

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Studijní program: Fyzikální chemie

Specializace: Biofyzikální chemie



Bc. Tereza Ulrichová

Lipidické nanoformulace pro dopravu derivátů naftochinonů pro léčbu
lupénky

Lipid-based nanoparticles for the delivery of naphthoquinone derivatives
for the treatment of psoriasis

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: doc. Mgr. Martin Hrubý, Ph.D., DSc.

Praha 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroj a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat všem, kteří mi v průběhu magisterského studia pomohli k nabytí nesčetného množství zkušeností a získání dat, které vedly k sepsání této práce, a také těm, kteří mě podporovali, abych se neustále rozvíjela a nadále se věnovala studiu chemie.

Největší poděkování patří mému školiteli doc. Mgr. Martinu Hrubému, Ph.D., DSc. za odborné vedení a korektury mé diplomové práce a za čas, který mi věnoval v rámci konzultací. Zároveň bych také chtěla poděkovat všem lidem na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR, kteří mi byli nápomocni v řešení potíží, které bylo třeba v průběhu mého působení v laboratoři překonat. Velké dík patří celému týmu vědeckého oddělení „Nadmolekulárních polymerních systémů“, kterého jsem mohla být po dobu 2 let součástí, za podporu a i rady ze strany zkušenějších. Výsledky práce by nebylo možné sepsat ani bez pomoci pracovníků ze servisně výzkumné skupiny pod vedením RNDr. Olgy Trhlíkové, PhD. Mockrát jim tímto děkuji.

Na závěr bych také ráda poděkovala své rodině za podporu a důvěru v rámci celého mého studia na Univerzitě Karlově v Praze.

Abstrakt

Lupénka (psoriáza) je autoimunitní chronické kožní onemocnění s globální prevalencí kolem 2–4%. Farmakologická léčba slouží především k potlačení symptomů onemocnění. Řada léčiv má však zásadní vedlejší účinky a mnohdy musí být od terapie upuštěno. Na druhou stranu pokroky v porozumění patofyziologie lupénky poukázaly na několik molekulárních cílů, na které se budoucí léčba může zaměřit.

Tradiční čínská medicína na lupénku používá bylinné extrakty obsahující různé 1,4-naftochinony. Tyto naftochinony přitáhly velkou pozornost farmaceutického průmyslu pro svou strukturní rozmanitost a široký rozsah farmakologických účinků. Barevné 1,4-naftochinony shikonin, juglon a jejich deriváty byly testovány již na řadě buněčných linií a zvířecích modelů. Problémem je jejich omezená rozpustnost ve vodě, termolabilita a náchylnost k oxidaci a polymeraci. Topickou aplikaci komplikuje jejich silná vazba na svrchní vrstvu kůže, která způsobuje obtížně smytelné zabarvení kůže a snižuje jejich penetraci do hlubších vrstev kůže, kde je potřebný jejich terapeutický efekt. Pro řešení těchto potíží byla v této práci navržena bezbarvá proléčiva na bázi peracetylovaných dihydroderivátů těchto naftochinonů a zároveň nanoformulací na bázi lipidů pro jejich solubilizaci. . Výhodou takovýchto nanosystémů je jejich schopnost selektivně pronikat do postižené tkáně (např. léze lupénky) a eliminovat řadu nežádoucích účinků. Systémy byly připraveny a detailně studovány řadou pokročilých instrumentálních fyzikálně-chemických metod.

Klíčová slova

Nanočástice, shikonin, juglon, lupénka

Abstract

Psoriasis is an autoimmune chronic skin disease with a global prevalence of around 2–4%. Pharmacological treatment currently serves mainly to suppress the symptoms of the disease. However, many drugs have major side effects and therapy must often be discontinued. On the other hand, advances in understanding the pathophysiology of psoriasis have pointed out several molecular targets to be considered for future treatment.

Traditional Chinese medicine has been using herbal extracts containing various types of 1,4-naphthoquinones for psoriasis treatment. These naphthoquinones have attracted much attention from the pharmaceutical industry for their structural diversity and wide range of pharmacological effects. Colored 1,4-naphthoquinones shikonin, juglon and their derivatives have already been tested on a numerous cell lines and animal models. The problem is their limited solubility in water, thermolability and susceptibility to oxidation and polymerization. Topical application is complicated by their strong binding to the upper layer of the skin, which causes skin discoloration that is difficult to wash off and reduces their penetration into the deeper layers of the skin, where their therapeutic effect is needed. To solve these problems, we developed within this thesis colorless prodrugs based on peracetylated dihydroderivatives of these naphthoquinones solubilized into nanoformulations based on lipids. The advantage of such nanosystems is their ability to selectively penetrate the affected tissue (e.g. psoriasis lesions) and eliminate a number of adverse effects. The systems were prepared and characterized in detail by number of advanced physico-chemical methods.

Keywords

Nanoparticles, shikonin, juglon, psoriasis

[IN CZECH]

Obsah

Seznam zkratek.....	10
1 Literární přehled	13
1.1 Lupénka.....	13
1.1.1 Komplikace a přidružená onemocnění lupénky	14
1.1.2 Patofyziologie a mechanismus	15
1.2 Léčba lupénky.....	21
1.2.1 Diagnostika a screening	21
1.2.2 Farmakologická léčba.....	22
1.3 Naftochinony.....	28
1.3.1 Mechanismy působení	28
1.3.2 Biologické účinky	32
1.3.3 Toxicita naftochinonů	38
1.3.4 Shikonin a jeho deriváty.....	39
1.4 Nanosystémy pro cílenou dopravu léčiv na lupénku.....	40
1.4.1 Nanosystémy na lipidové bázi	40
1.4.2 Způsoby přípravy lipozomů	44
1.5 Teoretické principy metod charakterizace nanočástic	49
1.5.1 Dynamický rozptyl světla (DLS).....	50
1.5.2 Měření ζ (zeta)-potenciálu	51
1.5.3 Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)	52
1.5.4 Elektronová mikroskopie (EM)	54
1.5.5 Metody pro kvantitativní analýzu léčiva v nanočásticích.....	55
2 Cíle práce	62
2.1 Motivace	62
2.2 Souhrn cílů	63
3 Materiál a metody.....	64
3.1 Použité chemikálie.....	64
3.3 Syntéza proléčiv a metody charakterizace.....	66
3.3.1 Syntéza peracetylovaného dihydrojuglonu (AJ)	66
3.3.2 Syntéza peracetylovaného dihydroshikoninu (ASH)	67
3.3.3 Spektroskopie nukleární magnetická rezonance (NMR)	69
3.3.4 Hmotnostní spektrometrie (MS)	69
3.3.5 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR).....	70
3.3.6 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	70

3.3.7	Elementární analýza (EA)	71
3.4	Příprava lipidických nanoformulací a metody charakterizace	72
3.4.1	Příprava nanoformulace metodou vstřikování rozpouštědla	72
3.4.2	Dynamický rozptyl světla (DLS) a měření ζ -potenciálu	74
3.4.3	Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)	74
3.4.4	Kvantifikace pomocí UV-VIS spektrofotometrie	75
3.4.5	Kvantifikace pomocí HPLC	76
3.4.6	Kvantifikace pomocí NMR spektroskopie	78
3.4.7	Kvantifikace pomocí GC-MS	79
3.4.8	Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)	80
3.4.9	Kinetika uvolňování léčiva z nanočástic	80
4	Výsledky a diskuze	81
4.1	Příprava a fyzikálně-chemická charakterizace proléčiv	81
4.1.1	Peracetylovaný dihydrojuglon (AJ)	81
4.1.2	Peracetylovaný dihydroshikonin (ASH)	83
4.2	Příprava a fyzikálně-chemická charakterizace nanoformulací	86
4.2.1	DLS a ζ -potenciál	87
4.2.2	FCS	90
4.2.3	Kvantifikace pomocí UV-VIS spektrofotometrie	91
4.2.4	Kvantifikace pomocí HPLC	94
4.2.5	Kvantifikace pomocí NMR spektroskopie	96
4.2.6	Kvantifikace pomocí GC-MS	97
4.2.7	Cryo-TEM	102
4.2.8	Kinetika uvolňování léčiva z nanočástic	103
5	Závěr	104
6	Seznam literatury	105

Seznam zkratek

ACN	acetonitril
AJ	peracetylovaný dihydrojuglon
AMK	aminokyselina
ASH	peracetylovaný dihydroshikonin
ATP	adenosintrifosfát
ATR	tlumený totální odraz, z angl. <i>attenuated total reflection</i>
BMI	index tělesné hmotnosti (z angl. <i>Body Mass Index</i>)
BSA	povrch těla, z angl. <i>Body Surface Area</i>
C ₁₈	n-oktadecylová skupina
C ₈	n-oktylová skupina
CAMP	kationtové antimikrobiální peptidy (z angl. <i>cationic antimicrobial peptides</i>)
cAMP	cyklický adenosimonofosfát
CARD14	z angl. <i>caspase recruitment domain-containing protein 14</i>
CASPAR	klasifikační kritéria pro psoriatickou artritidu, z angl. <i>Classification Criteria for Psoriatic Arthritis</i>
CCL20	CC-chemokinový ligand 20
DCTB	trans-2-[3-(4-t-butyl-fenyl)-2-methyl-2-propenyliden]malonitril
DL	obsah léčiva v systému, z angl. <i>drug loading</i>
DLS	dynamický rozptyl světla
DMF	dimethylester kyseliny fumarové
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EA	elementární analýza
EE	účinnost enkapsulace (z angl. <i>entrapment/encapsulation efficiency</i>)
EM	elektronová mikroskopie
FADH ₂	redukovaný flavinadenindinukleotid
FCS	fluorescenční korelační spektroskopie
FMN	flavinmononukleotid
FT-IR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GC	plynová chromatografie (z angl. <i>gass chromatography</i>)
GLUT	glukosový transportér
GUVs	obrovské unilamelární vezikuly (z angl. <i>giant unilamellar vesicles</i>)

HaCaT	pozměněná lidská buněčná linie epidermis (z angl. <i>transformed epidermal human cell line</i>)
HLA-C	lidské leukocytové antigeny, z angl. <i>human leukocyte antigens</i>
HPLC	vysokoúčinná/vysokotlaká kapalinová chromatografie (z angl. <i>high performance/ high pressure liquid chromatography</i>)
CHOL	cholesterol
IFN	interferon
IL	interleukin
IMQ	imiquimod
J	juglon
JAK	Janus kinasa
JNK	z angl. <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LUVs	velké unilamelární vezikuly (z angl. <i>large unilamellar vesicles</i>)
MAPK	mitogen aktivovaná protein kinasa (z angl. <i>mitogen activated protein kinase</i>)
mDC	myeloidní dendritické buňky
MEF	monoethylester kyseliny fumarové
MHC	hlavní histokompatibilitní komplex (z angl. <i>major histocompatibility complex</i>)
MLVs	multilamelární vezikuly (z angl. <i>multilamellar vesicles</i>)
MS	hmotnostní spektrometrie
mTOR	savčí receptor pro rapamycin, z angl. <i>mammalian target of rapamycin</i>
MTX	methotrexát
MVVs	multivezikulární vezikuly (z angl. <i>multivesicular vesicles</i>)
NADH + H ⁺	redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
NF-κB	jaderný faktor κB (z angl. <i>nuclear factor κB</i>)
NLCs	nanostrukturované lipidové nosiče (z angl. <i>nanostuctured lipid carriers</i>)
NMR	nukleární magnetická rezonance
PASI	index závažnosti lupénky, z angl. <i>Psoriasis Area and Severity Index</i>
PBS	fyzilogický roztok pufrovaný fosfátem
PC	L-α-fosfatidylcholin

pDC	plazmacytoidní dendritické buňky
PDE-4	fosfodiesterasa-4
PEG	polyethylenoxid
PEP	fosfoenolpyruvát
PIN1 protein	z angl. <i>peptidylprolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1</i>
PKM2	pyruvátkinasa M2
PMN	polymorfonukleární leukocyty
PsA	psoriatická artritida
RA	revmatická artritida
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku, z angl. <i>Reactive Oxygen Species</i>
RT	pokojová teplota
RVO	rotační vakuová odparka
SD	směrodatná odchylka
SEM	skenovací/rastrovací elektronová mikroskopie
SH	shikonin
SIR	metoda záznamu vybraného iontu (z angl. <i>selected ion recording</i>)
SLNs	pevné lipidické nanočástice (z angl. <i>solid lipid nanoparticles</i>)
STAT	z angl. <i>signal transducer and aktivator of transcription</i>
SUVs	malé unilamelární vezikuly (z angl. <i>small unilamellar vesicles</i>)
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TFA	kyselina trifluoroctová
T _H buňky	T pomocné buňky (z angl. <i>T helper cells</i>)
THF	tetrahydrofuran
TIR	celkový záznam iontů, z angl. <i>total ion recording</i>
TLR	z angl. <i>Toll-like receptor</i>
TNF	z angl. <i>tumor necrosis factor</i>
TNF	transformační růstový faktor (z angl. <i>transforming growth factor</i>)
T _{reg} buňky	regulační T-lymfocyty
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor

1 Literární přehled

1.1 Lupénka

Lupénka je chronické systémové autoimunitní onemocnění zasahující především kůži a klouby, ale v pokročilých stádiích může postihovat i vnitřní orgány. Buňky vrozené i získané imunity uvolňují prozánětlivé cytokiny, které jsou signálem pro abnormální diferenciaci a hyperproliferaci keratinocytů. Existuje několik klinických subtypů lupénky: lupénka plakového typu (z lat. *psoriasis vulgaris*), inverzní lupénka (z angl. *inverse psoriasis*), gutátní lupénka (z angl. *guttate psoriasis*), pustulární lupénka (z angl. *pustular psoriasis*), palmoplantární lupénka (z angl. *palmoplantar psoriasis*) či erythrodermická lupénka (z angl. *erythrodermic psoriasis*) [1], viz Obr. 1, str. 14.

Jednotlivé fenotypy se mohou vyskytovat v kombinaci, nejčastější je však lupénka plakového typu, která se vyznačuje ohraničenými erytematózními plakami pokrytými stříbrnými šupinami. Inverzní lupénka zasahuje oblasti, ve kterých dochází ke zvýšenému tření (třísla, v podpaží, pod prsy). Gutátní lupénka je častější u dětí a dospívajících, spustit ji může streptokoková infekce mandlí typu A, erytematózní plakky jsou menší. Pustulární lupénka je charakterizována mnohočetnými pustulami (kožní nebo slizniční pupínek, jehož dutina je vyplněna hnisem). Rozlišují se dva typy: pustulární lupénka lokalizovaná nebo generalizovaná. Lokalizovaná postihuje především ruce a nohy, zatímco generalizovaná se projevuje akutním a velmi rychle progredujícím průběhem se zarudnutím a je mnohdy doprovázena systémovými příznaky. Erythrodermická lupénka se může rozvinout z kteréhokoli fenotypu, více jak 90 % pokožky je zanícené a erytematózní. Jedná se o akutní stav, který vyžaduje pohotovostní ošetření. Mezi společné znaky všech fenotypů patří svědění, pálení a bolestivost [2].

Onemocnění má zpravidla cyklický vývoj, kdy se střídá období vzplanutí po dobu několika týdnů či měsíců s obdobím prakticky bezpříznakovým až do následující remise. Postihuje muže a ženy jakéhokoli věku po celém světě (u dospělých je častější). Globální prevalence se odhaduje na 2–4 % a incidence v čase roste. Lidé trpící lupénkou jsou mnohdy postiženi i jinými onemocněními (revmatologické, metabolické, kardiovaskulární a psychiatrické), které mohou být příčinou, ale i důsledkem tohoto onemocnění [1], [3].



Obr. 1: Typy lupénky dle fenotypu: a) lupénka plakového typu, b) gutátní lupénka, c) inverzní lupénka, d) pustulární lupénka, e) erythrodermická lupénka. Obrázek převzat ze zdroje [1] dne 27. 2. 2022.

1.1.1 Komplikace a přidružená onemocnění lupénky

Lupénka je v posledních letech považována za onemocnění s multisystémovými dopady. Nejčastějším přidruženým onemocněním lupénky je psoriatická artritida (0,3–1 % světové populace), nastupuje přibližně mezi 35–45 rokem života a to většinou do 10 let od propuknutí lupénky. Korelace mezi závažností lupénky a propuknutím artritidy nebyla prokázána. Psoriatická artritida (PsA) se projevuje bolestivostí a zarudnutím kloubů v důsledku zánětu, nejčastěji bývají postiženy chodidla, ruce, kolena, kotníky a ramena. Bolest doprovází i pocitová ztuhlost, která je nejhorší po ránu a během aktivity se zlepšuje [1], [2], [4].

Těžší průběh lupénky je spojován se zvýšenou prevalencí aterosklerózy, systémového zánětu a vyšším rizikem kardiovaskulárních příhod nad rámec rizikových faktorů (věk, obezita). Pacienti s těžkým průběhem mají až sedminásobně zvýšené riziko infarktu myokardu ve srovnání s kontrolami pro věk, pohlaví a BMI (index tělesné hmotnosti, z angl. *Body Mass Index*). Úmrtnost těchto pacientů na kardiovaskulární příhody je až o 50 % vyšší [1].

Průběh lupénky je ovlivněn i přidruženými onemocněními jako je metabolický syndrom (hypertenze, obezita, diabetes 2. typu, onemocnění gastrointestinálního traktu), chronická obstrukční plicní nemoc, spánková apnoe či návykové chování (alkohol, kouření). Lupénka negativně ovlivňuje kvalitu života pacientů, mnohdy vede k rozvoji psychosociálních úzkostí, depresí a sociálního diskomfortu včetně stigmatizace [1], [2], [4], [5].

1.1.2 Patofyziologie a mechanismus

Genetické faktory

Manifestace lupénky, podobně jako u jiných autoimunitních onemocnění, je podmíněna několika faktory. Geminologické studie potvrdily, že i zde hrají velkou roli genetické predispozice. Porovnáním konkordance (tj. pojem označující shodu, ve studiích na dvojčatech znamená shodu sledovaného znaku uvnitř páru dvojčat) monozygotních a dizygotních dvojčat lze hodnotit, zda je sledovaný znak geneticky či negeneticky determinován. U monozygotních dvojčat (stejná genetická výbava) je konkordance lupénky 2–3,5x vyšší než u dizygotních. Odhady dědičnosti z dalších epidemiologických studií se pohybovaly mezi 60–90 % u evropské populace, v případě lupénky tedy můžeme hovořit o multifaktoriální dědičnosti (fenotyp je ovlivňován faktory genetickými, ale i faktory související s životním stylem, pracovním prostředím atd., které bezprostředně mají vliv i na genetickou informaci, tyto souvislosti popisuje epigenetika) [1], [3], [4].

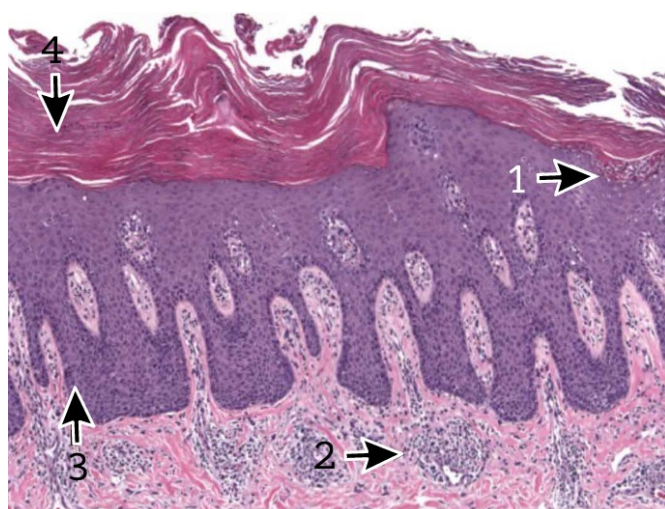
Genetické studie identifikovaly přes více než 80 genů vnímavosti (z angl. *psoriatic susceptibility regions*), které souvisejí s dědičností lupénky. Většina genů se nachází v tzv. HLA-C oblasti (z angl. *human leukocyte antigens*) hlavního histokompatibilního komplexu (MHC z angl. *major histocompatibility complex*) na chromosomu 6p21.3. U pacientů s lupénkou byly metodami sekvenování DNA objeveny např. mutace v genu s vysokou penetrancí¹ CARD14 (z angl. *caspase recruitment domain-containing protein 14*) v oblasti PSORS2, mutace v epiteliálních genech epidermálního diferenciálního komplexu v PSORS4, v genu pro interleukin-23 receptor v PSORS7 či v genu pro tyrosin-kinasu 2 v PSORS6 [1], [4], [6].

V posledních letech se výzkum ubírá cestou hledání příčinných souvislostí mezi genetickou informací a odpovídající funkcí exprimovaných proteinů a biochemických drah. Statistické testy pro identifikaci tříd genů (případně tříd proteinů), které jsou nadměrně zastoupeny v genomu (případně proteomu) a mohou korelovat s daným onemocněním, odhalily změněnou signalizaci jaderného faktoru κ B (NF- κ B) a signalizaci interferonu typu I (IFN). Odchytky v signalizačních dráhách JAK/STAT (z angl. *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) a MAP kinas (MAPK, z angl. *mitogen activated protein kinase*) rovněž vedou k rozvoji lupénky [1], [3].

¹ Penetrance vyjadřuje pravděpodobnost, s jakou se gen projeví ve fenotypu. Geny s nízkou penetrancí jsou obecně dobře ovlivnitelné prostředím (epigenetika), zatímco geny s vysokou penetrancí s vysokou pravděpodobností ovlivní fenotyp, mutace v těchto genech např. predisponuje vznik lupénky.

Imunitní odpověď

Lupénka je důsledkem deregulace vrozené (nespecifické) i získané (specifické adaptivní) imunity. Hlavní roli hrají keratinocyty, buňky získané imunity, T-lymfocyty, a antigen prezentující buňky – dendritické buňky, které jsou prostředníkem vrozené a získané imunity. Jedinec může onemocnět na základě genetických predispozic, fyzikálním či chemickým narušením kůže (oděrky, řezy, tření) či infekcí (*Streptococcus pyogenes*). K rozvinutí nemoci jednoznačně přispívá i stres, mohou ale bohužel přispět i léky obsahující IFN- α , lithium, inhibitory kontrolních bodů či β -blokátory (praktolol, propranolol, pindolol). Abnormality zahrnují změny v prezentaci antigenu, aktivaci NF- κ B signalizační dráhy, diferenciaci T pomocných buněk (z angl. *T helper cells*) hlavně T_H17, které produkují cytokiny třídy interleukinů, konkrétně IL-17. Zvýšená odezva na IL-17 vede k imunitní odpovědi a k infiltraci imunitními buňkami [1], [4], [7], viz Obr. 2.



Obr. 2: Biopsie kůže pacienta s lupénkou plakového typu. Vzorek byl obarven hematoxylinem a eosinem. Šipka 1 ukazuje na nahromadění neutrofilních granulocytů (mikrofágy), šipka 2 na infiltraci mononukleárními buňkami (buňky s jedním jádrem: lymfocyty – T, B; NK buňky; dendritické buňky a monocyty). Šipka 3 poukazuje na akantózu neboli rozšíření jedné z vrstev epidermis a šipka 4 na izolované neutrofilní v nejsvrchnější vrstvě epidermis tj. *stratum corneum* a parakeratózu neboli nedokonalé rohovatění. Obrázek převzat ze zdroje [1] dne 14. 3. 2022.

V počáteční fázi lupénky se aktivuje patologický zánět, který přetrvává a stává se vlivem zpětnovazebného působení a zesilujících signálů chronickým. Klíčovými mediátory druhé chronické fáze onemocnění jsou antimikrobiální peptidy, angiogenní faktory, prozánětlivé cytokiny (např. interleukiny IL-17, IL-22; TNF, z angl. *tumor necrosis factor*) a chemokiny. Mezi nejdůležitější zástupce antimikrobiálních peptidů (CAMP, z angl. *cationic antimicrobial peptides*) patří kladně nabitě peptidy ze třídy katellicidinů, které pomáhají v boji s patogeny. Při vzniku komplexu CAMP s virovou

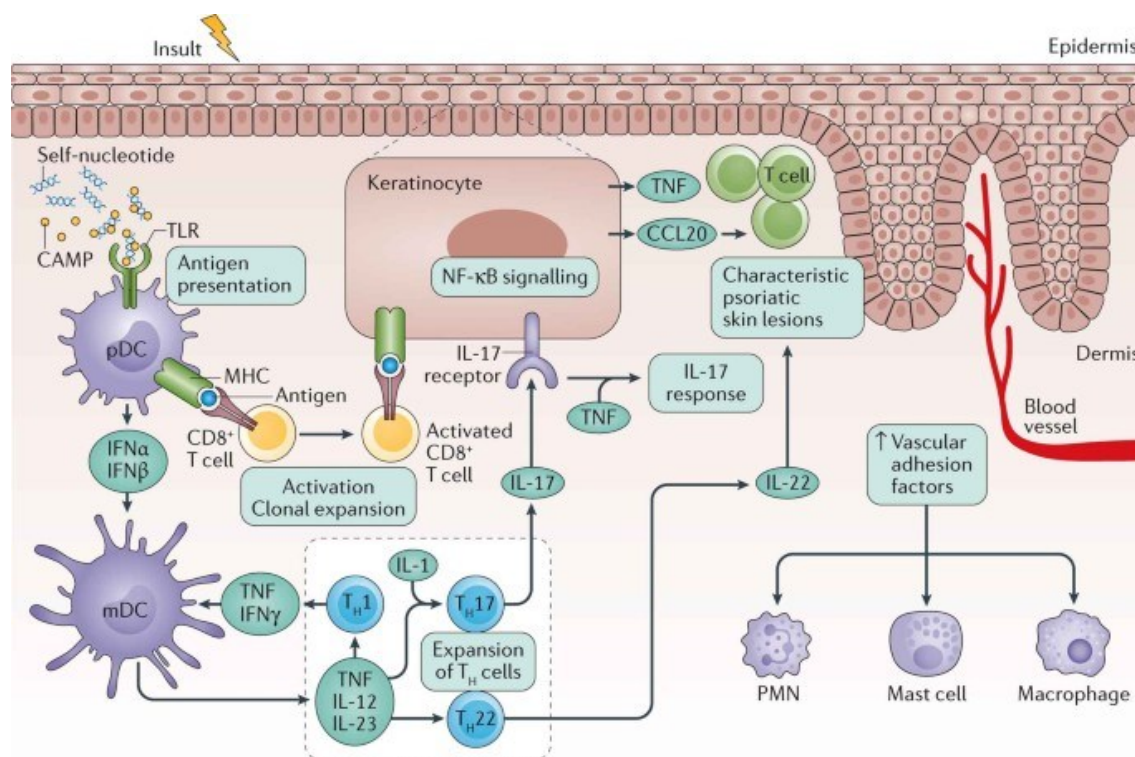
DNA se aktivuje imunitní systém a antivirová odpověď řízena interferony. Dochází k intracelulární degradaci v dendritických buňkách. U zdravých jedinců komplex CAMP s nukleotidy pomáhá v procesu hojení ran a infekce. V psoriatických lézích je exprese CAMP nekontrolovaná, zvýšená koncentrace spouští interferon dependentní signální kaskády, které vedou k aktivaci dendritických buněk, a tedy i k chronickému zánětu a dalším klinickým projevům lupénky (viz Obr. 2, str. 16). Aktivita CAMP je úzce spojena s angiogenními faktory i cytokiny. Jejich inhibice se projevuje dočasným zlepšením klinických projevů lupénky, přesto ale existují i případy, kdy je tato abnormální signalizace odhalena i u jedinců se zdravě vypadající kůží [1], [4].

Pro porozumění patogeneze nemoci a i možností léčby je důležité nahlédnout na signalizaci mezi keratinocyty, T-lymfocyty a ostatními typy buněk. Převládá tradiční paradigma, že každá linie T-lymfocytů produkuje své vlastní specifické cytokiny (např. buňky T_H1 produkují interferon $IFN-\gamma$ a interleukin IL-12, zatímco T_H17 produkují IL-17) a zpracovává přijaté signály pomocí transkripčních faktorů. Nicméně vnější a vnitřní faktory mohou vést k heterogenitě a plasticitě T-lymfocytů, kdy různé linie T-lymfocytů mohou produkovat stejné cytokiny a zároveň může docházet k přepínání mezi jednotlivými liniemi. To je typické i pro přirozený průběh lupénky: v počáteční fázi má převahu buněčná linie T_H1 , v chronické zánětlivé fázi má převahu buněčná linie T_H17 . Přestože keratinocyty primárně slouží k výstavbě pokožky, která má funkci ochranné bariéry před vnějšími vlivy, produkují také pro-zánětlivé cytokiny např. TNF, exprimují receptory pro IL-17 a účastní se obou fází nemoci. Výše zmíněné antigen prezentující dendritické buňky propojují vrozenou a získanou imunitu. Plazmacytoidní dendritické buňky (pDC) jsou typické pro iniciační fázi lupénky, cirkulují v krvi a reagují na přítomnost virových či jiných antigenů vylučováním IFN typu I. Na signály pDC reagují myeloidní dendritické buňky (mDC) produkující cytokiny IL-12 a IL-23, které jsou signálem pro expanzi T_H -lymfocytů [1], [2], viz Obr. 3, str. 18.

Shrnutí mechanismu viz Obr. 3, str. 18

Lupénka je nemoc, na kterou je třeba nahlížet komplexně. U geneticky predisponovaných jedinců může k propuknutí lupénky přispívat i poškození tkáně vlivem infekce, léků či nadměrné fyzické a psychické zátěže. To vede k uvolňování nukleotidů z keratinocytů, které tvoří komplexy s antimikrobiálními peptidy např. s katelicidinem (CAMP). Vzniklé komplexy interagují s receptory TLR (z angl. *Toll-like receptor*) na plazmacytoidních dendritických buňkách (pDC). Interakce spouští kaskádu biochemických dějů počínaje

prezentaci antigenu na povrchu pDC, která je signálem pro aktivaci klonální expanze² antigen-specifických CD8⁺ T-lymfocytů. Děje se tak obvykle v dermis nebo v lymfatických uzlinách. Aktivované CD8⁺ buňky migrují a mohou interagovat s MHC na povrchu keratinocytů v epidermis. Plazmatoidní DC zároveň uvolňují pro-zánětlivé interferony IFN- α a IFN- β , které stimulují myeloidní DC k produkci pro-zánětlivých faktorů (TNF, IL-12 a IL-13) vedoucí k expanzi T_H buněk [1], [3].



Obr. 3: Mechanismus a signální transdukce vedoucí k fenotypu lupénky. Obrázek převzat ze zdroje [1] dne 19. 3. 2022.

Základem pochopení nemoci je právě vzájemná komunikace mezi keratinocyty a buňkami imunitního systému. Cytokiny IL-17 uvolněné z T_H17 buněk interagují s IL-17 receptorem na povrchu keratinocytů. Keratinocyty tedy přijímají mnoho podnětů, které je stimulují k hyperproliferaci, abnormální diferenciaci a k produkci řady cytokinů, např. TNF a chemokinů, např. CC-chemokinový ligand 20 (CCL20). Tyto chemické působky potencují infiltraci T-lymfocytů a dendritických buněk do kožních lézí

² Klonální expanze je typem imunitní odpovědi, při které dochází k rychlé proliferaci lymfocytů z „v tělu již existujících“ paměťových buněk, díky které organismus bojuje vůči specifickému patogenu. Některé již existující lymfocyty reagují na tělu vlastní proteiny, klonální expanze těchto lymfocytů může vést k rozvoji autoimunitního onemocnění.

charakteristických pro lupénku, jejichž vznik zároveň úzce souvisí s produkcí cytokinu IL-22 T_H22 buňkami [1], [3], [4].

V amplifikační fázi, důsledkem které je udržován v pokožce chronický lokální zánět, hrají roli klíčové transkripční faktory: cyklický AMP (cAMP), JAK³ a NF-κB, které stimulují buňky k produkci dalších cytokinů, např. TNF a IL-17. Do kůže se následně rekrutují i jiné buňky imunitního systému např. makrofágy, žírné buňky (z angl. *mast cells*) a polymorfonukleární leukocyty (PMN) jako odpověď na expresi adhezivních faktorů endoteliálními buňkami (tvoří výstelku cév). Charakteristickým znakem lupénky bývají i krvácející skvrny označované jako znamení Auspitze. K jeho rozvoji přispívají klikatě zkroucené papilární cévy zásobující kožní léze, které vznikly vlivem působení angiogenních faktorů, rovněž produkovanými endotelem [1].

Tato symptomatická chronická fáze zpravidla přetrvává, dokud nedojde k terapeutické intervenci, která se zaměřuje na použití protilátek proti hlavním regulátorům zánětu (TNF, IL-17 a IL-23) nebo jejich inhibici jinou cestou. V ojedinělých případech dochází k přirozenému zlepšení průběhu nemoci. Po ukončení léčby může pacient pozorovat i dlouhodobý ústup onemocnění, ale většinou se nemoc vrací [1], [4], [8].

Odchylky od metabolismu

Hyperproliferace keratinocytů a expanze buněk imunitního systému do epidermis zvyšuje nároky na dostatek živin a energie v daném mikroprostředí: energie (ATP), aminokyseliny (AMK), nukleotidy a lipidy. D-glukosa je hlavním zdrojem energie pro všechny typy buněk a především pro ty nadměrně se dělící. Zdravé buňky v aerobním prostředí metabolizují D-glukosu na pyruvát, který je přeměňován oxidativní dekarboxylací za katalýzy pyruvát dehydrogenasy na acetyl-CoA a redukované kofaktory (NADH + H⁺). Acetyl-CoA vstupuje do citrátového cyklu a redukované kofaktory (včetně FADH₂) jsou pohonem dýhacího řetězce a oxidativní fosforylace (aerobní fáze metabolismu D-glukosy) v mitochondriích za vzniku ATP a molekul vody, kofaktory se oxidují na NAD⁺ a FAD. Celkový energetický zisk za těchto podmínek je 36 molekul ATP na jednu molekulu D-glukosy [3], [9].

³ JAKs jsou kinasy, které se vážou na cytokinové receptory (např. T_H17 buněk) a přenášejí signál dále. Jsou důležité při transdukci signálu zprostředkovaného interleukiny IL-23 produkovanými myeloidními dendritickými buňkami (mDC) [4].

Hyperproliferující keratinocyty, stejně tak imunitní buňky (makrofágy, dendritické buňky, T-lymfocyty) indukované zánětem vykazují stejný metabolický profil jako nádorové buňky. Hovoříme o tzv. Warburgově efektu, při kterém buňky preferují anaerobní fázi metabolismu D-glukosy, tj. glykolýzu, s kyselinou mléčnou (laktátem) jako výsledným metabolitem redukce pyruvátu laktát dehydrogenasou i za aerobních podmínek a zároveň získáním dvou molekul ATP na jednu molekulu D-glukosy. Tato změna v metabolismu výrazně zvyšuje nároky na příjem D-glukosy, protože energetický zisk je v porovnání s oxidativní fosforylací velmi nízký. D-glukosa je z krve vychytávána pomocí glukosových transportérů, jejichž exprese je u těchto buněk také zvýšena [9].

U pacientů s lupénkou, ale i u myších modelů, u kterých byla indukována lupénka imiquimodem (IMQ), byla zjištěna nadměrná exprese a výskyt glukosového transportéru 1 (GLUT1) na povrchu aktivovaných T-lymfocytů a na povrchu keratinocytů v epidermis. Hladina GLUT1 koreluje se skórovacím systémem PASI (viz kapitola 1.2.1 Diagnostika a screening), se zvýšenou tloušťkou epidermis, hustotou sítě mikrocév a i s množstvím infiltrovaných imunitních buněk. Genetická delece nebo inhibice GLUT1 snižuje sice příjem glukosy zhruba o 95 %, Delece GLUT1 genu zlepšila pouze IMQ a IL-23 indukovanou hyperplazii a lokální podání inhibitoru GLUT, WZB117, zmírnilo hyperplazii i zánět, nevedlo ale k remisi. Keratinocyty zřejmě využívají i alternativní substráty pro glykolýzu a cyklus trikarboxylových kyselin (aminokyseliny, lipidy a jiné hexosy). Zajímavým zjištěním byla korelace mezi podáváním hypoglykemických léků na diabetes mellitus 2. typu a příznivým vlivem na průběh lupénky. Z toho lze odvodit, jaké jsou doporučené stravovací návyky, základem kterýchž je omezení příjmu sacharidů (především monosacharidů) ve stravě [3], [8].

V kožních lézích byla dále zjištěna nadměrná exprese enzymu katalyzujícího rychlost určující krok glykolýzy, konkrétně isoenzymu pyruvátkinasy M2 (PKM2), který je exprimován především v tkáních, které potřebují vysokou dodávku energie. PKM2 v tetramerní formě má vysokou afinitu ke svému substrátu, fosfoenolpyruvátu (PEP), a katalyzuje defosforylaci PEP za vzniku pyruvátu, který je metabolizován laktát dehydrogenasou na laktát. PKM2 v dimerní formě má naopak nízkou afinitu k PEP. Důsledkem je hromadění glykolytických intermediátů a spuštění biosyntetických procesů, které vedou např. k syntéze prekurzorů nukleotidů (ribosa-5-fosfát), triacylglycerolů (glycerol). Ukázalo se, že myši s IMQ-indukovanou lupénkou, které mají sníženou expresi PKM2 v keratinocytech (delece PKM2 genu či farmakologická inhibice enzymu přes EGF-receptor), vykazovaly remisi [3], [10].

1.2 Léčba lupénky

1.2.1 Diagnostika a screening

Diagnostika

V raných fázích onemocnění se u většiny pacientů objevují strukturní změny na pokožce. Zhruba 15 % pacientů si stěžuje na bolesti a otoky kloubů ještě před tím, než se objeví kožní projevy. Na Obr. 1, str. 14 jsou znázorněny typy lupénky dle fenotypu, lupénka plakového typu bývá diagnostikována dle klinických příznaků, pomocnou metodou bývá histologické vyšetření včetně kožní biopsie, viz Obr. 2, str. 16. Závažnost onemocnění je hodnocena dle několika různých skórovacích systému. Jedním z nich je systém BSA (z angl. *Body Surface Area*), který byl původně určen na procentuální odhad kožních popálenin. Měří se skóre na základě celkové postižené plochy těla, pro zjednodušení se předpokládá, že 1 % povrchu těla odpovídá jedné dlani. Skórovací systém PASI (z angl. *Psoriasis Area and Severity Index*), který byl vyvinut na konci 70. let 20. století k hodnocení účinků retinoidů u lupénky, hodnotí oblasti hlavy a krku (H), horních končetin (UL), trupu (T) a dolních končetin (LL) zvlášť. Procento každé postižené oblasti (A_H , A_{UL} , A_T , A_{LL}) je dáno numerickým skóre A: 1 (0–9 %), 2 (10–29 %), 3 (30–49 %), 4 (50–69 %), 5 (70–89 %), 6 (90–100 %). Každá oblast se následně hodnotí dle erytému (E), tloušťky/indurace (I) a šupinatosti/odlupování (D) na 5 bodové škále: 0 (žádné), 1 (mírné), 2 (střední), 3 (závažné), 4 (velmi závažné). Konečné skóre PASI se vypočítá dle následujícího vztahu (1) a pohybuje se od 0–72 [1], [11]:

$$PASI = 0,1 (E_H + I_H + H_H) A_H + 0,2 (E_{UL} + I_{UL} + H_{UL}) A_H \\ + 0,3 (E_T + I_T + H_T) A_T + 0,4 (E_{LL} + I_{LL} + H_{LL}) A_{LL}$$

Během vyšetření se doporučují zvážit i případné přidružené onemocnění (viz kapitola: 1.1.1 Komplikace a přidružená onemocnění lupénky), které mohou ovlivnit průběh léčby. Při diagnostice psoriatické artritidy se běžně využívá skórovací systém CASPAR (z angl. *Classification Criteria for Psoriatic Arthritis*), nicméně je nutné hledět i na rozmístění postižených kloubů, protože jedince postižené s lupénkou mohou omezovat i jiné typy artritid, např. revmatická artritida (RA), osteoartritida či dna [1].

Screening

V důsledku zvýšeného rizika kardiovaskulárních příhod (viz kapitola 1.1.1 Komplikace a přidružená onemocnění lupénky) je doporučen častější screening rizikových faktorů, mezi které patří hypertenze, hyperlipidémie, diabetes mellitus a rodinná anamnéza předčasného infarktu myokardu (< 55 let). Jedincům, kterým byla diagnostikována lupénka, se doporučuje jednou za pět let (mezi 18 až 40 lety) provádět krevní testy na sledování koncentrace glukosy a cholesterolu a měřit BMI a procento tělesného tuku, protože obezita je mnohdy původcem výše zmíněných rizikových faktorů [1].

1.2.2 Farmakologická léčba

Detailně popsané mechanismy rozvoje lupénky včetně metabolických odchylek nabízejí několik různých cílů farmakologické léčby. Je však nutné podotknout, že léčba slouží především na potlačení symptomů onemocnění. Léčebné strategie vedoucí k úplnému vyléčení jsou stále velkou výzvou, a to především proto, že příčiny rozvoje onemocnění jsou multifaktoriální. Při výběru vhodné léčby se přihlíží na věk a stav pacienta (těhotné ženy) a přidružená onemocnění. Tato kapitola poskytuje ucelený přehled používaných farmak a i odlišných způsobů podání léčiv.

Topické podání léčiv

Mezi konvenční léčebné přístupy lupénky patří topická, orální, biologická a parenterální terapie či fototerapie. Podání léčiva topickou cestou, tj. aplikace léčiva lokálně (léčivo se vstřebává do bezprostředního okolí podání a nepřechází, nebo jen minimálně, do krve) je indikováno v případě mírné až středně těžké formy lupénky (< 10 % BSA) bez přítomnosti PsA. Účinky terapie jsou ale mnohdy neuspokojivé. Nevýhodou navíc je nutnost častějšího dávkování, snížená schopnost penetrace léčiva do cíleného místa a i snížená compliance pacienta (vyjadřuje schopnost pacienta dodržovat dietní opatření, zásady životosprávy, dostatečný pohybový režim, tj. nefarmakologická compliance, či doporučené dávkovací schéma předepsaného léku, tj. farmakologická compliance). Mezi historicky první topická léčiva patří dithranol (anthralin), který způsobuje apoptózu keratinocytů, a černouhelné dehty, které snižují produkci IL-15 a inhibují aktivitu NO synthasy. Tyto látky však byly v posledních letech nahrazeny hlavně kortikosteroidy, které jsou dostupné v různých formulacích dle místa aplikace, např.: roztoky, pěny, spreje, šampony či gely na pokožku hlavy; pro obličej, trup či končetiny se předepisují masti či krémy. Na citlivá místa, obličej a intertriginózní oblasti – třísla podpaží, pod prsy,

se předepisují kortikosteroidy s nižší účinností, případně kortikosteroidy v kombinaci s jinými léčivy (vitamin D a jeho analogy, topické inhibitory kalcineurinu), které snižují vedlejší účinky. Vitamin D a jeho analogy mohou být podávány i v rámci monoterapie, působí prostřednictvím imunomodulace a normalizace zrání keratinocytů. Přestože jsou méně účinné, mají výrazně příznivější profil nežádoucích účinků na rozdíl od kortikosteroidů. Retinoidy jsou dalšími účinnými látkami v boji proti lupénce, normalizují diferenciaci keratinocytů a potlačují imunitní odpověď. Další alternativou ke kortikosteroidům mohou být lokální inhibitory kalcineurin fosfatasy, viz Tab. 1. Aplikace topických léčiv může být doprovázena místním podrážděním a pálením pokožky [1], [7].

Tab. 1: Shrnutí druhů léčiv aplikovaných lokálně při léčbě lupénky. Informace převzaty a přeloženy z tabulky ze zdroje [7] dne 25. 5. 2022.

Druh léčiva	Mechanismus působení	Nežádoucí účinky
Analogy vitaminu D (kalcitriol, kalcipotriol)	Interferují s geny, které souvisí s proliferací epidermis, zánětem a rohovatěním.	Podráždění pokožky, snížení nežádoucích účinků v podání s topickými kortikosteroidy.
Kortikosteroidy (betamethason dipropionát, mometason furoát, klobetasol propionát)	Inhibují tvorbu prozánětlivých cytokinů prostřednictvím regulace genové exprese.	Dlouhodobá terapie vede k atrofii kůže, dyspigmentace a potlačení HPA osy ⁴ .
Dithranol	Způsobuje mitochondriální dysfunkce, vede k obnově diferenciaci buněk a snižuje proliferaci keratinocytů.	Podráždění pokožky a schopnost barvit.
Retinoidy (tretinoin)	Mění genovou expresi prostřednictvím vazby na jaderné receptory α a β kyseliny retinové v keratinocytech.	Šupinatění, pálení, štípání a erytém pokožky.
Inhibitory kalcineurinu ⁵ (takrolimus)	Inhibují kalcineurin fosfatasy a syntézu zánětlivých mediátorů.	Mírné podráždění pokožky.
Keratolytika (kyselina salicylová, močovina, olivový olej)	Způsobují odlupování korneocytů ⁶ .	Podráždění a pálení pokožky.

⁴ HPA osa je neurohumorální spojení hypothalamu, hypofýzy a nadledvinek. Potlačení této osy vede k nedostatečné produkci kortisolu nadledvinkami.

⁵ Kalcineurin je Ser-Thr fosfatasa, která se účastní přenosu signálu v Ca^{2+} dependentních signalizačních drahách.

⁶ Korneocyty jsou ploché bezjaderné mrtvé buňky. Tvoří vnější vrstvu epidermis, tj. stratum corneum.

Systémové orální podání léčiv

Pokud lokální terapie selhává, přechází se většinou k fototerapii či systémovému podání léčiv orální cestou. Přináší ale také řadu omezení spojených především s toxicitou a častějšími a závažnějšími nežádoucími účinky. Mezi běžně používané léky pro systémovou léčbu patří: acitretin, methotrexát, cyklosporin, apremilast, estery kyseliny fumarové či mykofenolát mofetil [7].

Acitretin patří do skupiny retinoidů, nasazuje se jen ve velmi výjimečných případech, kdy ostatní typy léčby selhávají, a to především na palmoplantární lupénku spolu s fototerapií. Snižuje aktivitu T_H1 a T_H17 buněk a normalizuje diferenciaci keratinocytů. Má teratogenní účinky, neměl by být předepisován těhotným ženám a ani ženám, které chtějí do tří let otěhotnět, protože se hromadí v tukové tkáni. Ženám v reprodukčním věku se doporučuje užívat alespoň dvě formy hormonální antikoncepce. Mezi vedlejší účinky patří změny vidění, vypadávání vlasů, vyrážky, ale i poškození jater [1], [7].

Methotrexát (MTX) je inhibitorem dihydrofolát reduktasy, enzymu, který je důležitý při syntéze purinových a pyrimidinových bází nukleotidů. Využívá se při léčbě mírné až středně těžké lupénky, podává se perorálně či intramuskulárně. Metabolizuje se na polyglutamátová analoga, která zvyšují hladinu adenosinu, jež má protizánětlivé účinky (snížení hladin TNF a podjednotek NF- κ B). Řadí se mezi imunosupresiva s antiproliferačními účinky, snižuje hypertrofii vrstev epitelu a indukuje apoptózu T-lymfocytů. Při jeho užívání se pro zmírnění vedlejších účinků doporučuje zařadit do jídelníčku potraviny bohaté na vysoký obsah kyseliny listové (taktéž vitamin B9 či folát) jako např. luštěniny, chřest, listová zelenina, brokolice, játra, lze však užívat i doplňky stravy. Mezi běžné vedlejší účinky patří suchý kašel, močení méně než obvykle, bílé skvrny v dutině ústní, krev ve stolici, horečka či průjemy. Při dlouhodobém užívání hrozí toxicita kostní dřeně a hepatotoxicita ($\rightarrow$ cirhóza jater), je teratogenní a interaguje s jinými léky (antibiotika a salicyláty). Před zahájením léčby MTX by měl lékař velmi dobře znát anamnézu pacienta a zvážit případné kontraindikace, taktéž je na místě monitorovat kompletní krevní obraz a provádět jaterní a ledvinové funkční testy během dlouhodobého podávání MTX [1], [2], [7].

Cyklosporin je inhibitorem kalcineurin fosfatasy, v důsledku čehož je inhibována syntéza IL-2 a také IFN- γ , využívá se při léčbě středně těžké až těžké lupénky. Mezi běžné vedlejší účinky patří hypertenze, hyperlipidémie, hyperkalémie, hypermagnezémie, nevolnost a bolest hlavy. V závislosti na délce užívání a vlivem

kumulativnímu efektu může být cyklosporin nefrotoxický a způsobovat renální dysfunkce, hrozí i rozvoj lymfomu nebo spinocelulárního karcinomu, proto se omezuje jeho použití na jeden až dva roky [1], [7], [12].

Na lupénku postihující nehty a pokožku hlavy se předepisuje apremilast. Inhibuje fosfodiesterasu-4 (PDE-4), tím zvyšuje koncentraci druhého posla cAMP a inhibuje NO syntasu. Dochází ke snížení hladiny prozánětlivých cytokinů (TNF a IL-23) a zvýšení hladiny protizánětlivého IL-10. Taktéž je prokázán účinek na snížení tloušťky epidermálních vrstev. Vykazuje dobrý bezpečnostní profil s běžnými vedlejšími účinky: bolest hlavy, nevolnost, zvracení. Dlouhodobé užívání vede k poklesu tělesné hmotnosti, mechanismus není známý. Jeho hlavní výhodou je, že na rozdíl od jiných malých molekul užívaných v systémové léčbě není nutné sledovat hematologické parametry [1], [2], [7].

Kombinovace dimethylesteru kyseliny fumarové (DMF) a monoethylesteru kyseliny fumarové (MEF) působí protizánětlivě a má antioxidační a antiproliferační účinky. Přesný mechanismus účinku nebyl objasněn, ale předpokládá se, že estery kyseliny fumarové interagují s glutathionem, který mimo jiné inhibuje transkripční aktivitu NF- κ B. Přestože estery kyseliny fumarové podobně jako apremilast mají dobrý bezpečnostní profil i účinnost, doporučují se kombinovat s topickou léčbou lupénky. Mezi běžné nežádoucí účinky patří gastrointestinální obtíže, méně časté zahrnují edém dolních končetin, bolest hlavy, únavu a svědění. Aktivní látky mohou snižovat počet lymfocytů a leukocytů, proto se doporučuje před zahájením léčby provést kompletní krevní obraz, který by se měl při dávkování kombinovaným léčivem DMF/MEF opakovat ob měsíc, v případě dávkování DMF stačí jednou za tři měsíce [2], [7].

Mykofenolát mofetil je imunosupresivum podávané jako proléčivo (z angl. *prodrug*), které se metabolizuje na kyselinu mykofenolovou, jež inhibuje inosin-5'-monofosfát dehydrogenasu. Tento enzym je esenciální pro biosyntézu guaninu *de novo* v B a T-lymfocytech. Studie [12] potvrdila velmi podobné účinky jako cyklosporin, je tedy skvělou alternativou při kontraindikacích nebo toxicitě vyvolané cyklosporinem. Nicméně i zde existuje riziko vedlejších účinků: nevolnost, zvracení, průjem a leukopenie (tj. celkové snížení leukocytů v krvi pod fyziologickou normu) především u pacientů, kteří užívají více jak dva gramy denně nebo přijímají ještě jiná imunosupresiva v rámci potransplantačního období. Mykofenolát mofetil interaguje s narkotiky, nesteroidními antiflogistiky, antibiotiky a inhibitory thymidin kinas [7], [12].

Fototerapie

Fototerapie je vhodnou metodou léčby pro pacienty se středně těžkým až těžkým průběhem onemocnění ($> 10\%$ BSA) bez přítomnosti PsA. Topická aplikace by byla z důvodu postižení velké plochy těla nepraktická. Při fototerapii se vystavuje pokožka UV záření, působí prostřednictvím několika mechanismů: indukce apoptózy imunitních buněk (např.: antigen prezentující buňky), zvýšení produkce protizánětlivých cytokinů (IL-10), suprese T_H17 buněk a aktivace T_H2 a regulačních T-lymfocytů (T_{reg}) a pomáhá zlepšit příznaky onemocnění (výskyt plaků a svědění). Terapeuticky aktivní rozsah vlnových délek je od 290 po 400 nm. Terapie je velmi časově náročná, vyžaduje 3–5 sezení týdně po dobu 2–3 měsíců. V souvislosti s využíváním ultrafialového záření hrozí riziko rozvoje rakoviny kůže. Používá se dlouhovlnné UV-A (320–400 nm) záření, které proniká do hlubších vrstev pokožky, nebo středněvlnné UV-B (290–320 nm). Fototerapie je mnohdy doplňkem ke stávající léčbě MTX. Ozařování UV-B lze kombinovat se systémovým užíváním retinoidů, které snižují kumulativní efekt léčby a zvyšují její účinnost a bezpečnost. Fototerapie s využitím UV-A záření se ve většině případů aplikuje v kombinaci s podáním furokumarinu psoralenu. Jedná se o fotoaktivní látku, jejíž účinky jsou zesílené UV zářením, při dlouhodobém užívání zvyšuje riziko rakoviny, proto je velmi důležitý lékařský dohled a přesné dávkování množství [1], [7].

Biologická léčba a parenterální terapie

V rámci biologické léčby se využívají malé molekuly, které působí systémově a podávají se pacientům parenterálně, tj. mimo střeva (většinou injekčně nebo infuzí). Tyto molekuly mají schopnost interagovat s konkrétními cíli imunitního systému a zaměřují se na dvě hlavní dráhy: osa IL-23/ T_H17 a signalizace TNF (viz Obr. 3, str. 18). Zahrnují monoklonální protilátky, cytokiny, fúzní proteiny, antisense oligonukleotidy⁷ či RNA (viz Tab. 2, str. 26). Biologická léčba se uvažuje jako poslední možnost po předchozím selhání a neúčinnosti jiných léčebných postupů a jejich netoleranci (topická lokální léčba, fototerapie, orální systémová léčba). Při volbě biologické léčby se musí brát v úvahu pohlaví pacienta, BMI, hladina C-reaktivního proteinu (marker zánětu), předchozí léčba a souběžné infekce (např. hepatitida C a B) [1], [7].

⁷ Antisense oligonukleotidy jsou molekuly, které jsou zrcadlovou kopií malého úseku na mRNA, jsou schopné s ní interferovat a znemožnit tak její čtení při translaci.

Tab. 2: Shrnutí druhů terapeutik využívaných při biologické léčbě. Informace převzaty a přeloženy z tabulky ze zdroje [1], [7] dne 31. 5. 2022.

Druh léčiva	Léčivo	Popis a vedlejší účinky
Inhibitor TNF- α	Etanercept	Fúzní protein využívaný k léčbě lupénky plakového typu u dospělých a dětí. Kontraindikace při srdečním selhání. Snížením funkce imunitního systému se zvyšuje náchylnost k infekcím.
	Adalimumab	Monoklonální protilátka využívaná při léčbě lupénky plakového typu, PsA a lupénce postihující nehtová lůžka. Vedlejší účinky: srdeční selhání, problémy s játry či nervovým systémem.
	Infliximab	Chimérická monoklonální protilátka taktéž využívaná při léčbě lupénky plakového typu a PsA. Riziko infekce a malignit. Vedlejší účinky: zimnice, bolest hrudi a břicha, únava, dušnost, závratě a dýchací potíže.
	Certolizumabpegol	PEGylovaná TNF protilátka vhodná při léčbě středně těžkého až těžkého průběhu lupénky plakového typu a PsA. Vedlejší účinky: bolest dutin, infekce horních dýchacích cest, bolest žaludku a zácpa, vyrážky.
Inhibitor IL-12/IL-23	Ustekinumab	Nespecifická monoklonální protilátka vázající se na podjednotku p40, která je společná pro IL-23 a IL-12. Využívá se při léčbě PsA a lupénky plakového typu. Vedlejší účinky: kýchání, migrény, bolesti v krku, průjem.
Inhibitor IL-17	Secukinumab	Monoklonální protilátka vhodná pro léčbu těžkého průběhu lupénky postihující vlasovou pokožku a PsA. Kontraindikace u pacientů se zánětlivým onemocněním střev. Vedlejší účinky: infekce horních dýchacích cest, rýma, kopřivka, oční infekce, neutropenie, oční infekce.
	Ixekizumab	Monoklonální protilátka předepisující se při léčbě lupénky plakového typu a PsA. Vedlejší účinky: plíšňové infekce, infekce horních dýchacích cest, nevolnost a zarudnutí.
	Brodalumab	Monoklonální protilátka vhodná na lupénku plakového typu. Často spojována se sebevražedným chováním. Vedlejší účinky: bolest kloubů a dutiny ústní, migrény, únava.
Selektivní inhibitor IL-23	Guselkumab	Selektivní monoklonální protilátka proti podjednotce p19 interleukinu IL-23. Využíváno při léčbě lupénky u dospělých. Vedlejší účinky: migrény, infekce horních dýchacích cest, průjem.

Pokroky v porozumění patofyziologie lupénky otevřely několik cílů, na které se může budoucí léčba zaměřit. Tato potenciální léčiva jsou nyní v různých krocích klinického testování. Jedná se o inhibitory Janus kinas (Upadacitinib, Ruxolitinib a Tofacitinib); antagonisty vaskulárního endotelového růstového faktoru, VEGF (Pazopanib); další inhibitory IL-23 (Tildrakizumab, Risankizumab); inhibitory TLR (IMO-8400) či agonisty adenosin A3 receptoru (Piclidenoson) [1].

Léčba lupénky vyžaduje spolupráci mnoha odborníků: dermatologů, revmatologů, kardiologů, genetiků, farmakologů a imunologů. Vzhledem k metabolickým odchylkám i psychosociálním dopadům ovlivňujících kvalitu života pacienta je doporučena i návštěva specializovaných diabetologů či nutričních specialistů a odborníků v oblasti psychologie, kteří mohou pacientům pomoci se lépe vypořádat se svou nemocí. Doporučení mohou zahrnovat úpravu životního stylu a práci se stresem např. pomocí „mindfulness“ technik [13].

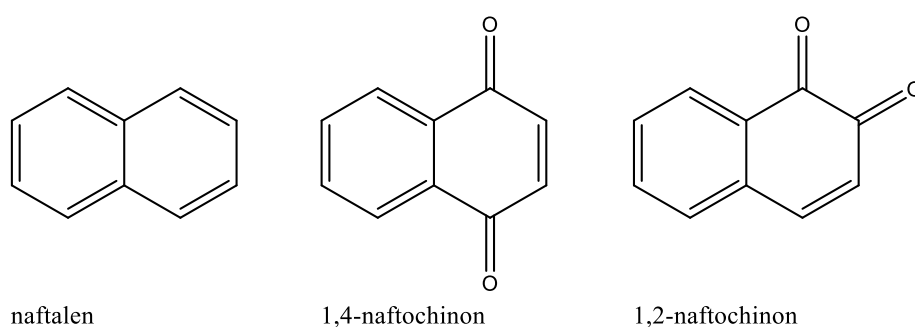
1.3 Naftochinony

1.3.1 Mechanismy působení

Naftochinony patří mezi sekundární metabolity zahrnující širokou škálu nízkomolekulárních sloučenin, jejichž základem je naftalenová kostra substituovaná dvěma karbonylovými skupinami. Teoreticky existuje několik izoforem, ale nejrozšířenějšími jsou 1,4-naftochinony s karbonyly na pozici C1 a C4 a 1,2-naftochinony, viz Obr. 4, str. 29. Mohou se seskupovat do dimerů, trimerů a dokonce i tetramerů. Jsou důležitými články elektronových transportních řetězců a řady oxidačně-redukčních procesů (v lidském těle zejména vitamín K, klíčový například pro biosyntézu faktorů krevní srážlivosti posttranslační modifikací glutamátového zbytku na γ -karboxyglutamátový). Nacházejí se v rostlinách, některých houbách, lišejnících či řasách. Rostliny je využívají např. v rámci obranného mechanismu vůči jiným druhům a při adaptaci na nové prostředí. Z toho důvodu se naftochinony staly velmi zajímavými biologicky aktivními látkami, které jsou známé hlavně pro své antibiotické, antivirové, antiproliferační a protizánětlivé účinky. Jejich toxicita a potenciální terapeutické účinky závisí na schopnosti vázat nukleofilní molekuly a působit jako oxidační činidla [14], [15].

Přirozeně se vyskytující naftochinony hrají klíčovou roli v kontextu negativní alelopatie, tj. inhibice sousedních organismů prostřednictvím sekrece inhibitorů klíčení nebo růstu. Klasickým příkladem je juglon (**J**, 5-hydroxy-1,4-naftochinon) z ořešáku

černého (lat. *Juglans nigra*) a královského (lat. *Juglans regia*), který je zodpovědný za inhibici růstu rostlinných druhů v okolí. Proto je např. potřeba na zahradě pod ořešákem na podzim shrabovat listí, jinak rostliny pod ním rostoucí chřadnou. Mechanismus negativní alelopatie je založený na inhibici fotosyntézy v pletivech listů, inhibici činnosti H-ATPasy, narušení zpětného příjmu vody kořeny atd. Sloučeniny jsou výrazně barevné vlivem systému π -konjugovaných elektronů a přitahují opylovače [14], [16].



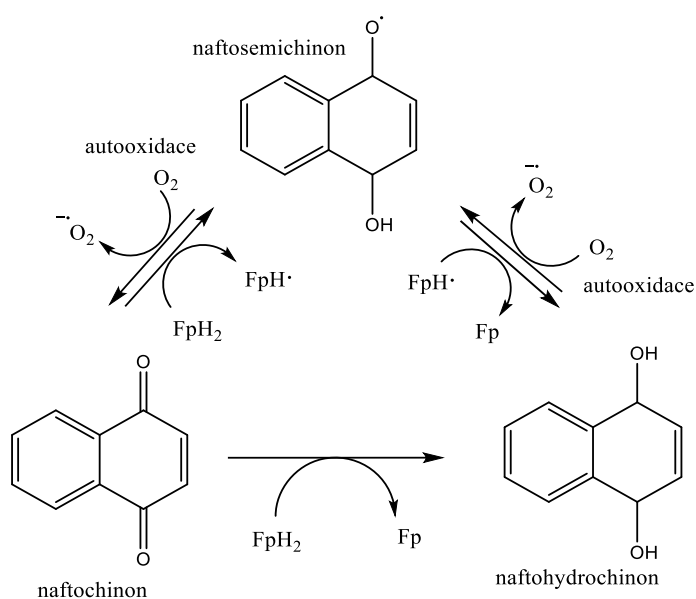
Obr. 4: Chemická struktura naftalenu, 1,4-naftochinonu a 1,2-naftochinonu.

Většina studií zabývajících se biologickým potenciálem naftochinonů popisuje jejich aktivitu založenou na prooxidačním charakteru molekuly. Molekuly snadno reagují s nukleofilními molekulami a generují reaktivní formy kyslíku (ROS) v důsledku svého redoxního chování. Tímto způsobem mohou ovlivňovat genovou expresi a aktivitu různých enzymů (viz Tab. 3), a tím zasahovat do důležitých signálních drah v organismu. Účinky se mohou projevit i na změnách DNA a nedostatku (deplece) glutathionu [14].

Tab. 3: Naftochinony zprostředkovaná inhibice enzymů. Informace převzaty a přeloženy z tabulky ze zdroje [14] dne 2. 8. 2022.

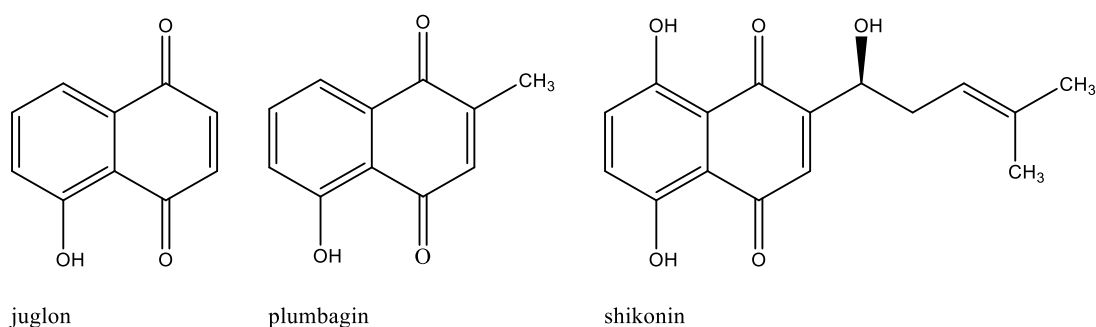
Inhibovaný enzym	Naftochinon
cytochrom P450 a monooxygenasové systémy	juglon
integráza HIV	naftazarin
reverzní transkriptáza (oncornavirus)	β -lapachon
RNasa (HIV virus)	1,4-naftochinony, juglon, menadion, plumbagin
RNA polymerasa II	juglon
topoisomerasa I	deriváty naftazarinu, β -lapachon, analogy acetyl shikoninu, deriváty alkaninu a shikoninu, isodiospyrin, diospyrin
topoisomerasa II	plumbagin, shikonin, deriváty eleutherin
fosfatidylinositol-3-kinasa	juglon, methyljuglon

Některé naftochinony podléhají v buňkách redoxním reakcím, které jsou katalyzované flavoenzymy (enzymy, které pro svou aktivitu potřebují kofaktor flavinmononukleotid FMN nebo flavinadenindinukleotid FAD), viz Obr. 5. Flavoenzymy v endoplasmatickém retikulu a v mitochondriích katalyzují redukci chinonu jedním elektronem za vzniku cytotoxického radikálu naftosemichinonu. V cytosolu dochází i k dvouelektronové redukci (katalýza NAD(P)H-chinon oxidoreduktasou neboli DT-diaforasou) za vzniku naftohydrochinonu, který je obecně stabilnější a méně škodlivý pro buňky. Většina semichinonů se totiž v aerobních podmínkách zpětně oxiduje, reagují s molekulárním kyslíkem a tvoří se superoxidové aniontové radikály ($O_2^{\cdot-}$), takovéto reakci mohou podléhat i hydrochinony. Superoxidové aniontové radikály se za katalýzy superoxid dismutasou přeměňují na peroxid vodíku, který může podléhat Fentonově reakci s železnatými kationty za vzniku hydroxylového radikálu ($OH^{\cdot}$). Tyto reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou silnými oxidačními činidly, které jsou zodpovědné za poškození esenciálních makromolekul v buňce. Schopnost naftohydrochinonu a naftosemichinonu generovat ROS je ovlivněna několika parametry: redoxním potenciálem naftochinonu, konstantou stability naftosemichinonu a hodnotou pK_a naftohydrochinonu. Přenos elektronů je řádově vyšší pro aniontovou formu redukčního činidla. Pokud tedy bude hodnota pK_a naftohydrochinonu dostatečně nízká (tzn. silnější kyselina), tím spíše bude autooxidace probíhat ve prospěch ROS [14]–[16].



Obr. 5: Schématické znázornění redoxního cyklu 1,4-naftochinonu. Jednoelektronovým mechanismem dochází k postupné redukci naftochinonu přes naftosemichinon až na naftohydrochinon. Dvouelektronovým mechanismem vzniká jednokrokovým mechanismem naftohydrochinon. Flavoenzym Fp.

Prooxidační charakter naftochinonů je ovlivněn druhem substituentů na naftalenové kostře. Zavedením elektrondonorní hydroxylové skupiny klesá elektrofilita naftochinonové části, přesto má ale hydroxy-1,4-naftochinon obdobný redoxní potenciál jako 1,4-naftochinon. Rychlost autooxidací byla zkoumána Buffintonem a spolupracovníky (1989), vytvořili pořadí založené na vlivu zkoumaných substituentů na rychlost autooxidace 1,4-naftohydrochinonu. Pořadí substituentů vypadalo následovně: 5-hydroxy- > 5,8-hydroxy- > 2-hydroxy- > 2-methyl-5-hydroxy- > 2,3-dimethoxy- > nesubstituovaný 1,4-naftohydrochinon > 2-methyl-1,4- > 2-hydroxy-. Došli k závěru, že hydrochinon odvozený od 5-hydroxy-1,4-naftochinonu, neboli juglonu, tím spíše podléhá zpětné oxidaci než např. 2-hydroxy-1,4-naftohydrochinonu. Vyšší rychlost autooxidační reakce hydrochinonu odvozeného od juglonu je připisována možnosti vzniku vodíkového můstku mezi 4- a 5-hydroxylovou skupinou a nižší hodnotě pK_a . Vysoká míra autooxidace vysvětluje, proč naftochinony s 5-hydroxylovou skupinou na aromatickém kruhu, např. juglon, plumbagin, shikonin (**SH**), viz Obr. 6, výrazně stimulují peroxidaci lipidů a cytotoxicitu hepatocytů a keratinocytů. Buněčná smrt může být způsobena oxidačním stresem a vyčerpáním antioxidační kapacity buňky, např. deplecí glutathionu (molekuly s antioxidační kapacitou), ale i elektrofilním charakterem molekul, které jsou schopné se kovalentně vázat na thiolovou skupinu cysteinu v proteinech a na bazické části DNA [14]–[16].



Obr. 6: Chemická struktura juglonu, plumbaginu a shikoninu.

Změny na makromolekulách působením naftochinonů mohou vyvolat změny v buněčné signalizaci. Nejvíce jsou zdokumentovány alterace v signalizačních drahách NF- κ B a p53. p53 je regulační protein monitorující změny na DNA. V případě poškození se protein p53 váže na DNA, to vede ke stimulaci exprese proteinu p21, který interaguje s proteinem cdk2, který stimuluje buněčné dělení. Proteinový komplex p21 a cdk2 je „stop signálem“ buněčného dělení, tím buňka předchází nekontrolované proliferaci

a vzniku nádorů [17]. Paulsen a Ljungman popsali účinky juglonu na p53 signalizaci, zřejmě docházelo buď k inhibici transkripce tumor supresorového genu p53 nebo k oxidaci thiolových skupin a následné agregaci proteinu p53, jenž byl proteolyticky degradován [18]. Protein p53 je redox-senzitivní a zaujímá svou aktivní konformaci pouze v redukčním prostředí. NF- κ B je rodinou transkripční faktorů regulujících expresi mnoha důležitých proteinů. Do rodiny patří proteiny p50, p52, p65, RelB a c-Rel [19]. V klidových fyziologických podmínkách je NF- κ B přítomen v cytoplasmě všech buněk v inaktivní heterotrimerní konformaci, nejčastěji p50, p65 a inhibitoru κ B α . Aktivuje se v případě fosforylace inhibitoru a jeho degradace v proteasomu za vzniku heterodimeru (někdy i homodimeru). Inhibicí kinasy, která fosforyluje inhibitor κ B α , nebo inhibicí interakce podjednotky p65 s DNA (př. plumbagin) dochází k umlčení genů, které jsou zapojené do buněčné proliferace (cyklin D₁ a cyklooxygenasa 2), potlačení apoptózy a angiogeneze (VEGF). To vysvětluje, proč jsou některé naftochinony více toxické pro nádorové buňky, ve kterých je dimerní forma NF- κ B dominující, jejich účinky potlačují invazi buněk, angiogenezi a zánět [14].

Naftochinony mohou způsobovat změny na DNA dvěma základními mechanismy: přímou interakcí s DNA (interkalace nebo alkylace/arylace nukleotidů) či inhibicí enzymů, které s DNA interagují. Příkladem jsou DNA topoisomerasy, které uvolňují torzní napětí řetězce, které mohlo vzniknout při replikaci DNA či opravných dějích. Topoisomerasy I a II jsou nadměrně exprimovány především v nádorových buňkách, kde je kladen důraz na vysokou rychlost proliferace a četnost chyb na DNA je vyšší. Předpokládá se, že inhibice topoisimeras naftochinony je založena na elektrofilním ataku thiolových skupin enzymů nebo na chelataci iontů kovů (topoisimerasa I obsahuje doménu zinkového prstu). Poškození DNA aktivuje další signální kaskády (včetně p53 dráhy), které řídí buněčný cyklus a rozhodují o DNA opravě či apoptóze. Plyta a spolupracovníci se domnívají, že naftochinony s alespoň jednou fenolovou hydroxylovou skupinou (juglon, shikonin) jsou významnými inhibitory topoisimeras [14]–[16].

1.3.2 Biologické účinky

Naftochinony, podobně jako další druhy sekundárních metabolitů (flavonoidy, alkaloidy, terpeny, kumariny atd.), jsou ve farmaceutickém průmyslu známy pro svou strukturní rozmanitost a široký rozsah farmakologických účinků. Rostliny obsahující tyto druhy látek jsou využívány v tradiční čínské a indické (ayurveda) medicíně po mnoha staletí pro léčbu různých nemocí, např. extrakty z ořešáku černého obsahující vysoké koncentrace

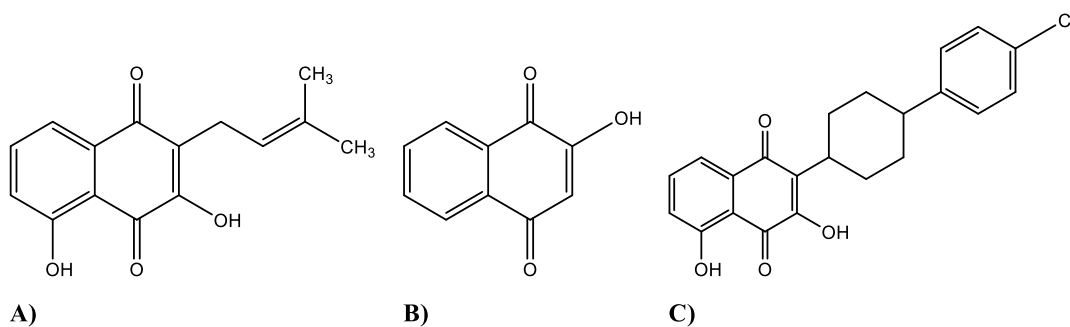
juglonu se používají na léčbu akné, zánětlivých onemocnění, ale i pro barvení vlasů. Kořeny olovence cejlonského (lat. *Plumbago zeylanica*), hlavního zdroje plumbaginu, byly využívány pro své neuroprotektivní a hepatoprotektivní účinky či stimulaci kardiovaskulárního systému [14].

Antimikrobiální účinky

Řada mikroorganismů si v průběhu několika desítek let vyvinula rezistenci vůči některým konvenčně využívaným antimikrobiálním látkám. To je velkou komplikací léčebných postupů. Řešením je hledání, testování a zavedení nových terapeutik, které budou mít minimálně stejnou účinnost. Řada vědců se inspiroje přírodními obrannými mechanismy proti mikrobiálním škůdcům. Následující řádky dokumentují antimikrobiální účinky naftochinonů, které však vyžadují klinické testování pro schválení jejich používání v praxi.

Rezistence bakterií na poli nadužívání antibiotik představuje největší výzvu. Žádaná jsou hlavně nová antibiotika proti bakteriím *Helicobacter pylori*, *Clostridium paraputrificum a perfringes*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis* a *Neisseria gonorrhoeae*. Aktivita naftochinonů byla srovnána s konvenčními antibiotiky (tetracykliny, amoxicilin, penicil, streptomycin). Zjistilo se, že pro účinnost je důležitější přítomnost methylové skupiny v poloze C2 na naftochinonu (plumbagin) než hydroxylové skupině na stejné pozici (lawson). Extrakt z lapacha (lat. *Tabebuia impetiginosa*) obsahující lapachol (viz Obr. 7, str. 34) prokázal selektivní snížení aktivity některých střevních bakterií, silné účinky měl proti patogenům *C. paraputrificum a perfringes*, mírný účinek proti *E. coli* a slabý až střední účinek proti tělu prospěšným bakteriím, tj. *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei* [14], [16].

Systémová nákaza kvasinkami (hlavně *Candida spp.*: *Candida albicans*) je vážnou příčinou úmrtí při nákaze HIV, problémem je jejich častá multirezistence na antimykotickou léčbu. Ukázalo se, že shikonin a jeho deriváty jsou vůči těmto druhům účinnější než flukonazol. Mezi další naftochinony s antimykotickou aktivitou patří plumbagin. Zajímavostí je, že naftochinony jsou syntetizovány i houbami, v nepříznivých podmínkách zpomalují nebo zastavují jejich růst [14], [16], [20].



Obr. 7: Chemická struktura A) lapacholu, B) lawsonu a C) atovaktonu.

Účinnost byla prokázána dokonce proti parazitům způsobujícím Chagasovu nemoc (*Trypanosoma cruzi*), tropickou malárii (*Plasmodium falciparum*) či toxoplazmózu (*Toxoplasma gondii*). Mechanismus účinku naftochinonů je založený na inhibici dihydrofolát reduktasy, která je důležitá při *de novo* syntéze stavebních bloků DNA a na interferenci s cytochrom c oxidoreduktasou, tj. komplexem III dýchacího řetězce, vedoucí ke znemožnění oxidace ubichinolu a kolapsu membránového potenciálu mitochondrií. Příkladem je klinickými studiemi schválený atovakvon (viz Obr. 7), naftochinon proti malárii, který se v dnešní době používá v synergické kombinaci s proguanilem. Po objevení atovaktonu byly studovány i další naftochinony za účelem posouzení jejich antimalarické aktivity. Jako slibné se ukázaly aminonaftochinony [14].

Některé naftochinony se osvědčily v inhibici enzymů důležitých pro přežití virů. β -lapachon inhibuje reverzní transkriptasu retrovirů [21]. Zatímco nesubstituované 1,4-naftochinony inhibují RNasu esenciální pro replikaci HIV viru [14].

Imunologické a protizánětlivé účinky

Naftochinony byly zkoumány i pro své imunomodulační účinky. Mohly by být prospěšné při léčbě autoimunitních, zánětlivých a cévních onemocnění. Plumbagin se osvědčil jako imunosupresivum při podání myším a zabránil odmítnutí implantovaného štěpu. Předpokládá se, že inhiboval nejen proliferaci lymfocytů bráněním jejich vstupu do S-fáze buněčného cyklu, ale i NF- κ B signalizační dráhu. Juglon moduluje prostřednictvím inhibice PIN1 protein (z angl. *peptidylprolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1*) buněčný růst a proliferaci T-lymfocytů včetně produkce prozánětlivých cytokinů (IL-2, INF- γ). PIN1 je enzym, který inhibuje interakci podjednotky p65 s inhibitorem κ Ba v NF- κ B signalizační dráze a také působí v jedné z nejdůležitějších regulačních signalizačních kaskád: MAP kinasy/JNK dráhy (JNK z angl. *c-Jun N-terminal kinase*). Ta má na starosti

přenos a amplifikaci signálu s dopadem na buněčné dělení, diferenciaci, zánětlivou reakci a apoptózu savčích buněk [14], [16], [22], [23].

Protizánětlivé a imunomodulační účinky byly studovány i u shikoninu a jeho derivátů na myším modelu artritidy indukované kolagenem. Inhibují expresi cyklooxygenasy-2, *in vitro* degranulaci žírných buněk a aktivitu fosfolipas C [14], [20]. Cyklooxygenasy jsou enzymy katalyzující syntézu prostaglandinů z kyseliny arachidonové. Expresi izoformy 2 indukují prozánětlivé cytokiny a její hladina je tedy zvýšena hlavně při zánětu [24]. Žírné buňky jsou zodpovědné za alergické reakce. V okamžiku, kdy alergen interaguje s imunoglobulinem E, který je schopný se vázat na povrch žírných buněk, dochází k uvolnění zánětlivých mediátorů, tzv. degranulaci [25]. Fosfolipasy typu C katalyzují hydrolýzu fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (fosfolipid nacházející se ve vnitřní části lipidové dvojvrstvy cytoplasmatické membrány) a generují druhé posly: inositol-4,5-trifosfát a diacylglycerol. Ty spolupůsobením aktivují proteinkinasu C ovlivňující celou řadu fyziologických procesů (svalová kontrakce, citlivost na opiáty, buněčná proliferace a přežití buněk) [26].

Antipsoriatické účinky

Chronický zánět provázející lupénku a produkce prozánětlivých cytokinů s ním spojená jsou řízeny T_H buňkami (T_H1, T_H2, T_H17 a T_H22), které jsou u zdravých jedinců pod kontrolou T_{reg} buněk. Regulační T-lymfocyty patří do skupiny CD4⁺ buněk a jsou velmi důležité v řízení fyziologické a patologické odpovědi imunitního systému. T_{reg} potlačují rozvoj autoimunitních onemocnění a produkují IL-10, IL-35 a transformační růstový faktor β (TNF- β , z angl. *transforming growth factor β*). V případě lupénky dochází k dysregulaci rovnováhy T_H17/T_{reg}. V kapitole 1.2.2 Farmakologická léčba byly popsány konvenční postupy při léčbě lupénky, do povědomí západního světa se však dostává i tzv. komplementární a alternativní medicína, která několik desítek až stovek let využívá extrakty z léčivých rostlin. V rostlinných výtažcích mohou být přítomné různé druhy bioaktivních sloučenin, které mohou být dále izolovány a testovány. Studie z roku 2022 [27] shrnuje různé druhy přírodních produktů včetně extraktů i látek z nich izolovaných, které zasahují do rovnováhy T_H17/T_{reg}, opírá se o studie provedené od roku 2015. Pro obsah této práce byly vybrány pouze sloučeniny se strukturou naftochinonů [27].

Juglon, lawson a plumbagin byly detekovány v extraktech z listů henovníku bílého (lat. *Lawsonia inermis*), lidově henna, která je běžně používána v kosmetickém průmyslu jako barvivo [28]. Účinky naftochinonů na keratinocyty otevřely obzory pro vývoj

nových léčiv na kožní onemocnění, např. na lupénku. Toxicita juglonu, plumbaginu a β -lapachonu na tzv. HaCaT keratinocytech (pozměněná lidská buněčná linie epidermis, z angl. *transformed epidermal human cell line*) naznačuje, že přípravky s těmito sloučeninami by měly být používány s opatrností, mohou být ve větších koncentracích potenciálně škodlivé. Nicméně inhibice proliferace keratinocytů je jedním z cílů farmakologické léčby lupénky. Zde je potřeba zmínit, že jedním z podstatných problémů naftochinonů je jejich silná vazba na svrchní vrstvu kůže (*stratum corneum*). To jednak způsobuje obtížné smytelné zbarvení kůže (obtížné např. u juglonu při loupání ořechů a naopak využívané u dočasného „tetování“ lawsonem - henou), ale hlavně snižuje vstřebání naftochinonů do hlubších vrstev kůže, kde je potřebný jejich terapeutický efekt. Proto je vývoj proléčiv a nanoformulací v této oblasti obcházejících tuto vlastnost naftochinonů vysoce žádoucí a zabývá se jím i tato diplomová práce [14], [16].

Shikonin izolovaný z kořenů kamejky rudokořenné (lat. *Lithospermum erythrorhizon*) byl zkoumán pro své imunomodulační, protizánětlivé a protinádorové účinky. Zhang s kolegy detekovali počet a funkci T_{reg} buněk *in vivo* a *in vitro*. Zjistili, že by shikonin mohl účinně podporovat diferenciaci indukovaných T_{reg} inhibicí mTOR dráhy *in vitro*. mTOR (z angl. *mammalian target of rapamycin*) je Ser/Thr kinasa, která se podílí na koordinaci růstu buněk, jejich přežívání, proliferaci a řízení sekrece prozánětlivých cytokinů keratinocyty: IL-6, chemokin CXCL8 ligand 8, VEGF či TNF- α . V *in vivo* pokusech shikonin zmírnil kožní léze myši, u kterých byla lupénka indukovaná IMQ, a stimuloval diferenciaci T_{reg} buněk ve slezině a jejich sekreci v periferních tkáních. Inhibuje také proliferaci HaCaT keratinocytů a DC buněk [27], [29], [30].

Antioxidační účinky

Ačkoli redoxní chování uděluje naftochinonům hlavně prooxidační charakter, někteří autoři obhajují, že mohou mít i antioxidační kapacitu. Gao a spolupracovníci studovali alkannin (jeho R-enantiomer je shikonin), který vykazoval silné antioxidační účinky proti různým typům ROS a protektivní účinky vůči peroxidaci lipidů. Jeho reaktivita se superoxidovými aniontovými radikály a singletovým kyslíkem byla vyšší než u běžně známých antioxidantů jako je kyselina L-askorbová nebo α -tokoferol [14], [20].

Protinádorové účinky

Naftochinony byly spolu s benzochinony a antrachinony (např. doxorubicin byl schválen v roce 1974) studovány na celé řadě buněčných linií s cílem otestovat jejich protinádorovou aktivitu. Extrakt z lapacha prokázal aktivitu vůči několika nádorovým buněčným liniím. Analýzou červeného čaje lapacho bylo izolováno několik chinoidních sloučenin, z nichž nejrelevantnější, kterým se přisuzuje klinický význam a protinádorový účinek, jsou lapachol a β -lapachon. Obě tyto látky se dostaly do klinických studií. Po orální manifestaci lapacholu bohužel nebyly pozorovány žádné signifikantní terapeutické účinky, v krvi nebyla detekována uspokojivá hladina. Předpokládá se, že sloučeniny přítomné v extraktu z lapacha mají synergické účinky a vzájemně se potencují. β -lapachon byl v klinickém testování úspěšnější, byla dokončena druhá fáze pro léčbu rakoviny slinivky břišní v kombinaci s gemcitabinem a spinocelulárního karcinomu hlavy a krku [14], [15], [31].

Jak už bylo zmíněno, selektivita naftochinonů vůči nádorovým buňkám byla přisuzována především vyšší intracelulární koncentraci aktivní dimerní formy NF- κ B. Nicméně cytotoxicita juglonu vedoucí k apoptóze a nekróze byla vyšší pro lidské zdravé fibroblasty než pro nádorové linie tlustého střeva a rakoviny prsu. Pro zvýšení selektivity bylo syntetizováno několik derivátů. Zavedení methoxy skupiny v poloze C5 zvýšilo cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám, stejně jako zavedení bromu v poloze C2 nebo C3. Plumbagin v *in vitro* a *in vivo* studiích prokázal tumorsupresivní účinky vůči melanomu a nádorům prostaty, děložního hrdla a vaječníků. Pozornost přitahuje i shikonin [14], [15].

Naftochinony by mohly být v budoucnu alternativou či adjuvantní léčbou chemorezistentních nádorů. Plumbagin zvyšoval senzitivitu nádorů na myších modelech při radioléčbě a β -lapachol vykazoval synergický účinek při podání s paklitaxelem na letalitu implantovaných nádorových buněčných linií do myši. Omezené použití některých slibných sloučenin, jako je plumbagin, tkví v jejich nízké rozpustnosti ve vodě, ale i vedlejších účinků. K překonání nízké rozpustnosti ve vodě, lepší biodistribuci včetně eliminace vedlejších účinků a prodloužení poločasu cirkulace se hojně využívají nanosystémy pro dopravu léčiv do organismu (viz kapitola 1.4 Nanosystémy pro cílenou dopravu léčiv na lupénku) [14], [15].

1.3.3 Toxicita naftochinonů

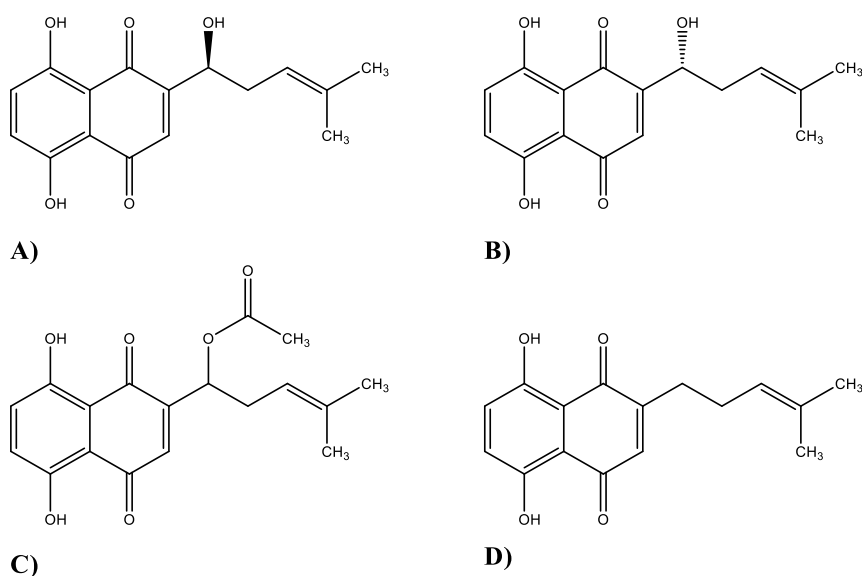
Hlavním důvodem, proč většina látek a chemických sloučenin neprojde klinickými testy, je jednoznačně jejich toxicita a nežádoucí účinky. Stejně tak je to i s některými naftochinony a jejich možnými farmakologickými aplikacemi. Vykazují vysoký stupeň toxicity nejen pro eukaryotní, ale i prokaryotní organismy. Nefrotoxicita byla prokázána u menadionu, také známý jako syntetický vitamin K3 (2-methyl-1,4-naftochinon), lawsonu (2-hydroxy-1,4-naftochinon) a 2-amino-1,4-naftochinonu, běžná byla i pro většinu 1,2-naftochinonů. Zajímavou souvislost s nefrotoxicitou prokázaly testy, ve kterých byly laboratorním krysám podány induktory DT diaforasy (oxidoreduktasa katalyzující dvouelektronovou redukci naftochinonu na naftohydrochinon). Potkani byli vystaveni expozici 2-amino-1,4-naftochinonu a lawsonu, nefrotoxicita nebyla potvrzena, nicméně došlo k výraznému úbytku červených krvinek (hemolýza). Člověk má hladiny DT diaforasy nízké, a tak je poškození ledvin vyvolané naftochinony velmi pravděpodobné. Dalším nežádoucím účinkem je nespecifická inhibice NO synthas. Inhibice endoteliálních NO synthas vede ke zvýšení cévního tonu (oxid dusnatý je důležitý pro vazodilataci) a potenciálnímu srdečnímu selhání [32]. Vaskulární dysfunkce byla pozorována při podání naftazarinu (5,8-dihydroxy-1,4-naftochinon) a jeho methyl-derivátu. Důkazy naznačují, že oxidační stres spojený s prooxidační aktivitou naftochinonů zřejmě přispívá nejen endoteliálním dysfunkcím, ale i ateroskleróze a hypertenzi [14].

Přestože byly diskutovány protinádorové účinky, dlouhodobá expozice může mít karcinogenní a mutagenní efekt. Mutagenita je přisuzovaná hlavně semichinoidním, za katalýzy NADH-cytochrom P450 oxidoreduktasy, vzniklým meziproductům. Naftochinony s prenylovým postranním řetězcem nebo bisnaftochinony mutagenní nejsou na rozdíl od naftochinonů s jednou nebo dvěma hydroxylovými skupinami a/nebo methylovými substituenty. Problémem je také nemožnost predikce akutní *in vivo* toxicity z *in vitro* cytotoxicity: menadion prokázal vyšší toxicitu *in vitro* než lawson, při *in vivo* testování tomu bylo naopak [14].

1.3.4 Shikonin a jeho deriváty

Shikonin je hlavní bioaktivní složkou Zicao, tj. sušený kořen kamejky rudokořenné, která se používá v tradiční čínské medicíně pro své protizánětlivé účinky. První derivát acetylshikonin, taktéž přítomný v kořenech rostliny, byl izolován v roce 1922. Později byl identifikován také S-enantiomer shikoninu, tzv. alkanin a deoxyshikonin (viz Obr. 8). Skutečnost, že od roku 2002 vzniklo přes 200 článků, poukazuje na to, jak je shikonin velmi zajímavou a perspektivní molekulou z pohledu farmakologických účinků [20], [30].

Shikonin má omezenou rozpustnost ve vodě, která je příčinou jeho nízké biologické dostupnosti. Kromě toho je termolabilní a náchylný k oxidaci a polymeraci. Za účelem zlepšení stability a rozpustnosti ve vodě se vyzkoušela řada nosičů a nanočásticových systémů zahrnujících např. použití biologicky odbouratelných biokompatibilních polymerních materiálů, hydroxypropyl- β -cyklodextrinu, β -laktoglobulinu, fosfolipidů v přítomnosti cholesterolu pro vznik polymerních nanočástic, nanogelů, micel a lipozomů (viz kapitola 1.4 Nanosystémy pro cílenou dopravu léčiv na lupénku). Shikonin, juglon i jejich deriváty byly testovány na několika typech buněčných linií. Studie [30] poskytuje souhrn mechanismů účinku, ke kterým se došlo na základě *in vitro* a *in vivo* testování od roku 2015. Uvádí také experimentální modely a typy buněčných linií, na kterých byly zvolené koncentrace shikoninu testovány. Farmakokinetické parametry jsou velmi důležité pro posouzení toxicity a optimalizaci návrhu zkoumaného potenciálního léčiva [20], [30].



Obr. 8: Chemická struktura A) shikoninu, B) alkaninu, C) acetylshikoninu a D) deoxyshikoninu.

1.4 Nanosystémy pro cílenou dopravu léčiv na lupénku

Nanotechnologie s sebou přinesly obrovský pokrok ve vědě, medicíně a technice. Biokompatibilní materiály v nanoměřítku začaly být používány jako systémy pro cílenou dopravu léčiv (z angl. *drug delivery systems*), *in vitro* diagnostiku, kontrastní látky pro zobrazovací metody a k usnadnění diagnostiky a léčby různých typů onemocnění. Systémy pro dopravu léčiv lze popsat jako biotechnologické formulace či nosiče, které umožňují zavedení terapeutické látky do organismu a významně zlepšují její farmakokinetický a farmakodynamický profil. Zlepšují účinnost, bezpečnost a řízení rychlosti, času a místa uvolňování. Lze dosáhnout vysoké lokální koncentrace, obejít nízkou rozpustnost ve vodném prostředí, zlepšit stabilitu léčiva, eliminovat nepříznivé interakce s biologickým prostředím, prodloužit dobu biodistribuce a snížit riziko vedlejších účinků. Nanosystémy lze dělit podle složek, které byly použity při jejich přípravě, na nanosystémy na lipidové bázi, polymerní a anorganické nanosystémy (zlaté nanočástice, stříbrné nanočástice apod.) [33]–[35]. Tato práce se soustředí především na využití lipozomů pro enkapsulaci naftochinonů, a proto se následující kapitola týká pouze nanosystémů na bázi lipidů.

1.4.1 Nanosystémy na lipidové bázi

Nanonosiče na bázi lipidů jsou minimálně toxické, neboť jsou pro jejich přípravu využívány složky, které jsou biologicky rozložitelné a mimikují přírodní fyziologické komponenty, protože mnohdy pochází z přírodních zdrojů (sójové boby, vaječný žloutek apod.). Patří sem lipozomy, které jsou nejpopulárnější, transferozomy, niozomy, pevné lipidové nanočástice, nanostrukturované lipidové nosiče, ethozomy, nanoemulze (viz Obr. 9, str. 43). Hlavními složkami jsou lipidy (včetně fosfolipidů a cholesterolu, lipidů v pevné a kapalné fázi) a nenabité i nabitě povrchově aktivní látky (surfaktanty), respektive emulgátory. Surfaktanty jsou sloučeniny, které mají hydrofilní a hydrofobní část a v kapalné fázi se orientují tak, aby snížily povrchové napětí. Emulgátor je speciálním typem povrchově aktivní látky, která stabilizuje emulzi. V mnoha případech se lipidy uspořádají do tzv. kapalně krystalické fáze (mezofáze), která má vlastnosti kapalin (toky) i pevných látek (dvojloň paprsků, typické pro anizotropní krystaly, jejichž index lomu závisí na směru procházejícího paprsku). Je to dynamická metastabilní fáze, která je kritická pro funkčnost systémů [7], [34].

Lipozomy

Lipozomy jsou drobné dvojvrstvé vezikuly (50–1000 nm v průměru) vznikající na základě amfipatického charakteru lipidu. Podle počtu lipidových dvojvrstev, které obklopují vodné jádro, je lze dělit na unilamelární a vícelamelární vezikuly. Jejich povrch lze snadno funkcionalizovat pro lepší zacílení či responzivitu na různé typy stimulů. Hydrofilní léčiva zůstávají ve vodném jádře a hydrofobní léčiva se mohou začlenit i do lipidové dvojvrstvy. Lipozomy mohou zvyšovat penetraci neiontových lipofilních léčiv do kůže. Mechanismus účinku zahrnuje adhezi lipozomu na povrch kůže a následné uvolnění aktivní látky ven. Povrchově aktivní látky mohou působit jako zesilovače penetrace, a proto se někdy k formulacím přidávají. Lipozomy z fosfatidylcholinu, kyseliny olejové a začleněného MTX podané transdermálně zvýšily propustnost díky přítomnosti kyseliny olejové, snížily podráždění kůže a zlepšily toleranci. Lipozomy s obsahem psoralenu taktéž zlepšily difúzi kůže, bezpečnost a i účinnost UV-A fototerapie při léčbě IMQ indukované lupénky na myších modelech. Problémem lipozomů může být krátký poločas rozpadu a unikání léčiva kvůli nedostatečné stabilizaci fosfolipidy. Ty také mohou podléhat hydrolytickým a oxidačním reakcím [7], [34], [36], [37].

Transferozomy

Strukturně podobnými vezikuly jsou transferozomy, které jsou velmi flexibilní, označují se také za elastické lipozomy. Jejich flexibilita a schopnost deformace je způsobena přítomností tzv. okrajových aktivátorů (z angl. *edge aktivator*), což jsou obvykle jednořetězcové surfaktanty, např. Tween 80, Span 80 nebo cholát sodný. Destabilizují lipidové dvojvrstvy a zvyšují fluiditu snížením mezifázového napětí [38]. Transferozomy se využívají pro dopravu nízko- i vysokomolekulárních látek. Jejich výhodou je schopnost lepšího průniku malými póry, což je prospěšné při kožních aplikacích. Příkladem jsou unilamelární transferozomy naplněné betamethasonem dipropionátem, které zvýšily stabilitu a snášenlivost léčiva u pacientů s lupénkou [7], [34], [37].

Niozomy

Niozomy jsou nejlepší alternativou lipozomů, taktéž se jim říká „syntetické lipozomy“. Byly vyvinuty k překonání nízké stability fosfolipidů. Jejich název je odvozen od nenabitých (z angl. *non-ionic*) povrchově aktivních látek, které tvoří amfifilní dvojvrstvu. Používají se především takové, které mají dlouhý uhlovodíkový řetězec bez dvojné vazby. Při přípravě niozomů za použití Tweenu 20, 60 nebo 80, se mnohdy zavádí

cholesterol, který zlepšuje tuhost a stabilitu vzniklé dvojvrstvy, kvůli nerovnováze hydrofilních hlaviček a krátkých hydrofobních konců komerčně dostupných povrchově aktivních látek [37].

Pevné lipidické nanočástice

Pevné lipidické nanočástice (SLNs, z angl. *solid lipid nanoparticles*) jsou částice o průměru od 10 nm do 10 µm tvořené vrstvou povrchově aktivních látek (např. dodecylsírán sodný). Vnitřek nanočástic tvoří lipidové jádro v kapalně krystalické fázi, která připomíná „cihlovou zed“, ve které jsou molekuly léčiva rovnoměrně rozprostřeny. SLNs se široce používají při léčbě různých kožních onemocnění včetně lupénky. Na povrchu kůže vzniká z nanočástic film, který se spojuje s lipidovou vrstvou na povrchu *stratum corneum*. Zvyšují hydrataci kůže až o 30 % za 4 týdny léčebné terapie. SLNs s cyklosporinem A a kalcipotriolem zlepšily penetraci a zvýšily lokální koncentraci těchto léků v kůži, léčba byla účinnější [7], [36], [37].

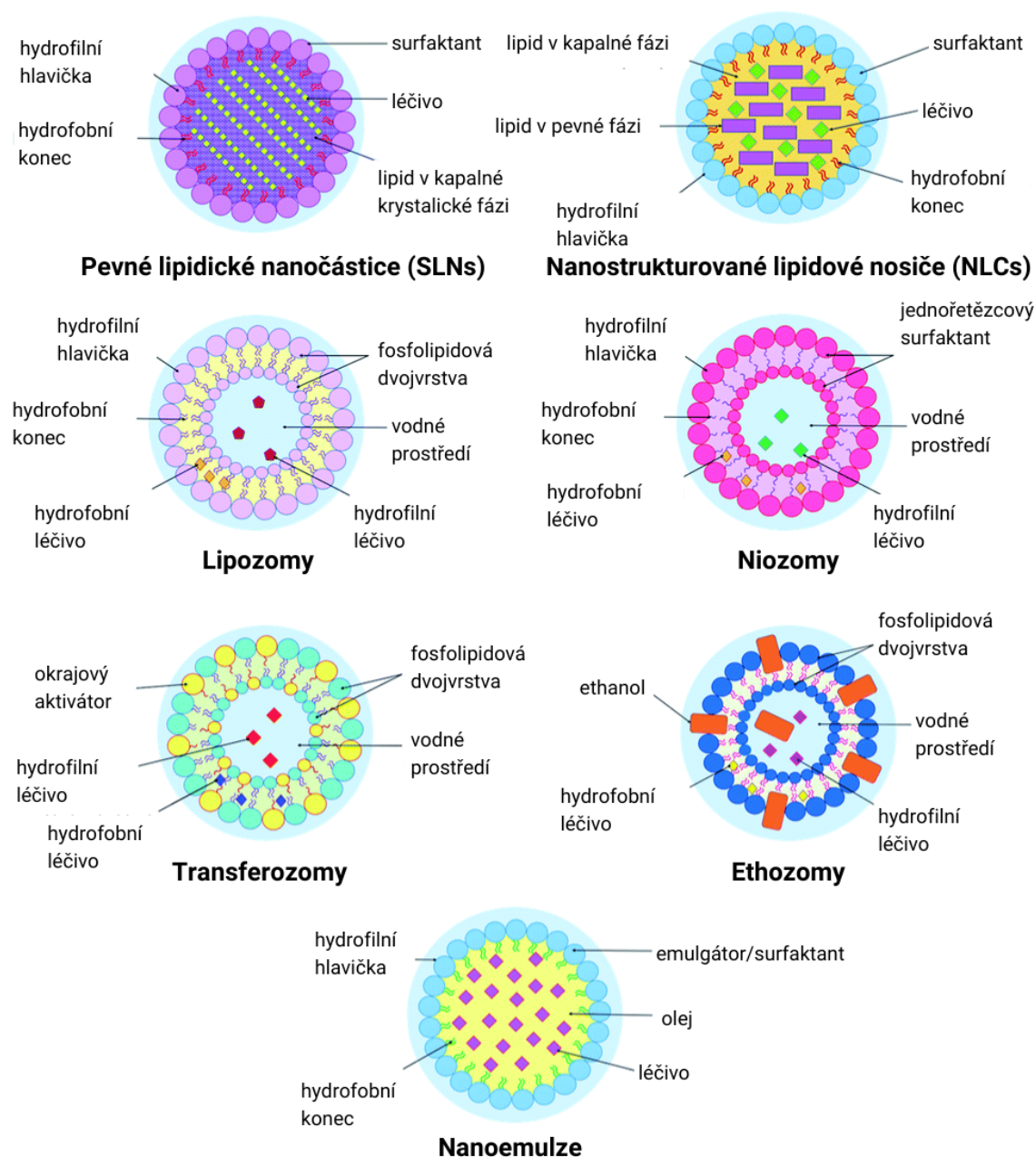
Nanostrukturované lipidové nosiče

Nanostrukturované lipidové nosiče (NLCs, z angl. *nanostuctured lipid carriers*) jsou druhou generací SLNs, aby se předešlo potížím s uvolňováním a omezeným množstvím léčiva, které lze do SLNs inkorporovat. Vznikají zavedením lipidů v kapalně fázi (olejů) do pevné lipidové matrice. Membránu tvoří surfaktanty (jeden typ nebo směs). Přítomnost kapalně fáze zvyšuje solubilizaci a depozici léčiva v kůži. Tyto systémy taktéž zvyšovaly hydrataci kůže, což je příhodné pro léčbu lupénky. Topicky podávaný gel obsahující NLCs se začleněním acitretinem signifikantně zvýšil jeho depozici v kůži oproti gelu bez nanonosiče. Dalším příkladem byly NLCs s MTX, které byly formulovány pomocí homogenizace za horka v kombinaci s ultrazvukem. Nanočástice byly stabilní při teplotě 25°C až 28 dní, účinnost zabudování léčiva (EE, z angl. *entrapment/encapsulation efficiency*) se pohybovala kolem 65 %. Zlepšily průchod pokožkou a bylo dosaženo poměrně rychlého uvolňování léčiva (70 % během 2 hodin) [7], [36], [37].

Ethozomy

Ethozomy nejsou příliš známou třídou lipidových nanosystémů. Skládají se z ethanolu (20–50 %), stabilizátorů a fosfolipidů. Existují jedno- i vícemelární struktury, ve velikosti od 30 nm do několika mikronů. Dokáží začlenit poměrně velké množství léčiva na rozdíl od lipozomů. Přítomnost ethanolu usnadňuje průnik do nejsvrchnější

vrstvy kůže začleněním se do fosfolipidových membrán a zvýšením jejich fluidity, nicméně může pokožku vysušovat a způsobit její podráždění. Ethozomy zvýšily účinnost transdermálního podání léčiv různých dermatologických poruch, příkladem je použití gelu na bázi ethozomů obsahujících kortikoid klobetasol propionát při léčbě lupénky [7], [36], [37].



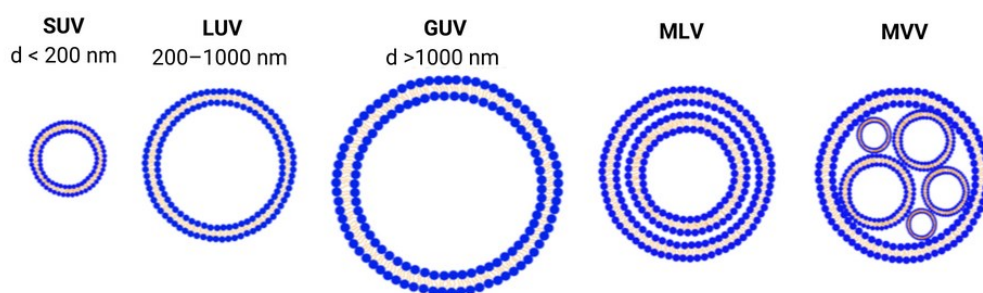
Obr. 9: Schématické znázornění některých typů nanosystémů na lipidové bázi. Obrázek ze zdroje [37] byl převzat a upraven dne 7. 8. 2022.

Nanoemulze

Nanoemulze a nanosuspenze podobně jako předešlé systémy nabízejí několik výhod při topickém podání léčiv: zvýšený průnik kůží, hydratace pokožky, delší doba uvolňování léčiva a nižší pravděpodobnost podráždění. Jedná se o izotropní, heterogenní systém, který se skládá ze dvou nemísitelných kapalin (voda v oleji, olej ve vodě). Léky jsou suspendovány v olejových kapičkách (s průměrem < 200 nm), které jsou stabilizovány tenkým filmem emulgátorů (Tween 80, fosfolipidy př. sójový lecitin, polysacharidy a polymery př. PEG). Nanoemulze s MTX začleněným do oleje ze semen *Hydnocarpus wightianus*, tzv. Chaulmoogra, stabilizované Tween 80 měly lepší biologickou dostupnost a nižší akumulaci v okolních tkáních a krevním séru [7], [36], [37].

1.4.2 Způsoby přípravy lipozomů

Lipozomy jsou považovány za malé kulovité dvouvrstvé vezikuly a lze je dále klasifikovat do malých unilamelárních vezikul (SUVs, z angl. *small unilamellar vesicles*) o průměru do 200 nm, velkých unilamelárních vezikul (LUVs, z angl. *large unilamellar vesicles*) o průměru v rozpětí od 200–1000 nm a obrovských unilamelárních vezikul (GUVs, z angl. *giant unilamellar vesicles*) o průměru větším než 1000 nm. Multilamelární vezikuly (MLVs, z angl. *multilamellar vesicles*) se skládají z několika soustředných dvojvrstev a multivezikulární vezikuly (MVVs, z angl. *multivesicular vesicles*) jsou složeny z několika malých váčků obalených větším [35], [39], viz Obr. 10.



Obr. 10: Schématické znázornění klasifikace lipozomů na základě jejich velikosti a lamelarity. Obrázek ze zdroje [35] byl převzat a upraven dne 7. 8. 2022.

Při přípravě lipozomů je třeba kontrolovat mnoho parametrů, tj. velikost, morfologii a vlastnosti jejich povrchu, které určují jejich využití pro dopravu léčiv. Obvykle je požadována menší velikost (100–200 nm) a homogenita ve struktuře. SUVs

proto přitahují velkou pozornost, jsou dostatečně velké, aby se zabránilo renální clearance, a dostatečně malé, aby mohly být pohlcené fagocytárním systémem buňky. V dnešní době jsou lipozomy připravovány z přírodních nebo syntetických lipidů, např. fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylserin či fosfatidylglycerol. Bohužel mají mnohdy špatnou chemickou a koloidní stabilitu, rychlé vylučování z krve po intravenózním podání, vysokou permeabilitu jejich membrán vedoucí k uvolňování léčiva. K překonání těchto problémů se lipozomy mohou připravovat s přídavkem glykolipidů (napodobující membránu červených krvinek), polymerů např. polyethylenoxidu (delší cirkulace) či cholesterolu, který dodává membráně rigiditu a zvyšuje její stabilitu *in vitro* a *in vivo*. Koloidní stabilita lipozomů vychází z charakteru fosfolipidů, které jsou ve vodě molekulárně nerozpustné a mají tendenci agregovat (rovnovážný stav), zatímco lipozomální struktura odpovídá spíše metastabilnímu stavu, kterého je dosaženo dodáním vnější energie (např. sonikace) [35], [39].

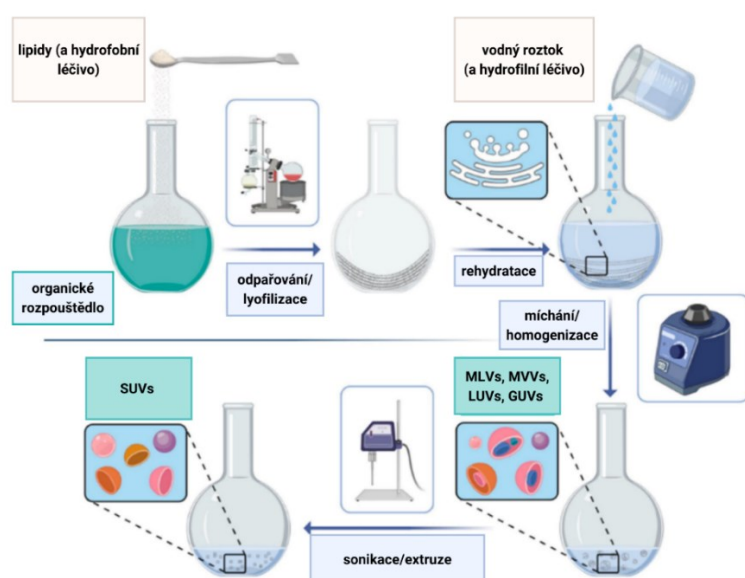
Fyzikálně-chemické vlastnosti lipozomů včetně účinnosti zabudování léčiva jsou silně ovlivněny složením systému a zvolenou metodou přípravy. Konvenční metody jsou jednoduché způsoby přípravy zejména v laboratorním měřítku, ale obvykle selhávají v reprodukovatelnosti mezi různými šaržemi a nejsou spolehlivé na průmyslové úrovni. Nové metody (hlavně mikrofluidní technologie a technologie na bázi superkritických tekutin, viz dále) jsou efektivnější, poskytují definovanější a reprodukovatelnější formulace, vyhovují různým typům environmentálních omezení a jsou vhodné pro průmyslovou výrobu, vyžadují ale speciální vybavení, které může zvýšit náklady přípravy [35].

Konvenční metody přípravy

Lipozomy lze konvenčně připravit metodou hydratace tenkého lipidového filmu, odpařováním reverzní fáze, technikou vstřikování rozpouštědla a dialýzou detergentu. Všechny tyto metody sestávají z kroku, ve kterém jsou lipozomy dispergované ve vodném prostředí. Výsledkem jsou většinou lipozomy typu LUVs, GUVs a MLVs. Pro získání zvolené strukturní charakteristiky, velikosti, morfologie a lamelarity jsou nutné i další kroky, např. sonikace, vysokotlaká homogenizace nebo extruze, které minimalizují polydisperzitu a velikost částic [37].

Metoda hydratace tenkého filmu (Banghamova metoda) je založena na rozpuštění lipidů v organické fázi (dichlormethan, chloroform, ethanol, chloroform-methanol), která se poté odpaří na rotační vakuové odparce (RVO) za vzniku tenkého filmu na stěnách

baňky s kulatým dnem. Úplné odpaření rozpouštědla je dosaženo lyofilizací. Nanovezikuly se tvoří po rehydrataci tenkého filmu vodným roztokem po dobu 1–2 hodin při teplotě 60–70°C (destilovaná voda nebo fosfátový pufr, pH = 7,4). Pro docílení kompletní hydratace lipidů se suspenze ponechá přes noc při 4°C [40]. Léčivo, které chceme enkapsulovat, se rozpouští v závislosti na své povaze buď v organické fázi s lipidy, nebo vodné fázi (viz Obr. 11). Velikost vytvořených lipozomů je přímo úměrná objemu vodného roztoku. Ačkoliv se jedná o jednouchou metodu v laboratorním měřítku, není dobře škálovatelná a výtěžnost i reprodukovatelnost jsou nízké [35], [39], [40].



Obr. 11: Schématické znázornění přípravy lipozomů metodou hydratace tenkého lipidového filmu. Multilamelární vezikuly MLVs, multivezikulární vezikuly MVVs, velké unilamelární vezikuly LUVs, obrovské unilamelární vezikuly GUVs, malé unilamelární vezikuly SUVs. Obrázek ze zdroje [41] byl převzat a upraven dne 8. 8. 2022.

Velmi široce používanou technikou je odpařování reverzní fáze. Lipidy se opět rozpustí v organické fázi, která se odpaří za vzniku tenkého lipidového filmu. Tento film se poté znovu rozpustí v etheru nebo isopropyletheru. Přidá se vodná fáze s rozpuštěným hydrofilním léčivem. Tyto dvě fáze se nechají míchat a vzniká emulze typu voda v organickém rozpouštědle. Organické rozpouštědlo se opatrně odpaří za sníženého tlaku. Výsledkem je disperze lipozomů ve vodě. Existuje i jednodušší provedení, ve kterém se lipidy s hydrofobními molekulami rozpustí v organické fázi, a přidá se vodný pufr, který může obsahovat ve vodě rozpustné léčivo. Organické rozpouštědlo se odpaří na RVO a zbylá vodná fáze obsahuje lipozomy nejčastěji typu LUVs a MLVs. Tato metoda má obvykle vyšší účinnost enkapsulace léčiva než metoda hydratace tenkého

filmu. Metody mohou být komplikovány špatnou rozpustností lipidu v organické fázi [35], [39].

Dalším způsobem přípravy lipozomů je technika vstřikování rozpouštědla. V tomto případě je organický roztok lipidů (případně i hydrofobního léčiva) vstřikován rovnou do vodné fáze či pufu, který se většinou ohřívá nad teplotu varu organického rozpouštědla, za účelem jeho samovolného odpaření. Například při použití diethyletheru (teplota varu 34,6°C) se vodná fáze před injekcí zahřívá na 60°C. Alternativně, pokud použité rozpouštědlo má vyšší teplotu varu (ethanol, tetrahydrofuran), vstřikování může probíhat za pokojové teploty a konstantního míchání. Rozpouštědlo může být odstraněno dialýzou nebo se opatrně odpaří na RVO. Tato technika se využívá k přípravě větších lipozomů s obvykle vyšším indexem polydisperity značící širokou distribuci velikostí a v mnoha případech i s obsahem MLVs [35], [39].

Při metodě odstraňování detergentu jsou lipidy a případně i jiné hydrofobní molekuly smíchány s molekulami detergentu s vysokou kritickou micelární koncentrací (Triton X-100, deoxycholát sodný, alkyl glykosid) v organickém rozpouštědle, které je následně odpařeno za sníženého tlaku. Hydratací filmu vznikají kombinované micely: lipid–detergent. Odstraňování detergentu dialýzou, gelovou permeační chromatografií nebo adsorpcí na hydrofobní částice vede ke spontánnímu přeuspořádání micel do unilamelárních váčků [39], [40]. Podobný postup se volí při extrakci membránových proteinů, rozdíl je v tom, že se odstraňují lipidy. Detergenty (dodecylsírán sodný, dodecylmaltosid) díky svým hydrofobním vlastnostem solubilizují membránu a vznikají směsné komplexy: membránový protein–detergent, membránový protein–lipid–detergent, detergent–lipid. V dalších purifikačních krocích se lipidy odstraňují [40].

Post-formulační metody

Pro biomedicínské aplikace jsou základními parametry nízký index polydisperzity, velikost částic, lamelarita a homogenita roztoku. Tyto parametry lze ovlivnit třemi tzv. post-formulačními metodami: sonikace, extruze a vysokotlaká homogenizace [35].

Metodou sonikace se rozumí aplikace ultrazvukových vln o vhodné frekvenci a době trvání založené na kavitaci (vznik dutin) v roztoku lipozomů. Na vodné disperze fosfolipidů se používá sonikace ve vodní lázni nebo sonikace ultrazvukovou próbou (malé objemy). Sonikace sondou může degradovat lipidy a znehodnotit léčiva kvůli teplotě, které je během procesu generované. Proto se doporučuje roztok lipidů umístit do ledové

lázň. Přestože je sonikace jednou z nejpoužívanějších metod pro tvorbu SUVs, hrozí vysoká polydisperzita a nízká účinnost zapouzdření léčiva [40].

Metoda extruze spočívá v protlačování roztoku lipozomů skrz membrány o specifické velikosti pórů (25 nm – 1 μm). Kolem extruderu je umístěn tepelný blok, který umožňuje provádět extruzi nad teplotou fázového přechodu fosfolipidů (teplota, při které dochází k přechodu fosfolipidů ze stavu gelového do stavu fluidního – membrána, lipozom). Metoda má vysokou reprodukovatelnost, nevýhodou jsou ale vysoké ztráty produktu. Pro lipozomální nanoformulace existuje metoda tzv. francouzského lisu, která za vysokého tlaku protlačuje suspenzi MLVs přes malé otvory za vzniku SUVs [40].

Při vysokotlaké homogenizaci se suspenze lipozomů obsahující MLVs kontinuálně dávkuje do otvoru homogenizátoru za konstantního vysokého tlaku. Zmenšení lipozomů je způsobeno nárazy do stěny z nerezové oceli doprovázenými smykovými jevy, kavitací a turbulencí. Distribuce velikostí lipozomů závisí na tlaku, teplotě a množství lipidů v systému [40].

Novější metody

Mezi hlavní nevýhody konvenčních způsobů přípravy lipozomů patří obtíž při škálování (důležité pro farmaceutický průmysl) a nižší účinnost enkapsulace léčiva. Metody nejsou nejvhodnější pro biomolekuly, které jsou citlivější vůči vnějším vlivům (detergenty, organická rozpouštědla, sonikace a homogenizace). S cílem překonat tyto překážky byly vyvinuty následující metody. Lyofilizace může být začleněna do jakékoli přípravy lipozomů pro zabránění úniku léčiva, jeho oxidaci na vzduchu či jiným chemickým modifikacím, ke kterým může být léčivo náchylné před aplikací. Vodný roztok lipozomů je za atmosférického tlaku zmrazen a umístěn do vakua hluboko pod trojným bodem vody (koexistence třech skupenství). Led je odstraněn sublimací (fázový přechod z pevného do plynného skupenství) ohříváním. Lyofilizované lipozomy jsou extrémně hygroskopické a uchovávají se ve vzduchotěsných vymrazovacích nádobách [40].

Další potíží při konvenční přípravě lipozomů může být přítomnost zbytkových rozpouštědel, které jsou pro biologické aplikace toxické a zároveň přispívají k degradaci formulovaných lipozomů. Řešením může být náhrada organických rozpouštědel za superkritické kapaliny, které nad kritickým bodem v pT diagramu mají ve skutečnosti charakteristiky přenosu hmoty jako plyny a rozpouštěcí schopnosti jako kapaliny a tradiční rozpouštědla. Metoda superkritických tekutin má dvě hlavní fáze. Nejdříve se lipidy rozpouštějí v superkritickém oxidu uhličitém za vysokého tlaku (250 bar),

získaný superkritický roztok expanduje při teplotě 60°C s přidáním malého množství (7 obj. % ethanolu). Expandovaná kapalina se přes trysku vstříkne do vodné fáze za formulace lipozomů (0,2–4 µm) o vyšší koloidní stabilitě (až šest měsíců). Velikost lipozomů je přímo úměrná velikosti trysky. Metoda je vhodná pro enkapsulaci hydrofilních i hydrofobních léčiv (cisplatina, doxorubicin) [35], [40].

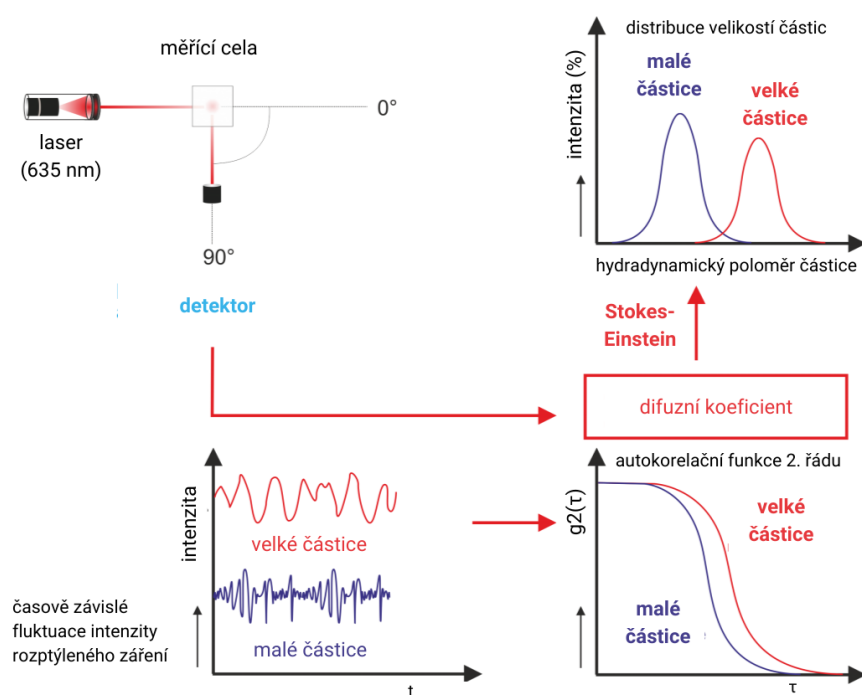
Mikrofluidika je založena na manipulaci proudění kapalin v prostorách planárního mikročipu. Lipidy jsou rozpuštěné v ethanolu nebo isopropanolu a jsou poháněné mikroskopickým kanálem o průřezu 5–500 µm. Alkoholická fáze je soustředěna mezi dva vodné proudy. Laminárním prouděním dochází k mísení dvou fází a k iniciaci samosestavování lipidových vezikul. S přesným řízením míchání a průtoku kapalin umožňuje tato metoda přípravu malých monodisperzních lipozomů bez nutnosti použití post-formulačních metod. Po optimalizaci metody se navíc dramaticky snižuje čas přípravy [35], [40].

1.5 Teoretické principy metod charakterizace nanočástic

Klíčové aspekty, které definují úspěšnost nanoformulace lipozomů, zahrnují velikost částic, stabilitu a povrchové vlastnosti částic (ζ-potenciál), účinnost enkapsulace léčiva a kinetiku uvolňování. Neefektivní inkorporace může vést ke značným ztrátám připravovaného (mnohdy finančně nákladného) léčiva. Jeho předčasné uvolnění může způsobit nežádoucí účinky nebo poukazuje na nedostatečnou koloidní stabilitu při skladování. Pro charakterizaci parametrů nanočástic se využívá několik fyzikálně-chemických metod, jejichž teoretické principy jsou obsahem této kapitoly. K určení velikostí částic mohou sloužit metody dynamického rozptylu světla (DLS), fluorescenční korelační spektroskopie nebo mikroskopické techniky (např. transmisní elektronová mikroskopie, cryo-TEM), které zobrazují strukturu objektu přímo. Pro ucelenou představu o zkoumaném vzorku se doporučuje rozptylové a mikroskopické metody kombinovat.

1.5.1 Dynamický rozptyl světla (DLS)

V typickém rozptylovém experimentu je vzorek ozařován monochromatickým paprskem záření (dnes se používají různé typy laserů o různé vlnových délkách, λ) a detektor měří odezvu. Po průchodu monochromatického paprsku vzorkem obsahujícím makromolekuly se světlo rozptyluje do všech směrů jako funkce jejich velikosti a tvaru. Při měření statického rozptylu světla se intenzita rozptýleného záření analyzuje jako její časový průměr, který poskytuje informaci o hmotnostním průměru molekulových vah makromolekul a gyračním poloměru částic. Rozptyl se dá měřit i v módu, ve kterém se analyzují časově závislé fluktuace intenzity rozptýleného záření pod určitým úhlem (nejčastěji 90°). Fluktuace jsou funkcí rychlosti Brownova pohybu makromolekul v roztoku. Neustále se mění podmínky interference páru vln rozptýleného záření v důsledku změn fázových rozdílů vln, které jsou dané vzdálenostmi rozptylových center, tj. makromolekul. Metoda dynamického rozptylu světla (DLS), také známá jako fotonová korelační spektroskopie umožňuje studovat difúzní chování makromolekul v roztoku. Pohyb makromolekul je analyzován na základě změny intenzity rozptýleného záření. Velké částice se pohybují pomalu, tzn., že fluktuace intenzity je pomalejší ve srovnání s malými částicemi. Digitální autokorelátor koreluje kolísání intenzity v čase. Výsledkem je tzv. autokorelační funkce, viz Obr. 12 [40], [42].



Obr. 12: Schématické znázornění principu měření dynamického rozptylu světla. Obrázek ze zdroje [43] byl převzat a upraven dne 9. 8. 2022.

Z rychlosti poklesu autokorelační funkce intenzity záření (autokorelační funkce druhého řádu, $g_2(\tau)$), viz Obr. 12, str. 50, lze určit rychlost pohybu rozptylových center a jejich difúzní koeficient (D), který je funkcí hydrodynamického poloměru částic (R_h), termodynamické teploty (T) a viskozity rozpouštědla (η), kde k_B je Boltzmannova konstanta ($1,380 \cdot 10^{-23} \text{ kg} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$), viz Stokesova-Einsteinova rovnice (1) [42].

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (1)$$

$G_2(\tau)$ je definována jako integrál součinu intenzit v čase t a $t + \tau$, viz rovnice (2+3):

$$\langle I(t) \rangle = \lim_{t' \rightarrow \infty} \int_0^{t'} I(t) dt \quad (2)$$

$$G_2(\tau) = \langle I(t)I(t + \tau) \rangle \quad (3)$$

kde $I(t)$ je intenzita rozptýleného záření v čase t , τ je tzv. korelační čas (časový interval mezi dvěma hodnotami intenzit), $\langle X \rangle$ značí časový průměr veličiny X . Autokorelační funkci druhého řádu lze normalizovat, viz rovnice (4) [42].

$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (4)$$

1.5.2 Měření ζ (zeta)-potenciálu

Měření ζ -potenciálu představuje užitečný nástroj pro popis elektrostatických vlastností povrchu nanočástic (např. lipozomů). Je dán povahou a distribucí povrchového náboje lipozomů. Závisí na složení lipidů a náboji hydrofilní hlavičky. Ze ζ -potenciálu lze předpokládat koloidní stabilitu, jejich biodistribuci, farmakokinetiku a buněčnou afinitu, neboť většina buněčných membrán je záporně nabitá. Lipozomy dispergované ve vodném roztoku získávají povrchový náboj způsobený ionizací hydrofilních hlaviček lipidů (případně jiných polárních funkčních skupin, které jsou na povrchu lipidu). Protiionty dispergované v roztoku elektrostaticky interagují s nabitým povrchem lipozomů a vzniká tzv. Sternova vrstva. Druhá difúzní vnější vrstva se skládá z volně asociovaných iontů. Zeta potenciál je elektrický potenciál vzniklé dvojvrstvy obklopující nanočástici, vyjadřuje také stupeň elektrostatického odpuzování mezi nanočásticemi v disperzi. Nanočástice s vysokým (negativním nebo pozitivním) ζ -potenciálem jsou elektricky

stabilizované a mají i vysokou koloidní stabilitu, protože se vzájemně Coulombicky odpuzují. Nanočástice s nízkou absolutní hodnotou ζ -potenciálu mají tendenci agregovat [40]. Přírodně se vyskytující lipidy: fosfatidylcholin, fosfatidylserin, sójový lecitin nebo lecitin z vaječného žloutku, obsahují polární hlavičku, která je velmi často elektricky neutrální, a proto je jejich povrchový potenciál také nulový, zatímco zeta-potenciál se pohybuje mezi -10 až $+10$ mV. Lipozomy v suspenzi vyžadují obvykle zeta-potenciály zápornější než -30 mV a kladnější než $+30$ mV, aby bylo dosaženo dostatečného elektrostatického odpuzování [44], [45].

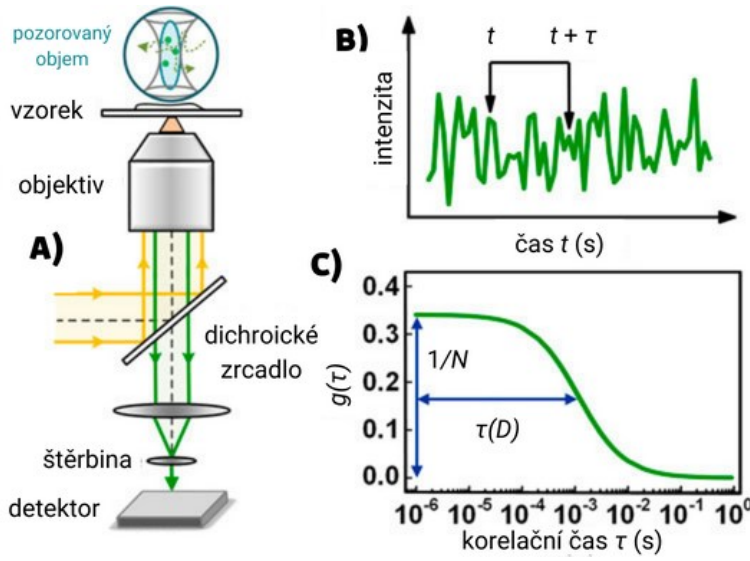
Při měření ζ -potenciálu se aplikuje elektrické pole, elektroforetický pohyb nanočástic je měřen tzv. laserovou dopplerovskou velocimetrií (optická technika měření rychlosti a rozložení turbulence v proudění). Pro výpočet potenciálu se použije tzv. Henryho rovnice (5):

$$U_e = \frac{2\varepsilon z f(\kappa a)}{3\eta} \quad (5)$$

kde U_e je elektroforetická pohyblivost, ε je dielektrická konstanta, η je absolutní viskozita rozpouštědla při nulovém smyku, $f(\kappa a)$ je Henryho funkce a κa je míra poměru poloměru částice k Debyeho délce [45].

1.5.3 Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)

Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) je výkonná technika pro kvantifikaci molekulární dynamiky. Svým principem se podobá DLS. Analyzují se časově závislé fluktuace intenzity fluorescence, které vznikají při difúzi molekul dovnitř a ven z malého pozorovaného objemu. Laserový paprsek je fokusován na malý pozorovaný objem, zhruba 0,5 fl (1 femtolitr je roven 10^{-15} litru), a excituje fluorescenčně aktivní pohybující se molekuly. FCS se nejčastěji provádí v konfokálním systému, viz Obr. 13, str. 53, a slouží ke kvantifikaci koncentrace, difúzního koeficientu, hydrodynamického poloměru a interakcí molekul *in vitro* a *in vivo*. Fluorescence emitovaná molekulami prochází stejným objektivem, ale v opačném směru, než excitační paprsek. Po průchodu dichroickým zrcadlem je fluorescence zaostřena šterbinou, která zaostřuje fluorescenční záření a filtruje emisní záření, které nepochází z ohniskového centr, a dopadá na fotodiodový detektor. Malý pozorovaný objem zvyšuje poměr signálu k šumu a zkracuje dobu měření pro získání kvalitní korelační křivky [46].



Obr. 13: Schématické znázornění principu, instrumentace a analýzy dat fluorescenční korelační spektroskopie (FCS). A) Schématické znázornění konfokální instrumentace FCS, B) časově závislé fluktuace intenzity fluorescence emitované molekulami v pozorovaném objemu, C) Autokorelační funkce a korelační křivka získaná z FCS. $g(\tau)$ autokorelační funkce. Obrázek ze zdroje [46] byl převzat a upraven dne 10. 8. 2022.

Pipetovaná kapka vzorku je umístěna do ohniskové roviny konfokálního mikroskopu. Kontinuálně excitované molekuly volně difundují dovnitř a ven z pozorovaného objemu. V detektoru se indukuje signál intenzity fluorescence $F(t)$, ze kterého se počítá autokorelační funkce $g(\tau)$ dle vztahu (6):

$$g(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (6)$$

kde $\langle X \rangle$ značí časový průměr veličiny X , t je čas a τ je časová prodleva (korelační čas). Za použití aproximace, že pozorovaný objem má 3D Gaussovský profil, lze autokorelační funkci fitovat 3D difuzním modelem s výsledným vztahem (7):

$$g(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \cdot \frac{r_0^2}{z_0^2} \right)^{-\frac{1}{2}} \quad (7)$$

kde N je průměrný počet molekul v detekčním objemu, τ_D je průměrná doba difúze molekul přes detekční objem, r_0 a z_0 jsou laterální a axiální vzdálenosti, ve kterých $F(t)$ klesá s faktorem $1/e^2$. Amplituda korelační křivky je nepřímo úměrná průměrnému počtu částic N [46].

Pološířka (šířka v polovině výšky) korelační křivky, τ_D , představuje průměrnou dobu, po které molekula difunduje ohniskem laterálně, lze ji popsat vztahem (8):

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D} \quad (8)$$

kde D je difúzní koeficient. Pro kvantitativní analýzu lze N a τ_D získat fitováním $g(\tau)$ rovnicí (7). Jakmile se předkalibruje r_0 , lze ze vztahu (8) vyjádřit difúzní koeficient a s použitím Stokesova-Einsteinova vztahu (1) vypočítat hydrodynamický průměr R_h [46].

1.5.4 Elektronová mikroskopie (EM)

Pro zobrazování struktur v nanoměřítku lze využít mikroskopické techniky. Rozlišovací limit je dán vlnovou délkou použitého záření, pro světelný mikroskop je v řádu stovek nm, zatímco rozlišení, kterého lze dosáhnout elektronovou mikroskopií, je v řádech 10^{-11} m. Elektronový paprsek je zaostřen sadou elektromagnetických čoček na povrch vzorku. Příprava vzorku v EM vyžaduje u nativně vodných vzorků odstranění přirozeného prostředí, které může vést ke vzniku morfologických artefaktů nebo indukovat jejich strukturální změny [40].

Skenovací (rastrovací) elektronový mikroskop (SEM) skenuje vzorek bod po bodu elektronovým paprskem. Detektor analyzuje sekundární elektrony, které jsou emitovány vzorkem po kolizi s elektronovým paprskem, a zpětně rozptýlené elektrony (z angl. *backscattered electrons*). Urychlovací napětí je nejčastěji 0,1–30 kV, protože není nutné, aby elektrony procházely skrz vzorek. Tímto způsobem je možné získat trojrozměrný obraz nanostruktur a jejich povrchu, velikosti, morfologie a lamelarity [40]

V transmisní elektronové mikroskopii (TEM) jsou elektrony emitovány ze zdroje a urychlovány vysokým napětím (100–400 kV). Některé elektrony prochází tenkým vzorkem (10–100 nm), zatímco ostatní elektrony jsou rozptylovány (elasticky/neelasticky) nebo difraktovány. Elektrony, které projdou vzorkem, prochází dalšími elektromagnetickými čočkami a nakonec dopadne na fluorescenčním stínítku. Při srážce se jejich kinetická energie přemění na energii viditelného světla, která je exponovaná na fotografický film nebo je digitalizovaná CCD kamerou. Vzniká obraz různých oblastí vzorku v různých odstínech šedé podle jejich hustoty [45].

Pro analýzu TEM je třeba vzorek předpřipravit. Ve vakuové komoře se ze vzorku odstraní rozpouštědlo. TEM poskytuje obraz nanočástic s rozlišením pod 1 nm a se zvýšeným kontrastem lze získat důležité informace o povrchových modifikacích lipozomů (konjugace s ligandy). Nevýhody TEM jsou spojené s předúpravou vzorku, která může způsobit artefakty a změny v lipozomální struktuře (bobtnání vezikul, smršťování, deformace) [40].

Metoda cryo-TEM umožňuje předejít strukturálním deformacím lipidů použitím bleskového zamražení pro přímou vizualizaci vzorku v pevném stavu a bez nutnosti eliminace rozpouštědla. Pro zobrazení lipozomů v jejich nativním stavu se připravuje tenký film, který je zesklenný v kapalném ethanu (-180°C). Bleskové zmražení zabraňuje vzniku ledových krystalů, které by vzorek narušily. Rozsah rozlišení (5–500 nm) je definován tloušťkou vzorku [40], [47].

1.5.5 Metody pro kvantitativní analýzu léčiva v nanočásticích

Dosažení vysokého obsahu léčiva v systému (DL, z angl. *drug loading*) a vysoké účinnosti enkapsulace léčiva (EE, z angl. *entrapment/encapsulation efficiency*) je rozhodujícím parametrem úspěšnosti lipozomální nanoformulace. Při stanovení koncentrace léčiva v suspenzi a následném výpočtu EE v lipozomech je třeba minimalizovat množství aktivní látky, která je volně rozpuštěná v roztoku. V opačném případě by došlo ke zkreslení výsledků.

UV-VIS absorpční spektrofotometrie

Absorpční UV-VIS spektrofotometrie je nejjednodušší a nejpoužívanější metodou, kterou lze použít pro výpočet koncentrace léčiva v roztoku za předpokladu, že aktivní látka absorbuje záření v rozsahu od 200 do 800 nm (nebo v rozsahu zvoleného spektrofotometru). V případě lipozomální suspenze je třeba lipozomy narušit (např. organickým rozpouštědlem) a uvolnit léčivo do roztoku, ve kterém je molekulárně rozpustné, aby nedocházelo k příspěvku rozptylu k měřené absorbanci. Zároveň je velmi důležité, aby se spektrální profily (hlavně absorpční maxima) aktivních látek a lipidů nepřekrývaly.

Kvantifikace stanovované látky je založena na Lambertově-Beerově zákoně, viz rovnice (9), který říká, že absorbance látky je přímo úměrná její koncentraci v roztoku. Kalibrační závislost se sestrojí na základě proměření absorbancí ředící řady standardu. Také se změří absorbance vzorku, který byl připraven ze suspenze lipozomů. Její hodnota

musí spadat do lineární oblasti kalibrační závislosti. Koncentrace se získá dosazením absorbance do rovnice kalibrační přímky (10):

$$A = \varepsilon cl \quad (9)$$

$$A = kc \quad (10)$$

kde A je absorbance, ε je molární absorpční koeficient látky rozpuštěné v roztoku, l je optická dráha spektrofotometrické kyvety a k je směrnice kalibrační přímky.

Chromatografické metody: vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS)

V případě, že se absorpční píky překrývají, lze ke stanovení využít chromatografické metod. Podstatou chromatografie je dělicí proces jednotlivých složek vzorku, při kterém dochází k neustálému ustavování rozdělovacích rovnováh mezi dvěma fázemi, mobilní a stacionární. Mobilní fáze unáší vzorek kolonou, ve které dochází k separaci, a stacionární fáze představuje nepohyblivou náplň kolony, se kterou vzorek opakovaně interaguje. Komponenty vzorku jsou na základě síly interakce se stacionární fází přímo úměrně brzděny. Rozdělení složky X mezi mobilní a stacionární fázi je popsáno rovnovážnou distribuční konstantou K_D , viz rovnice (11):

$$K_D = \frac{a_S}{a_M} \approx \frac{[X]_S}{[X]_M} \quad (11)$$

kde a_S je aktivitní koeficient látky X ve stacionární fázi, a_M je aktivitní koeficient látky X v mobilní fázi, které jsou přímo úměrné rovnovážné molární koncentraci látky X ve stacionární a mobilní fázi. Komponenty s odlišnými hodnotami K_D prochází kolonou různými rychlostmi, a na základě toho dochází k jejich separaci [48], [49].

Detektory (např. fotometrický detektor, fluorimetrický detektor, hmotnostní detektor apod.) používané v chromatografii poskytují odezvu úměrnou koncentraci. Výsledkem analýzy je tzv. chromatogram, ve kterém zóny separovaných látek jsou koncentračními profily s maximem, neboli píky ideálně Gaussovského tvaru. Z chromatogramu lze vyčíst retenční časy separovaných složek vzorku, tj. doba od nástřiku vzorku do okamžiku detekce odpovídající průchodu látky o maximální

koncentraci. Plocha píku odpovídá množství nastříknuté látky a je v dnešní době nejčastěji vyhodnocována numerickou integrací v softwarovém programu [49].

Chromatografické metody lze klasifikovat dle několika parametrů: dle fyzikálně-chemického principu dělení (adsorpční, rozdělovací, iontově výměnná, gelová či afinitní chromatografie), dle skupenství mobilní fáze (kapalinová, plynová či superkritická fluidní chromatografie), podle uspořádání stacionární fáze (kolonová, kapilární, tenkovrstvá) či dle účelu (preparativní či analytická).

Vysokoúčinná nebo také vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC, z angl. *high performance/ high pressure liquid chromatography*) slouží k separaci složek kapalného, či pevného vzorku rozpuštěného ve vhodném rozpouštědle, který je po nástřiku šesticestným ventilem veden přes chromatografickou kolonu mobilní fází. Mezi nejčastěji používané kolony patří kolony s polární stacionární fází založené na organosilanu obecné formy $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{RCl}$, kdy R je polární skupina ($-\text{C}_2\text{H}_4\text{CN}$, $-\text{C}_3\text{H}_6\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2(\text{OH})$, $-\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2$) a kolony s nepolární stacionární fází, ve kterých R je nepolární n-oktylová (C_8) nebo n-oktadecylová skupina (C_{18}). Kombinace polární stacionární fáze a nepolární mobilní fáze je tzv. chromatografie s normální fází, zatímco kombinace nepolární stacionární fáze s polární mobilní fází je tzv. chromatografie s reverzní fází. HPLC se běžně používá pro kvalitativní i kvantitativní analýzu [49]. Kalibrační závislost se vynáší např. jako plocha píku vůči koncentraci standardu v ředící řadě. Následným změřením vzorku o neznámé koncentraci je zvolen pik o stejném elučním čase, jako měl standard, a číselná hodnota plochy píku je dosazena do rovnice kalibrační přímky, která má obdobný tvar jako rovnice (10).

Plynovou chromatografií (GC, z angl. *gass chromatography*) lze separovat plyný nebo kapalný vzorek, který se vstřikuje do proudu inertní plyné mobilní fáze, tzv. nosného plynu (N_2 , Ar, He). Komponenty vzorku jsou unášeny kolonou a děleny na základě síly interakce se stacionární fází. Kolony používané pro GC se dělí na náplňové kolony a kapilární kolony. Náplňové kolony jsou vyrobeny ze skla, nerezové oceli, mědi nebo hliníku o vnitřním průměru 2–4 mm a délce 2–6 m. Kolona je naplněna částicemi stacionární fáze (nejčastěji porézními částicemi kyseliny křemičité – silikagelem, obvykle povrchově funkcionalizovanými některým z výše uvedených organosilanů) o průměru 30–350 μm . Kapilární kolony jsou nejčastěji křemenné kapiláry o vnitřním průměru 150–300 μm o délce až 100 m, potažené vrstvou polyimidu pro zvýšení chemické odolnosti. Na vnitřní straně kapiláry je chemicky navázána netěkavá kapalina sloužící jako vlastní stacionární fáze o velmi vysoké separační

účinnosti vhodná na malé množství vzorku. Všechny komponenty analyzovaného vzorku musí být těkavé, netěkavé rozpuštěné látky kolonu degradují. Blok vstřikovače se zahřeje na teplotu alespoň o 50°C vyšší než je teplota složky vzorku s nejvyšším bodem varu, v takovémto případě dochází ke zplynění celého vzorku. Kapilární kolony vyžadují použití speciální injektoru, nejčastěji typu „split“ nebo „splitless“. Při nástřiku do „splitless“ injektoru se udržuje teplota kolony v rozmezí 20–25°C pod bodem varu rozpouštědla. Teplota kolony se poté postupně zvyšuje a dochází k separaci jednotlivých komponent na základě jejich bodů varu. Píky v chromatogramu jsou přímo úměrné jejich koncentraci ve vzorku, toho lze využít při kvantitativní analýze. Pro detekci komponent se využívá tepelně vodivostní detektor, plamenově ionizační detektor, detektor elektronového záchytu nebo detektory, které jsou nezávislými přístroji: infračervený spektrofotometr (FT-IR) nebo hmotnostní spektrometr (MS). V GC-MS se eluční tok zavádí přímo do ionizační komory hmotnostního spektrometru, ve které se většina nosného plynu eliminuje. V ionizační komoře jsou všechny molekuly ionizovány a ionty jsou odděleny na základě poměru jejich hmotnosti k náboji (m/z). Selektivity lze dosáhnout sledováním pouze vybraných m/z metodou záznamu vybraného iontu (SIR, z angl. *selected ion recording*) [49].

Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR) se zabývá atomovými jádry a jejich magnetickými vlastnostmi. NMR aktivní atomová jádra jsou pouze ta, která mají nenulový spin, neboli vlastní moment hybnosti $\vec{I}$, který je přímo úměrný magnetickému momentu $\vec{\mu}$. Konstantou úměrnosti je gyromagnetický moment γ , viz rovnice (12):

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \quad (12)$$

Magnetický moment atomového jádra, které je vloženo do vnějšího magnetického pole, začne vykonávat precesní pohyb, tzv. Larmorovu precesi. NMR analyzuje tzv. Larmorovu frekvenci ν , tj. frekvence precese, která je přímo úměrná magnetické indukci vnějšího magnetického pole B_0 , viz rovnice (13):

$$\nu = -\frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad (13)$$

Atomové jádro je obklopeno elektrony, které jako nabitě částice také interagují s vnějším magnetickým polem. Důsledkem je snížení lokálního magnetického pole, které je v místě atomového jádra. To znamená, že stejná jádra vázaná v různých funkčních skupinách molekuly mají různé Larmorovy frekvence na základě svého chemického okolí, které je stíní. Stínící efekt závisí na hustotě a rozložení elektronů, kvalitativně ho popisuje stínící konstanta σ , viz rovnice (14), kde B je celková magnetická indukce, B_{loc} je lokální magnetická indukce, B_0 je magnetická indukce vnějšího pole:

$$B = B_0 + B_{\text{loc}} = B_0(1 - \sigma) \quad (14)$$

Analyzovaný vzorek je složen ze souboru částic, každé jádro má svůj magnetický moment, který vykonává Larmorovu precesi. V rovnováze se ustavuje preferenční směr, kdy je více magnetických momentů orientováno paralelně podél vnějšího magnetického pole. Součet všech magnetických momentů jádra je dán statickou makroskopickou veličinou magnetizace $\vec{M}$. Rovnovážné rozdělení magnetických momentů v souboru částic je dáno Boltzmannovým rozdělením energií, viz rovnice (15), kde $\hbar$ je redukovaná Planckova konstanta a ν_{rez} je rezonanční Larmorova frekvence odpovídající přechodu jádra mezi dvěma magnetickými momenty:

$$\Delta E = \hbar \gamma B_0(1 - \sigma) = \hbar \nu_{\text{rez}} \quad (15)$$

Energie má dvě maximální hodnoty v závislosti na paralelní či antiparalelní orientaci magnetického momentu vůči magnetickému poli, viz rovnice (16).

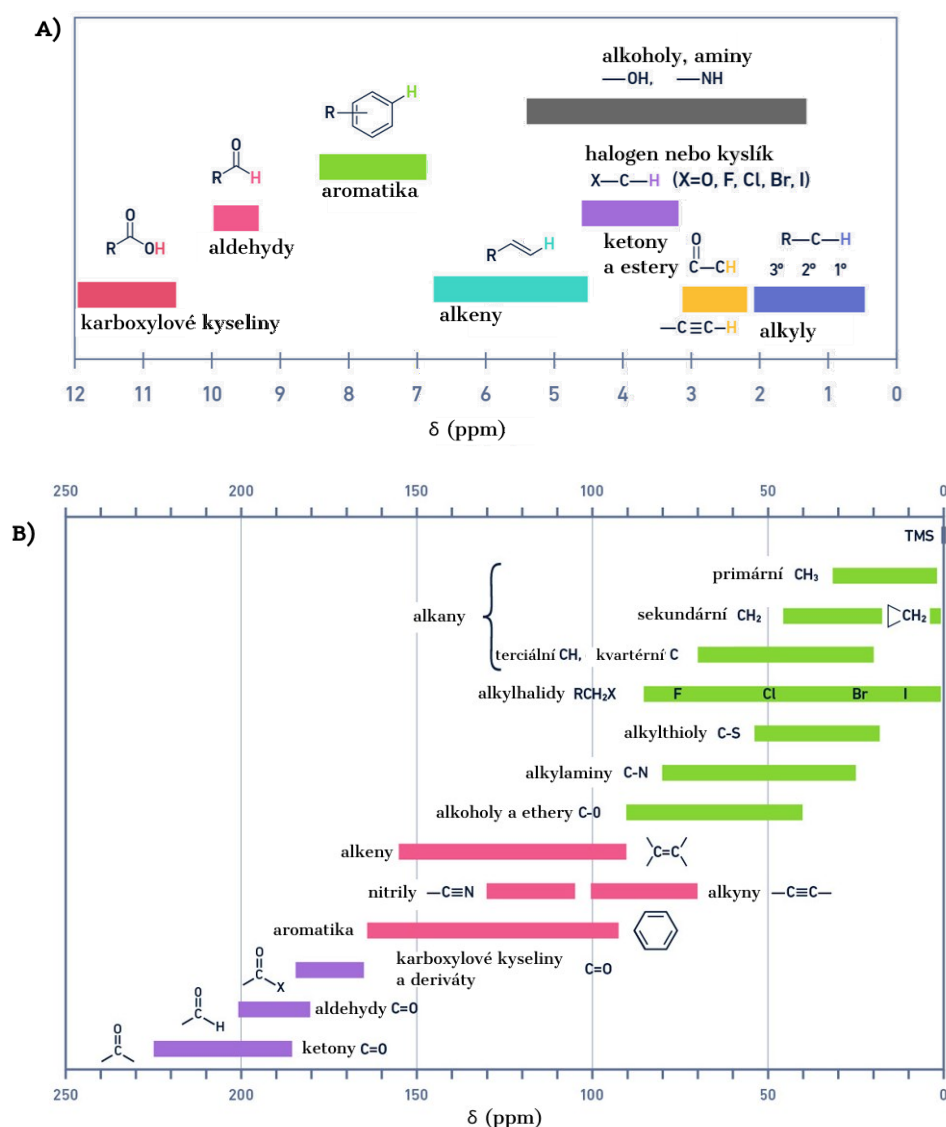
$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} \quad (16)$$

Pro změření Larmorovy frekvence je třeba vyvést magnetizaci chemicky ekvivalentních jader (jádra ve stejném chemickém okolí) z rovnováhy. Na systém se aplikuje časově proměnné magnetické pole, tzv. radiofrekvenční pulzy, které sklápí magnetizaci. Po vypnutí pulzu začne magnetizace konat Larmorovu precesi. Magnetizace se vrací do svého původního stavu a indukuje v detekční cívkce tzv. signál volné precese, který je Fourierovou transformací převeden z časové domény do domény frekvenční, výsledkem je NMR signál.

Naměřené rezonanční frekvence ν se vyjadřují jako relativní veličiny, tzv. chemické posuny δ [ppm], které jsou vztažené vůči rezonanční frekvenci standardu (obvykle tetramethylsilan (TMS)) a jsou na magnetickém poli nezávislé, tzn., že jsou shodné na všech NMR spektrometrech, viz rovnice (17):

$$\delta_i = 10^6 \frac{\nu_i - \nu_{\text{TMS}}}{\nu_{\text{TMS}}} \quad (17)$$

Elektrony v molekule různě intenzivně stíní vnější magnetické pole, takže efektivní magnetické pole v blízkosti jádra je ovlivněno jeho chemickým okolím. Například jádra v blízkosti elektronegativních atomů, násobných vazeb nebo aromátů jsou silně „odstíněna“, a mají tedy větší chemický posun, viz Obr. 14.



Obr. 14: Chemické posuny A) jader ^1H v různých funkčních skupinách, B) jader ^{13}C v různých funkčních skupinách. Obrázek ze zdroje [50] byl převzat a upraven dne 17. 8. 2022.

Jádra, která jsou spojena chemickou vazbou (maximálně cca ve vzdálenosti čtyř chemických vazeb), spolu interagují nepřímou spin-spinovou interakcí (též J-interakcí), která způsobuje jemné štěpení NMR signálu a nese informaci o okolních NMR aktivních jádrech. Rozdělení signálu je dáno hodnotou této J-interakce (J-interakční konstantou) a počtem jader, které interagují s měřeným jádrem o daném δ . Charakteristický tvar a rozdělení signálu se nazývá multiplicita, kterou lze vypočítat pro jádra se spinem $\frac{1}{2}$ (např. ^1H , ^{13}C , ^{19}F) pomocí pravidla $n + 1$. Toto pravidlo říká, že pokud ^1H interaguje s n protony vázanými na sousední uhlík, tak se signál daného ^1H rozdělí na $n + 1$ píků s relativními intenzitami definovanými Pascalovým trojúhelníkem.

Spektroskopie NMR je z definice kvantitativní spektroskopický nástroj, protože plocha NMR píku I_X (získaná numerickou integrací) je přímo úměrná počtu rezonančních atomových jader X přispívajících k signálu N_X , viz rovnice (18), kde K_S je konstantou spektrometru. Tato skutečnost umožňuje určit množství funkčních skupin obsahujících dané jádro v molekule, a nabízí tedy nástroj pro kvantifikaci molekuly i ve směsích. Kvantitativní NMR je poměrně časově nenáročnou metodou, která zároveň nepoškozuje vzorek.

$$I_X = K_S N_X \quad (18)$$

NMR signál se obvykle skládá z několika rezonančních čar (píků). Pro kvantifikaci stačí vybrat jedinou, která je specifická pro danou komponentu vzorku a nepřekrývá se s jinými píky. Pro ^1H NMR experiment o jednom radiofrekvenčním pulzu se správně zvolenými akvizičními parametry je konstanta spektrometru K_S stejná pro všechny píky ve spektru. To znamená, že poměry ploch jednotlivých píků jsou rovny poměrům počtu přispívajících vodíkových jader X a Y , viz rovnice (19):

$$\frac{I_X}{I_Y} = \frac{N_X}{N_Y} \quad (19)$$

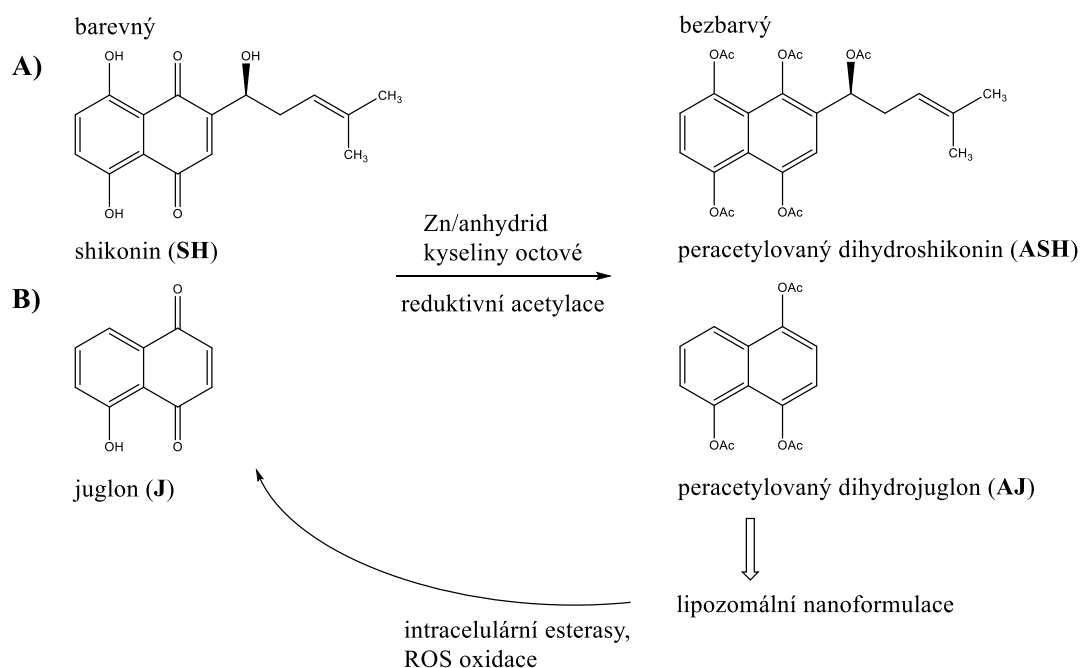
Plochy píků jsou zároveň přímo úměrné molární koncentraci molekuly, jejíž vodíkové atomy přispívají k NMR signálu. Platí vztah (20), ze kterého lze vypočítat koncentraci analyzované látky X na základě přidání standardu St o známém množství [51].

$$\frac{c_X}{c_{St}} = \frac{I_X}{I_{St}} \quad (20)$$

2 Cíle práce

2.1 Motivace

V literárním přehledu byly popsány mechanismy účinku v biologických systémech a řada farmakologických vlastností naftochinonů. Shikonin (**SH**) a juglon (**J**) jsou skvělými kandidáty bioaktivních sloučenin na léčbu lupénky. Antipsoriatické, antiproliferační a protinádorové účinky shikoninu byly testovány na řadě buněčných linií i v *in vivo* experimentálních modelech [30], např. na myších s lupénkou, která byla indukovaná IMQ. Komplikací shikoninu a juglonu je jejich omezená rozpustnost ve vodném prostředí, výrazné zabarvení a schopnost ulpívat na horních vrstvách kůže. Terapeutický účinek je žádoucí hlavně v hlubších vrstvách kůže, a proto byl navrhnutý vývoj bezbarvých proléčiv na bázi peracetylovaných derivátů připravených reduktivní acetylací (viz Obr. 15), a nanoformulací na bázi lipidů, které jsou dobře tolerovatelné buňkami a živoucími organismy. Výhodou takového systému je schopnost selektivně pronikat do postižené tkáně (např. léze lupénky, ve kterých je bariérová funkce kůže značně narušena), kde výše zmíněné naftochinony mohou působit antiproliferačně a inhibovat zánět. Po vstupu do buněk se předpokládá deacetylase proléčiv intracelulárními esterasami a oxidace pomocí ROS, které jsou ve zvýšené míře produkovány nadměrně se dělícími buňkami, na původní strukturu shikoninu a juglonu.



Obr. 15: Schématické znázornění přípravy proléčiv: A) peracetylovaného dihydroshikoninu a B) peracetylovaného dihydrojuglonu reduktivní acetylací s následnou deacetylací a oxidací na původní bioaktivní molekulu v buňce.

2.2 Souhrn cílů

1) Příprava a fyzikálně-chemická charakterizace proléčiv:

- Syntéza peracetylovaného dihydrojuglonu (**AJ**) a peracetylovaného dihydroshikoninu (**ASH**)
- Charakterizace **ASH** a **AJ** pomocí NMR, MS, FT-IR, HPLC a elementární analýzy (EA)

2) Příprava, fyzikálně-chemická charakterizace a *in vitro* chování nanoformulací v abiotických systémech:

- Příprava lipidových nanoformulací **SH**, **J**, **ASH** a **AJ**
- Charakterizace nanoformulací pomocí DLS, FCS, cryo-TEM a měření ζ -potenciálu
- Stanovení obsahu **SH**, **J**, **ASH** a **AJ** v nanoformulacích pomocí UV-VIS spektrofotometrie, HPLC, NMR a GC-MS a výpočet obsahu léčiva (DL, z angl. *drug loading*) a účinnosti enkapsulace (EE, z angl. *encapsulation efficiency*)
- Změření kinetiky uvolňování léčiva: **SH**, **J** z nanočástic

3 Materiál a metody

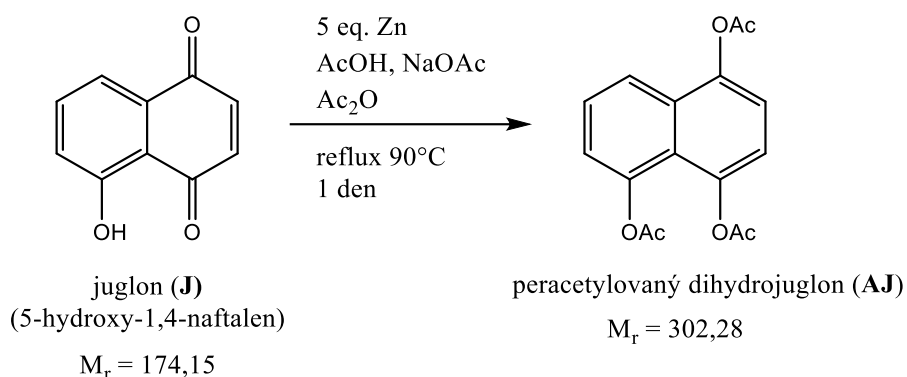
3.1 Použité chemikálie

CHEMIKÁLIE	DODAVATEL
1,4-dioxan	Lach-Ner, s.r.o.
2-hydroxypropyl- γ -cyklodextrin	Sigma Aldrich Co.
5-hydroxy-1,4-naftochinon (juglon)	Sigma Aldrich Co.
aceton	Lach-Ner, s.r.o.
acetonitril (HPLC kvalita)	Fischer Scientific
anhydrid kyseliny octové	Lach-Ner, s.r.o.
azid sodný	Sigma Aldrich Co.
cyklohexan	Lach-Ner s.r.o.
deuterovaný chloroform	Eurisotop
diethylether	Lach-Ner s.r.o.
dichlormethan	Lach-Ner, s.r.o.
ethanol	Lach-Ner, s.r.o.
ethylacetát	Lach-Ner, s.r.o.
fosfatidylcholin (z vaječného žloutku, > 99 %)	Sigma Aldrich Co.
fyzilogický roztok pufrovaný fosfátem (PBS) ve formě tablet	Sigma Aldrich Co.
hexan	Lach-Ner, s.r.o.
hydrogenuhličitan sodný	Lach-Ner, s.r.o.
hydroxid sodný	Lach-Ner, s.r.o.
chlorid sodný	Lach-Ner, s.r.o.
chloroform	Lach-Ner, s.r.o.
cholesterol	Sigma Aldrich Co.
kyselina chlorovodíková (35 %, w/w)	Lach-Ner, s.r.o.
kyselina octová (80 %, w/w)	Lach-Ner s.r.o.
kyselina trifluoroctová	Honeywell Fluka
L- α -fosfatidylcholin (≥ 40 % fosfatidylcholin, ≥ 95 % fosfolipidy nerozpustné v acetonu)	Sigma Aldrich Co.
methanol	Lach-Ner, s.r.o.

methanol (HPLC kvalita)	VWR International
octan sodný	Sigma Aldrich Co.
Pluronic F127	Sigma Aldrich Co.
<i>R</i> -5,8-dihydroxy-2-(1-hydroxy-4-methylpent-3-en-1-yl)- naftalen-1,4-dion (shikonin)	CSNpharm
silicagel (40–75 µm)	Sigma Aldrich Co.
síran hořečnatý (bezvodý)	Lach-Ner, s.r.o.
SPAN 65	Sigma Aldrich Co.
tetrahydrofuran	Lach-Ner, s.r.o.
toluen	Lach-Ner, s.r.o.
zinkový prach ($\leq 10\text{ }\mu\text{m}$)	Sigma Aldrich Co.

3.3 Syntéza proléčiv a metody charakterizace

3.3.1 Syntéza peracetylovaného dihydrojuglonu (AJ)

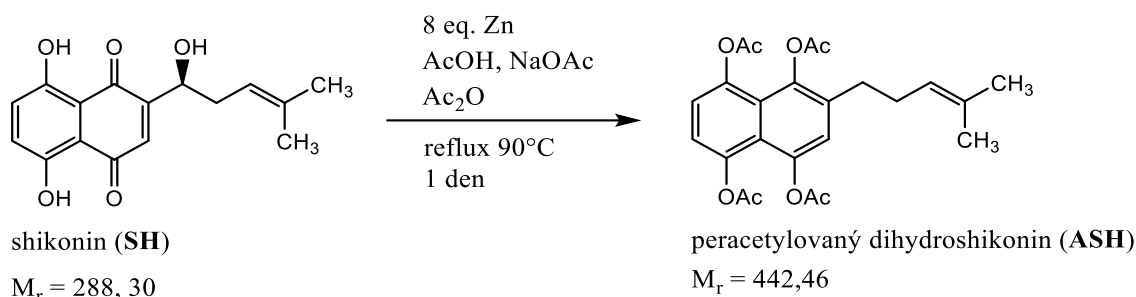


Obr. 16: Schématické znázornění přípravy peracetylovaného dihydrojuglonu (**AJ**) reduktivní acetylací.

Reduktivní acetylace juglonu (5-hydroxy-1,4-naftochinon) byla provedena za podobných podmínek jako analogická reduktivní acetylace 1,4-naftochinonu ve zdroji [52]. Bylo naváženo 0,5 g (2,87 mmol) juglonu (**J**) a 0,94 g Zn prachu (14,36 mmol; 5 ekv.). **J** a zinek byly suspendovány ve 40 ml anhydridu kyseliny octové (Ac_2O) ve 150ml kulaté zábrusové baňce. Následně bylo přidáno 78 mg (0,95 mmol; 1/3 ekv.) bezvodého octanu sodného (NaOAc) a po 10 minutách míchání reakční směsi na magnetické míchačce bylo přidáno 8 ml kyseliny octové (AcOH , 80 %, w/w). Reakční směs byla zahřívána přes noc na reakčním bloku pod zpětným chladičem (reflux) při teplotě 90°C, viz Obr. 16.

Další den byla směs dekantována a přefiltrována přes fritu o hrubosti S4 pro odstranění zinku. Pro iniciaci hydrolyzy anhydridu kyseliny octové byla do směsi přidána destilovaná voda (40 ml). Reakční směs byla extrahována dichlormethanem (3×80 ml). Organická fáze byla promývána nasyceným roztokem NaHCO_3 (3×120 ml) a sušena bezvodým síranem hořečnatým, který byl následně odfiltrován fritou o hrubosti S3. Směs byla zahuštěna do hnědooranžového oleje na RVO. Odparek byl triturován ve zhruba 50 ml diethyletheru za použití ultrazvuku. Pevný produkt byl zfiltrován na fritě o hrubosti S4 a byl triturován v 10 ml vroucího ethanolu nad horkovzdušnou pistolí. Výsledný produkt **AJ** ve světle žluté krystalické formě byl odfiltrován na fritě o hrubosti S4.

3.3.2 Syntéza peracetylovaného dihydroshikoninu (ASH)



Obr. 17: Schématické znázornění přípravy peracetylovaného dihydroshikoninu (**ASH**) reduktivní acetylací.

Pro přípravu peracetylovaného dihydroshikoninu (**ASH**) dle schématu, viz Obr. 17, bylo 201 mg (0,70 mmol) shikoninu (**SH**) a 365 mg Zn prachu (5,6 mmol, 8 ekv.) suspendováno v 10 ml acetanhydridu kyseliny octové ve 150ml kulaté zábrusové baňce. Následně bylo přidáno 42 mg (0,51 mmol, 0,75 ekv.) bezvodého octanu sodného a po 10 minutách míchání reakční směsi na magnetické míchačce byly přidány 4 ml kyseliny octové (AcOH, 80 %, w/w). Reakční směs byla zahřívána přes noc (1 den) na reakčním bloku pod zpětným chladičem (reflux) při teplotě 90°C.

Následující den byly do reakční směsi přidány 2 ml kyseliny octové (AcOH, 80 %, w/w) pro převedení Zn na octan zinečnatý a 25 ml destilované vody pro iniciaci hydrolýzy acetanhydridu kyseliny octové. Reakční směs byla extrahována dichlormethanem (3 × 30 ml) v dělicí nálevce. Organická fáze byla opatrně promývána nasyceným roztokem NaHCO₃ (3 × 120 ml) a sušena bezvodým síranem hořečnatým, který byl odfiltrován fritou o hrubosti S3. Filtrát byl zahuštěn na RVO do hnědočerveného oleje. Výsledný produkt **ASH** ve světle růžové krystalické formě byl oddělen od vedlejších produktů pomocí flash chromatografie a semipreparativního HPLC, viz dále.

Flash chromatografie

Pro separaci syntetizovaného peracetylovaného dihydroshikoninu (**ASH**) od vedlejších produktů byl použit přístroj PURIFLASH XS420 a program InterSoft X (Advion Interchim Scientific). Kolona o délce 14 cm a průměru 3 cm byla naplněna silikagelem o velikosti částic 40–75 μm. Před vlastní chromatografickou separací byla kolona promývána programem „Purge“ směsí rozpouštědel, které byly zvoleny pro počáteční

krok gradientu mobilní fáze, tj. 5 % ethylacetátu a 95 % cyklohexanu. Vzorek byl nanesen na kolonu metodou „dry loading“, která spočívá v rozpuštění směsi, která bude separována, v minimu rozpouštědla (v tomto případě v cyklohexanu). K organické fázi bylo přidáno přesné množství silikagelu, které se vejde do předkolony o délce 6 cm a průměru 1 cm. Organické rozpouštědlo bylo následně odpařeno za sníženého tlaku. Suchý odparek byl přesypán do předkolony, která byla upevněna nad připravenou kolonu. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 20 ml/min, nastavení gradientu mobilní fáze je znázorněno v Tab. 4. Frakce byly jímány po dobu jedné hodiny do 15ml skleněných zkumavek. Dle spektrálních píků v chromatogramu byly frakce spojeny do kulatých odměrných baněk, ze kterých byla organická rozpouštědla odpařena na RVO. Odparky byly dále analyzovány pomocí semipreparativní HPLC.

Tab. 4: Gradient mobilních fází pro Flash chromatografii.

Čas [min]	Ethylacetát [%]	Cyklohexan [%]
0	5	95
20	20	80
60	95	5

Semireparativní vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Peracetylovaný dihydroshikonin (**ASH**) byl izolován z odparků získaných Flash chromatografií pomocí semipreparativní HPLC na přístroji Shimadzu opatřeném pumpou LC-20AP, komunikačním modulem CBM-20A a detektorem diodového pole SPD-M20A, který byl ovládán programem LabSolutions (Shimadzu Corporation, Version 5.71 SP2). K dělení směsi byla použita C₁₈ kolona Chromolith® prep RP18e 100-25mm. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 20 ml/min, nastavení gradientu mobilní fáze je znázorněné v Tab. 5. Odparek byl rozpuštěn v co nejmenším objemu methanolu a byl nastříknut na kolonu. **ASH** byl eluován v čase 10,81 min. Výsledný produkt **ASH** v krystalické formě byl získán odpařením mobilní fáze na RVO.

Tab. 5: Gradient mobilních fází pro Flash chromatografii.

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]*	Mobilní fáze B [%]**
0,10	95	5
12,55	5	95

*mobilní fáze A: 95 % H₂O, 5 % acetonitril (ACN), 0,1 % kyselina trifluoroctová (TFA) (v/v/v)

**mobilní fáze B: 5 % H₂O, 95 % ACN, 0,1 % TFA (v/v/v)

3.3.3 Spektroskopie nukleární magnetická rezonance (NMR)

^1H a ^{13}C spektra byla měřena na spektrometru BRUKER Ascend 400. Pulzní sekvence pro měření 1D a 2D spekter při teplotě 25°C byly vybrány z knihovny sekvencí softwarového programu. Parametry měření ^1H a ^{13}C spekter a 2D experimentů jsou uvedeny v Tab. 6. Během měření ^{13}C spekter byl zapnutý širokopásmový dekaplink ^1H ($\{^1\text{H}\}$). Vzorky byly připraveny rozpuštěním 10 mg v 0,6 ml deuterovaného chloroformu CDCl_3 ve standardní NMR kyvetě o průměru 5 mm. Spektra byla zpracována v programu MestReNova (Mestrelab Research S.L., Version: 12.0. 1-20560). Za referenční hodnotu chemického posunu byl zvolen chemický posun „zbytkového“ CHCl_3 (v ^1H spektrech: $\delta = 7,26$ ppm). Získané hodnoty chemických posunů δ [ppm] jsou uváděny na dvě desetinná místa pro ^1H a na jedno desetinné místo pro ^{13}C .

Tab. 6: Parametry pulzní sekvence pro měření ^1H , ^{13}C spekter a HSQC a HMBC experimentů.

Experiment	^1H	^{13}C	HSQC	HMBC
počet skenů	16	1024	2	4
relaxační prodleva [s]	5	2	1,5	1,5
délka pulzu [μs]	10	10	10	10
doba akvizice [s]	4,0894	1,2976	0,1830	0,1830

3.3.4 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektra byla naměřena v pozitivním reflektroновém módu na Maldi-TOF spektrometru UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) vybaveném Nd:YAG laserem (355 nm, 2000 Hz). Spektrum bylo získáno akumulací cca 5 000 pulzů laseru. Byla použita opožděná extrakce a vnější kalibrace. Vzorky byly připraveny metodou suché kapky: Roztoky analyzované látky (10 mg/ml), DCTB (trans-2-[3-(4-*t*-butyl-fenyl)-2-methyl-2-propenyliden]malonitril; 10 mg/ml; matrice) a trifluoracetátu sodného (10 mg/ml; ionizační činidlo) byly smíchány v tetrahydrofuranu v objemovém poměru 4:20:1. Jeden μl směsi byl nanesen na ocelovou terčíkovou destičku a ponechán vyschnout za laboratorních podmínek. Výsledná data jsou uvedena ve tvaru „ x (y ; $[\text{M} + \text{K}]^+$ či $[\text{M} + \text{Na}]^+$)“, kde x značí experimentálně určené hodnoty m/z a y značí teoretickou hodnotu m/z uvedenou na dvě desetinná místa, M je označení pro molekulu, která byla analyzována. Data změřila Ing. Zuzana Walterová ze servisně výzkumné skupiny „Laboratoře analytické chemie“ na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR.

3.3.5 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR)

FT-IR spektra byla měřena na spektrometru Bruker IFS 55 s použitím ATR (z angl. *attenuated total reflection*) techniky Specac MKII Golden Gate Single Reflection ATR System s diamantovým krystalem a úhlem dopadu paprsku 45°. Všechna spektra byla měřena s rozlišením 4 cm⁻¹ a při 64 scanech. Pro detekci záření byl použit fotodiodový HgCdTe MCT detektor. Vzorky byly přímo bez úprav nanесeny na diamantový krystal a měřeny. Data změřil Ing. Michal Pekárek z vědeckého oddělení „Vibrační spektroskopie“ na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR.

3.3.6 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Pro analýzu čistoty připravených látek byl použit přístroj DIONEX UltiMate3000 (Thermo Fisher Scientific) opatřený pumpou LPG3400RS a detektorem diodového pole DAD-3000 ovládaný programem Chromeleon Client (Dionex Corporation, Version 6.80 SR16 Build 5387 (291597)). Vzorky byly rozpuštěny v mobilní fázi nebo její složce a byly nastříknuty do šesticestného ventilu mikrostřikačkou Hamilton. Vzorek **AJ** byl separován na C₁₈ koloně Chromolith® Performance RP-18e 100-4,6mm s elučním časem 6,72 min. Průtok a gradient mobilní fáze je znázorněn v Tab. 7. Vzorek **ASH** byl isokraticky eluován methanolem (HPLC kvality) na koloně Chromolith® Performance Si 100-4,6mm v čase 2,34 min, chromatografická metoda byla nastavena na celkový čas 5 minut.

Tab. 7: Gradient mobilních fází pro HPLC analýzu peracetylovaného dihydrojuglonu (**AJ**).

Čas [min]	Průtok [ml/min]	Mobilní fáze A [%]*	Mobilní fáze B [%]**
0,10	1,0	95	5
0,50	1,0	95	5
8,00	1,0	5	95
9,00	1,0	5	95
9,10	1,0	95	5
9,90	0,5	95	5
9,91	0,1	95	5

*mobilní fáze A: 95 % H₂O, 5 % ACN, 0,1 % TFA (v/v/v)

**mobilní fáze B: 5 % H₂O, 95 % ACN, 0,1 % TFA (v/v/v)

3.3.7 Elementární analýza (EA)

Ke stanovení obsahu C a H byl použit přístroj FlashSmart TM Elemental Analyzer (Thermo Fisher Scientific). Ca 1,5 mg vzorku bylo přesně naváženo do cínové kapsle za použití váhy Sartorius SE 2-OCE. Kapsle byla vložena do autosampleru analyzátoru a byly použity standardní operační postupy. Obdržené výsledky (průměrná hodnota 2 měření) analýzy C : H ve vzorku jsou uvedeny jako „naměřená hodnota/teoretická hodnota“. Data změřila Ing. Anna Macháčková ze servisně výzkumné skupiny „Laboratoře analytické chemie“ na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR.

3.4 Příprava lipidických nanoformulací a metody charakterizace

3.4.1 Příprava nanoformulace metodou vstřikování rozpouštědla

Pro přípravu nanoformulací byla zvolena metoda vstřikování organického rozpouštědla (tetrahydrofuranu, THF) do vodného roztoku (destilovaná voda nebo fyziologický roztok pufrovaný fosfátem (PBS)). Navážky juglonu (**J**), shikoninu (**SH**) nebo proléčiv (**AJ** nebo **ASH**), stejně tak L- α -fosfatidylcholinu (PC, složení: $\geq 40\%$ PC, $\geq 95\%$ fosfolipidů) či přídavku cholesterolu (CHOL) v různých poměrech (viz Tab. 8, str. 73) byly rozpuštěny ve zvoleném objemu THF a byly sonifikovány po dobu 5 minut v ultrazvukové lázni. Následně byla organická fáze nastříknuta tenkou jehlou do vodné fáze při pokojové teplotě (RT) nebo teplotě 60°C. Směs organické a vodné fáze byla míchána na magnetické míchačce po dobu minimálně 30 minut. Organické rozpouštědlo bylo odstraněno odpařováním za sníženého tlaku nebo dialýzou či kombinací obou postupů. Pokud se během odstraňování organického rozpouštědla vysrážely bioaktivní látky (**J**, **SH**, **AJ**, **ASH**), suspenze byla zfiltrována na vhodném filtru o velikosti pórů 0,45 μm nebo 0,22 μm . Vzniklé lipidické nanoformulace byly změřeny na DLS pro určení velikosti částic (hydrodynamický poloměr R_h) a jejich povrchového náboje (ζ -potenciál). Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) byly získány R_h nanočástic z některých připravených nanoformulací pro potvrzení výsledků z DLS. Vybrané nanoformulace byly také změřeny na kryogenním transmisním elektronovém mikroskopu (cryo-TEM) pro přímé zobrazení morfologie a velikosti nanočástic. Pro odstranění bioaktivních látek, které nebyly enkapsulovány, byly vyzkoušeny metody centrifugace na přístroji CENTRIFUGE 5430R (Eppendorf) s rotorem F-35-6-30 v centrifugačních zkumavkách s filtrem (Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit) a dialýzy po dobu 2–3 hodin v dialyzační membráně (Spectra/Por® Dialysis Membrane MWCO: 12–14000) nebo v dialyzačních falkonkách (Pur-A-Lyzer™ Maxi 6000 Dialysis Kit). U nanoformulací s **J** nebo **SH** (nanoformulace: **6** a **12**) byla taktéž sledována kinetika uvolňování léčiva pomocí dialýzy v průběhu 48 hodin, úbytek byl kvantifikován pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Úbytek obsahu **AJ** nebo **ASH** byl sledován až po 24hodinové dialýze (nanoformulace: **14** a **17**) kvůli komplikacím stanovení a nedostatečnému množství **AJ** nebo **ASH** v nanoformulacích.

Tab. 8: Souhrn přípravy nanoformulací na bázi lipidů s bioaktivními komponenty: **SH**, **J**, **ASH**, **AJ**. Dialýza (na 3 hodiny) byla použita jak pro odstranění organického rozpouštědla (THF), tak pro eliminaci neenkapsulované bioaktivní látky. U nanoformulací, kde nebyla provedena dialýza, se měřila kinetika uvolňování léčiva až po fyzikálně-chemické charakterizaci.

	m [mg]	SH/J/ ASH/AJ	m(PC) [mg]	m(CHOL) [mg]	V(THF)/ V(H ₂ O/PBS) [ml/ml]	Odpaření THF na RVO	Dialýza
1	2	SH	12	–	12/24 THF/H ₂ O	✓	✓
2	1,5	SH	12	–	12/24 THF/H ₂ O	×	✓
3	1,5	SH	12	–	12/24 THF/H ₂ O	✓	✓
4	0,75	SH	6 (≥ 99% PC)	–	6/12 THF/H ₂ O	×	✓
5	1,5	SH	100	20	10/10 THF/PBS (60°C)	✓	×
6	1,5	SH	100	20	10/10 THF/H ₂ O (60°C)	✓	×
7	6	J	12	–	12/24 THF/H ₂ O	✓	✓
8	2	J	12	–	12/24 THF/H ₂ O	✓	✓
9	6	J	12	–	12/24 THF/H ₂ O	×	✓
10	2	J	12	–	12/24 THF/H ₂ O	×	✓
11	1,5	J	100	20	10/10 THF/PBS (60°C)	✓	×
12	1,5	J	100	20	10/10 THF/H ₂ O (60°C)	✓	×
13	1,5	ASH	100	20	10/10 THF/PBS (60°C)	✓	×
14	1,5	ASH	100	20	10/10 THF/H ₂ O (60°C)	✓	×
15	6	AJ	12	–	12/24 THF/H ₂ O	✓	✓
16	1,5	AJ	100	20	10/10 THF/PBS (60°C)	✓	×
17	1,5	AJ	100	20	10/10 THF/H ₂ O (60°C)	✓	×

Nanoformulace byly připravovány v triplicátech. Příprava lipozomální nanoformulace s cholesterolem a shikoninem v PBS byla popsána ve zdroji [53]. Postupy příprav nanoformulací s obsahem cholesterolu, které byly studovány v rámci této diplomové práce, byly optimalizovány dle Tab. 8, str. 73, poměry však byly zachovány. V následujícím textu bude pro zjednotění použito číslování nanoformulací, viz Tab. 8, str. 73.

3.4.2 Dynamický rozptyl světla (DLS) a měření ζ -potenciálu

Dynamický rozptyl světla byl měřen v polystyrenových semimikro kyvetách o objemu 1,5 ml a ζ -potenciál v kyvetách DTS1070 „*Disposable Folded Capillary Cell*“ na přístroji ZetaSizer Nano-ZS ZEN3600 (Malvern Instruments Limited) ovládaném programem Zetasizer Software (Malvern Instruments Ltd, Version: 7.11). Alikvoty nanoformulací byly před měřením zfiltrvány 0,45 μm filtrem. Měření velikosti nanočástic v každém alikvotu bylo provedeno minimálně 5 $\times$ a bylo nastaveno na 60 s. Měření ζ -potenciálu bylo provedeno taktéž minimálně 5 $\times$.

3.4.3 Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)

Fluorescenční korelační spektroskopie byla měřena na IX83 konfokálním laserovém skenovacím mikroskopu (Olympus, Tokyo, Japan) vybaveném FLIM/FLCS upgrade kitem (PicoQuant GmbH, Berlin, Germany). Vzorky byly vhodně zředěny a excitovány laserovou diodou LDH-DC-485 o vlnové délce 485 nm, jejíž intenzita byla v případě potřeby snížena (viz Tab. 9, str. 75). Laser byl ovládán ovladačem PDL 828 Sepia II v pikosekundovém pulzním módu s opakovací frekvencí 40 MHz. Objektiv (Olympus UPlanSApo) byl ponořen do kapky vzorku, který excitoval pomocí laseru. Emitovaná fluorescence následně prošla objektivem a emisními filtry (Semrock 600/50 nebo 520/35 BrightLine) a byla detekována na hybridním fotonásobiči (PMA Hybride-40, PicoQuant) v režimu počítání jednotlivých fotonů. Počty fotonů byly zaznamenány pomocí modulu PicoHarp300 TCSPC. Vzorky byly před analýzou zfiltrvány 0,45 μm nebo 0,22 μm filtrem. Data naměřil Ing. Jiří Pánek z vědeckého oddělení „Nadmolekulární polymerní systémy“ Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR.

Tab. 9: Souhrn nanoformulací, které byly analyzovány pomocí FCS a parametry měření.

Nanoformulace	Ředění vzorku	Intenzita laseru [%]	Doba měření [s]	Detektor: 1 nebo 2
1 (SH)	10×	65	60	2
3 (SH)	10×	65	60	2
5 (SH)	20×	67	180	2
6 (SH) před 2h dialýzou	10×	67	180	2
6 (SH) po 2h dialýze	10×	67	180	2
6 (SH) po 2h dialýze	–	67	180	2
7 (J) před centrifugací	2×	65	60	2
7 (J) po centrifugaci	2×	65	60	2
8 (J) před centrifugací	2×	65	60	2
8 (J) po centrifugaci	–	65	60	2
11 (J)	20×	69	180	1 a 2
12 (J) před 2h dialýzou	10×	70	180	1 a 2
12 (J) po 2h dialýze	5×	70	180	2
14 (ASH) před 2h dialýzou	5×	75	180	2
14 (ASH) po 2h dialýze	5×	75	180	2
16 (AJ)	20×	67	180	2
16 (AJ)	30×	73	180	1
17 (AJ) před 2h dialýzou	–	75	180	1 a 2
17 (AJ) po 2h dialýze	–	75	180	1 a 2

3.4.4 Kvantifikace pomocí UV-VIS spektrofotometrie

Na UV-Vis spektrofotometru Evolution™ 220 UV-Visible Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) ovládaném programem Thermo INSIGHT (Thermo Fisher Scientific, Version: 1.4.40) byla proměřena absorpční spektra THF roztoků **J**, **SH**, proléčiv: **AJ** a **ASH** a PC v křemenných spektrofotometrických kyvetách. Kvantitativní analýza pomocí UV-VIS spektrofotometrie byla možná pouze u nanoformulací s obsahem **SH** nebo **J** (viz kapitola 4 Výsledky a diskuze). Pro kvantifikaci byly naměřeny kalibrační křivky v THF nebo ve specifickém poměru THF:H₂O při vlnové délce: $\lambda_{\max}(\text{SH}) = 510$ nm; $\lambda_{\max}(\text{J}) = 415$ nm. Vzorky, v případě kvantifikace **SH**, byly připraveny odpařením vody na RVO z odebraných alikvotů z nanoformulací nebo přidáním THF ve specifickém poměru pro rozrušení nanočástic a uvolnění **SH** do směsi 2 mísitelných kapalin (H₂O a THF). Pro kvantifikaci **J** byl zvolen pouze 2. postup (vysvětlení viz kapitola 4 Výsledky a diskuze). Naměřené hodnoty absorbance vzorků byly dosazeny do rovnic kalibračních přímek v rozsahu koncentrací od 4 do 40 µg/ml o $R^2 \sim 0,99$ a byly vypočítány koncentrace bioaktivních látek v nanoformulacích.

3.4.5 Kvantifikace pomocí HPLC

Kalibrační závislost při kvantitativní analýze na HPLC se vynáší jako plocha píku vůči koncentraci standardu v ředící řadě. Pro kvantifikaci proléčiv (**AJ** a **ASH**) v lipidických nanoformulacích byl použit přístroj DIONEX UltiMate3000 (Thermo Fisher Scientific) opatřený pumpou LPG3400RS a detektorem diodového pole DAD-3000 ovládaný programem Chromeleon Client (Dionex Corporation, Version 6.80 SR16 Build 5387 (291597)). Vzorky byly připraveny odpařením vodné fáze odebraného alikvotu (1 ml) z nanoformulace na RVO. K odparku byl přidán 1 ml THF pro rozrušení lipidické membrány a uvolnění proléčiva do organického rozpouštědla. Takto připravené vzorky byly nastříknuty do šesticestného ventilu mikrostřikačkou Hamilton. Pro nalezení optimální separační metody pro rozdělení složek vzorku, tj. PC od proléčiva (**AJ** nebo **ASH**), byly vyzkoušeny různé typy kolon, mobilních fází a jejich gradientů, viz následující text a Tab. 10–17.

Metoda 1: Gradientová eluce

Stacionární fáze: Kolona C₁₈ Chromolith® Performance RP-18e 100-4,6mm

Mobilní fáze A: 95 % H₂O, 5 % ACN, 0,1 % TFA (v/v/v)

Mobilní fáze B: 5 % H₂O, 95 % ACN, 0,1 % TFA (v/v/v)

Tab. 10: Gradient mobilních fází pro metodu 1.

Čas [min]	Průtok [ml/min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0,10	0,5	50	50
0,50	1,0	50	50
8,00	1,0	5	95
9,00	1,0	5	95
9,10	1,0	50	50
9,90	0,5	50	50
9,99	0,1	50	50

Metoda 2: Gradientová eluce

Stacionární fáze: Kolona C₁₈ Chromolith® Performance RP-18e 100-4,6mm

Mobilní fáze A: 95 % H₂O, 5 % ACN, 0,1 % TFA (v/v/v)

Mobilní fáze B: 5 % H₂O, 95 % ACN, 0,1 % TFA (v/v/v)

Tab. 11: Gradient mobilních fází pro metodu 2.

Čas [min]	Průtok [ml/min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0,10	1	95	5
0,50	1	95	5
8,00	1	5	95
9,00	1	5	95
9,10	1	95	5
9,90	0,5	95	5
9,91	0,1	95	5

Metoda 3: Gradientová eluce

Stacionární fáze: Kolona Chromolith® Performance Si 100-4,6mm

Mobilní fáze C: THF

Mobilní fáze D: Toluén

Tab. 12: Gradient mobilních fází pro metodu 3.

Čas [min]	Průtok [ml/min]	THF [%]	Toluén [%]
0,10	0,5	95	5
0,50	1	95	5
9,50	1	5	95
10,00	0,5	5	95

Metoda 4: Gradientová eluce

Stacionární fáze: kolona Chromolith® Performance Si 100-4,6mm

Mobilní fáze E: Ethylacetát

Mobilní fáze F: Cyklohexan

Tab. 13: Gradient mobilních fází pro metodu 4.

Čas [min]	Průtok [ml/min]	Ethylacetát [%]	Cyklohexan [%]
0,10	0,5	95	5
0,50	1	95	5
9,50	1	5	95
10,00	0,5	5	95

Metoda 5: Gradientová eluce

Stacionární fáze: Kolona Chromolith® Performance Si 100-4,6mm

Mobilní fáze E: Ethylacetát

Mobilní fáze F: Cyklohexan

Tab. 14: Gradient mobilních fází pro metodu 5.

Čas [min]	Průtok [ml/min]	Ethylacetát [%]	Cyklohexan [%]
0,10	0,5	5	95
0,50	1	5	95
9,50	1	95	5
10,00	0,5	95	5

Metoda 6: Gradientová eluce

Stacionární fáze: Kolona Chromolith® Performance Si 100-4,6mm

Mobilní fáze G: Methanol

Mobilní fáze H: Chloroform

Tab. 15: Gradient mobilních fází pro metodu 6.

Čas [min]	Průtok [ml/min]	Methanol [%]	Chloroform [%]
0,10	0,5	5	95
6,00	0,75	95	5
10,00	1	95	5

Metoda 7: Isokratická eluce po dobu 5 min

Stacionární fáze: Kolona Chromolith® Performance Si 100-4,6mm

Mobilní fáze: Methanol

Metoda 8: Isokratická eluce po dobu 10 min

Stacionární fáze: Kolona SeQuant® ZIC®-pHILIC 5µm polymer 150 × 4,6 mm

Mobilní fáze: 95 % ACN, 5 % H₂O (v/v)

Metoda 9: Isokratická eluce po dobu 10 min

Stacionární fáze: Kolona SeQuant® ZIC®-pHILIC 5µm polymer 150 × 4,6 mm

Mobilní fáze: 95 % ACN, 5 % 5 mM vodný roztok octanu amonného (v/v)

Metoda 10: Gradientová eluce

Stacionární fáze: Kolona SeQuant® ZIC®-pHILIC 5µm polymer 150 × 4,6 mm

Mobilní fáze I: ACN

Mobilní fáze J: 5 mM vodný roztok octanu amonného

Tab. 17: Gradient mobilních fází pro metodu 10.

Čas [min]	Průtok [ml/min]	Mobilní fáze I [%]	Mobilní fáze J [%]
0,10	0,5	60	40
0,50	1	60	40
9,50	1	95	5
10,00	0,5	95	5

3.4.6 Kvantifikace pomocí NMR spektroskopie

Kvantitativní analýza pomocí NMR spektroskopie byla vyzkoušena na nanoformulaci s **ASH**. Vzorek byl připraven odpařením vodné fáze odebraného alikvotu (4 ml) z nanoformulace na RVO. K odparku bylo přidáno 5 ml THF pro rozrušení lipidické membrány a THF byl opět odpařen na RVO. Odparek byl následně rozpuštěn v 0,55 ml deuterovaném chloroformu. Jako vnitřní standard byl do NMR kyvety přidán 1,4-dioxan (500 µl). ¹H spektrum vzorku bylo měřeno při teplotě na spektrometru Bruker AVANCE III 600 o frekvenci 600 MHz a porovnáno s ¹H spektrem standardu (**ASH**). Parametry pulzní sekvence jsou uvedeny v Tab. 18. Data naměřil a zpracoval Mgr. Rafał Łukasz Konefał, Ph.D. z vědeckého oddělení „NMR spektroskopie a Rtg. a neutronová difrakce“ Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR.

Tab. 18: Parametry pulzní sekvence pro měření ¹H spektra **ASH** a nanoformulace s **ASH**.

	Délka 90° pulzu [µs]	Relaxační prodleva [s]	Doba akvizice [s]	Počet skenů
¹ H experiment	18	30	1,82	2000

3.4.7 Kvantifikace pomocí GC-MS

Vzorky připravené z lipidických nanoformulací obsahujících peracetylovaný dihydrojuglon (**AJ**) nebo peracetylovaný dihydroshikonin (**ASH**) byly analyzovány plynovým chromatografem Perkin Elmer Clarus 680 spojeným s hmotnostním detektorem Perkin Elmer Clarus SQ 8 T (GC-MS). Byla použita kapilární kolona DB-35MS (30 m, 0.25 mm, 0.25 μ m, Agilent Technologies). Teplota GC interface byla 300 °C a teplota iontového zdroje 190 °C. Jako nosný plyn bylo použito helium s průtokem 1 ml/min a nastaveným splitem 50 ml/min. Nastříknuto bylo 0.5 μ l vzorku. Identifikace látek byla provedena porovnáním retenčního času se standardem a analýzou hmotnostního spektra. Na základě analýzy hmotnostního spektra měřeného metodou TIR (z angl. *total ion recording*, full scan, m/z 15 - 620) byly zvoleny hmotnosti, které byly u standardu zastoupeny s největší intenzitou a ty byly následně použity ke kvantitativní analýze. Kvantitativní analýza byla provedena metodou SIR na základě kalibrační křivky. Data změřila RNDr. Livia Kanizsová ze servisně výzkumné skupiny „Laboratoře analytické chemie“ na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR.

Pro kvantitativní analýzu GC-MS byl připraven zásobní roztok v tetrahydrofuranu z odparku alikvotu nanoformulace s **AJ** o koncentraci 15 mg/ml. Pro měření byla nastavena teplota injektoru 200 °C a teplotní program pece plynového chromatografu následující: počáteční teplota 50 °C byla držena po dobu 3 min, potom byla teplota zvýšena rychlostí 10 °C/min na 300 °C, a tato teplota byla držena 2 minuty. Pro kvantitativní analýzu metodou SIR byly zvoleny hmotnosti m/z: 43, 176, 218, 260, 302.

Pro kvantitativní analýzu GC-MS byl připraven zásobní roztok v tetrahydrofuranu z lyofilizované nanoformulace s **ASH** o koncentraci 15 mg/ml. Pro měření byla nastavena teplota injektoru 300 °C a teplotní program pece plynového chromatografu následující: počáteční teplota 50 °C byla držena po dobu 3 min, potom byla teplota zvýšena rychlostí 10 °C/min na 320 °C, a tato teplota byla držena 5 minut. Pro kvantitativní analýzu metodou SIR byla zvolena hmotnost m/z 274.

3.4.8 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Pro přímé zobrazení velikosti a morfologie nanočástic byly vybrány lipidové nanoformulace analyzovány na TEM mikroskopu Tecnai G2 Spirit (FEI). Vzorky byly připravovány dvěma způsoby: metodou rychlého vysušení vzorku (z angl. *fast drying*) s negativním barvením a metodou rychlého mražení (z angl. *fast freezing*) na přístroji EMS-002 cryo Workstation/rapid immersion freezer. V případě první metody se napipetovaly 2 μ l vzorku na měděnou mřížku s uhlíkovým filmem a rozpouštědlo je rychle zmrazeno a odstraněno řízenou sublimací. V případě druhé metody vzniká amorfni led, ve kterém jsou nanočástice v nezměněném stavu zmrazeny. Předpokládá se totiž, že zmražení je rychlejší než pohyb či případná deformace nanočástic. Vzorky připravil a výsledky zpracoval doc. RNDr. Miroslav Šlouf, Ph.D. z vědeckého oddělení „Morfologie polymerů“ Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR.

3.4.9 Kinetika uvolňování léčiva z nanočástic

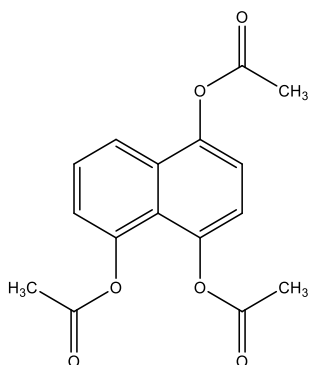
U nanoformulace **6** (s obsahem **SH**) a **12** (s obsahem **J**) byla měřena kinetika uvolňování léčiv z nanočástic pomocí dialýzy. Do dvou dialyzačních falkonek Pur-A-LyzerTM Maxi 6000 Dialysis Kit bylo pipetováno po 2 ml nanoformulace **6** a do dalších dvou nanoformulace **12**. Dialyzační falkonky byly umístěny do odměrného válce s 1 l destilované vody (pro každou nanoformulaci zvlášť). V časových intervalech byly odebrány alikvoty o objemu 200 μ l, které byly ředěny 400 μ l THF. Vzorky byly sonifikovány po dobu 5 minut v ultrazvukové lázni. Úbytek byl kvantifikován pomocí UV-VIS spektrofotometrie při vlnových délkách: $\lambda_{\max}(\text{SH}) = 510 \text{ nm}$; $\lambda_{\max}(\text{J}) = 415 \text{ nm}$. Kalibrační závislost byla proměřena v rozsahu od 2 $\mu\text{g/ml}$ do 60 $\mu\text{g/ml}$ s $R^2 \sim 0,999$.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Příprava a fyzikálně-chemická charakterizace proléčiv

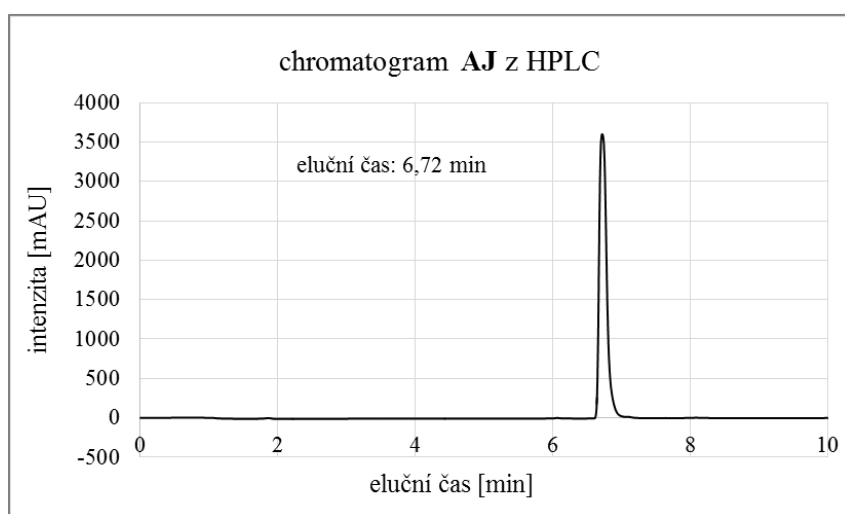
4.1.1 Peracetylovaný dihydrojuglon (AJ)

Syntézou (viz Obr. 16, str. 66) bylo získáno 0,51 g (59 %) peracetylovaného dihydrojuglonu (**AJ**) světle žluté barvy v krystalické formě (viz Obr. 18). Vzorek byl podroben analýze fyzikálně-chemickými metodami.



Obr. 18: Struktura peracetylovaného dihydrojuglonu (**AJ**).

Metodou reversní **HPLC** byla analyzována čistota připraveného **AJ**. Vzorek byl eluován gradientem mobilních fází A a B (viz Tab. 7, str. 74) na C₁₈ koloně Chromolith® Performance RP-18e 100-4,6mm s elučním časem 6,72 min, viz chromatogram při $\lambda = 256$ nm, Obr. 19. Vzorek je čistý, nebyly detekovány píky případných vedlejších produktů.



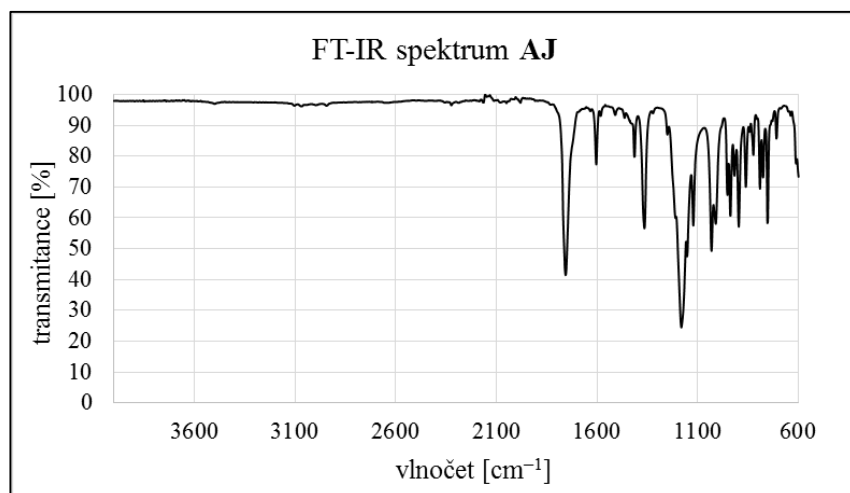
Obr. 19: Chromatogram gradientové eluce peracetylovaného dihydrojuglonu (**AJ**) z HPLC při $\lambda = 256$ nm.

Spektroskopie NMR, vibrační FT-IR (viz Obr. 20), hmotnostní spektrometrie a elementární analýza izolovaného **AJ** také potvrdily předpokládanou strukturu (viz Obr. 18, str. 81):

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 2.40 (s, 6H, $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_3$), 2.46 (s, 3H, $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_3$), 7.13 (d, 1H, aromatický cyklus); 7.19 (d, 1H, aromatický cyklus); 7.29 (d, 1H, aromatický cyklus); 7.51 (t, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{}$); 7.84 (d, 1H, aromatický cyklus)

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (400 MHz, CDCl_3): 21.1, 2×21.2 , 118.4, 120.1, 120.4, 121.4, 121.9, 126.6, 129.7, 142.8, 144.6, 145.4, 169.0, 2×169.4

FT-IR: Oblast fingerprintu ($500\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$) molekuly **AJ**, oblast od $500\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ zřejmě přísluší vibracím C–H na aromatickém cyklu, pás v oblasti $1050\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$ zřejmě přísluší vibracím C–O esterových vazeb, silný pás v oblasti $1600\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ přísluší vibraci C=O vazby. Vibrační pásy, které by potvrdily přítomnost hydroxylových skupin (vibrace O–H vazby) na juglonu nejsou ve spektru přítomné ($3400\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$).



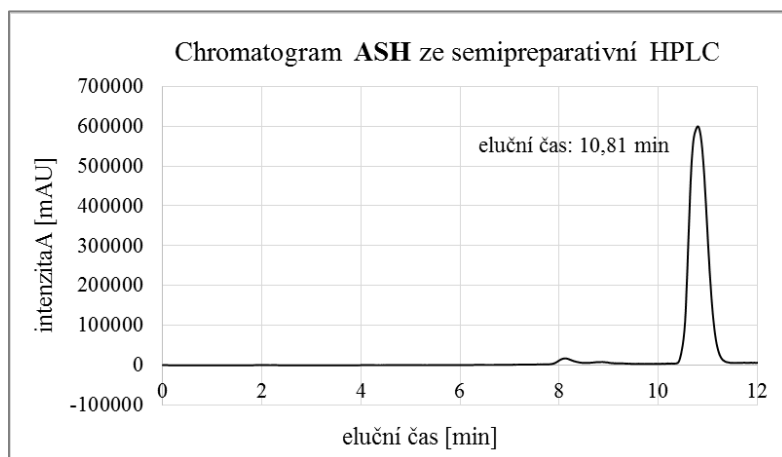
Obr. 20: FT-IR spektrum peracetylovaného dihydrojuglonu (**AJ**).

MS(+): 325.143 (325.07; $[\text{M} + \text{Na}]^+$)

EA: nalezeno/vypočteno C 63.69/63.58, H 4.65/4.67

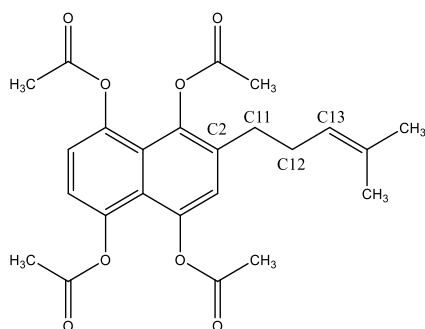
4.1.2 Peracetylovaný dihydroshikonin (ASH)

Syntézou (viz Obr. 17, str. 67) a separací pomocí Flash chromatografie s následnou semipreparativní HPLC bylo získáno 100 mg (59 %) peracetylovaného dihydroshikoninu (**ASH**) světle růžové barvy v krystalické formě. Chromatogram dělení **ASH** v gradientu mobilních fází dle Tab. 4, str. 72 na koloně Chromolith® prep RP18e 100-25mm je znázorněn na Obr. 21. **ASH** byl eluován v čase 10,81 min a byl izolován od vedlejších produktů, které byly eluovány v čase od 8. do 9. minuty.



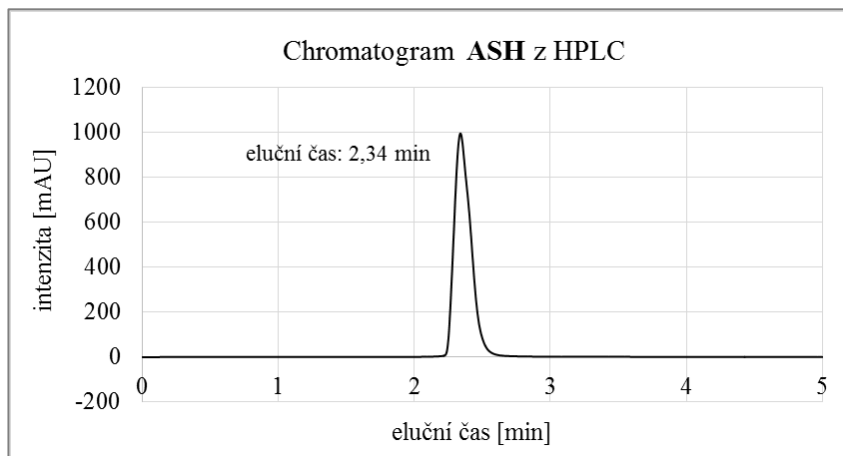
Obr. 21: Chromatogram z izolace **ASH** pomocí semipreparativní HPLC.

Vzorek **ASH**, viz Obr. 22, byl podroben analýze fyzikálně-chemickými metodami. Předpokládalo se, že se bude acetylovat i hydroxylová skupina alifatického řetězce na C2 1,4-naftochinonu. Nicméně ^1H NMR spektrum a hmotnostní spektrometrie potvrzují, že hydroxylová, ani pátá acetyloxy skupina není přítomná. Sekundární hydroxylová skupina na alifatickém řetězci je výrazně reaktivní, a tak mohlo dojít k dehydrataci této skupiny během redukční acetylce Zn, v tom případě by ale měla vznikat dvojná vazba mezi uhlíkem C11 a C12, která nebyla potvrzena. Reakce by ale mohla probíhat obdobným mechanismem jako hydrogenační debenzylace katalyzovaná Pd.



Obr. 22: Struktura peracetylovaného dihydroshikoninu (**ASH**).

Čistota izolované látky byla analyzována pomocí **HPLC**. Vzorek byl isokraticky eluován methanolem na koloně Chromolith® Performance Si 100-4,6mm v čase 2,34 min, viz chromatogram při $\lambda = 300$ nm, Obr. 23. Připravený **ASH** je čistý.



Obr. 23: Chromatogram isokratické eluce peracetylovaného dihydroshikoninu (**ASH**) z HPLC při $\lambda = 300$ nm.

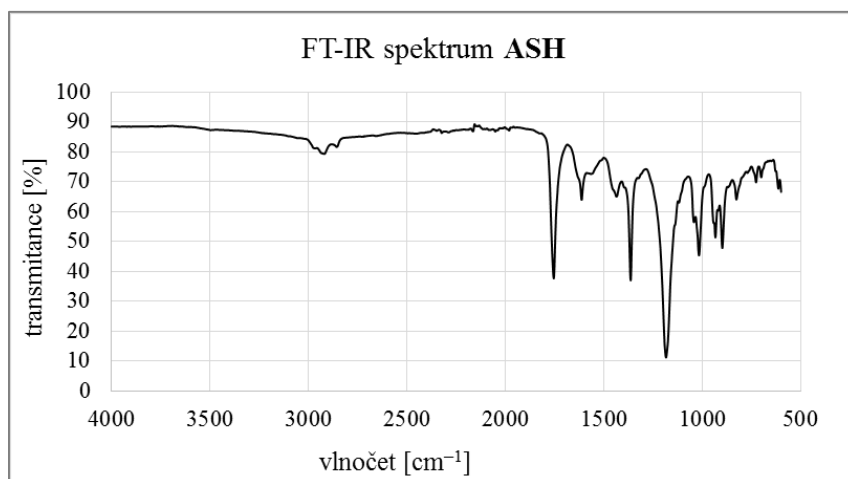
V ^1H NMR spektru je na chemickém posunu $\delta = 2.59$ ppm přítomný signál dubletu dubletů (dd) odpovídající dvěma atomům vodíku vázaných na C11. Toto štěpení potvrzuje chemickou neekvivalenci dvou vedlejších vodíkových jader vázaných na C12. Zatímco signál odpovídající dvěma atomům vodíku na chemickém posunu $\delta = 2.27$ ppm je kvartet (q). Atomy vodíku na C11 mají vůči těmto vodíkům zřejmě stejnou J-interakční konstantu jako atom vodíku vázaný na C13.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 1.55 (s, 3H, C- CH_3), 1.68 (s, 3H, C- CH_3), 2.27 (q, 2H, - $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH=C(CH}_3)_2$), 2.36–2.41 (m, 12H, -O-C(O)- CH_3), 2.59 (dd, 2H, - $\text{CH}_2\text{-CH=}$), 5.13 (triplet, 1H, - $\text{CH}_2\text{-CH=}$), 7.05–7.10 (m, 3H, aromatický cyklus)

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (400 MHz, CDCl_3): 17.8, 21.0, 3×21.4 , 25.8, 28.1, 30.6, 120.3, 121.2, 122.1, 123.0, 123.2, 123.9, 133.3, 133.4, 141.0, 143.2, 143.3, 143.6, 169.1, 3×169.3 ,

Ve spektru FT-IR nejsou vibrační pásy ($3400\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$), které by potvrdily přítomnost hydroxylových skupin (vibrace O-H). Z toho vyplývá, že struktura **ASH** i dle hmotnostní spektrometrie a elementární analýzy odpovídá struktuře na Obr. 22, str. 83.

FT-IR: Oblast fingerprintu ($500\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$) molekuly **ASH**, oblast od $500\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ zřejmě přísluší vibracím C–H na aromatickém cyklu, silný pás v oblasti $1000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ zřejmě přísluší vibracím C–O esterových vazeb, silný pás kolem 1300 cm^{-1} zřejmě přísluší vibraci C=C–H vazby vodíku na alkenovém uhlíku, silný pás kolem 1700 cm^{-1} přísluší vibraci C=O vazby.



Obr. 24: FT-IR spektrum peracetylovaného dihydroshikoninu (**ASH**).

MS(+): 465.24 (465.15; $[M + Na]^+$), 481.22 (481.12; $[M + K]^+$)

EA: nalezeno/vypočteno C 64.89/65.15, H 5.99/5.92

4.2 Příprava a fyzikálně-chemická charakterizace nanoformulací

Pro optimalizaci postupu přípravy nanoformulací byly zprvu testovány pouze 1,4-naftochinony: Juglon (**J**) a shikonin (**SH**). Po optimalizaci byly připraveny nanoformulace i s proléčivou (**ASH** nebo **AJ**). Nanoformulace byly nejdříve připravovány Banghamovou metodou hydratace tenkého filmu (viz str. 45). Bylo testováno několik poměrů **J** a 2-hydroxypropyl- γ -cyklodextrinu. Byly připraveny zásobní roztoky detergentu a **J** v methanolu, které byly smíchány ve zvoleném poměru. Organické rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO a vzniklý tenký film na stěnách baňky s kulatým dnem byl rehydratován roztokem PBS (fyziologický roztok pufrovaný fosfátem) za použití ultrazvukové lázně na 15 min. Suspenze byly zfiltrány PVDF filtrem o velikosti pórů 0,45 μm . Taktéž byla vyzkoušena příprava nanoformulace s **J** a komerčně dostupným detergentem SPAN65, který je dobře rozpustný v chloroformu. Příprava byla obdobná s rozdílem organického rozpouštědla, které bylo použito. Vzniklé suspenze však nevykazovaly na DLS vhodnou velikost (hydrodynamický průměr D_h).

Další metodou byla příprava nanoformulací s obsahem **J** a komerčně dostupného detergentu Pluronic F127 nebo L- α -fosfatidylcholinu (PC, složení: $\geq 40\%$ PC, $\geq 95\%$ fosfolipidů nerozpustných v acetonu). Tato komerčně dostupná směs (PC a dalších fosfolipidů) vhodná pro mikrobiologické experimenty byla zvolena hlavně kvůli cenové dostupnosti s ohledem na množství. Nanoformulace byly připravovány metodou vstřikování organické fáze s obsahem **J** a PC nebo Pluronic F127 do vody s následným odpařením organického rozpouštědla na RVO. Po filtraci vodných suspenzí bylo změřeno DLS. Suspenze měly ideální tvar autokorelačních křivek. Obdobným způsobem byla otestována i příprava nanoformulací se **SH**.

Pro nalezení optimálního způsobu přípravy nanočástic s co největším DL a EE byla vyzkoušena řada nanoformulací o různých poměrech PC a **J/SH/AJ/ASH** a různých způsobech odstraňování organické fáze, viz Tab. 8, str. 73. Dialýza nedokázala efektivně odstranit veškerý přidaný THF, proto byly nanoformulace s **ASH** a **AJ** připravovány s krokem odpařování THF na RVO.

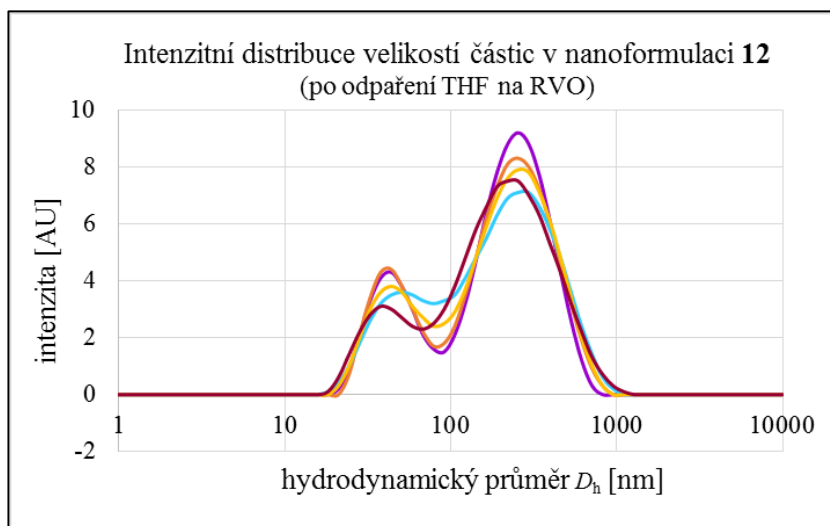
4.2.1 DLS a ζ -potenciál

Data získaná z měření DLS byla analyzována pomocí Zetasizer Software. V získaných intenzitních distribucích velikostí nanočástic ve vzorcích byly identifikovány populace nanočástic jako jednotlivé píky. Tyto píky byly v softwarovém programu Zetasizer Software popsány hodnotami středních velikostí a standardních odchylek v rámci daného píku. Taktéž byly změřeny ζ -potenciály. Všechny nanoformulace byly připravovány v triplikátech, z nichž každý byl na stroji proměřen minimálně 5×. Jednotlivé výsledky z měření triplikátů pro danou nanoformulaci byly zprůměrovány, viz Tab. 19. Nanoformulace, které byly připravovány s přidavkem cholesterolu v PBS jsou v tabulce zabarvené modře, zatímco nanoformulace, s cholesterolem v destilované vodě, jsou zabarvené červeně. Významné rozdíly jsou pozorovatelné v jejich ζ -potenciálech: částice v H₂O mají zápornější ζ -potenciály oproti nanočásticím v PBS. Na str. 52 bylo zmíněno, že ζ -potenciál přirozeně se vyskytujících fosfolipidů (teoreticky by mělo platit i pro PC, který byl použitý při přípravě těchto nanoformulací) se pohybuje v rozmezí od –10 až +10 mV. Lipozomy v suspenzi vyžadují hodnoty zápornější než –30 mV nebo kladnější než +30 mV. Z toho je možné soudit, že nanočástice s ζ -potenciálem ≤ -30 mV by měly mít dostatečnou koloidní stabilitu, viz Obr. 28, str. 89. U nanoformulací **13** a **16** nebylo možné ζ -potenciál změřit, zřejmě docházelo k oxidaci vzorku a ke korozi kyvety. Průměry částic (D_h) se pohybují od 200 do 300 nm s relativně širokou distribucí.

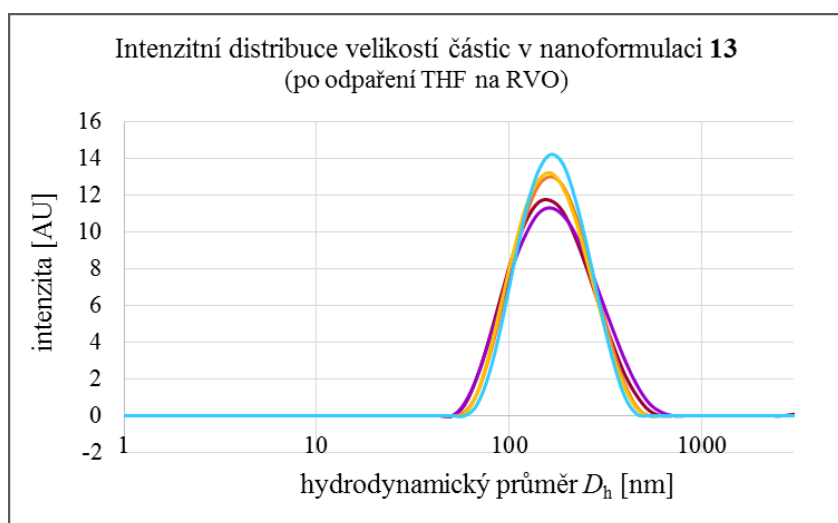
Tab. 19: Zprůměrované výsledky z měření DLS a ζ -potenciálu zvolených nanoformulací.

Nanoformulace	(pro)léčivo	Střední velikost (průměru) [nm]	Standardní odchylka [nm]	ζ -potenciál [mV]	Standardní odchylka [mV]
1	SH	201,2	69,1	–51,0	8,2
2	SH	239,5	91,1	–36,6	6,2
3	SH	245,9	142,2	–45,8	6,9
4	SH				
5	SH	224,8	121,8	–17,2	17,8
6	SH	189,7; 38,1	98,9; 8,7	–49,8	6,9
7	J	271,1	120,7	–40,4	6,1
8	J	268,8	146,8	–43,3	6,3
9	J	217,0	77,5	–31,3	6,4
11	J	189,9	89,5	–20,6	17,9
12	J	239,4; 39,1	142,1; 11,3	–47,2	5,8
13	ASH	199,7	90,8	×	×
14	ASH	211,3	131,7	–52,3	6,8
15	AJ	206,4	94,4	×	×
16	AJ	251,1	139,1	×	×
17	AJ	278,3	186,1	–51,5	5,8

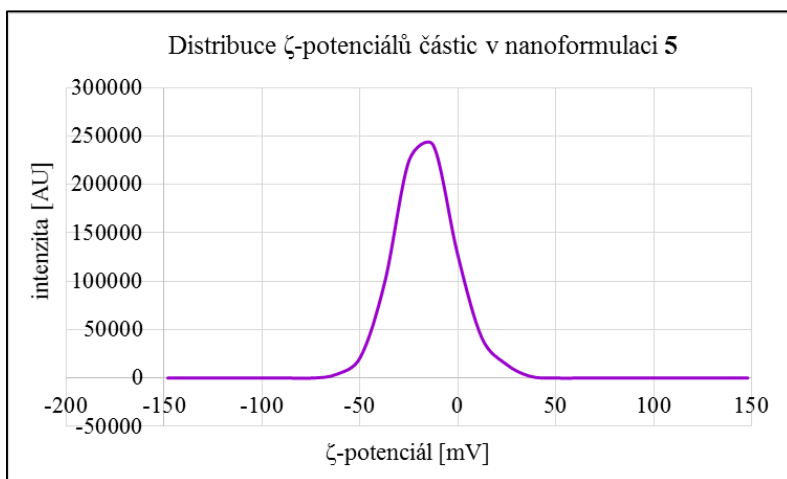
U nanoformulací **6** a **12** byla potvrzována i přítomnost menších útvarů, tyto nanoformulace byly na DLS měřeny před dialýzou, je možné, že hodnoty kolem 40 nm odpovídaly agregátům či shlukům **J** (v případě **12**) a **SH** (v případě **6**), viz Obr. 25. Větší nanočástice rozptylují vzhledem k vlastnostem rozptylu více světla než menší nanočástice, které ve vzorku zastupují větší poměr, než by se mohlo zdát z intenzitně vážené distribuce [54]. Následující obrázky jsou ukázkou intenzitních distribucí velikostí částic v nanoformulaci 13 (s obsahem **ASH**), viz Obr. 26 a ζ -potenciálů částic v nanoformulacích **5** (s obsahem **SH**) a **17** (s obsahem **AJ**), viz Obr. 27 a 28, str. 89. Distribuční grafy velikostí nanočástic jsou vykresleny s osou x v logaritmické škále kvůli čitelnosti.



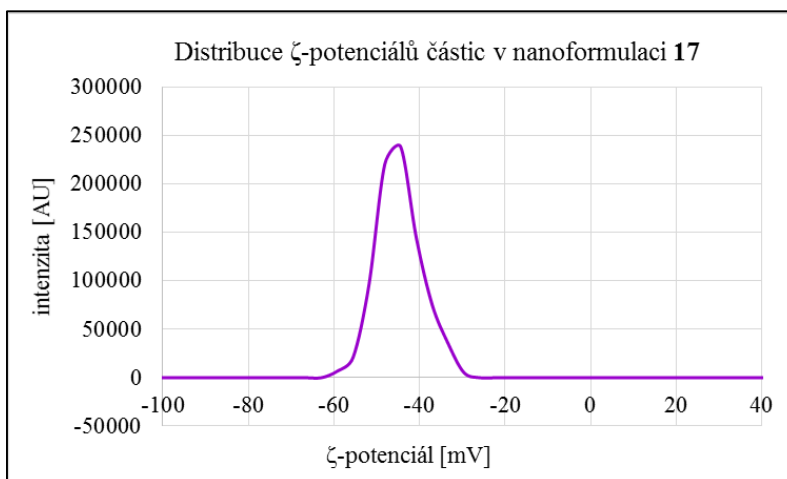
Obr. 25: Intenzitní distribuce velikostí částic v nanoformulaci **12** před dialýzou. Na obrázku jsou vidět 2 populace velikostí nanočástic.



Obr. 26: Intenzitní distribuce velikostí částic v nanoformulaci **13** před dialýzou.



Obr. 27: Intenzitní distribuce ζ -potenciálů částic v nanoformulaci 5.



Obr. 28: Intenzitní distribuce ζ -potenciálů částic v nanoformulaci 17.

Prokázalo se, že dialýza a centrifugace výrazně ovlivňují velikost nanosystémů. Dialýza je dynamický rovnovážný proces, při kterém lze pozorovat nejen úbytek enkapsulovaného léčiva (viz kapitola 4.2.8 Kinetika uvolňování léčiva z nanočástic), ale i změnu ve velikosti nanočástic, viz Tab. 20, str. 90. Centrifugace ve zkumavkách s filtrem byla prováděna 3× po dobu 10 min při teplotě 15°C na 5000 RPM pro odstranění neenkapsulovaného (pro)léčiva na přístroji CENTRIFUGE 5430R (Eppendorf) s rotorem F-35-6-30. Ukázalo se, že taktéž ovlivňuje velikost nanočástic, viz Tab. 21, str. 90. V měřených nanoformulacích 7, 8 a 9 byla naměřená velikost nanočástic po centrifugaci větší. Zřejmě dochází k narušení lipidových membrán a průchod lipidů skrz filtr do spodní části zkumavky, neboť hmotnost lyofilizovaného vzorku (stejného objemu) před a po centrifugaci s filtrem se výrazně lišila. Tato metoda zřejmě není vhodná pro tyto systémy.

Tab. 20: Porovnání výsledků středních hodnot velikostí nanočástic ve vybraném triplikátu nanoformulace s výsledky po 24hodinové dialýze.

Nanoformulace		5	6	11	12	14	16
po odpaření THF na RVO	střední hodnota velikosti (průměru) nanočástic [nm]	196,2	176,9	201,6	246,2	206,7	247,7
	standardní odchylka [nm]	91,4	96,5	104,9	171,4	120,0	130,9
po 24h dialýze	střední hodnota velikosti (průměru) nanočástic [nm]	340,7	147,2	205,6	167,6	201,3	198,4
	standardní odchylka [nm]	177,6	74	107,4	104,9	114,3	90,4

Tab. 21: Porovnání výsledků středních hodnot velikostí nanočástic ve vybraném triplikátu nanoformulace s výsledky po centrifugaci ve zkumavkách s filtrem.

Nanoformulace		7	8	9
před centrifugací	střední hodnota velikosti (průměru) nanočástic [nm]	272,1	337,4	215,5
	standardní odchylka [nm]	120,7	196,6	75,0
po centrifugaci	střední hodnota velikosti (průměru) nanočástic [nm]	284,3; 44,5	370,9	265,0
	standardní odchylka [nm]	173,8; 10,9	265,4	130,3

4.2.2 FCS

Fluorescenční korelační spektroskopie a výsledky získané touto metodou byly porovnány s výsledky z DLS. Měřil se pouze jeden vybraný triplikát z dané nanoformulace, proto jsou hydrodynamické průměry D_h z DLS uvedeny jako průměry pouze z jednoho daného triplikátu pro lepší srovnání, viz Tab. 22, str. 91. D_h z FCS byly vypočítány z difuzních koeficientů dle FITu autokorelační křivky. V nanoformulacích **11** a **16** byla prokázána přítomnost malých částic či molekulárně rozpuštěné látky. Tuto skutečnost lze vysvětlit tím, že před měřením nebyla provedena žádná purifikační metoda, která by volné fluorescenčně aktivní (pro)léčivo odstranila. Prokázalo se, že vzorky měřené po centrifugaci měly menší intezitu fluorescence a bylo v nich pozorováno méně částic. Dialýza po dobu pouhých 2 h rovněž výrazně ovlivňuje vzorek, autokorelační křivky nebyly dostatečné pro výpočet difuzních koeficientů.

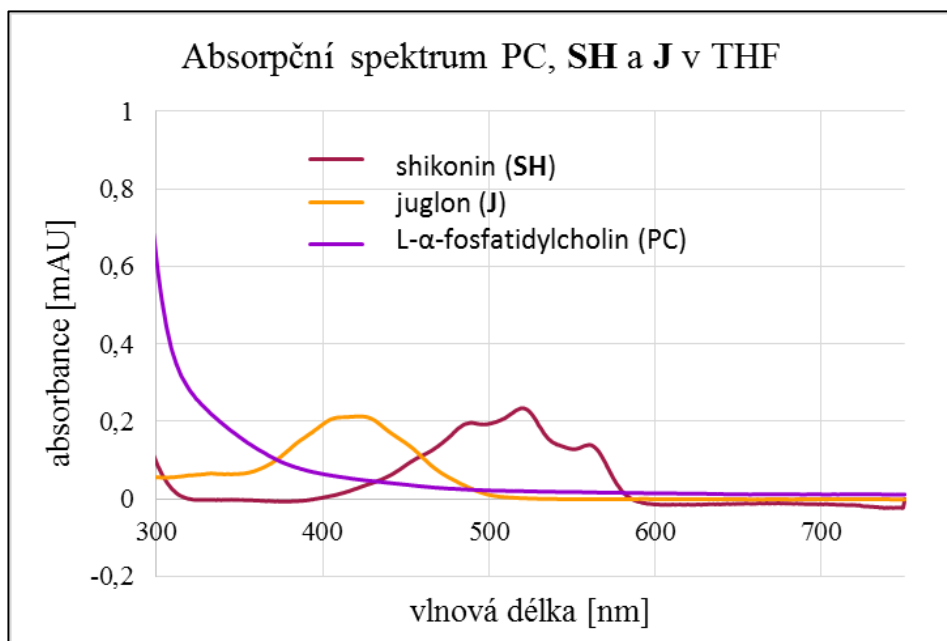
Tab. 22: Porovnání hodnot hydrodynamických průměrů částic vypočítaných z difúzních koeficientů určených pomocí FCS s hydrodynamickými průměry částic získaných pomocí DLS.

Nanoformulace	Hydrodynamický průměr D_h z FCS [nm]	Hydrodynamický průměr D_h z DLS $\pm$ standardní odchylka z DLS [nm]
1 (SH)	110; 800*	148,3 $\pm$ 49,2
3 (SH)	500	241,9 $\pm$ 130,3
5 (SH)	240	271,8 $\pm$ 168,4
6 (SH) před 2h dialýzou	150	195,5 $\pm$ 100,0
6 (SH) po 2h dialýze	slabá korelace	×
7 (J) před centrifugací	120; 1200*	332,9 $\pm$ 163,5
7 (J) po centrifugaci	200–300; 1200*	331,1 $\pm$ 208,2
8 (J) před centrifugací	200–300; 1000*	337,4 $\pm$ 196,6
8 (J) po centrifugaci	200–300; 1000*	370,9 $\pm$ 265,4
11 (J)	18; 220*	265,6 $\pm$ 119,0
12 (J) před 2h dialýzou	190	241,8 $\pm$ 163,9
12 (J) po 2h dialýze	220	×
14 (ASH) před 2h dialýzou	110, při opakovaném měření slabá korelace	×
14 (ASH) po 2h dialýze	150, při opakovaném měření slabá korelace	×
16 (AJ)	1; 40; 190**	247,7 $\pm$ 130,9
17 (AJ) před 2h dialýzou	230; 420*	283,5 $\pm$ 175,8; 34,7 $\pm$ 8,9
17 (AJ) po 2h dialýze	slabá korelace	×

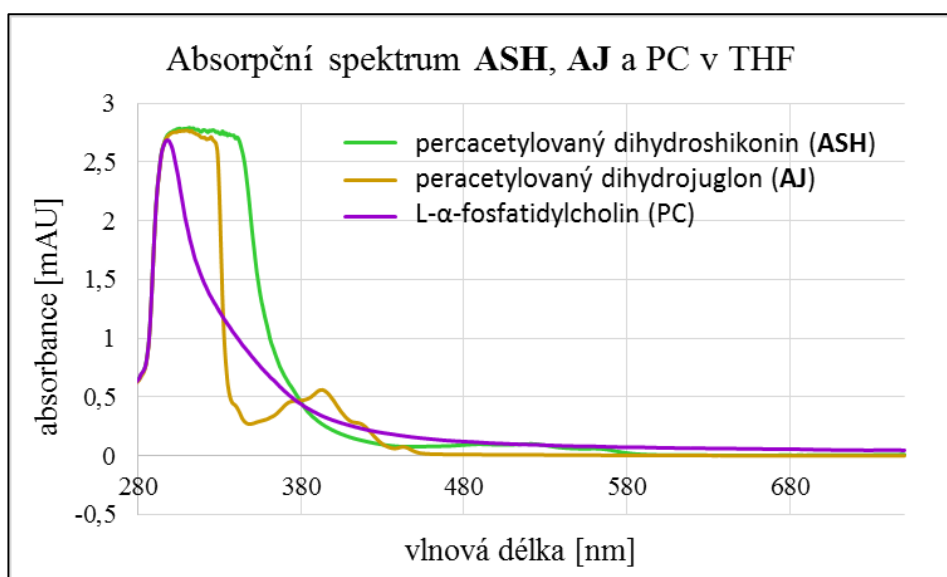
*bimodální distribuce; ** trimodální distribuce

4.2.3 Kvantifikace pomocí UV-VIS spektrofotometrie

Kvantitativní analýza pomocí UV-VIS spektrofotometrie je nejjednodušší metodou k výpočtu koncentrace, obsahu (DL) a účinnosti enkapsulace (EE) (pro)léčiva v nanočásticích. Velmi důležité je, aby se absorpční spektra přítomných látek ve vzorku nepřekrývaly, v opačném případě dochází k interferenci a výsledek je zkreslen příspěvkem dalších látek (např. lipidů). V případě více absorpčních maxim je vhodné zvolit delší vlnovou délku kvůli případnému příspěvku rozptylu. Nejdříve byla naměřena absorpční spektra **SH**, **J**, **ASH**, **AJ** a L- α -fosfatidylcholinu (PC), viz. Obr 29 a 30, str. 92. Vzorky byly připraveny rozpuštěním v THF. Dle Obr. 30, str. 92 je patrné, že se absorpční spektra **AJ** a **ASH** překrývají s absorpčním spektrem PC, proto byla pro kvantifikaci nanoformulací s proléčivou zvolena jiná analytická metoda.



Obr. 29: Absorpční spektra shikoninu (**SH**), juglonu (**J**) a L- α -fosfatidylcholinu (**PC**) ve viditelné oblasti.



Obr. 30: Absorpční spektra peracetylovaného dihydroshikoninu (**ASH**), peracetylovaného dihydrojuglonu (**AJ**) a L- α -fosfatidylcholinu (**PC**).

Pro kvantifikaci obsahu barevných látek (**SH** a **J**) v nanoformulacích byly proměřeny kalibrační křivky (závislost absorbance při: $\lambda_{\max}(\text{SH}) = 510 \text{ nm}$; $\lambda_{\max}(\text{J}) = 415 \text{ nm}$ na hmotnostní koncentraci látky v roztoku), ze kterých byly odečteny hmotnostní koncentrace **SH** nebo **J** v jednotlivých připravených vzorcích. Následným výpočtem byla získána molární koncentrace, DL i EE **SH** či **J** v nanoformulacích, viz Tab. 23, str. 93. Kalibrační křivky byly proměřeny v rozsahu zhruba od 4 do 40 $\mu\text{g/ml}$ o $R^2 \sim 0,99$. Vzorky byly původně připravovány odpařením vody na RVO z odebraných

aliquotů z nanoformulací s následným rozpuštěním odparku v THF za pomoci ultrazvukové lázně. **J** se bohužel destiloval s vodní parou, proto byl zvolen postup přidání THF do vodných aliquotů ve specifickém poměru pro rozrušení nanočástic a uvolnění barevných látek do směsi 2 mísitelných kapalin (H₂O a THF). Tento postup se ukázal jako časově efektivnější. Vzorky z nanoformulací v PBS (**5** a **11**) byly připravovány přidáním chloroformu k PBS aliquotu z nanoformulace v poměru 1:10. Vzorek byl třepán po dobu 10 min na minitřepačce (vortex). Organická fáze byla odebrána a sušena bezvodým síranem hořečnatým, který byl odfiltrován na fritě o hrubosti S4. Postup se ukázal jako nepřesný, zanáší chyby do výsledků kvantifikace, viz Tab. 23.

Měření vzorků nanoformulací, které byly připravovány s přidavkem cholesterolu, byla prováděna dle článku [53]. Hodnoty hmotností **SH** vypočítaných z kalibrací nepřekročily hodnoty navážky **SH**. Nicméně výsledky stanovení koncentrace, pak tedy i DL a EE, u nanoformulace **12** překračují maximální hodnoty, které by byly dle navážek **J** možné (viz Tab. 23, označeno červeně). Z toho soudě, že k absorpci zřejmě přispívá cholesterol. Lze předpokládat, že výsledky všech nanoformulací s obsahem **J** a **SH** s přidavkem cholesterolu, tj. **5**, **6**, **11**, **12** jsou zkreslené.

Tab. 23: Výsledky stanovení koncentrace, obsahu léčiva (DL) a účinnosti enkapsulace (EE) **J** nebo **SH** v nanoformulacích **1** až **12**. SD je směrodatná odchylka.

	Poměr léčivo:PC (+CHOL)	<i>c</i> roztoku nanoform. [mg/ml]	SD [mg/ml]	Molární <i>c</i> léčiva [mM]	SD [mM]	DL [%]	SD [%]	EE [%]	SD [%]
1	1:6	0,0054	0,0009	0,019	0,003	1,4	0,2	8,7	1,4
2	1:8	0,0051	0,0005	0,018	0,002	1,9	0,3	15,4	2,9
3	1:8	0,0067	0,0013	0,023	0,005	1,2	0,2	9,7	1,4
4	1:8	0,0040	0,0001	0,014	0,001	1,4	0,2	11,1	1,4
5	1:80	0,0997	0,0065	0,346	0,022	0,9	0,1	63,4	12,7
6	1:80	0,0519	0,0017	0,180	0,006	0,4	0,0	29,0	3,5
7	1:2	0,0335	0,0042	0,192	0,024	7,5	0,8	16,3	2,1
8	1:6	0,0112	0,0035	0,064	0,020	2,4	0,6	14,4	3,7
9	1:2	0,0229	0,0012	0,131	0,007	7,5	0,5	16,4	1,6
10	1:6	měřeno až po centrifugaci ve zkumavkách s filtry							
11	1:80	0,1003	0,0266	0,576	0,153	0,9	0,2	73,2	16,1
12	1:80	0,2244	0,0034	1,289	0,020	1,8	0,0	143,6	3,2

Ačkoliv jsou obsahy léčiv (DL) v nanoformulacích s většími poměry léčiva oproti PC vyšší, ztráty jsou výraznější (EE). U všech nanoformulací se **SH** kromě případu v PBS (**5**) docházelo k precipitaci/vzniku agregátů shikoninu již v průběhu přípravy (během pomalého odpařování THF, v průběhu dialýzy nebo v rámci následujících dní). Při účinné

enkapsulaci většiny naváženého léčiva zřejmě hraje roli iontová síla. Tato skutečnost nebyla pozorována u nanoformulací s **J** zřejmě kvůli jeho vyšší rozpustnosti oproti **SH**. Proto se předpokládalo, že dialýza po dobu 3h pro odstranění neenkapsulovaného juglonu nebyla dostatečná. Proto výsledky uvedené v Tab. 23, str. 93 mohou být zkreslené vlivem této skutečnosti, která byla následně otestována centrifugací 8ml alikvotů ve zkumavkách s filtrem. V Tab. 24 lze vidět, jak se hodnoty celkové hmotnost juglonu v nanoformulace, DL a EE po centrifugaci výrazně snížily.

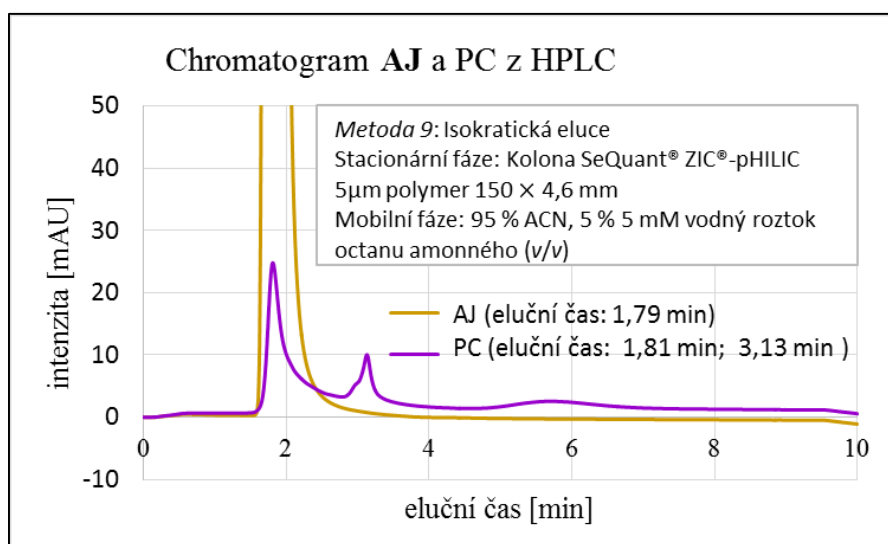
Tab. 24: Porovnání výsledků stanovení koncentrací, obsahu léčiva (DL) a účinnosti enkapsulace (EE) **J** v nanoformulacích 7 až 9.

Nanoformulace	7		8		9	
stanovení před/po centrifugaci	před	po	před	po	před	po
poměr <i>m</i> juglon:PC	6:12		2:12		6:12	
celková <i>m</i> juglonu [mg]	0,98	0,26	0,29	0,12	0,98	0,11
DL [%]	7,5	2,1	2,4	1,00	7,5	0,9
EE [%]	16,3	4,4	14,4	6,01	16,4	1,9

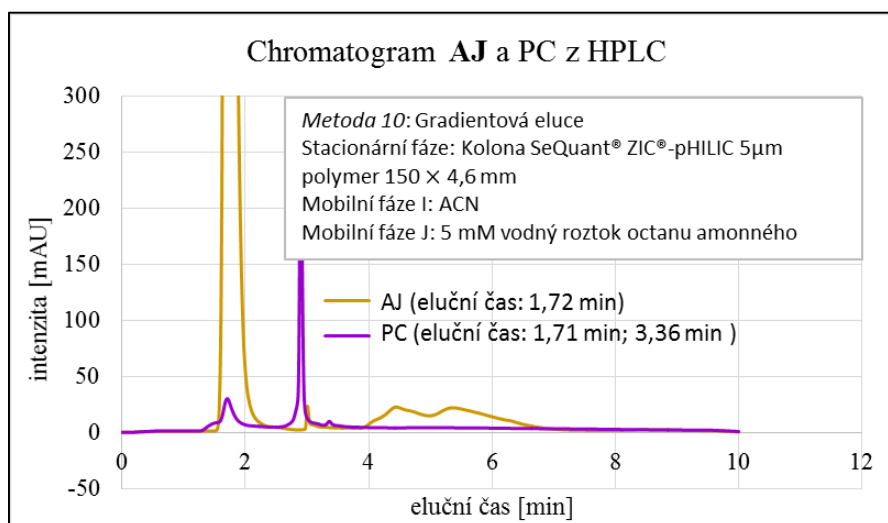
4.2.4 Kvantifikace pomocí HPLC

Pro kvantifikaci obsahu **ASH** nebo **AJ** v nanoformulacích byla jako druhá metoda po UV-VIS spektrofotometrii zvolena metoda HPLC. Cílem bylo separovat PC od **ASH** nebo **AJ** tak, aby se plochy píků vzájemně nepřekrývaly. Kalibrační závislost se pak vynáší jako plocha píku vůči koncentraci standardu v ředící řadě. Byly vyzkoušeny různé typy kolon, mobilních fází a gradientů, viz kapitola 3.4.5 Kvantitativní HPLC. Žádná z testovaných metod však neposkytovala výsledky, které by vedly k úspěšnému stanovení obsahu proléčiv v nanoformulacích, protože docházelo k překryvům píků (viz Obr. 31–34, str. 95, 96). Fosfolipidy, které byly pro přípravu nanoformulací používány (L- α -fosfatidylcholin: ≥ 40 % fosfatidylcholin, ≥ 95 % další typy fosfolipidů), se v rámci jednotlivých separačních metod na kolonách dělily, to bohužel ztížilo hledání chromatografické metody, která by účinně rozdělila jednotlivé fosfolipidy od **ASH** nebo **AJ**.

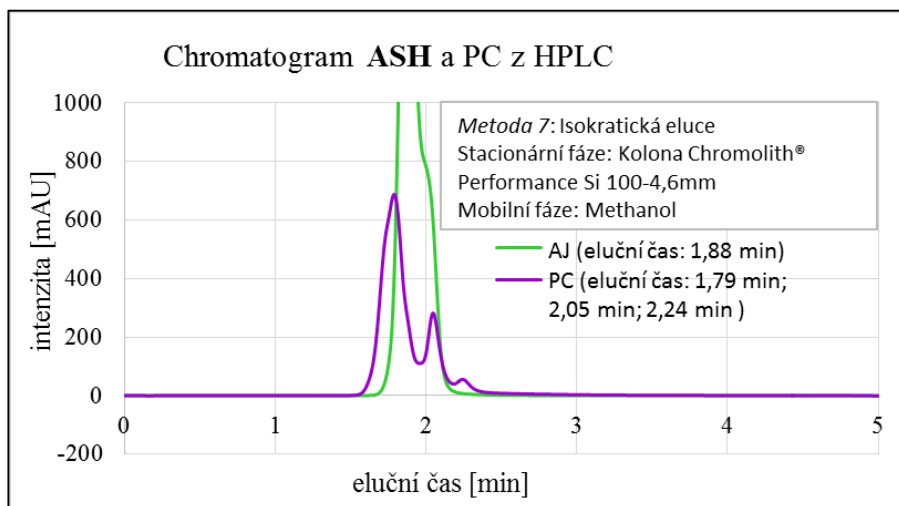
Pro analýzu **AJ** a PC HPLC *metodou 8, 9, 10* (viz str. 78) byly připraveny zásobní roztoky v mobilní fázi o koncentraci 1 mg/ml. V reálném vzorku nanoformulace je však koncentrace PC minimálně 6× větší (dle poměru proléčiva k/ke PC), tzn., že plocha píku v chromatogramu při analýze vzorku z nanoformulace by byla daleko větší než na znázorněných chromatogramech, a to by vedlo k nesprávným výsledkům. Po každé eluci byla spuštěna metoda na prázdko pro promytí a přípravu kolony na další separaci. Obě látky byly eluovány v mrtvém čase, proto byly testovány i další chromatografické metody s různými gradienty. Analýza elučních časů **ASH** a PC isokratickou elucí (*metoda 7*) a gradientovou elucí (*metoda 6*) na HPLC taktéž ukázala překryvy píků, viz chromatogramy (Obr. 33 a 34, str. 96).



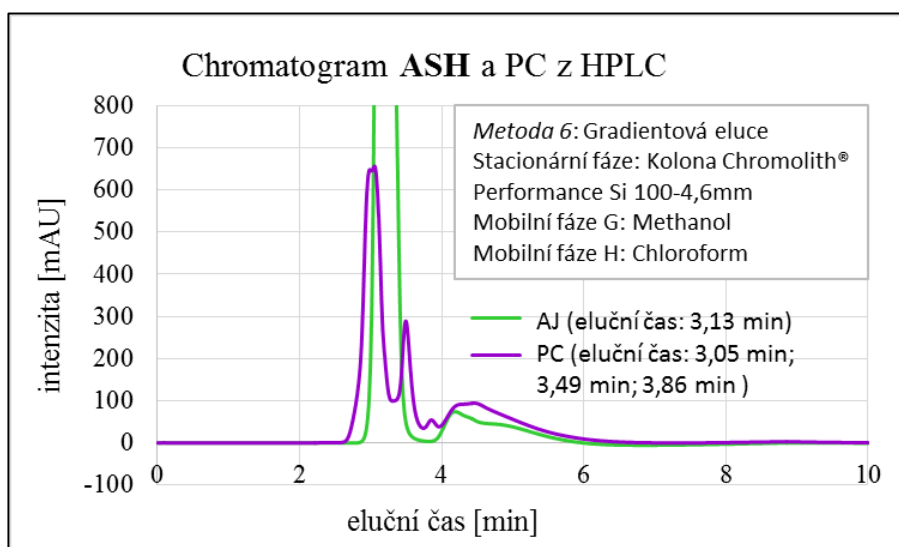
Obr. 31: Chromatogram isokratické eluce **AJ** a PC *metodou 9* při $\lambda = 300$ nm.



Obr. 32: Chromatogram gradientové eluce **AJ** a PC *metodou 10* při $\lambda = 300$ nm.



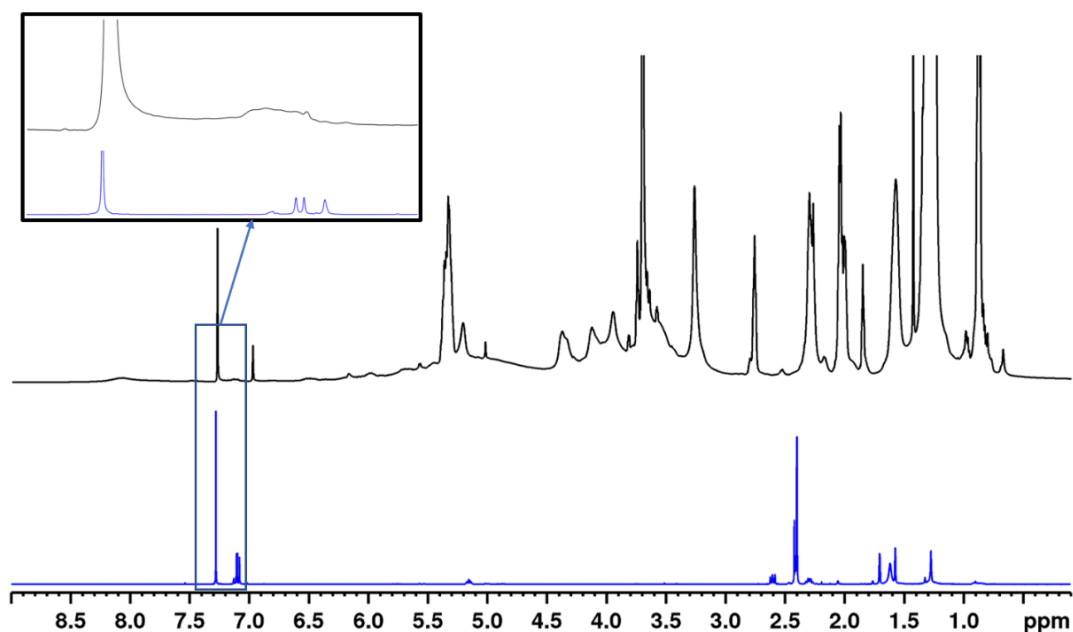
Obr. 33: Chromatogram isokratické eluce **ASH** a **PC** *metodou 7* při $\lambda = 300$ nm.



Obr. 34: Chromatogram gradientové eluce **ASH** a **PC** *metodou 6* při $\lambda = 300$ nm.

4.2.5 Kvantifikace pomocí NMR spektroskopie

Kvantitativní analýza byla rovněž otestována metodou NMR spektroskopie. Vzorku s obsahem **ASH** a **PC** v deuterovaném chloroformu s vnitřním standardem 1,4-dioxanem bylo změřené ^1H spektrum. Toto spektrum bylo porovnáno s ^1H spektrem **ASH**, viz Obr. 35, str. 97. Pro kvantifikaci byl zvolen pík v oblasti 7.05–7.10 ppm příslušející 3 atomům H na aromatickém kruhu peracetylovaného dihydroshikoninu. Bohužel ve spektru vzorku nebyly tyto píky ostré a specifikovatelné. Ostatní píky byly v překryvu s píky **PC**. Pokud by se podařilo účinně odstranit **PC** ze vzorku bez vlivu na obsah **ASH**, byla by tato metoda teoreticky vhodná.



Obr. 35: Modře je znázorněno ^1H NMR spektrum standardu (**ASH**). Černě je znázorněno ^1H NMR spektrum vzorku z nanoformulace s **ASH** a PC. V černém rámečku je přiblížena oblast chemického posunu s píky, které přísluší atomům H aromatického kruhu **ASH**. Pík o $\delta = 7.28$ ppm odpovídá zbytkovému chloroformu (CHCl_3) z deuterovaného rozpouštědla (CDCl_3).

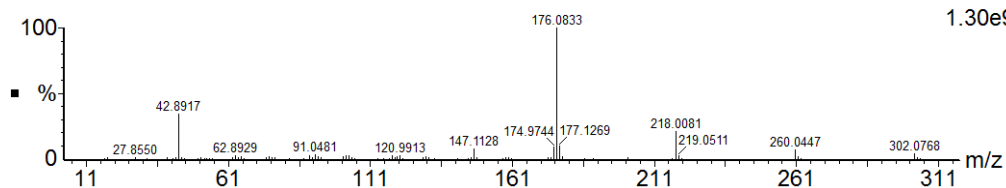
4.2.6 Kvantifikace pomocí GC-MS

Obsah proléčiv (**ASH** nebo **AJ**) byl kvantifikován pomocí GC-MS. Z roztoku nanoformulace **15** s obsahem **AJ** a PC bylo po dialýze odebrána polovina (11 ml), která byla ponechána centrifugaci ve zkumavce s filtrem (5×10 min, 3000 RPM) pro eliminaci neenkapsulovaného **AJ**. Oba 11ml alikvoty byly lyofilizovány. Hmotnost vzorku bez centrifugace byla 5 mg, hmotnost vzorku po centrifugaci byla 3,3 mg. Vzhledem k tomu, že celková navážka byla 18 mg (6 mg **AJ** a 12 mg PC), došlo i ke ztrátám lipidu (během filtrace po dialýze a/nebo během centrifugace). Lyofilizované vzorky byly rozpuštěny v THF a analyzovány pomocí GC-MS. MS spektrum (viz Obr. 36, str. 98) píku s retenčním časem 26,06 min z chromatogramu standardu (**AJ**) bylo porovnáno se strukturou **AJ** v komerčním fragmentačním programu, shoda struktury s MS spektrem byla 99,9 %. Pro hmotnostní detekci byla nastavena metoda SIR a byly vybrány nejintenzivnější hodnoty m/z z MS spektra standardu (m/z : 43, 176, 218, 260 a 302). Za těchto nových experimentálních podmínek byly proměřeny vzorky a standard **AJ** znovu. Výsledné chromatogramy jsou znázorněné v Obr. 37, str. 98.

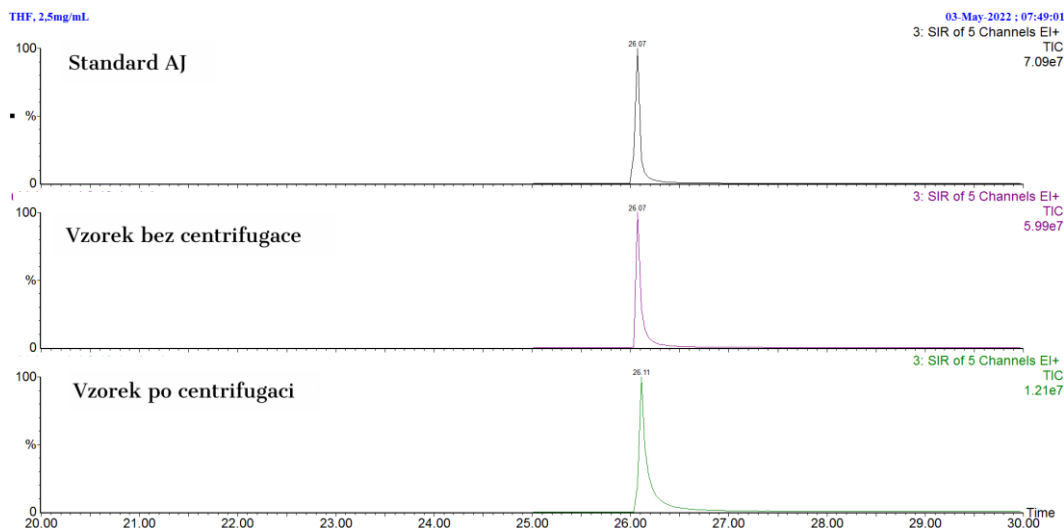
Standard AJ

, 03-May-2022 + 07:49:01

1: Scan EI+
1.30e9



Obr. 36: MS spektrum píku s retenčním časem 26,06 min z chromatogramu standardu (**AJ**).



Obr. 37: Chromatogramy standardu **AJ** a vzorků z nanoformulace **15** z GC-MS s hmotnostní detekcí pomocí metody SIR.

Ředěním roztoku standardu (**AJ**) byly připraveny kalibrační standardy a všechny byly změřeny metodou SIR. Na základě ploch píku s retenčním časem 26,06 min byla sestrojena kalibrační závislost v rozsahu 0,3–5 mg/ml. Roztoky vzorků v THF z nanoformulace **15** byly změřeny za stejných experimentálních podmínek a na základě plochy píku se stejným retenčním časem a sestrojené kalibrační závislosti byla vypočtena koncentrace **AJ** ve vzorcích jako průměr ze 3 měření. Procentuální obsah (DL) **AJ** ve vzorcích je uveden v tabulce Tab. 25. Ve vzorku po centrifugaci byl procentuální obsah **AJ** menší, nelze však říci, zda je to způsobené eliminací neenkapsulovaného **AJ** nebo negativním vlivem centrifugace na lipidickou nanoformulaci, ze které by mohl být **AJ** uvolněn.

Tab. 25: Výsledný obsah **AJ** ve vzorcích z nanoformulace **15**.

Nanoformulace 15	Vzorek před centrifugací	Vzorek po centrifugaci
DL [%]	5,33 ± 0,65	5,13 ± 1,81
vypočtená <i>m</i> AJ v nanoformulaci [mg]	0,54	0,34
EE [%]	9,0	5,6

Nanoformulace **17** (obsah **AJ**, PC a cholesterolu), která byla připravována v triplicátu **A**, **B**, **C** byla analyzována obdobným způsobem. Vzorky byly připraveny z odparků jednotlivých 3ml alikvotů v kulatých baňkách, z každé baňky byla odebrána část vzorku a byla rozpuštěna v THF a změřena metodou GC-MS. Pro hmotnostní detekci byla nastavena metoda SIR s vybranými m/z , viz str. 97. Pík **AJ** v tomto nastavení měl retenční čas 26,11 min. Ředěním roztoku standardu (**AJ**) byly připraveny kalibrační standardy a všechny byly změřeny s nastavenou metodou SIR a na základě ploch píků s retenčním časem 26,11 min byla sestrojena kalibrační závislost. Roztoky vzorků **17A**, **B**, **C** byly změřeny za stejných experimentálních podmínek. Na základě plochy jejich píků s časem 26,11 min a sestrojené kalibrační závislosti byl vypočten procentuální obsah (DL) **AJ** v jednotlivých vzorcích, viz Tab. 26. Hodnoty se od sebe výrazně liší, to může být způsobeno zvolenou metodou přípravy nanoformulace nebo tím, že v odparku nemusí být **AJ** rovnoměrně rozmístěn, a tak při odebrání částí vzorku z různých míst baňky se obsah **AJ** může lišit. Proto byly z triplicátů **A**, **B** a **C** odebrány 3ml alikvoty, které byly následně lyofilizovány. Z lyofilizovaných vzorků byly připraveny roztoky v THF o koncentraci 15mg/ml, které byly analyzovány stejným způsobem, výsledky jsou uvedeny v Tab. 27. Vypočtené hmotnosti **AJ** ze vzorce pro DL v daném triplicátu a účinnosti enkapsulace (EE) poskytují nereálné výsledky, to je dáno zřejmě tím, že během přípravy nanoformulace docházelo k výrazným ztrátám lipidu a/nebo cholesterolu (zřejmě během odpařování THF i následné filtraci), a tak reálné procentuální zastoupení **AJ** ve vzorcích vyšlo větší než 100%.

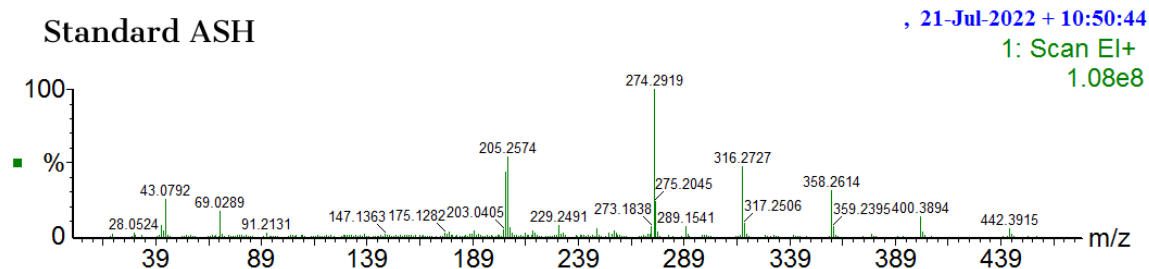
Tab. 26: Výsledný obsah **AJ** v triplicátech **A**, **B** a **C** z nanoformulace **17** stanovený pomocí GC-MS z odparků alikvotů.

Nanoformulace 17	Vzorek A	Vzorek B	Vzorek C
DL [%]	0,77 ± 0,03	2,08 ± 0,19	0,22 ± 0,01
Vypočtená m AJ v nanoformulaci [mg]	0,64	1,83	0,17
EE [%]	42,7	121,9	11,33

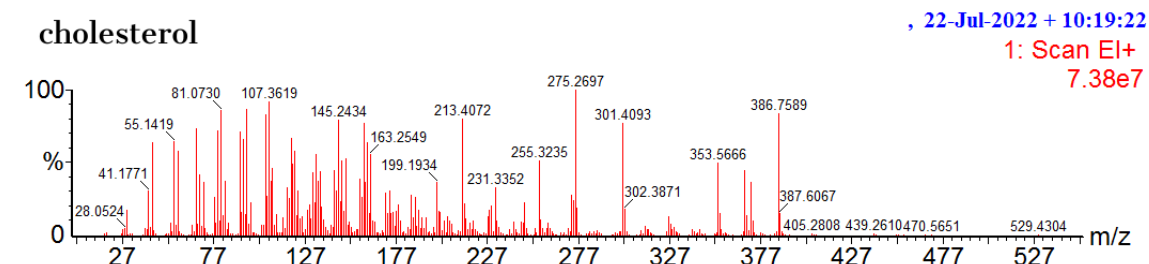
Tab. 27: Výsledný obsah **AJ** v triplicátech **A** a **C** z nanoformulace **17** stanovený pomocí GC-MS z lyofilizovaných alikvotů.

Nanoformulace 17	Vzorek A	Vzorek C
DL [%]	2,22 ± 0,19	1,28 ± 0,13
Vypočtená m AJ v nanoformulaci [mg]	2,16	1,26
EE [%]	144	84

Nanoformulace **14** s obsahem **ASH**, PC a cholesterolu (navážky: 1,5 mg, 100 mg, 20 mg) byla připravována v triplicátech **A**, **B**, **C**. Obsah **ASH** v těchto triplicátech byl analyzován pomocí GC-MS. Vzorky byly připraveny z odparků jednotlivých 3ml alikvotů v kulatých baňkách, z každé baňky byla odebrána část vzorku a byla rozpuštěna v THF a změřena metodou GC-MS. Obsah **ASH** v těchto vzorcích byl pod limitem detekce. Proto byly vzorky připraveny obdobně jako u nanoformulace **17**, a to lyofilizací 3ml alikvotu z každého triplicátu. Standard (**ASH**) byl rozpuštěn v THF a jeho ředěním byly připraveny kalibrační standardy. Kalibrační závislost byla vytvořena v rozmezí 0,01–0,25 mg/ml. Z lyofilizovaných vzorků byly připraveny zásobní roztoky v THF o koncentraci 15 mg/ml. MS spektrum (Obr. 38) píku s retenčním časem 31,02 min z chromatogramu standardu (3 mg/ml) bylo porovnáno se strukturou **ASH** v komerčním fragmentačním programu. Shoda struktury s MS spektrem byla 98,4 %. Pro hmotnostní detekci byla nastavena metoda SIR a byla vybrána nejintenzivnější hodnota m/z : 274. Z MS spektra cholesterolu je zřejmé, že také obsahuje pík při m/z 274, viz Obr. 39

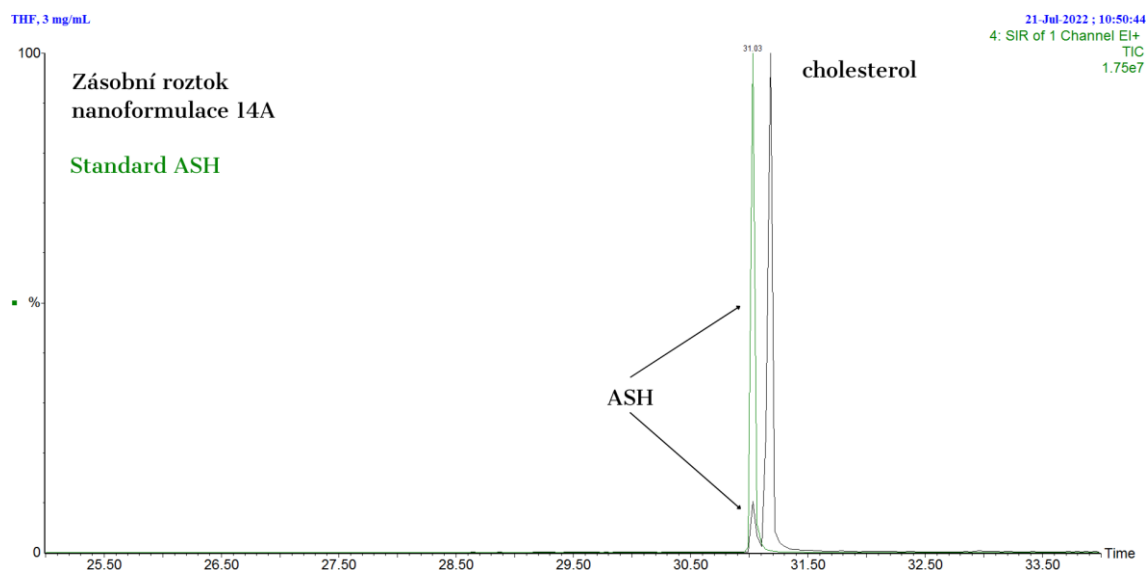


Obr. 38: MS spektrum píku s retenčním časem 31,02 min z chromatogramu standardu (**ASH**).



Obr. 39: MS spektrum cholesterolu.

Za těchto nových experimentálních podmínek byly proměřeny vzorky a standard (**ASH**) znovu. Na obrázku Obr. 40, str. 101, je porovnání chromatogramů analýzy vzorku **14A** a standardu (3 mg/ml) v módu TIR.



Obr. 40: Chromatogramy standardu **ASH** a zásobního roztoku nanoformulace **14A** z GC-MS s hmotnostní detekcí pomocí metody SIR.

Na základě plochy píku s retenčním časem 31,02 min a sestrojené kalibrační závislosti byla vypočtena koncentrace **ASH** v zásobních roztocích připravených z lyofilizovaných 3ml alikvotů triplikátu **A** a **B** jako průměr ze 3 měření. Procentuální obsah (DL) **ASH** v jednotlivých triplikátech je uveden v tabulce Tab. 28. Metoda přípravy nanoformulací zřejmě neposkytuje reprodukovatelné výsledky, během přípravy hraje roli hodně proměnných.

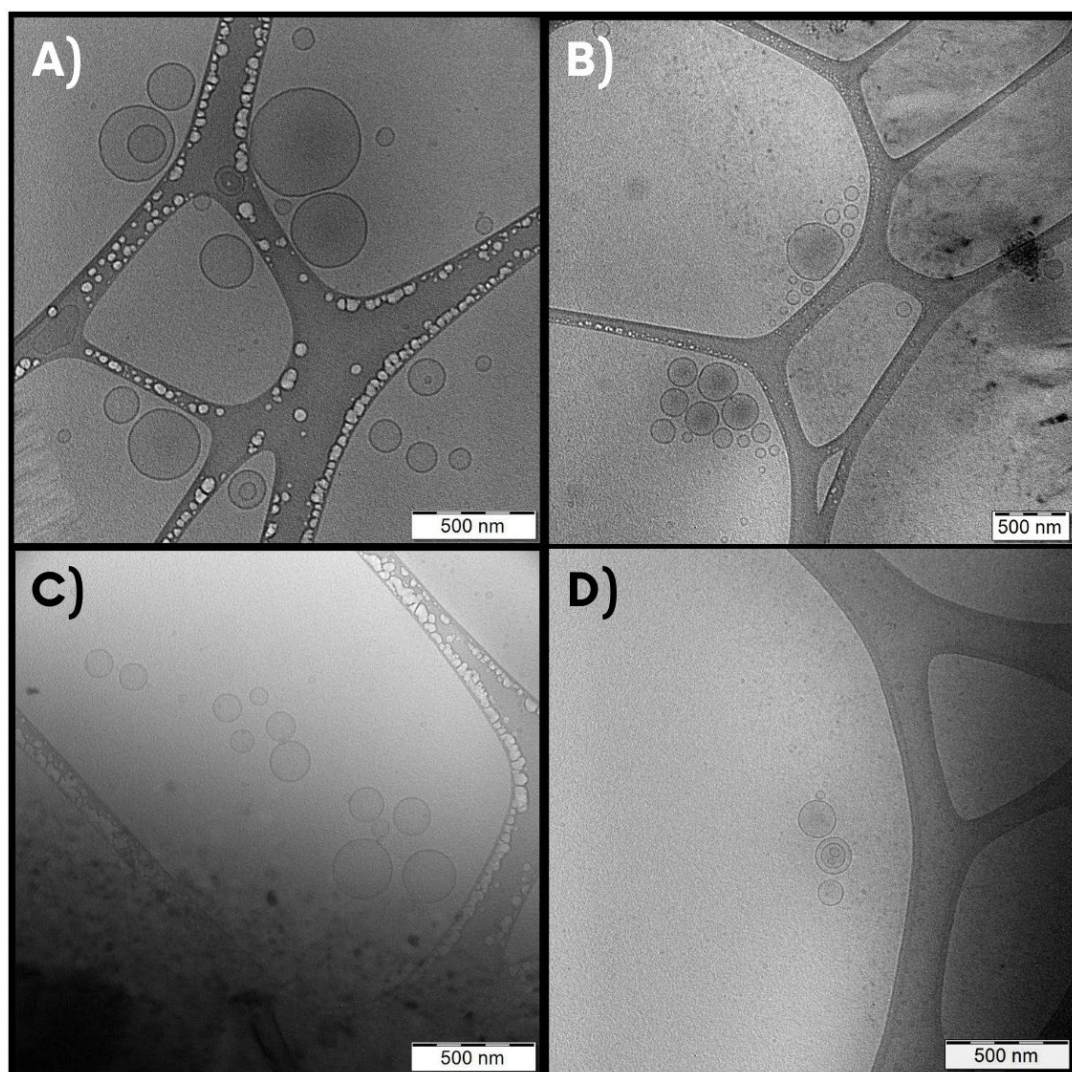
Tab. 28: Výsledný obsah **ASH** v triplikátech **A** a **B** z nanoformulace **14** stanovený pomocí GC-MS z lyofilizovaných alikvotů.

Nanoformulace 14	Vzorek A	Vzorek B
DL [%]	1,20 ± 0,16	0,64 ± 0,06
Vypočtená <i>m</i> ASH v nanoformulaci [mg]	1,16	0,67
EE [%]	77,3	44,7

Nanoformulace **13** a **16** nebyla analyzována kvůli vysokému procentuálnímu zastoupení solí PBS, které se nepodařilo centrifugací efektivně oddělit. Analyzovány byly ještě triplikáty **C** z nanoformulace **14** a **B** z nanoformulace **17** po 24h dialýze, obsah **AJ** a **ASH** byl pod limitem detekce.

4.2.7 Cryo-TEM

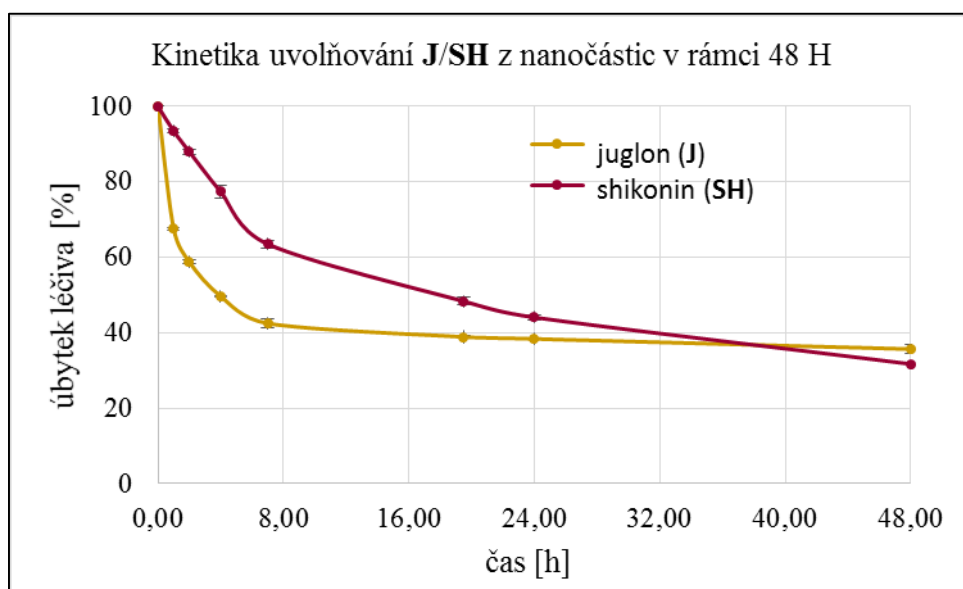
Vzorky na transmisní elektronovou mikroskopii byly připravovány dvěma způsoby. Vzorky připravené metodou rychlého vysušení poskytovaly artefakty, proto bylo od této metody přípravy upuštěno. Na Obr. 41 je zobrazena morfologie vzorku připraveného z lipidické nanoformulace s **J** (7) a **AJ** (15). Vzorek s obsahem **SH** nebo **ASH** se nepovedl připravit, lze však předpokládat, že morfologie, struktura i velikost nanočástic by byly obdobné. Lze usuzovat, že se jedná o lipozomální nanoformulace s výraznou membránou o průměru od 100 do 500 nm, což je více méně ve shodě s výsledky z DLS a FCS. V nanoformulacích jsou přítomné malé a velké unilamelární vezikuly (SUVs a LUVs), viz Obr. 41 A) a C), ale i multilamelární vezikuly (MLVs), viz Obr. 41 A) a B), a multivezikulární vezikuly (MVVs), viz Obr. 41 D).



Obr. 41: Zobrazení morfologie lipidických nanoformulací. A) a B) mikrofotografie vzorku připraveného z nanoformulace 7; C) a D) mikrofotografie vzorku připraveného z nanoformulace 15.

4.2.8 Kinetika uvolňování léčiva z nanočástic

V nanoformulacích se neustále ustanovuje rovnováha mezi enkapsulovaným léčivem v nanočásticích a volným léčivem v roztoku. Kinetika uvolňování léčiva byla proměřena u nanoformulace **6** (s obsahem **SH**) a **12** (s obsahem **J**). Juglon se během dialýzy uvolňuje rychleji než shikonin, zřejmě je to dáno jeho vyšší mírou polarity.



Obr. 42: Kinetika uvolňování juglonu (žlutě) a shikoninu (červeně) z lipidických nanočástic v rámci 48 hodin.

5 Závěr

Byla připravena a detailně charakterizována bezbarvá proléčiva 1,4-naftochinonů peracetylovaný dihydrojuglon a peracetylovaný dihydroshikonin. Fyzikálně-chemickými metodami byla prokázána jejich chemická struktura a čistota.

Následně byly připraveny lipidické nanoformulace s obsahem juglonu, shikoninu, peracetylovaného dihydrojuglonu nebo peracetylovaného dihydroshikoninu. Struktura a morfologie nanočástic byla charakterizována pomocí DLS, FCS a cryo-TEM. Měření ζ -potenciálu nanočástic poskytlo informaci o jejich povrchových vlastnostech a koloidní stabilitě. Kvantitativní analýzou pomocí UV-VIS spektrofotometrie byla stanovena účinnost enkapsulace a obsah léčiv, tj. juglonu či shikoninu v připravených nanoformulacích. Pro stanovení obsahu proléčiv, tj. peracetylovaného dihydrojuglonu nebo peracetylovaného dihydroshikoninu v nanoformulacích byly testovány metody HPLC, NMR a GC-MS. Dialyzační technikou byla taktéž u vybraných nanoformulací změřena kinetika uvolňování léčiva z nanočástic.

6 Seznam literatury

- [1] Greb J. E.; et al.: Psoriasis. *Nat Rev Dis Primers*, roč. 2, č. 1, s. 16082, (2016).
- [2] Rendon A.; Schäkel K.: Psoriasis Pathogenesis and Treatment. *Int J Mol Sci*, roč. 20, č. 6, s. 1475, (2019)
- [3] Zhou X.; Chen Y.; Cui L.; Shi Y.; Guo C.: Advances in the pathogenesis of psoriasis: from keratinocyte perspective. *Cell Death Dis*, roč. 13, č. 1, s. 81, (2022).
- [4] Yamanaka K.; Yamamoto O.; Honda T.: Pathophysiology of psoriasis: A review. *J. Dermatol.*, roč. 48, č. 6, s. 722–731, (2021).
- [5] Hao Y.; et al.: Metabolic Syndrome and Psoriasis: Mechanisms and Future Directions. *Front Immunol*, roč. 12, s. 711060, (2021).
- [6] Allen M. H.; et al.: The major psoriasis susceptibility locus PSORS1 is not a risk factor for late-onset psoriasis. *J Invest Dermatol*, roč. 124, č. 1, s. 103–106, (2005).
- [7] Bakshi H.; Negpal M.; Singh M.; Dhngra G.; Aggarwal G.: Treatment of Psoriasis: A Comprehensive Review of Entire Therapies. *Current Drug Safety*, roč. 15, (2020).
- [8] Cibrian D.; de la Fuente H.; Sánchez-Madrid F.: Metabolic Pathways That Control Skin Homeostasis and Inflammation. *Trends in Molecular Medicine*, roč. 26, č. 11, s. 975–986, (2020).
- [9] Palsson-McDermott E. M.; O'Neill L. A. J.: The Warburg effect then and now: From cancer to inflammatory diseases. *BioEssays*, roč. 35, č. 11, s. 965–973, (2013).
- [10] Liu Y.-Z.; et al.: Pyruvate Kinase M2 Mediates Glycolysis Contributes to Psoriasis by Promoting Keratinocyte Proliferation. *Front Pharmacol*, roč. 12, s. 765790, (2021).
- [11] Božek A.; Reich A.: The reliability of three psoriasis assessment tools: Psoriasis area and severity index, body surface area and physician global assessment. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, roč. 26, s. 851–856, (2017).
- [12] Pedraz J.; Daudén E.; Delgado-Jiménez Y.; García-Río I.; García-Díez A.: Sequential study on the treatment of moderate-to-severe chronic plaque psoriasis with mycophenolate mofetil and cyclosporin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, roč. 20, č. 6, s. 702–706, (2006).
- [13] Wang X.; et al.: Dysregulation of the gut-brain-skin axis and key overlapping inflammatory and immune mechanisms of psoriasis and depression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, roč. 137, s. 111065, (2021).
- [14] Pinho B.; Sousa C.; Oliviera J.; Valentão P.; Andrade P.: Naphthoquinones' biological activities and toxicological effects. *Bioactive Compounds: Types, Biological Activities and Health Effects*, s. 181–218, (2012).

- [15] Qiu H.-Y.; Wang P.-F.; Lin H.-Y.; Tang C.-Y.; Zhu H.-L.; Yang Y.-H.: Naphthoquinones: A continuing source for discovery of therapeutic antineoplastic agents. *Chemical Biology & Drug Design*, roč. 91, č. 3, s. 681–690, (2018).
- [16] Widhalm J. R.; Rhodes D.: Biosynthesis and molecular actions of specialized 1,4-naphthoquinone natural products produced by horticultural plants. *Horticulture Research*, roč. 3, s. 16046, (2016).
- [17] National Center for Biotechnology Information (US): *The p53 tumor suppressor protein*. Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22268/>> [cit. 3. 8. 2022]
- [18] Paulsen M. T.; Ljungman M.: The natural toxin juglone causes degradation of p53 and induces rapid H2AX phosphorylation and cell death in human fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol*, roč. 209, č. 1, s. 1–9, (2005).
- [19] Liu T.; Zhang L.; Joo. D.; Sun S.-C.: NF-κB signaling in inflammation. *Sig Transduct Target Ther*, roč. 2, č. 1, Art. č. 1, (2017).
- [20] Andúraj I.; Ríos J. L.; Giner R. M.; Recio M. C.: Pharmacological Properties of Shikonin – A Review of Literature since 2002. *Planta Med*, roč. 79, č. 18, s. 1685–1697, (2013).
- [21] Willard T.; Murray M. T.: 115 - Tabebuia avellanedae (syn. T. Impetiginosa, Lapacho, Pau d'Arco, Ipe Roxo). *Textbook of Natural Medicine (Fifth Edition)*, Pizzorno J. E.; Murray M. T., Ed. St. Louis (MO): Churchill Livingstone, (2020).
- [22] Zhang W.; Liu H. T.: MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res*, roč. 12, č. 1, Art. č. 1, (2002).
- [23] Lu K. P.; Finn G.; Lee T. H.; Nicholson L. K.: Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer. *Nat Chem Biol*, roč. 3, č. 10, Art. č. 10, (2007).
- [24] Turini M. E.; DuBois R. N.: Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med*, roč. 53, s. 35–57, (2002).
- [25] Mak T. W.; Saunders M. E.; Jett B. D., Ed.: Chapter 18 - Immune Hypersensitivity. *Primer to the Immune Response (Second Edition)*, Boston: Academic Cell, s. 487–516, (2014).
- [26] Lyon A. M.; Tesmes J. J. G.: Structural Insights into Phospholipase C-β Function. *Mol Pharmacol*, roč. 84, č. 4, s. 488–500, (2013).
- [27] Zhong L.; Luo N.; Zhong X.; Xu T.; Hao P.: The immunoregulatory effects of natural products on psoriasis via its action on Th17 cells versus regulatory T cells balance. *International Immunopharmacology*, roč. 110, s. 109032, (2022).
- [28] Hassa Wagini N.: Phytochemical Analysis of Nigerian and Egyptian Henna (Lawsonia Inermis L.) Leaves using TLC, FTIR and GCMS. *PLANT*, roč. 2, č. 3, s. 27, (2014).
- [29] Wang J.; et al.: Evidence and Potential Mechanism of Action of Lithospermum erythrorhizon and Its Active Components for Psoriasis. *Front Pharmacol*, roč. 13, s. 781850, (2022).

- [30] Sun Q.; et al: Shikonin, a naphthalene ingredient: Therapeutic actions, pharmacokinetics, toxicology, clinical trials and pharmaceutical researches. *Phytomedicine*, roč. 94, s. 153805, (2022).
- [31] Castellanos J.; Prieto J.; Heinrich M.: Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*)-A global ethnopharmacological commodity?. *Journal of ethnopharmacology*, roč. 121, s. 1–13, (2008).
- [32] Vallance P.; Hingorani A.: Endothelial nitric oxide in humans in health and disease. *Int J Exp Pathol*, roč. 80, č. 6, s. 291–303, (1999).
- [33] Demetzos C.; Pippa N.: Advanced drug delivery nanosystems (aDDnSs): a mini-review. *Drug Delivery*, roč. 21, č. 4, s. 250–257, (2014).
- [34] Naziris N.; Demetzos C.: Lipid Nanoparticles as Platforms for Theranostic Purposes: Recent Advances in the Field. *Journal of Nanotheranostics*, roč. 3, č. 2, Art. č. 2, (2022).
- [35] Grimaldi N.; et al.: Lipid-based nanovesicles for nanomedicine. *Chem. Soc. Rev.*, roč. 45, č. 23, s. 6520–6545, (2016).
- [36] Roberts M.; et al.: Topical and cutaneous delivery using nanosystems. *Journal of Controlled Release*, roč. 247, s. 86–105, (2017).
- [37] Nordin U. U. M.; Ahmad N.; Salim N.; Yusof N. S. M.: Lipid-based nanoparticles for psoriasis treatment: a review on conventional treatments, recent works, and future prospects. *RSC Advances*, roč. 11, č. 46, s. 29080–29101, (2021).
- [38] Singh S.; Vardhan H.; Kotla N. G.; Maddiboyina B.; Sharma D.; Webster T. J.: The role of surfactants in the formulation of elastic liposomal gels containing a synthetic opioid analgesic. *IJN*, roč. 11, s. 1475–1482, (2016).
- [39] Large D. E.; Abdelmessih R. G.; Fink E. A.; Auguste D. T.: Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. *Advanced Drug Delivery Reviews*, roč. 176, s. 113851, (2021).
- [40] Lombardo D.; Kiselev M. A.: Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application. *Pharmaceutics*, roč. 14, č. 3, s. 543, (2022).
- [41] Sforzi J.; Palagi L.; Aime S.: Liposome-Based Bioassays. *Biology*, roč. 9, č. 8, Art. č. 8, (20220).
- [42] Stetefeld J.; McKenna S. A.; Patel T. R.: Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev*, roč. 8, č. 4, s. 409–427, (2016).
- [43] Dynamic Light Scattering (DLS) | 3P Instruments: Dostupné z: <<https://www.3p-instruments.com/measurement-methods/dynamic-light-scattering/>> [cit. 9. 8. 2022]
- [44] Wang D.-Y.; van der Mei H. C.; Ren Y.; Busscher H. J.; Shi L.: Lipid-Based Antimicrobial Delivery-Systems for the Treatment of Bacterial Infections. *Front. Chem.*, roč. 7, s. 872, (2020).
- [45] McNeil S. E., Ed.: *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*, roč. 697. Totowa, NJ: Humana Press, (2011).

- [46] Yu L.; et al.: A Comprehensive Review of Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Frontiers in Physics*, roč. 9, (2021).
- [47] Carroni M.; Saibil H. R.: Cryo electron microscopy to determine the structure of macromolecular complexes. *Methods*, roč. 95, s. 78–85, (2016).
- [48] Harvey D.: Obtaining and Preparing Samples for Analysis. *Modern Analytical Chemistry*, First edition., United States: Te McGraw-Hill Companies, Inc., (2000).
- [49] Harvey D.: Chromatographic and Electrophoretic Methods. in *Modern Analytical Chemistry*, (2000).
- [50] NMR Spectroscopy Principles, Interpreting an NMR Spectrum and Common Problems: *Analysis & Separations from Technology Networks*. Dostupné z: <<http://www.technologynetworks.com/analysis/articles/nmr-spectroscopy-principles-interpreting-an-nmr-spectrum-and-common-problems-355891>> [cit. 17. 8. 2022]
- [51] Malz F.; Jancke H.: Validation of quantitative NMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, roč. 38, č. 5, s. 813–823, (2005).
- [52] Bauch M.; Krtitschka A.; Linker T.: Photooxygenation of oxygen-substituted naphthalenes. *Journal of Physical Organic Chemistry*, roč. 30, č. 9, s. e3734, (2017).
- [53] Xia H.; et al.: Preparation, cellular uptake and angiogenic suppression of shikonin-containing liposomes in vitro and in vivo. *Biosci Rep*, roč. 33, č. 2, s. e00020, (2013).
- [54] Babuka D.; et al.: Investigation of the internal structure of thermoresponsive diblock poly(2-methyl-2-oxazoline)-b-poly[N-(2,2-difluoroethyl)acrylamide] copolymer nanoparticles. *European Polymer Journal*, roč. 121, s. 109306, (2019).