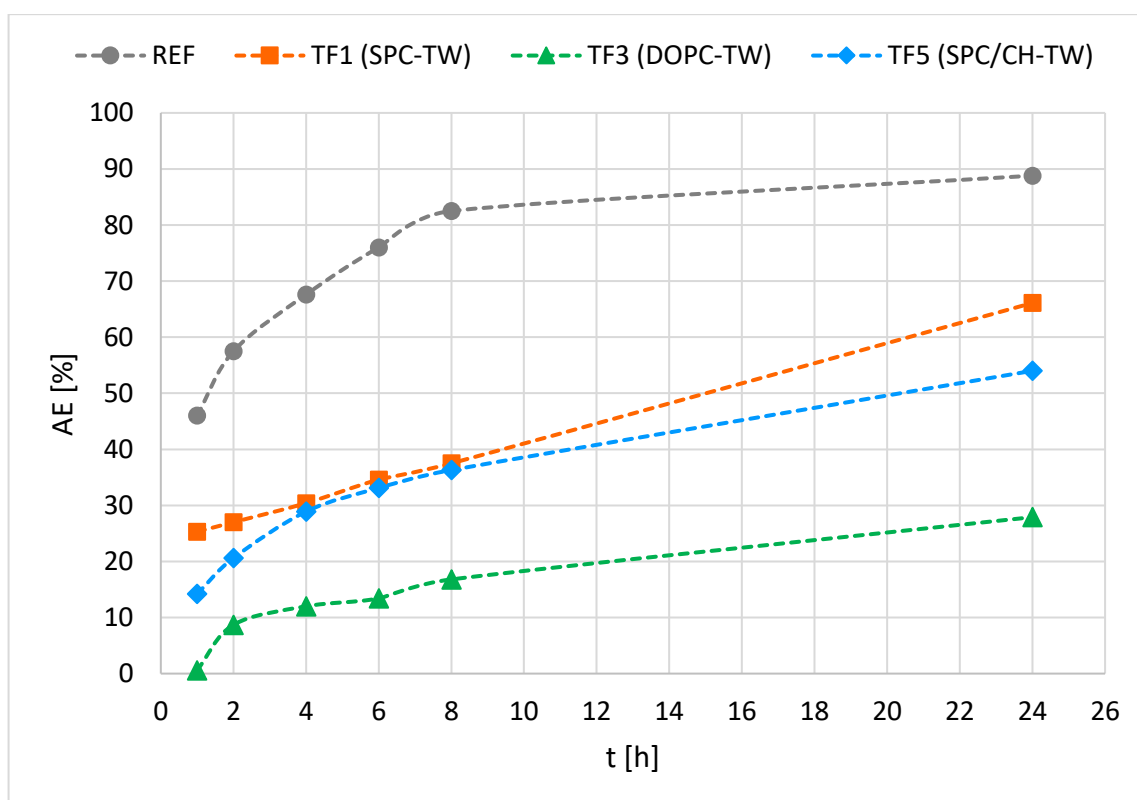
Antioxidační účinnost (AE) připravených formulací byla hodnocena prostřednictvím metody zhášení stabilních radikálů DPPH (viz kapitola 7.5). Jako reference byl využit roztok ASTX v DMSO, jehož koncentrace byla nastavena na hodnotu výchozí koncentrace ASTX v připravených formulacích. Výsledné hodnoty AE vzorků jsou shrnuty v Tab. 5.

Tab. 5. Hodnoty antioxidační účinnosti (AE) připravených transferosomů a referenčního vzorku roztoku ASTX v DMSO (REF) stanovené v časových intervalech 1 až 24 hodin

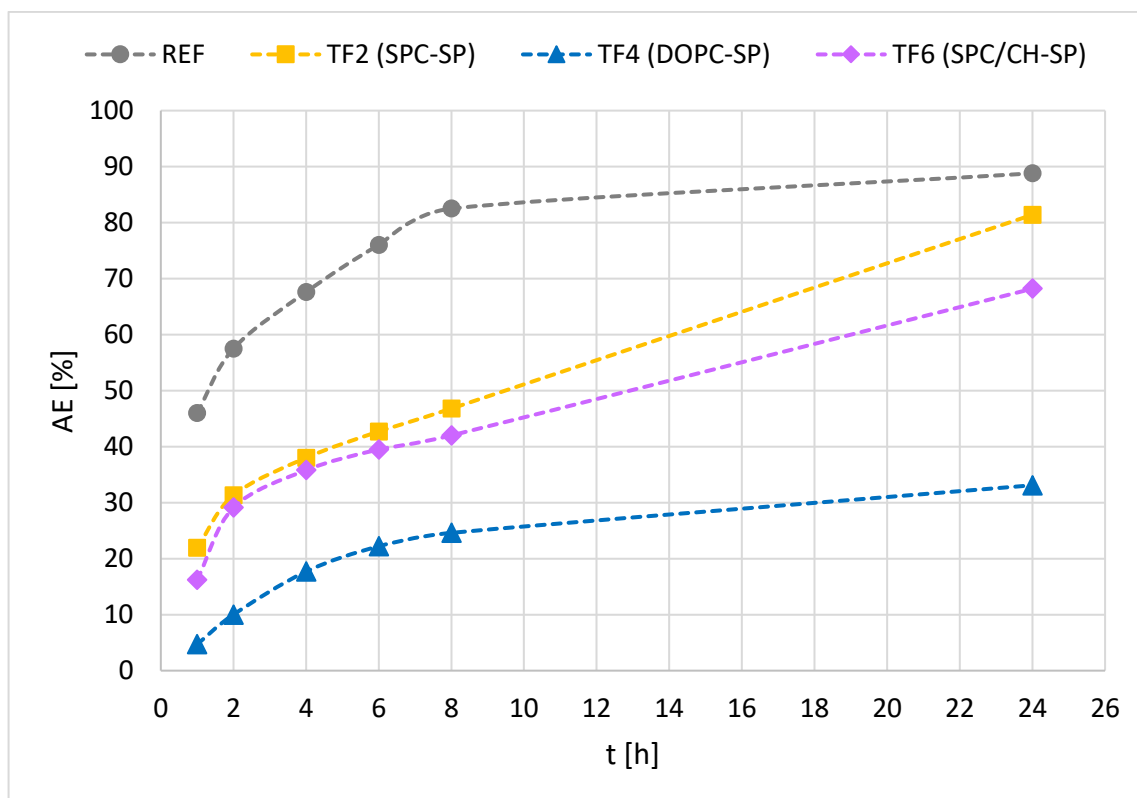
Vzorek	AE [%]					
	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	24 h
REF	46,0 ± 1,0	57,5 ± 1,8	67,6 ± 1,4	76,0 ± 1,6	82,5 ± 1,3	88,8 ± 0,8
TF1 (SPC-TW)	25,3 ± 0,5	27,0 ± 1,0	30,4 ± 1,8	34,6 ± 1,3	37,5 ± 1,3	66,1 ± 0,5
TF2 (SPC-SP)	21,9 ± 0,5	31,3 ± 1,2	38,0 ± 1,0	42,7 ± 1,8	46,8 ± 0,3	81,4 ± 1,6
TF3 (DOPC-TW)	0,6 ± 0,3	8,7 ± 1,3	12,0 ± 1,3	13,4 ± 1,0	16,8 ± 0,4	27,9 ± 1,6
TF4 (DOPC-SP)	4,7 ± 0,4	10,0 ± 0,9	17,7 ± 0,9	22,2 ± 1,4	24,6 ± 1,1	33,1 ± 1,0
TF5 (SPC/CH-TW)	14,2 ± 1,2	20,6 ± 1,4	28,9 ± 1,7	33,1 ± 1,9	36,3 ± 1,8	54,0 ± 0,8
TF6 (SPC/CH-SP)	16,2 ± 1,3	29,1 ± 1,9	35,8 ± 1,4	39,5 ± 1,6	42,0 ± 1,6	68,2 ± 0,8

Enkapsulace ASTX do transferosomů vedla, ve srovnání s referenčním vzorkem neenkapsulovaného ASTX v DMSO, ke zpomalení procesu zhášení radikálů. Zatímco hodnota AE u reference dosahovala po první hodině více než 45 %, u všech testovaných formulací byla hodnota AE po uplynutí této doby nižší než 25 %. S postupujícím časem byl u vzorků pozorován růst AE.

Nejvyšší účinnost zhášení radikálů DPPH byla z testovaných formulací vyhodnocena u vzorků TF2 (SPC-SP) a TF6 (SPC/CH-SP), u nichž byl po 8 h pozorován úbytek absorbance vyšší než 40 %. Po 24 h hodnota AE transferosomů TF2 (SPC-SP) jako jediná překročila 80 %, konkrétně  $81,4 \pm 1,6$  %, u vzorku TF6 (SPC/CH-SP) byla hodnota AE vypočtena na  $68,2 \pm 0,8$  %. Transferosomy s TW dosahovaly obecně horších výsledků účinnosti zhášení DPPH\*. Pouze v případě vzorku TF1 (SPC-TW) byla hodnota úbytku absorbance stanovená po 1 h ( $25,3 \pm 0,5$  %) vyšší než u srovnatelné formulace TF2 (SPC-SP) s hodnotou  $21,9 \pm 0,5$  %. Typ použitého surfaktantu tedy měl u většiny vzorků vliv na výsledné hodnoty AE. Zvýšená míra zhášení u formulací s SP však mohla souviset s vyššími koncentracemi volného ASTX dostupného pro reakci s DPPH\*, které byly u těchto systémů stanoveny v rámci hodnocení EE (viz kapitola 8.4). Míru AE ovlivňovalo rovněž lipidové složení membrány transferosomů, jak je patrné z grafických srovnání na Obr. 22 a 23.



Obr. 22. Srovnání vlivu lipidového složení membrány transferosomů s obsahem TW na hodnoty AE připravených formulací; referenci představuje neenkapsulovaný ASTX v DMSO



Obr. 23. Srovnání vlivu lipidového složení membrány transferosomů s obsahem SP na hodnoty AE připravených formulací; referenci představuje neenkapsulovaný ASTX v DMSO

Formulace TF5 (SPC/CH-TW) a TF6 (SPC/CH-SP) uvolňovaly díky obsahu CH, v porovnání s TF1 (SPC-TW) a TF2 (SPC-SP), ASTX pomaleji. Přítomnost CH v membráně pravděpodobně přispívala ke zvýšení stability dvojvrstvy, což mělo za následek snížený přechod molekul ASTX do reakčního prostředí roztoku radikálů. Obecně nejnižší hodnoty AE vykazovaly v rámci stanovení formulace založené na DOPC. V případě TF3 (DOPC-TW) úbytek absorbance ani po 8 h působení nepřesáhl 20 %, u analogické formulace TF4 (DOPC-SP) byla účinnost zhášení mírně vyšší ( $24,6 \pm 1,1$  %). Výsledné hodnoty AE se po 24 h pohybovaly u obou zmíněných formulací ~ 30% úbytku absorbance. Takto nízké hodnoty AE mohly být způsobeny vysokou mírou inkorporace molekul ASTX do membrány tvořené kombinací DOPC a surfaktantu, případně však také předčasnou oxidační degradací molekul ASTX v těchto vzorcích.

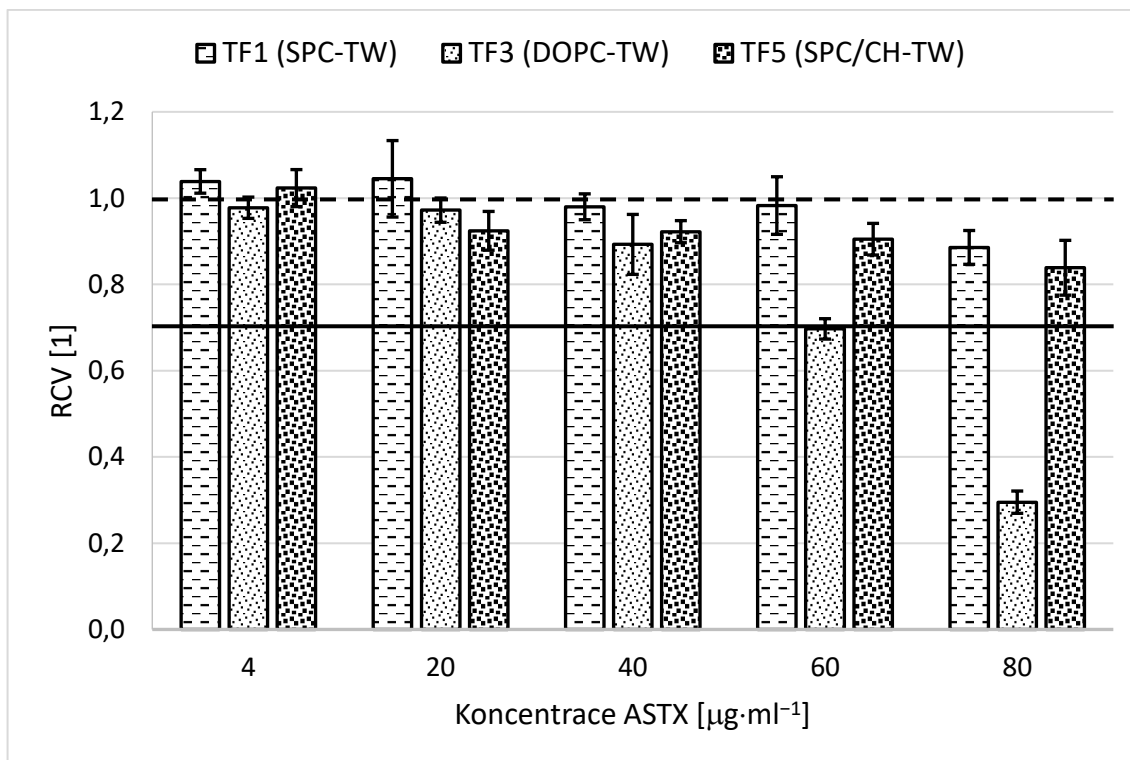
Stanovené hodnoty AE jsou nicméně srovnatelné s již dříve publikovanými výsledky studií zaměřujících se na antioxidační schopnosti lipidových nosičů s obsahem ASTX. Například liposomy využívající kombinace SPC a CH v poměru 5 : 1, w/w s obsahem ASTX v koncentraci 1 hm. % z celkového množství použitých lipidů, připravené v rámci studie Pana a kol. [113], dosahovaly při použití této metody účinnosti zhášení DPPH• ~ 75 %.

## 8.6 Vyhodnocení cytotoxicity *in vitro*

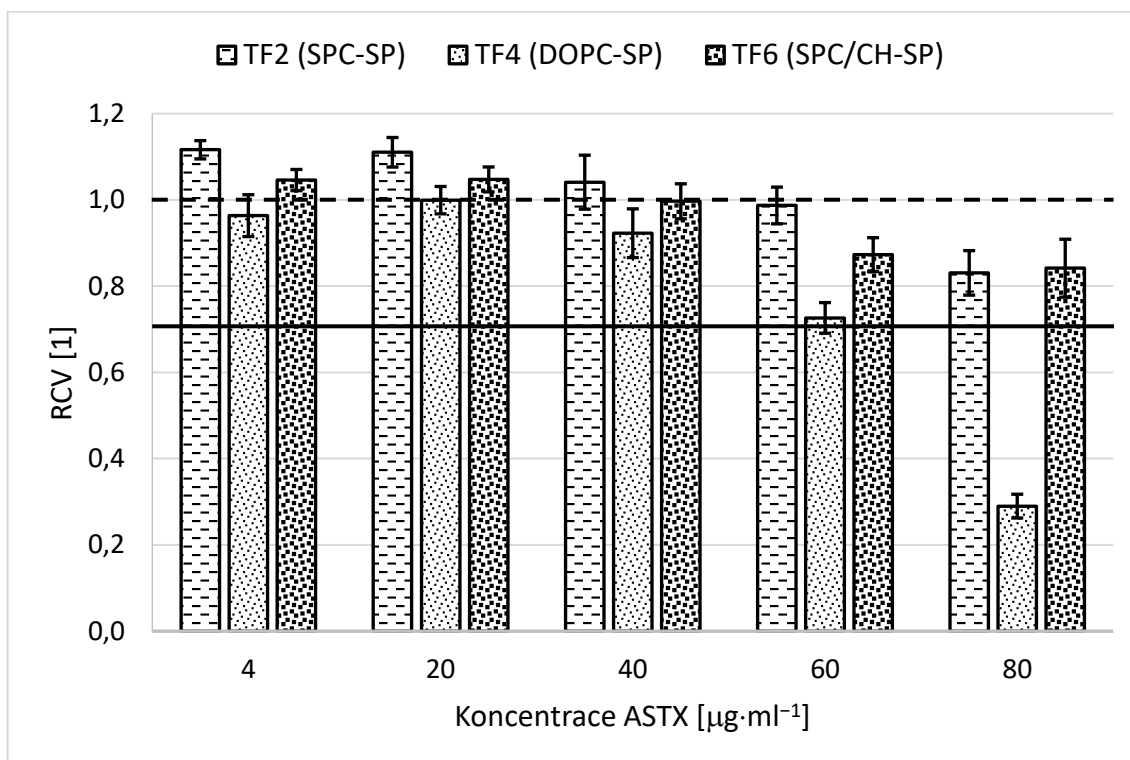
Cytotoxicita připravených formulací transferosomů byla hodnocena metodou MTT testu na myších fibroblastech (viz kapitola 7.6). Životaschopnost buněk po inkubaci se vzorky transferosomů o různé koncentraci byla hodnocena na základě stanovené hodnoty absorbance vzorku transferosomů vztažené k průměrné hodnotě absorbance reference, která představovala 100% životaschopnost buněk, tedy hodnotu relativní životaschopnosti buněk (RCV) rovnou 1. Pro účely diskuse byla ředění transferosomů přepočítána na hodnoty teoretických koncentrací ASTX ve vzorcích. Stanovené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 6. Srovnání cytotoxicity transferosomů s TW je vyobrazeno na Obr. 24, srovnání pro vzorky s obsahem SP pak na Obr. 25.

Tab. 6. Hodnoty relativní životaschopnosti buněk (RCV) po inkubaci se vzorky transferosomů s různou koncentrací ASTX

Formulace	RCV [1]				
	4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	80 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
TF1 (SPC-TW)	1,04 $\pm$ 0,01	1,04 $\pm$ 0,09	0,98 $\pm$ 0,03	0,98 $\pm$ 0,07	0,89 $\pm$ 0,04
TF2 (SPC-SP)	1,12 $\pm$ 0,02	1,11 $\pm$ 0,03	1,04 $\pm$ 0,06	0,99 $\pm$ 0,04	0,83 $\pm$ 0,05
TF3 (DOPC-TW)	0,98 $\pm$ 0,02	0,97 $\pm$ 0,03	0,89 $\pm$ 0,07	0,70 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,03
TF4 (DOPC-SP)	0,96 $\pm$ 0,05	1,00 $\pm$ 0,03	0,92 $\pm$ 0,06	0,73 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,03
TF5 (SPC/CH-TW)	1,02 $\pm$ 0,04	0,92 $\pm$ 0,04	0,92 $\pm$ 0,03	0,90 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,06
TF6 (SPC/CH-SP)	1,05 $\pm$ 0,02	1,05 $\pm$ 0,03	1,00 $\pm$ 0,04	0,87 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,07



Obr. 24. Srovnání hodnot RCV u formulací transferosomů s obsahem TW – TF1, TF3 a TF5 (reference odpovídající 100% životaschopnosti buněk - - -; hranice cytotoxicity —)



Obr. 25. Srovnání hodnot RCV u formulací transferosomů s obsahem SP – TF2, TF4 a TF6 (reference odpovídající 100% životaschopnosti buněk - - -; hranice cytotoxicity —)

Za cytotoxické jsou v případě MTT testu dle normy ISO 10993-5 považovány vzorky, u nichž hodnota RCV klesne pod hraniční hodnotu 0,7. Žádný ze vzorků transferosomů TF1 (SPC-TW), TF2 (SPC-SP), TF5 (SPC/CH-TW) a TF6 (SPC/CH-SP) nebyl na základě této hraniční hodnoty vyhodnocen jako cytotoxický ani v případě nejvyšší studované koncentrace ASTX ( $80 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). V případě formulací TF3 (DOPC-TW) a TF4 (DOPC-SP) však hodnoty RCV u vzorků s koncentrací ASTX  $60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  klesly na hodnoty blízké cytotoxické hranici. Při koncentraci ASTX  $80 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pak byly obě formulace na bázi DOPC vyhodnoceny jako silně cytotoxické. Výsledná cytotoxicita vzorků však mohla být způsobena přítomností zbytkového množství organických rozpouštědel použitých pro přípravu uvažovaných formulací. Zajímavým zjištěním byla indukce množení buněk u vzorků TF2 (SPC-SP) při koncentracích ASTX 4 a  $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , kdy hodnoty RCV ve srovnání s referencí vzrostly na  $1,12 \pm 0,02$ , resp.  $1,11 \pm 0,03$ .

Problematice cytotoxicity lipidových nosičů s obsahem ASTX se ve své publikaci věnovali např. Shimokawa a kol. [120]. Liposomy na bázi EPC s ASTX nezpůsobovaly snížení životaschopnosti epitelálních buněk lidské rohovky. Kontakt tohoto typu buněk s liposomy obsahujícími  $0,6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ASTX navíc vedl ke zvýšení životaschopnosti buněk o  $\sim 20 \%$  v porovnání s kontrolním vzorkem liposomů bez ASTX. Dle Changa a kol. [119] enkapsulace ASTX do liposomů zvyšovala životaschopnost myších fibroblastů, ve srovnání s buňkami ošetřenými pouze roztokem neenkapsulovaného ASTX v ethanolu o stejné koncentraci, o více než 50 %.

## 8.7 Stanovení stability transferosomů

Hodnocení stability formulací transferosomů bylo provedeno vizuálně a na základě měření změn distribuce velikosti a zeta potenciálu vezikul v časových intervalech po 7, 14 a 21 dnech skladování při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Naměřená data jsou uvedena v Tab. 7 a 8.

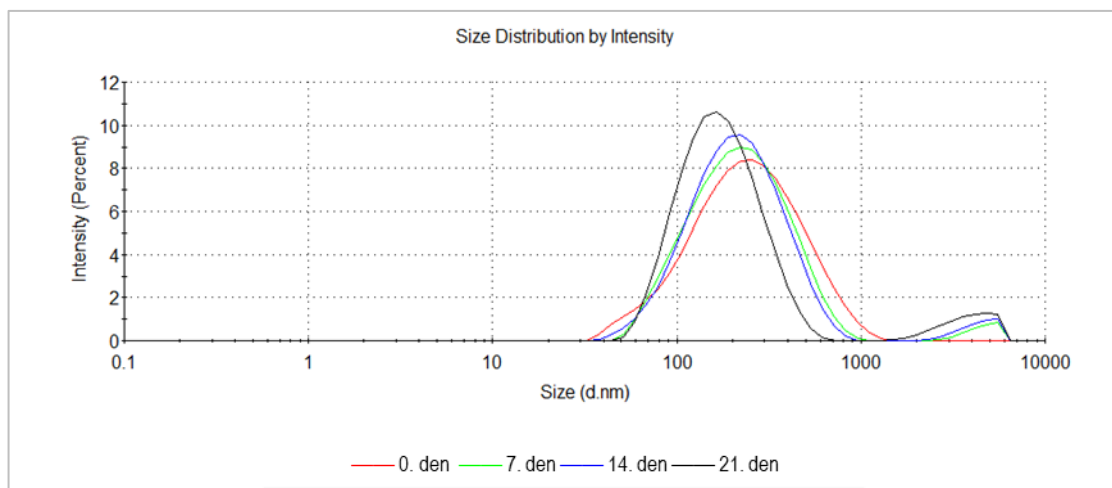
Na základě zjištěných hodnot je možné konstatovat, že transferosomy s TW si bez ohledu na složení lipidů membrány zachovávaly průměrnou velikost vezikul i po 21 dnech od přípravy. U formulací na bázi SP docházelo v průběhu skladování překvapivě ke snižování průměrné velikosti vezikul. Nejvyšší rozdíl byl stanoven u TF6 (SPC/CH-SP), kde průměrná velikost vezikul po 21 dnech skladování klesla z  $198 \pm 4 \text{ nm}$  na  $165 \pm 5 \text{ nm}$ , zároveň však byly u vzorku pozorovány změny v distribuci, které indikovaly postupný nárůst frakce vezikul o velikosti nad  $2 \mu\text{m}$  (Obr. 26).

Tab. 7. Průměrné hodnoty velikosti vezikul transferosomů stanovené ihned po přípravě, po 7, 14 a 21 dnech skladování při 4 °C

Formulace	Velikost [nm]			
	0 dnů	7 dnů	14 dnů	21 dnů
TF1 (SPC-TW)	95 ± 5	94 ± 2	96 ± 1	96 ± 2
TF2 (SPC-SP)	218 ± 6	206 ± 6	198 ± 3	194 ± 2
TF3 (DOPC-TW)	88 ± 1	88 ± 2	87 ± 1	88 ± 2
TF4 (DOPC-SP)	192 ± 2	184 ± 3	187 ± 3	180 ± 2
TF5 (SPC/CH-TW)	92 ± 2	93 ± 2	94 ± 1	94 ± 3
TF6 (SPC/CH-SP)	198 ± 4	192 ± 3	183 ± 7	165 ± 5

Tab. 8. Průměrné hodnoty zeta potenciálu transferosomů stanovené ihned po přípravě, po 7, 14 a 21 dnech skladování při 4 °C

Formulace	Zeta potenciál [mV]			
	0 dnů	7 dnů	14 dnů	21 dnů
TF1 (SPC-TW)	-7,2 ± 0,3	-8,0 ± 1,9	-10,3 ± 1,2	-10,8 ± 1,3
TF2 (SPC-SP)	-11,7 ± 0,7	-11,4 ± 0,9	-12,4 ± 1,5	-18,4 ± 1,7
TF3 (DOPC-TW)	-5,8 ± 0,1	-7,3 ± 1,2	-9,5 ± 0,9	-10,6 ± 1,5
TF4 (DOPC-SP)	-10,3 ± 0,7	-12,9 ± 0,8	-9,7 ± 0,8	-10,1 ± 1,2
TF5 (SPC/CH-TW)	-8,9 ± 1,0	-6,8 ± 0,9	-13,0 ± 1,0	-14,1 ± 0,8
TF6 (SPC/CH-SP)	-14,0 ± 1,3	-9,1 ± 1,2	-11,1 ± 0,3	-17,8 ± 1,0



Obr. 26. Změny v distribuci velikostí vezikul formulace TF6 (SPC/CH-SP) při skladování

V případě zeta potenciálu byly u vzorků zaznamenány časově podmíněné změny. Jeho nejvyššího poklesu bylo dosaženo u formulace TF2 (SPC-SP), kde hodnota zeta potenciálu klesla po 21 dnech skladování z původních  $-11,7 \pm 0,7$  mV na  $-18,4 \pm 1,7$  mV. Výraznější snížení bylo naměřeno i pro vzorek TF5 (SPC/CH-TW), u něhož potenciál klesl z  $-6,8 \pm 0,9$  mV až na  $-14,1 \pm 0,8$  mV. Velmi zajímavé chování vykazoval vzorek TF6 (SPC/CH-SP); potenciál po 7 dnech skladování vzrostl z  $-14,0 \pm 1,3$  mV na  $-9,1 \pm 1,2$  mV, v dalších týdnech však došlo k opětovnému poklesu až na  $-17,8 \pm 1,0$  mV.

Na základě vizuálního hodnocení (Obr. 27) nedocházelo u disperzí transferosomů s obsahem TW v membráně, na rozdíl od vzorků s SP, k projevům sedimentace po celou dobu skladování. Výsledky pozorování v tomto případě odpovídaly tvrzení o vysoké kinetické stabilitě transferosomů na bázi hydrofilních surfaktantů [45].

U obou formulací s DOPC došlo po 14 dnech k téměř úplnému odbarvení disperze, což svědčilo o degradaci nenasyceného terpenického řetězce molekul ASTX v těchto systémech. U ostatních vzorků byly degradační změny menší, jelikož v prvních 14 dnech ke změně barvy nedošlo. Tento závěr se však zakládá pouze na vizuálním hodnocení barevných změn a pro přesnější informace o možných změnách v chemické struktuře ASTX by bylo třeba provést jeho podrobnější charakterizaci.

Po 21 dnech skladování byla určitá míra změny zabarvení pozorována u všech formulací transferosomů s ASTX. Degradaci ASTX a karotenoidů se věnuje např. publikace Boona a kol. [121]. Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.1.1 věnující se charakteristice ASTX, omezená stabilita vůči působení zvýšených teplot, vzdušné oxidace a světelného záření poměrně limituje širší aplikace tohoto bioaktivního karotenoidu. Ve studii Yuana a kol. [122] vedla



inkorporace ASTX do inkluzního komplexu s hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrinem k podstatnému zvýšení jeho teplotní i oxidační stability, kromě toho komplex dosahoval, ve srovnání se samotným ASTX, vysoké rozpustnosti ve vodném prostředí (nad  $1,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

U vzorků TF2 (SPC-SP) a TF6 (SPC/CH-SP), kde byl použit jako aktivátor hran SP, došlo navíc k vytvoření sedimentu, což potvrzovalo změny v distribuci velikostí vezikul stanovené metodou DLS. Sedimentaci v disperzi transferosomů rovněž naznačily snímky z konfokální laserové mikroskopie (Obr. 15 až 17). Míra degradace ASTX byla v rámci sedimentu nicméně viditelně nižší. Potenciálním zdůvodněním zvýšené stability zmiňovaných vzorků může být vyšší míra kompatibility lipofilního ASTX s molekulami SP, resp. CH.



Obr. 27. Vizuelní srovnání vzorků transferosomů skladovaných při  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (horní snímek po 14 dnech skladování, spodní snímek po 21 dnech skladování); TF1 (SPC-TW), TF2 (SPC-SP), TF3 (DOPC-TW), TF4 (DOPC-SP), TF5 (SPC/CH-TW) a TF6 (SPC/CH-SP).

## ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývá problematikou transferosomů. Pozornost je věnována zejména složení, vlastnostem, metodám přípravy a současným aplikacím těchto vezikulárních nosičů. Teoretická část se dále zaměřuje na látky s antioxidačním účinkem vhodné pro enkapsulaci do transferosomů, konkrétně na karotenoidy a jejich zástupce ASTX.

V praktické části práce bylo s využitím třech různých lipidových systémů (SPC, DOPC a směsi SPC s CH v poměru 5 : 1, w/w) a dvou typů neionických surfaktantů (TW a SP) připraveno šest formulací transferosomů s enkapsulovaným ASTX kombinovanou metodou hydratace tenkého filmu a sonikace. U všech formulací byl dodržen fixní poměr lipid : surfaktant (90 : 10, w/w) a koncentrace ASTX byla nastavena na  $0,4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Pomocí optimalizovaných metod byly připravené systémy zcharakterizovány z pohledu průměrné velikosti vezikul, morfologie, míry polydisperzity, zeta potenciálu, účinnosti zachycení ASTX a stability. Antioxidační kapacita vzorků *in vitro* byla zhodnocena prostřednictvím metody zhášení radikálů DPPH, stanovení cytotoxicity *in vitro* bylo provedeno na myších embryonálních fibroblastech pomocí MTT testu.

Složení membrány transferosomů, zejména typ použitého surfaktantu, výrazně ovlivňoval vlastnosti výsledných vezikul. Formulace s obsahem TW dosahovaly bezprostředně po přípravě průměrných velikostí v rozmezí 88 až 95 nm a vykazovaly nižší míru polydisperzity ( $\text{PDI} < 0,25$ ); u formulací s SP byly stanovené průměrné hodnoty velikosti více než dvojnásobné (192 až 218 nm) a hodnoty PDI vyšší (0,29 až 0,35).

Všech šest formulací dosahovalo velmi vysoké účinnosti zachycení ASTX s hodnotami EE nad 80 %. V případě formulací s TW byly stanovené hodnoty EE obecně vyšší a konkrétně nejvyšší hodnota EE ( $98,1 \pm 0,6 \%$ ) byla dosažena u formulace TF1 (SPC-TW). Přítomnost molekul CH v membráně transferosomů nevedla k výraznému ovlivnění výsledných hodnot EE. Různé složení lipidů membrány mělo vliv na hodnoty EE pouze u transferosomů s lipofilním aktivátorem hran SP.

Důsledkem inkorporace molekul ASTX do membrány transferosomů byly změny zaznamenané v procesu zhášení radikálů DPPH. Transferosomy s ASTX tak, ve srovnání se vzorkem neenkapsulovaného ASTX v DMSO, prodlužovaly fázi postupného uvolňování ASTX do reakčního prostředí. Formulace s obsahem TW dosahovaly horší účinnosti zhášení, což

mohlo být způsobeno lepší solubilizací molekul ASTX do membrán vezikul a jejich pomalejším uvolňováním. Přítomnost CH ve fosfolipidové dvojvrstvě přispívala dále k její stabilizaci, a tedy i ke zpomalení procesu uvolňování ASTX.

Transferosomy s obsahem ASTX na bázi SPC nevykazovaly cytotoxický účinek při žádné ze studovaných koncentrací ASTX ve vzorku (4 až 80  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Pouze v případě formulací využívající DOPC klesly hodnoty životaschopnosti buněk při koncentraci ASTX 60  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  na hodnoty blízké hranici cytotoxicity a při koncentraci 80  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  byla tato hranice překročena. Tyto výsledky však mohly být způsobeny nedokonalým odstraněním organických rozpouštědel při přípravě disperzí transferosomů uvažovaných formulací.

Transferosomy využívající TW si i po 21 dnech skladování při 4 °C zachovávaly průměrné hodnoty velikosti vezikul a PDI. U formulací na bázi SP docházelo v průběhu skladování ke změnám ve velikosti vezikul. Zároveň byl u nich pozorován nárůst frakce o velikosti nad 1  $\mu\text{m}$ , jenž se projevoval viditelnou sedimentací a byl potvrzen i změnami v distribuci. I přes začlenění ASTX do membrány transferosomů byla pozorována jeho chemická degradace, která se projevila změnou barvy disperze transferosomů.

Na základě získaných studijních poznatků je však možné transferosomy na bázi SPC a TW, resp. SP považovat za slibné nosiče pro ASTX s obecně dobrou velikostní stabilitou a vysokou účinností zachycení tohoto karotenoidu při zachování jeho antioxidačních vlastností.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] CASANOVA, F., L. SANTOS. Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application – a review. *Journal of Microencapsulation* [online]. 2015, 33(1), 1-17 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.3109/02652048.2015.1115900. ISSN 0265-2048. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/02652048.2015.1115900>
- [2] OPATHA, S. A. T., V. TITAPIWATANAKUN et al. Transfersomes: A Promising Nanoencapsulation Technique for Transdermal Drug Delivery. *Pharmaceutics* [online]. 2020, 12(9), 1-23 [cit. 2021-10-28]. DOI: 10.3390/pharmaceutics12090855. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1999-4923/12/9/855>
- [3] FERNÁNDEZ-GARCÍA, R., A. LALATSA, L. STATTS et al. Transfersomes as nanocarriers for drugs across the skin: Quality by design from lab to industrial scale. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2020, 573(1), 1-15 [cit. 2021-10-21]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118817. ISSN 0378-5173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517319308622>
- [4] PRAUSNITZ, M. R., T. FRANZ, P. M. ELIAS et al. Skin Barrier and Transdermal Drug Delivery. In: BOLOGNIA, J. L., J. L. JORIZZO, J. V. SCHAFFER. *Dermatology* [online]. 3rd. Saunders Elsevier, 2012, s. 2065-2073 [cit. 2021-11-01]. ISBN 978-0723435716. Dostupné z: <http://drugdelivery.chbe.gatech.edu/Papers/2012/Prausnitz%20Derm%20Book%20Chapter%202012.pdf>
- [5] BANGHAM, A.D., R.W. HORNE. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology* [online]. 1964, 8(5), 660-668 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.1016/S0022-2836(64)80115-7. ISSN 00222836. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283664801157>
- [6] LI, J., X. WANG, T. ZHANG, C. WANG et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2015, 10(2), 81-98 [cit. 2021-10-29]. DOI: 10.1016/j.ajps.2014.09.004. ISSN 1818-0876. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1818087614000725>

- [7] AKBARZADEH, A., R. REZAEI-SADABADY, S. DAVARAN et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2013, 8(1), 1-9 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102. ISSN 1556-276X. Dostupné z: <https://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-8-102>
- [8] RAJAN, R., S. JOSE, V. P. BIJU MUKUND et al. Transferosomes – A vesicular transdermal delivery system for enhanced drug permeation. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* [online]. 2011, 2(3), 138-143 [cit. 2021-11-02]. DOI: 10.4103/2231-4040.85524. ISSN 2231-4040. Dostupné z: <http://www.japtr.org/text.asp?2011/2/3/138/85524>
- [9] XU, X., M. A. KHAN, D. J. BURGESS. Predicting hydrophilic drug encapsulation inside unilamellar liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2012, 423(2), 410-418 [cit. 2021-11-02]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.12.019. ISSN 0378-5173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517311011458>
- [10] SUNDARI, P. T., H. ANUSHREE. Novel delivery systems: current trend in cosmetic industry. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, [online]. 2017, 4(8), 617-627 [cit. 2021-11-02]. ISSN 2394-3211. Dostupné z: [https://www.ejpmr.com/home/abstract\\_id/2798](https://www.ejpmr.com/home/abstract_id/2798)
- [11] BARTELDIS, R., M. H. NEMATOLLAHI, T. POLS et al. Niosomes, an alternative for liposomal delivery. *PLOS ONE* [online]. 2018, 13(4), 1-18 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.1371/journal.pone.0194179. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0194179>
- [12] MASJEDI, M., T. MONTAHAEI. An illustrated review on nonionic surfactant vesicles (niosomes) as an approach in modern drug delivery: Fabrication, characterization, pharmaceutical, and cosmetic applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2021, 61(1), 1-22 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.1016/j.jddst.2020.102234. ISSN 17732247. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773224720315239>
- [13] ZHANG, Y.-T., L.-N. SHEN, Z.-H. WU et al. Comparison of ethosomes and liposomes for skin delivery of psoralen for psoriasis therapy. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2014, 471(1), 449-452 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.06.001. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517314004190>

- [14] RAI, S., V. PANDEY, G. RAI. Transfersomes as versatile and flexible nano-vesicular carriers in skin cancer therapy: the state of the art. *Nano Reviews & Experiments* [online]. 2017, 8(1), 1-18 [cit. 2021-11-02]. DOI: 10.1080/20022727.2017.1325708. ISSN 2002-2727. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20022727.2017.1325708>
- [15] KIM, B., H.-E. CHO, S. H. MOON et al. Transdermal delivery systems in cosmetics. *Biomedical Dermatology* [online]. 2020, 4(1), 1-12 [cit. 2021-11-01]. DOI: 10.1186/s41702-020-0058-7. ISSN 2398-8460. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s41702-020-0058-7>
- [16] DUDHIPALA, N., R. P. MOHAMMED et al. Effect of lipid and edge activator concentration on development of aceclofenac-loaded transfersomes gel for transdermal application: in vitro and ex vivo skin permeation. *Drug Development and Industrial Pharmacy* [online]. 2020, 46(8), 1334-1344 [cit. 2021-11-01]. DOI: 10.1080/03639045.2020.1788069. ISSN 0363-9045. Dostupné z: <https://doi:10.1080/03639045.2020.1788069>
- [17] JIANG, T., T. WANG, T. LI et al. Enhanced Transdermal Drug Delivery by Transfersome-Embedded Oligopeptide Hydrogel for Topical Chemotherapy of Melanoma. *ACS Nano* [online]. 2018, 12(10), 9693-9701 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.1021/acsnano.8b03800. ISSN 1936-0851. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.8b03800>
- [18] ISKANDARSYAH, I., A. D. RAHMI, D. M. PANGESTI. Comparison of the Characteristics of Transfersomes and Protransfersomes Containing Azelaic Acid. *Journal of Young Pharmacists* [online]. 2018, 10(2), 11-15 [cit. 2021-11-01]. DOI: 10.5530/jyp.2018.2s.3. ISSN 09751-483. Dostupné z: <https://www.jyoungpharm.org/article/1218>
- [19] GARG, V., H. SINGH, S. BIMBRAWH et al. Ethosomes and Transfersomes: Principles, Perspectives and Practices. *Current Drug Delivery* [online]. 2017, 14(5), 613-633 [cit. 2021-11-01]. DOI: 10.2174/1567201813666160520114436. ISSN 1567-2018. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/142368/article>
- [20] BARENHOLZ, Y., T. E. THOMPSON. Sphingomyelin: biophysical aspects. *Chemistry and Physics of Lipids* [online]. 1999, 102(1-2), 29-34 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.1016/S0009-3084(99)00072-9. ISSN 0009-3084. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009308499000729>

- [21] SAMAD, A., Y. SULTANA, M. AQIL. Liposomal Drug Delivery Systems: An Update Review. *Current Drug Delivery* [online]. 2007, 4(4), 297-305 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.2174/156720107782151269. ISSN 1567-2018. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/article/4991>
- [22] SAHOO, S. K., V. LABHASETWAR. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today* [online]. 2003, 8(24), 1112-1120 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.1016/S1359-6446(03)02903-9. ISSN 1359-6446. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644603029039>
- [23] TAYLOR, K. M. G., R. M. MORRIS. Thermal analysis of phase transition behaviour in liposomes. *Thermochimica Acta* [online]. 1995, 248(1), 289-301 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.1016/0040-6031(94)01884-J. ISSN 0040-6031. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/004060319401884J>
- [24] IKEDA, A., Y. KAWAI, J. KIKUCHI et al. Formation and regulation of fullerene-incorporation in liposomes under the phase transition temperature. *Organic & Biomolecular Chemistry* [online]. 2011, 9(8), 2622-2628 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.1039/c0ob01030h. ISSN 1477-0520. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c0ob01030h>
- [25] VAN HOOGEVEST, P., A. WENDEL. The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2014, 116(9), 1088-1107 [cit. 2021-11-01]. DOI: 10.1002/ejlt.201400219. ISSN 1438-7697. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejlt.201400219>
- [26] ISHIKAWA, S., I. TATEYA et al. The Distribution of Phosphatidylcholine Species in Superficial-Type Pharyngeal Carcinoma. *BioMed Research International* [online]. 2017, 2017(1), 1-10 [cit. 2021-11-01]. DOI: 10.1155/2017/5387913. ISSN 2314-6133. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/5387913>
- [27] WANG, J., Y. WEI, Y.-R. FEI et al. Preparation of mixed monoterpenes edge activated PEGylated transfersomes to improve the in vivo transdermal delivery efficiency of sinomenine hydrochloride. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2017, 533(1), 266-274 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.09.059. ISSN 0378-5173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517317309250>

- [28] RANGSIMAWONG, W., P. OPANASOPIT, T. ROJANARATA et al. Terpene-Containing PEGylated Liposomes as Transdermal Carriers of a Hydrophilic Compound. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* [online]. 2014, 37(12), 1936-1943 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.1248/bpb.b14-00535. ISSN 0918-6158. Dostupné z: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/37/12/37\\_b14-00535/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/37/12/37_b14-00535/_article)
- [29] ANGGRAINI, W., E. SAGITA, I. ISKANDARSYAH. Effect of hydrophilicity surfactants toward characterization and in vitro transfersomes penetration in gels using Franz diffusion test. *International Journal of Applied Pharmaceutics* [online]. 2017, 9(1), 112-115 [cit. 2021-11-01]. DOI: 10.22159/ijap.2017.v9s1.67\_74. ISSN 0975-7058. Dostupné z: <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijap/article/view/23308>
- [30] CHEN, J., W.-L. LU, W. GU et al. Skin permeation behavior of elastic liposomes: role of formulation ingredients. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2013, 10(6), 845-856 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.1517/17425247.2013.779252. ISSN 1742-5247. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425247.2013.779252>
- [31] DUANGJIT, S., P. OPANASOPIT, T. ROJANARATA et al. Effect of Edge Activator on Characteristic and in Vitro Skin Permeation of Meloxicam Loaded in Elastic Liposomes. *Advanced Materials Research* [online]. 2011, 194-196(2011), 537-540 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.194-196.537. ISSN 1662-8985. Dostupné z: <https://www.scientific.net/AMR.194-196.537>
- [32] KUMAR, G. P. a P. RAJESHWARRAO. Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery—an overview. *Acta Pharmaceutica Sinica B* [online]. 2011, 1(4), 208-219 [cit. 2021-11-01]. DOI: 10.1016/j.apsb.2011.09.002. ISSN 2211-3835. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211383511000815>
- [33] AHMED, T. A. Preparation of transfersomes encapsulating sildenafil aimed for transdermal drug delivery: Plackett–Burman design and characterization. *Journal of Liposome Research* [online]. 2014, 25(1), 1-10 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.3109/08982104.2014.950276. ISSN 0898-2104. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/08982104.2014.950276>



- [34] BALATA, G. F., M. M. FAISAL, H. A. ELGHAMRY et al. Preparation and Characterization of Ivabradine HCl Transfersomes for Enhanced Transdermal Delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2020, 60(1), 1-12 [cit. 2021-11-01]. DOI: 10.1016/j.jddst.2020.101921. ISSN 1773-2247. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773224720312107>
- [35] BNYAN, R., I. KHAN, T. EHTEZAZI, et al. Surfactant Effects on Lipid-Based Vesicles Properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2018, 107(5), 1237-1246 [cit. 2021-11-01]. DOI: 10.1016/j.xphs.2018.01.005. ISSN 0022-3549. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354918300054>
- [36] JANGDEY, M. S., A. GUPTA, S. SARAF et al. Development and optimization of apigenin-loaded transfersomal system for skin cancer delivery: in vitro evaluation. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* [online]. 2017, 45(7), 1452-1462 [cit. 2021-11-01]. DOI: 10.1080/21691401.2016.1247850. ISSN 2169-1401. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1080/21691401.2016.1247850>
- [37] CEVC, G. Transdermal Drug Delivery of Insulin with Ultradeflexible Carriers. *Clinical Pharmacokinetics* [online]. 2003, 42(5), 461-474 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.2165/00003088-200342050-00004. ISSN 0312-5963. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.2165/00003088-200342050-00004>
- [38] N'DA, D. Prodrug Strategies for Enhancing the Percutaneous Absorption of Drugs. *Molecules* [online]. 2014, 19(12), 20780-20807 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.3390/molecules191220780. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/12/20780>
- [39] CEVC, G., G. BLUME. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 1992, 1104(1), 226-232 [cit. 2021-11-01]. DOI: 10.1016/0005-2736(92)90154-E. ISSN 0005-2736. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000527369290154E>
- [40] GUILLOT, A. J., E. JORNET-MOLLÁ, N. LANDSBERG et al. Cyanocobalamin Ultraflexible Lipid Vesicles: Characterization and In Vitro Evaluation of Drug-Skin Depth Profiles. *Pharmaceutics* [online]. 2021, 13(3), 1-22 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.3390/pharmaceutics13030418. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/3/418>

- [41] OMAR, M. M., O. A. HASAN, A. M. EL SISI. Preparation and optimization of lidocaine transferosomal gel containing permeation enhancers: a promising approach for enhancement of skin permeation. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2019, 14(1), 1551-1562 [cit. 2021-11-01]. DOI: 10.2147/IJN.S201356. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <https://www.dovepress.com/preparation-and-optimization-of-lidocaine-transferosomal-gel-contains-peer-reviewed-article-IJN>
- [42] PANWAR, P., B. PANDEY, P. C. LAKHERA et al. Preparation, characterization, and in vitro release study of albendazole-encapsulated nanosize liposomes. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2010, 9(5), 101-108 [cit. 2021-11-01]. DOI: 10.2147/IJN.S8030. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/preparation-characterization-and-in-vitro-release-study-of-albendazole-peer-reviewed-article-IJN>
- [43] KUMAR, A. TRANSFEROSOME: A RECENT APPROACH FOR TRANSDERMAL DRUG DELIVERY. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* [online]. 2018, 8(5), 100-104 [cit. 2021-11-01]. DOI: 10.22270/jddt.v8i5-s.1981. ISSN 2250-1177. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.22270/jddt.v8i5-s.1981>
- [44] VAN ZYL, L., J. M. VILJOEN, R. K. HAYNES et al. Topical Delivery of Artemisone, Clofazimine and Decoquinat Encapsulated in Vesicles and Their In vitro Efficacy Against Mycobacterium tuberculosis. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2019, 20(1), 1-11 [cit. 2021-11-01]. DOI: 10.1208/s12249-018-1251-5. ISSN 1530-9932. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1208/s12249-018-1251-5>
- [45] HADIDI, N., M. SAFFARI, M. FAIZIC. Optimized Transferosomal Bovine Lactoferrin (BLF) as a Promising Novel Non-Invasive Topical Treatment for Genital Warts Caused by Human Papilloma Virus (HPV). *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* [online]. 2018, 17(2), 12-23 [cit. 2021-12-31]. ISSN 1726-6890. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6447872/>
- [46] FATHI-AZARBAYJANI, A., K. X. NG, Y. W. CHAN et al. Lipid Vesicles for the Skin Delivery of Diclofenac: Cerosomes vs. Other Lipid Suspensions. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* [online]. 2015, 5(1), 25-33 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.5681/apb.2015.004. ISSN 2251-7308. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4352220/>

- [47] BELFORT, G., C. S. LEE. Attractive and repulsive interactions between and within adsorbed ribonuclease A layers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1991, 88(20), 9146-9150 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.1073/pnas.88.20.9146. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.88.20.9146>
- [48] EDWARDS, K., M. JOHNSON, G. KARLSSON et al. Effect of polyethyleneglycol-phospholipids on aggregate structure in preparations of small unilamellar liposomes. *Biophysical Journal* [online]. 1997, 73(1), 258-266 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.1016/S0006-3495(97)78066-4. ISSN 0006-3495. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349597780664>
- [49] REIS, A., C. M. SPICKETT. Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2012, 1818(10), 2374-2387 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.02.002. ISSN 0005-2736. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273612000387>
- [50] FISHER, A. B., M. JAIN. Phospholipases: Degradation of Phospholipids in Membranes and Emulsions. In: *Encyclopedia of Life Sciences (eLS)* [online]. John Wiley, 2009, s. 1-8 [cit. 2022-04-25]. ISBN 978-0470015902. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0001394.pub2>
- [51] ZUIDAM, N. J., D. J. A. CROMMELIN. Chemical Hydrolysis of Phospholipids. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 1995, 84(9), 1113-1119 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.1002/jps.2600840915. ISSN 0022-3549. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915498934>
- [52] DHOPAVKAR, S., P. KADU. Transfersomes - a Boon for Transdermal Delivery. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2017, 4(09), 2908-2919 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.5281/zenodo.892229. ISSN 2349-7750. Dostupné z: <https://zenodo.org/record/892229#.Yc8mT2jMKUk>
- [53] WAGNER, A., K. VORAUER-UHL. Liposome Technology for Industrial Purposes. *Journal of Drug Delivery* [online]. 2011, 2011(1), 1-9 [cit. 2021-11-02]. DOI: 10.1155/2011/591325. ISSN 2090-3014. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/jdd/2011/591325/>

- [54] KRAFT, J. C., J. P. FREELING, Z. WANG et al. Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2014, 103(1), 29-52 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.1002/jps.23773. ISSN 0022-3549. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915307814>
- [55] CHAURASIYA, P., E. GANJU, N. UPMANYU et al. Transfersomes: a novel technique for transdermal drug delivery. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* [online]. 2019, 9(1), 279-285 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.22270/jddt.v9i1.2198. ISSN 2250-1177. Dostupné z: <http://jddtonline.info/index.php/jddt/article/view/2198>
- [56] EL ZAAFARANY, G. M., G. A. S. AWAD, S. M. HOLAYEL et al. Role of edge activators and surface charge in developing ultradeformable vesicles with enhanced skin delivery. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2010, 397(1-2), 164-172 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.06.034. ISSN 0378-5173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037851731000462X>
- [57] SHARMA, V., M. YUSUF, K. PATHAK. Nanovesicles for transdermal delivery of felodipine: Development, characterization, and pharmacokinetics. *International Journal of Pharmaceutical Investigation* [online]. 2014, 4(3), 119-130 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.4103/2230-973X.138342. ISSN 2230-973X. Dostupné z: <http://www.jpionline.org/index.php/ijpi/article/view/115>
- [58] BATZRI, S., E. D. KORN. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 1973, 298(4), 1015-1019 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.1016/0005-2736(73)90408-2. ISSN 0005-2736. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0005273673904082>
- [59] YANG, Y., R. OU, S. GUAN et al. A novel drug delivery gel of terbinafine hydrochloride with high penetration for external use. *Drug Delivery* [online]. 2014, 22(8), 1086-1093 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.3109/10717544.2013.878856. ISSN 1071-7544. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10717544.2013.878856>
- [60] CEVC, G. Transfersomes, Liposomes and Other Lipid Suspensions on the Skin: Permeation Enhancement, Vesicle Penetration, and Transdermal Drug Delivery. *Critical Reviews<sup>TM</sup> in Therapeutic Drug Carrier Systems* [online]. 1996, 13(3-4), 257-388 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v13.i3-4.30. ISSN 0743-4863. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9016383/>

- [61] SAHIL, K., S. PREMJEET, B. AJAY et al. Stealth liposomes: a review. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy* [online]. 2011, 2(5), 1534-1538 [cit. 2021-12-31]. ISSN 2229-3566. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/266225913>
- [62] SZOKA, F., D. PAPAHADJOPOULOS. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1978, 75(9), 4194-4198 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.1073/pnas.75.9.4194. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.75.9.4194>
- [63] CHEN, G., D. LI, Y. JIN et al. Deformable liposomes by reverse-phase evaporation method for an enhanced skin delivery of (+)-catechin. *Drug Development and Industrial Pharmacy* [online]. 2013, 40(2), 260-265 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.3109/03639045.2012.756512. ISSN 0363-9045. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03639045.2012.756512>
- [64] GULCIN, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology* [online]. 2020, 94(3), 651-715 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.1007/s00204-020-02689-3. ISSN 0340-5761. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00204-020-02689-3>
- [65] HOANG, H. T., J.-Y. MOON, Y.-C. LEE. Natural Antioxidants from Plant Extracts in Skincare Cosmetics: Recent Applications, Challenges and Perspectives. *Cosmetics* [online]. 2021, 8(4), 1-24 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.3390/cosmetics8040106. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2079-9284/8/4/106>
- [66] BHATT, T., K. PATEL. Carotenoids: Potent to Prevent Diseases Review. *Natural Products and Bioprospecting* [online]. 2020, 10(3), 109-117 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.1007/s13659-020-00244-2. ISSN 2192-2195. Dostupné z: <https://link.springer.com/10.1007/s13659-020-00244-2>
- [67] MAOKA, T. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines* [online]. 2020, 74(1), 1-16 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.1007/s11418-019-01364-x. ISSN 1340-3443. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11418-019-01364-x>

- [68] AMBATI, R., S.-M. PHANG, S. RAVI et al. Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review. *Marine Drugs* [online]. 2014, 12(1), 128-152 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.3390/md12010128. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1660-3397/12/1/128>
- [69] MEZZOMO, N., S. R. S. FERREIRA. Carotenoids Functionality, Sources, and Processing by Supercritical Technology: A Review. *Journal of Chemistry* [online]. 2016, 2016(1), 1-16 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.1155/2016/3164312. ISSN 2090-9063. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jchem/2016/3164312/>
- [70] HIGUERA-CIAPARA, I., L. FÉLIX-VALENZUELA, F. M. GOYCOOLEA. Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2006, 46(2), 185-196 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.1080/10408690590957188. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408690590957188>
- [71] JANNEL, S., Y. CARO, M. BERMUDEZ et al. Novel Insights into the Biotechnological Production of Haematococcus pluvialis-Derived Astaxanthin: Advances and Key Challenges to Allow Its Industrial Use as Novel Food Ingredient. *Journal of Marine Science and Engineering* [online]. 2020, 8(10), 1-48 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.3390/jmse8100789. ISSN 2077-1312. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2077-1312/8/10/789>
- [72] JAFARI, Z., A. BIGHAM, S. SADEGHI, et al. Nanotechnology-Aided Astaxanthin Formulations in Multimodal Therapeutic and Biomedical Applications. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2022, 65(1), 2-36 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c01144. ISSN 0022-2623. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.1c01144>
- [73] DHANKHAR, J., S. S. KADIAN, A. SHARMA. Astaxanthin: A potential carotenoid. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* [online]. 2012, 3(5), 1246-1259 [cit. 2021-12-31]. ISSN 0975-8232. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/265009819>

- [74] DONOSO, A., J. GONZÁLEZ-DURÁN, A. A. MUÑOZ et al. “Therapeutic uses of natural astaxanthin: An evidence-based review focused on human clinical trials”. *Pharmacological Research* [online]. 2021, 166(1), 1-12 [cit. 2021-11-02]. DOI: 10.1016/j.phrs.2021.105479. ISSN 1043-6618. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661821000633>
- [75] YANG, L., X. QIAO, J. GU et al. Influence of molecular structure of astaxanthin esters on their stability and bioavailability. *Food Chemistry* [online]. 2021, 343(1), 1-44 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128497. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814620323591>
- [76] BRODOSUDARMO, T. H. P., L. LIMANTARA, E. SETIYONO. Structures of Astaxanthin and Their Consequences for Therapeutic Application. *International Journal of Food Science* [online]. 2020, 2020(1), 1-16 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.1155/2020/2156582. ISSN 2356-7015. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/ijfs/2020/2156582/>
- [77] GOTO, S., K. KOGURE, K. ABE et al. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2001, 1512(2), 251-258 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.1016/S0005-2736(01)00326-1. ISSN 0005-2736. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273601003261>
- [78] RANGA RAO, A., R. L. RAGHUNATH REDDY, V. BASKARAN et al. Characterization of Microalgal Carotenoids by Mass Spectrometry and Their Bioavailability and Antioxidant Properties Elucidated in Rat Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2010, 58(15), 8553-8559 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.1021/jf101187k ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf101187k>
- [79] SOLOVCHENKO, A. E. Recent breakthroughs in the biology of astaxanthin accumulation by microalgal cell. *Photosynthesis Research* [online]. 2015, 125(3), 437-449 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.1007/s11120-015-0156-3. ISSN 0166-8595. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11120-015-0156-3>

- [80] SHAH, M. M. R., Y. LIANG, J. J. CHENG et al. Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2016, 7(1), 1-28 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.3389/fpls.2016.00531. ISSN 1664-462X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.00531/abstract>
- [81] KAMATH, B. S., B. M. SRIKANTA, S. M. DHARMESH et al. Ulcer preventive and antioxidative properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *European Journal of Pharmacology* [online]. 2008, 590(1-3), 387-395 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.1016/j.ejphar.2008.06.042. ISSN 0014-2999. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299908006328>
- [82] LIU, J., Z. SUN, H. GERKEN et al. *Chlorella zofingiensis* as an Alternative Microalgal Producer of Astaxanthin: *Biology and Industrial Potential*. *Marine Drugs* [online]. 2014, 12(6), 3487-3515 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.3390/md12063487. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1660-3397/12/6/3487>
- [83] FAKHRI, S., I. Y. ANEVA, M. H. FARZAEI et al. The Neuroprotective Effects of Astaxanthin: Therapeutic Targets and Clinical Perspective. *Molecules* [online]. 2019, 24(14), 1-19 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.3390/molecules24142640. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/14/2640>
- [84] GALASSO, C., I. OREFICE, P. PELLONE et al. On the Neuroprotective Role of Astaxanthin: New Perspectives?. *Marine Drugs* [online]. 2018, 16(8), 1-16 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.3390/md16080247. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1660-3397/16/8/247>
- [85] SUGANUMA, K., H. NAKAJIMA, M. OHTSUKI et al. Astaxanthin attenuates the UVA-induced up-regulation of matrix-metalloproteinase-1 and skin fibroblast elastase in human dermal fibroblasts. *Journal of Dermatological Science* [online]. 2010, 58(2), 136-142 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2010.02.009. ISSN 0923-1811. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923181110000538>
- [86] NIU, T., R. XUAN, L. JIANG et al. Astaxanthin Induces the Nrf2/HO-1 Antioxidant Pathway in Human Umbilical Vein Endothelial Cells by Generating Trace Amounts of ROS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2018, 66(6), 1551-1559 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b05493. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.7b05493>



- [87] PASTOREK, M., P. MÜLLER, B. VOJTĚŠEK. Nrf2 – Two Faces of Antioxidant System Regulation. *Klinická onkologie* [online]. 2015, 28(2), 2S26-2S31 [cit. 2022-04-25]. ISSN 0862-495X. DOI: 10.14735/amko20152S26. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/klinicka-onkologie-journal/search-for-articles/skupina/a/zobrazit/ids/4746/>
- [88] TAVASSOLIFAR, M. J., M. VODJGANI, Z. SALEHI et al. The Influence of Reactive Oxygen Species in the Immune System and Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Autoimmune Diseases* [online]. 2020, 2020(1), 1-14 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.1155/2020/5793817. ISSN 2090-0422. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/ad/2020/5793817/>
- [89] CHEN, Z., J. XIAO, H. LIU, K. YAO et al. Astaxanthin attenuates oxidative stress and immune impairment in d -galactose-induced aging in rats by activating the Nrf2/Keap1 pathway and suppressing the NF-κB pathway. *Food & Function* [online]. 2020, 11(9), 8099-8111 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.1039/D0FO01663B. ISSN 2042-6496. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=D0FO01663B>
- [90] COUTEAU, C., L. COIFFARD. Microalgal Application in Cosmetics. In: LEVINE, I. A., J. FLEURENCE. *Microalgae in Health and Disease Prevention* [online]. 1. Elsevier, 2018, s. 317-323 [cit. 2022-04-25]. ISBN 978-0128114056. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128114056000153>
- [91] SOTIROPOULOU, G., E. ZINGKOU, G. PAMPALAKIS. Redirecting drug repositioning to discover innovative cosmeceuticals. *Experimental Dermatology* [online]. 2021, 30(5), 628-644 [cit. 2022-04-25]. DOI:10.1111/exd.14299. ISSN 0906-6705. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/exd.14299>
- [92] YAMASHITA, E. The effects of a dietary supplement containing astaxanthin on skin condition. *Food Style 21* [online]. 2005, 9(9), 91-95 [cit. 2022-04-25]. ISSN 1343-9502. Dostupné z: [https://www.bonaloka.cz/userfiles/ageoff-astaxanthin\\_wrinkle-reduction-study\\_1543497957727.pdf](https://www.bonaloka.cz/userfiles/ageoff-astaxanthin_wrinkle-reduction-study_1543497957727.pdf)
- [93] TOMINAGA, K., N. HONGO, M. KARATO et al. Cosmetic benefits of astaxanthin on human subjects. *Acta Biochimica Polonica* [online]. 2012, 59(1), 43-47 [cit. 2022-05-08]. DOI: 10.18388/abp.2012\_2168. ISSN 1734-154X. Dostupné z: [http://www.actabp.pl/pdf/1\\_2012/43.pdf](http://www.actabp.pl/pdf/1_2012/43.pdf)

- [94] LYONS, N. M., N. M. O'BRIEN. Modulatory effects of an algal extract containing astaxanthin on UVA-irradiated cells in culture. *Journal of Dermatological Science* [online]. 2002, 30(1), 73-84 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.1016/S0923-1811(02)00063-4. ISSN 0923-1811. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923181102000634>
- [95] VEERURAJ, A., L. LIU, J. ZHENG et al. Evaluation of astaxanthin incorporated collagen film developed from the outer skin waste of squid *Doryteuthis singhalensis* for wound healing and tissue regenerative applications. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2019, 95, 29-42 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.1016/j.msec.2018.10.055. ISSN 0928-4931. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493118305927>
- [96] TAKEUNGWONGTRAKUL, S., S. BENJAKUL. Astaxanthin degradation and lipid oxidation of Pacific white shrimp oil: kinetics study and stability as affected by storage conditions. *International Aquatic Research* [online]. 2016, 8(1), 15-27 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.1007/s40071-015-0120-z. ISSN 2008-4935. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s40071-015-0120-z>
- [97] AHAD, A., A. A. AL-SALEH, A. M. AL-MOHIZEA et al. Formulation and characterization of novel soft nanovesicles for enhanced transdermal delivery of eprosartan mesylate. *Saudi Pharmaceutical Journal* [online]. 2017, 25(7), 1040-1046 [cit. 2022-04-25]. DOI:10.1016/j.jsps.2017.01.006. ISSN 1319-0164. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1319016417300208>
- [98] ASCENSO, A., A. SALGADO, C. EULETÉRIO et al. In vitro and in vivo topical delivery studies of tretinoin-loaded ultradeformable vesicles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2014, 88(1), 48-55 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.1016/j.ejpb.2014.05.002. ISSN 0939-6411. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641114001519>
- [99] DAS, B., S. SEN, R. MAJÍ et al. Transferosomal gel for transdermal delivery of risperidone: Formulation optimization and ex vivo permeation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2017, 38(1), 59-71 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.1016/j.jddst.2017.01.006. ISSN 1773-2247. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773224716306256>

- [100] MAJI, R., C. A. OMOLO, Y. JAGLAL et al. A transferosome-loaded bigel for enhanced transdermal delivery and antibacterial activity of vancomycin hydrochloride. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2021, 607(1), 1-12 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120990. ISSN 0378-5173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517321007961>
- [101] KHATOON, K., M. RIZWANULLAH, S. AMIN et al. Cilnidipine loaded transferosomes for transdermal application: Formulation optimization, in-vitro and in-vivo study. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2019, 54(1), 1-35 [cit. 2022-04-25]. DOI:10.1016/j.jddst.2019.101303. ISSN 1773-2247. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773224719310135>
- [102] CHEN, M., M. A. SHAMIM, A. SHAHID et al. Topical Delivery of Carvedilol Loaded Nano-Transfersomes for Skin Cancer Chemoprevention. *Pharmaceutics* [online]. 2020, 12(12), 1-17 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.3390/pharmaceutics12121151. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1999-4923/12/12/1151>
- [103] AVADHANI, K. S., J. MANIKKATH, M. TIWARI, et al. Skin delivery of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and hyaluronic acid loaded nano-transfersomes for antioxidant and anti-aging effects in UV radiation induced skin damage. *Drug Delivery* [online]. 2017, 24(1), 61-74 [cit. 2021-12-31]. DOI: 10.1080/10717544.2016.1228718. ISSN 1071-7544. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10717544.2016.1228718>
- [104] MANCA, M. L., M. FIROZNEZHAD, C. CADDEO et al. Phytocomplexes extracted from grape seeds and stalks delivered in phospholipid vesicles tailored for the treatment of skin damages. *Industrial Crops and Products* [online]. 2019, 128(1), 471-478 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.11.052. ISSN 0926-6690. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669018310288>
- [105] PANDIT, A. P., S. B. OMASE, V. M. MUTE. A chitosan film containing quercetin-loaded transfersomes for treatment of secondary osteoporosis. *Drug Delivery and Translational Research* [online]. 2020, 10(5), 1495-1506 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.1007/s13346-020-00708-5. ISSN 2190-393X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13346-020-00708-5>

- [106] HSIEH, W.-C., C.-W. FANG, M. SUHAIL et al. Improved skin permeability and whitening effect of catechin-loaded transfersomes through topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2021, 607(1), 1-7 [cit. 2022-04-25]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.121030. ISSN 0378-5173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037851732100836X>
- [107] GOLDBURG, W. I. Dynamic light scattering. *American Journal of Physics* [online]. 1999, 67(12), 1152-1160 [cit. 2022-05-07]. DOI: 10.1119/1.19101. ISSN 0002-9505. Dostupné z: <http://aapt.scitation.org/doi/10.1119/1.19101>
- [108] STETEFELD, J., S. A. MCKENNA, T. R. PATEL. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews* [online]. 2016, 8(4), 409-427 [cit. 2022-05-07]. DOI: 10.1007/s12551-016-0218-6. ISSN 1867-2450. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12551-016-0218-6>
- [109] KASZUBA, M., D. MCKNIGHT, M. T. CONNAH et al. Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. *Journal of Nanoparticle Research* [online]. 2008, 10(5), 823-829 [cit. 2022-05-07]. DOI: 10.1007/s11051-007-9317-4. ISSN 1388-0764. Dostupné z: <https://link.springer.com/10.1007/s11051-007-9317-4>
- [110] KASZUBA, M., J. CORBETT, F. M. WATSON et al. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* [online]. 2010, 368(1927), 4439-4451 [cit. 2022-05-07]. DOI: 10.1098/rsta.2010.0175. ISSN 1364-503X. Dostupné z: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsta.2010.0175>
- [111] MINTON, A. P. Recent applications of light scattering measurement in the biological and biopharmaceutical sciences. *Analytical Biochemistry* [online]. 2016, 501(1), 4-22 [cit. 2022-05-07]. DOI: 10.1016/j.ab.2016.02.007. ISSN 0003-2697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269716000683>
- [112] SZE, A., D. ERICKSON, L. REN et al. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2003, 261(2), 402-410 [cit. 2022-05-07]. DOI: 10.1016/S0021-9797(03)00142-5. ISSN 0021-9797. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979703001425>

- [113] PAN, L., S. ZHANG, K. GU et al. Preparation of astaxanthin-loaded liposomes: characterization, storage stability and antioxidant activity. *CyTA - Journal of Food* [online]. 2018, 16(1), 607-618 [cit. 2022-05-07]. DOI: 10.1080/19476337.2018.1437080. ISSN 1947-6337. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19476337.2018.1437080>
- [114] PAULOVÁ, H., H. BOCHOŘÁKOVÁ, E. TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy* [online]. 2004, 98(4), 174-179 [cit. 2022-05-07]. ISSN 0009-2770. Dostupné z: [http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004\\_04\\_03.pdf](http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf)
- [115] SHEIKH, H. I., B. YOUSEF AL-TARIFI, A. MAHMOOD et al. Comparison of Different Organic Solvents on Antioxidant Activity of Astaxanthin Extracted from *Hematococcus pluvialis* Using Colorimetric and Non-colorimetric Methods. *Oriental Journal of Chemistry* [online]. 2020, 36(03), 466-473 [cit. 2022-05-07]. DOI: 10.13005/ojc/360316. ISSN 097-0020X. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/342634098>
- [116] GHASEMI, M., T. TURNBULL, S. SEBASTIAN et al. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, 22(23), 1-30 [cit. 2022-05-07]. DOI: 10.3390/ijms222312827. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/23/12827>
- [117] KHAN, I., R. NEEDHAM, S. YOUSAF et al. Impact of phospholipids, surfactants and cholesterol selection on the performance of transfersomes vesicles using medical nebulizers for pulmonary drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2021, 66(1), 1-12 [cit. 2022-05-10]. DOI: 10.1016/j.jddst.2021.102822. ISSN 1773-2247. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773224721005025?via%3Dihub>
- [118] ESTUPIÑAN, O. R., P. GARCIA-MANRIQUE, M. C. BLANCO-LOPEZ et al. Vitamin D3 Loaded Niosomes and Transfersomes Produced by Ethanol Injection Method: Identification of the Critical Preparation Step for Size Control. *Foods* [online]. 2020, 9(10), 1-18 [cit. 2022-05-10]. DOI: 10.3390/foods9101367. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/10/1367>

- [119] CHANG, H.-I., C.-W. SHAO, E. HUANG et al. Development of Astaxanthin-Loaded Nanosized Liposomal Formulation to Improve Bone Health. *Pharmaceuticals* [online]. 2022, 15(4), 1-16 [cit. 2022-05-10]. DOI: 10.3390/ph15040490. ISSN 1424-8247. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1424-8247/15/4/490>
- [120] SHIMOKAWA, T., M. YOSHIDA, T. FUKUTA et al. Efficacy of high-affinity liposomal astaxanthin on up-regulation of age-related markers induced by oxidative stress in human corneal epithelial cells. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* [online]. 2019, 64(1), 27-35 [cit. 2022-05-10]. DOI: 10.3164/jcbtn.18-27. ISSN 0912-0009. Dostupné z: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jcbtn/64/1/64\\_18-27/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jcbtn/64/1/64_18-27/_article)
- [121] BOON, C. S., D. J. MCCLEMENTS, J. WEISS et al. Factors Influencing the Chemical Stability of Carotenoids in Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2010, 50(6), 515-532 [cit. 2022-05-12]. DOI: 10.1080/10408390802565889. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408390802565889>
- [122] YUAN, C., Z. JIN, X. XU et al. Preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Food Chemistry* [online]. 2008, 109(2), 264-268 [cit. 2022-05-12]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.07.051. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814607007510?via%3Dihub>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

ASTX	Astaxanthin
pH	Vodíkový exponent
SC	<i>Stratum corneum</i>
Log P	Dekadický logaritmus rozdělovacího koeficientu oktanol/voda
PAL	Povrchově aktivní látka
PE	Fosfatidylethanolamin
PS	Fosfatidylserin
PC	Fosfatidylcholin
EPC	Vaječný fosfatidylcholin
SPC	Sójový fosfatidylcholin
DMPC	1,2-dimyristoyl fosfatidylcholin
DPPC	1,2-palmitoyl fosfatidylcholin
DPPG	1,2-palmitoyl fosfatidylglycerol
T <sub>c</sub>	Teplota fázového přechodu
DSPC	1,2-stearoyl fosfatidylcholin
DOPC	1,2-dioleoyl fosfatidylcholin
DPPE	1,2-palmitoyl fosfatidylethanolamin
HSPC	Hydrogenovaný sójový fosfatidylcholin
ESM	Vaječný sfingomyelin
DLPC	1,2-lauroyl fosfatidylcholin
DMPG	1,2-myristoyl fosfatidylglycerol
DOPG	1,2-dioleoyl fosfatidylglycerol
DSPG	1,2-stearoyl fosfatidylglycerol
DMPE	1,2-myristoyl fosfatidylethanolamin
DOPE	1,2-dioleoyl fosfatidylethanolamin

---

DMPS	1,2-myristoyl fosfatidylserin
DPPS	1,2-palmitoyl fosfatidylserin
DOPS	1,2-dioleoyl fosfatidylserin
HLB	Hydrofilně-lipofilní rovnováha
PDI	Index polydisperzity
PEG	Polyethylenglykol
ROS	Reaktivní formy kyslíku
UV	Ultrafialový
MMP	Matricová metaloproteináza
DNA	Kyselina deoxyribonukleová
CH	Cholesterol
TW	Tween® 80 – polyoxyethylen-80-sorbitan monooleát
SP	Span® 80 – sorbitan monooleát
PBS	Fosfátem pufovaný fyziologický roztok
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPH	2,2-difenyl-1-pikryl hydrazyl
DPPH-H	2,2-difenyl-1-pikryl hydrazin
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-difenyl-2H-tetrazoliumbromid
DLS	Dynamický rozptyl světla
D	Translační difúzní koeficient
d(H)	Hydrodynamický průměr
k	Boltzmannova konstanta
T	Termodynamická teplota
$\eta$	Dynamická viskozita
ELS	Elektroforetický rozptyl světla
TEM	Transemisní elektronová mikroskopie



EE	Enkapsulační účinnost
C	Koncentrace
AE	Antioxidační účinnost
A	Absorbance
RCV	Relativní životaschopnost buněk

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<i>Obr. 1. Schématické znázornění struktury transferosomu [upraveno dle 15]</i> .....	13
<i>Obr. 2. Sorbitan monooleát (Span® 80)</i> .....	18
<i>Obr. 3. Polyoxyethylen-80-sorbitan monooleát (Tween® 80)</i> .....	18
<i>Obr. 4. Schéma prostupu transferosomu skrze SC</i> .....	21
<i>Obr. 5. Polohy působení jednotlivých typů fosfolipáz [50]</i> .....	24
<i>Obr. 6. Molekula ASTX</i> .....	29
<i>Obr. 7. Odpaření organické fáze a tvorba tenkého filmu</i> .....	39
<i>Obr. 8. Hydratovaná primární disperze transferosomů s obsahem ASTX</i> .....	39
<i>Obr. 9. Srovnání připravených tenkých filmů (vlevo SPC-TW, vpravo SPC/CH-TW)</i> .....	47
<i>Obr. 10. Vizuální srovnání finálních formulací transferosomů bezprostředně po přípravě; TF1 (SPC-TW), TF2 (SPC-SP), TF3 (DOPC-TW), TF4 (DOPC-SP), TF5 (SPC/CH-TW) a TF6 (SPC/CH-SP)</i> .....	48
<i>Obr. 11. Vliv doby sonikace na distribuci transferosomů SPC-SP (90 : 10, w/w)</i> .....	49
<i>Obr. 12. Vliv doby sonikace na distribuci transferosomů SPC-TW (90 : 10, w/w)</i> .....	49
<i>Obr. 13. Vliv doby sonikace na distribuci transferosomů SPC-TW (95 : 5, w/w)</i> .....	50
<i>Obr. 14. Vliv doby sonikace na distribuci transferosomů SPC-TW (85 : 15, w/w)</i> .....	50
<i>Obr. 15. Aglomeráty vezikul transferosomů formulace TF2 (SPC-SP) pozorované konfokální mikroskopií v transmisním módu (60× zvětšení)</i> .....	52
<i>Obr. 16. Aglomeráty vezikul transferosomů formulace TF4 (DOPC-SP) pozorované konfokální mikroskopií v transmisním módu (60× zvětšení)</i> .....	52
<i>Obr. 17. Aglomeráty vezikul transferosomů formulace TF6 (SPC/CH-SP) pozorované konfokální mikroskopií v transmisním módu (60× zvětšení)</i> .....	53
<i>Obr. 18. Vezikuly transferosomů formulace TF1 (SPC-TW) pozorované metodou TEM</i> ...	53
<i>Obr. 19. Vezikula transferosomu formulace TF1 (SPC-TW) pozorovaná metodou TEM</i> ...	54
<i>Obr. 20. Absorpční spektrum ASTX v acetonu</i> .....	55
<i>Obr. 21. Kalibrační přímka ASTX v acetonu ze spektrofotometrického stanovení</i> .....	55

- Obr. 22. Srovnání vlivu lipidového složení membrány transferosomů s obsahem TW na hodnoty AE připravených formulací; referenci představuje neenkapsulovaný ASTX v DMSO.....*58
- Obr. 23. Srovnání vlivu lipidového složení membrány transferosomů s obsahem SP na hodnoty AE připravených formulací; referenci představuje neenkapsulovaný ASTX v DMSO.....*59
- Obr. 24. Srovnání hodnot RCV u formulací transferosomů s obsahem TW – TF1, TF3 a TF5 (reference odpovídající 100% životaschopnosti buněk - - -; hranice cytotoxicity —).....*61
- Obr. 25. Srovnání hodnot RCV u formulací transferosomů s obsahem SP – TF2, TF4 a TF6 (reference odpovídající 100% životaschopnosti buněk - - -; hranice cytotoxicity —).....*61
- Obr. 26. Změny v distribuci velikostí vezikul formulace TF6 (SPC/CH-SP) při skladování ..... 64*
- Obr. 27. Vizuální srovnání vzorků transferosomů skladovaných při 4 °C (horní snímek po 14 dnech skladování, spodní snímek po 21 dnech skladování) ); TF1 (SPC-TW), TF2 (SPC-SP), TF3 (DOPC-TW), TF4 (DOPC-SP), TF5 (SPC/CH-TW) a TF6 (SPC/CH-SP).....*65

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1. Přehled hodnot <math>T_c</math> pro vybrané fosfolipidy [6, 21, 23, 24].....</i>	16
<i>Tab. 2. Navážky ingrediencí pro přípravu 5 ml transferosomálních disperzí .....</i>	40
<i>Tab. 3. Průměrná velikost vezikul, hodnota PDI a zeta potenciálu připravených formulací s fixním poměrem lipid : aktivátor (90 : 10, w/w) po sonikaci (120 s).....</i>	51
<i>Tab. 4. Průměrné hodnoty enkapsulační účinnosti (EE) připravených formulací transferosomů s obsahem ASTX .....</i>	56
<i>Tab. 5. Hodnoty antioxidační účinnosti (AE) připravených transferosomů a referenčního vzorku roztoku ASTX v DMSO (REF) stanovené v časových intervalech 1 až 24 hodin.....</i>	57
<i>Tab. 6. Hodnoty relativní životaschopnosti buněk (RCV) po inkubaci se vzorky transferosomů s různou koncentrací ASTX.....</i>	60
<i>Tab. 7. Průměrné hodnoty velikosti vezikul transferosomů stanovené ihned po přípravě, po 7, 14 a 21 dnech skladování při 4 °C.....</i>	63
<i>Tab. 8. Průměrné hodnoty zeta potenciálu transferosomů stanovené ihned po přípravě, po 7, 14 a 21 dnech skladování při 4 °C.....</i>	63

