

VYUŽITÍ 3D LIPIDOVÝCH MATRIC PRO ZAČLENĚNÍ A STABILIZACI BIOLOGICKY AKTIVNÍCH MOLEKUL

Tento článek je součástí seriálu Ženy v české chemii

MARTINA ZATLOUKALOVÁ

Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

Martina.zatloukalova@seznam.cz

Došlo 30.12.21, přijato 26.1.22.

Klíčová slova: lipidové nanočástice, lipidová kubická fáze, kubozom, hexozom, biologicky aktivní látka

• <https://doi.org/10.54779/chl20220172>

Obsah

1. Úvod
2. Lipidové mezofáze
3. Začlenění proteinů do lipidových kubických fází
4. Začlenění elektroaktivních značek do lipidových kubických fází
5. 3D lipidové nanočástice
6. Závěr

1. Úvod

Povrchově aktivní lipidy (dále jen lipidy) jsou nejen základními biomolekulami lidského těla, ale také jednou z hlavních složek produktů farmaceutického, kosmetického nebo potravinářského průmyslu. Kromě toho, že jsou

zdrojem energie, plní řadu životně důležitých funkcí, podílí se na diferenciaci buněk, přenosu signálu, ochraně a izolaci orgánů a syntéze esenciálních biomolekul, jako jsou hormony nebo žlučové kyseliny¹. Lipidy jsou amfifilní látky obsahující ve své struktuře hydrofilní a hydrofobní část. Nepolární vazby hydrofobní části molekuly způsobují jejich omezenou rozpustnost ve vodném prostředí. Rozpustnost lipidů a jiných amfifilních molekul je charakterizována kritickou micelární koncentrací² (KMK). Po překročení KMK jednotlivých monomerů dochází ve vodném prostředí k tvorbě vyšších lipidových struktur, jako jsou např. micely, lipozomy, lipidové nanočástice nebo lipidové lyotropní tekuté krystaly³.

Na přelomu 19. a 20. století česko-rakouský biolog Reinitzer⁴ zjistil, že cholesteryl-benzoát přechází do kapalného stavu při teplotě 145 °C, do 179 °C má mléčné zbarvení a od 179 °C se jedná o čirou kapalinu. Stav, ve kterém má látka dva body tání, nazval „třetí fází“. Na jeho pilotní studie navázal fyzik Lehmannov⁴, který tyto látky nazval „mezofáze“ (později kapalné krystaly, tekuté krystaly). Tekuté krystaly jsou přechodem mezi kapalným a pevným krystalickým skupenstvím, mají tedy vlastnosti jak pevné substance (uspořádané a orientované molekuly), tak i kapaliny (pohyblivost, tekutost). Tekuté krystaly lze získat rozpouštěním pevné substance v rozpouštědle (lyotropní tekuté krystaly), nebo roztavením (termotropní tekuté krystaly). Tekuté krystaly mohou vznikat ve vodném prostředí i z některých lipidů⁴.

Lyotropní tekutá fáze na bázi lipidů je materiál napodobující biologické membrány a představuje vhodnou matici pro stabilizaci hydrofilních, hydrofobních i amfifilních látek. Biologicky aktivní sloučeniny jsou často relativně málo stabilní látky, které mohou být málo rozpustné, nebo dokonce nerozpustné ve vodném prostředí. Začlenění



Mgr. Martina Zatloukalová, Ph.D. studovala v letech 1997–2005 Gymnázium Jakuba Škody v Přerově, dále pak v letech 2005–2010 Chemicko-technologickou fakultu v Pardubicích, obor Klinická biochemie. Od roku 2010 působí na Ústavu lékařské chemie a biochemie Palackého Univerzity v Olomouci. Zde se v rámci disertační práce věnovala studiu flavonolignanů a flavonolů pod vedením prof. Jana Vacka. Během doktorského studia strávila roční zahraniční stáž v laboratoři prof. Any Brett v Portugalsku. Po obhajobě absolvovala roční postdoktorskou stáž na univerzitě ve Varšavě, kde se pod vedením prof. Renaty Bilewicz věnovala inkorporaci membránových proteinů do 3D-lipidových kubických fází. Od návratu do ČR až do současnosti pracuje jako odborný asistent na Ústavu lékařské chemie a biochemie v Olomouci. Hlavní oblastí jejího vědeckého zájmu je vývoj elektrochemických biosenzorů pro studium interakcí s proteiny, lipidy a DNA, studium oxidačně-redukčních vlastností, biotransformačních produktů a příprava lipidových stabilizačních matic pro biologicky aktivní látky. Je spoluautorkou 40 publikací v mezinárodních časopisech.

těchto relativně nestabilních molekul do nosných médií nabízí nové možnosti jejich transportu, řízeného a cíleného uvolňování, ale také jejich stabilizaci. Metodologie nanoenkapsulace se neustále vyvíjí a poskytuje tak nové možnosti přípravy a aplikace cílených formulací⁵.

V posledních několika desetiletích se pozornost zaměřuje na vývoj nových způsobů cíleného podávání léčiv. Transportní a aplikační soustava by v ideálním případě měla splňovat několik předpokladů. Měla by mít vysokou kapacitu pro inkorporaci látek, být stabilní a biokompatibilní, měla by umožnit řízené uvolňování látek a cíleně směřovat na místo působení⁶.

Dnešní konvenční lékové formy včetně lékových forem s postupným uvolňováním neplní všechny z uvedených podmínek. Řada nanoforem, mezi které řadíme polymerní nanočástice a nanokapsle, lipozomy, pevné lipidové nanočástice, fytozomy, nanoemulze a další, přináší značnou řadu výhod, včetně zvýšení rozpustnosti a biologické dostupnosti, zvýšení farmakologické aktivity, stability a zlepšení tkáňové distribuce. Nanoformy s inkorporovanými biologicky aktivními látkami tak mají potenciál pro zvýšení biodostupnosti a stabilních parametrů léčiv a obecně biologicky a farmakologicky aktivních látek.

2. Lipidové mezofáze

Samovolné uspořádání amfifilních molekul do organizovaných struktur je jedním ze spontánních rysů mnoha biologických struktur, jako je buněčná plazmatická membrána, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát a hustě zvrásněné mitochondriální membrány. Uvedené biologické

struktury jsou inspirací pro vývoj nových biomimetických materiálů³.

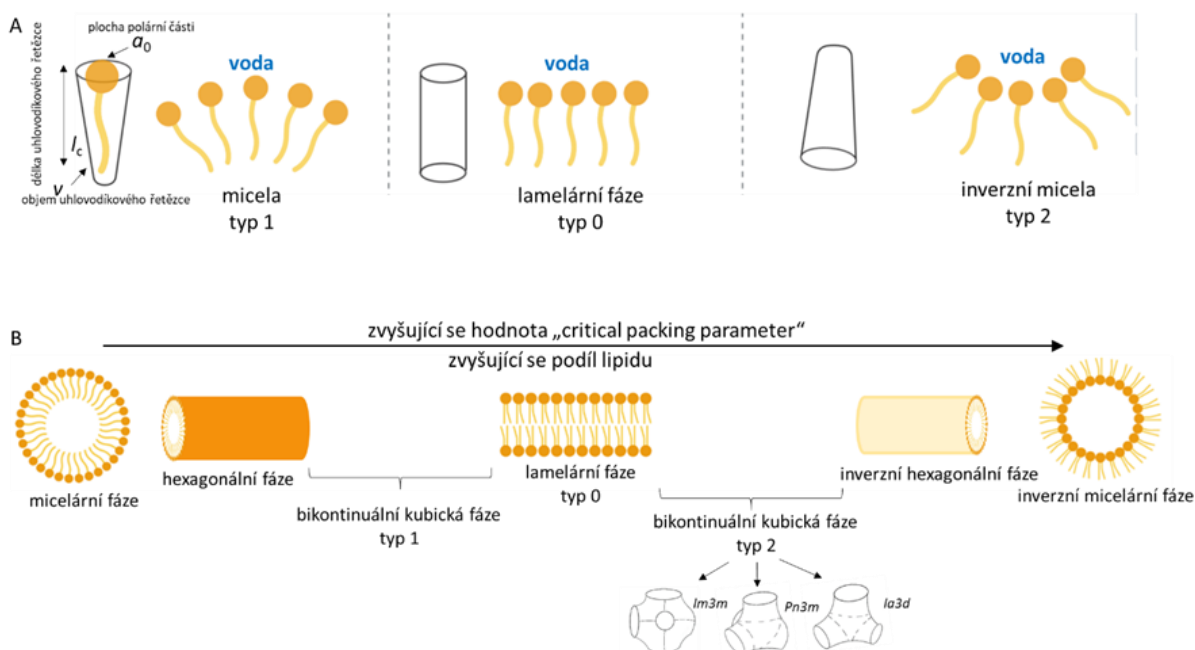
Cílem samouspořádaných útvarů je dosáhnout energeticky výhodného stavu. Jednou z hlavních hnacích sil vzniku těchto nadmolekulárních struktur je hydrofobní efekt. Existuje však mnoho faktorů určujících a ovlivňujících strukturu a stabilitu jednotlivých samouspořádaných útvarů. Rozhodující roli hraje koncentrace a tvar amfifilu. Pokud je koncentrace amfifilu rovna nebo vyšší než KMK a teplota vyšší než kritická micelární teplota (známá také jako Krafftova teplota), dochází k tvorbě micel. Amfifyly se liší především velikostí a tvarem hydrofilní a hydrofobní části molekuly, které se následně odrážejí v jejich prostorovém uspořádání (obr. 1).

Tenzidy mají tendenci tvořit samouspořádané kuželovité útvary typu 1, zatímco molekuly, které disponují menší polární částí, např. lipidy, mají tendenci tvořit inverzní micelární fáze typu 2. Biologické membrány tvořené širokým spektrem molekul různých tvarů tvoří dynamické samouspořádané útvary včetně lokálních planárních/lamelárních struktur⁷. Tvar samouspořádaných útvarů lze kvalitativně popsat podle teorie Israelachviliho². Tato teorie je založena na bezrozměrném parametru¹, tzv. „critical packing parameter“ (CPP). Parametr CPP je definován podle následující rovnice:

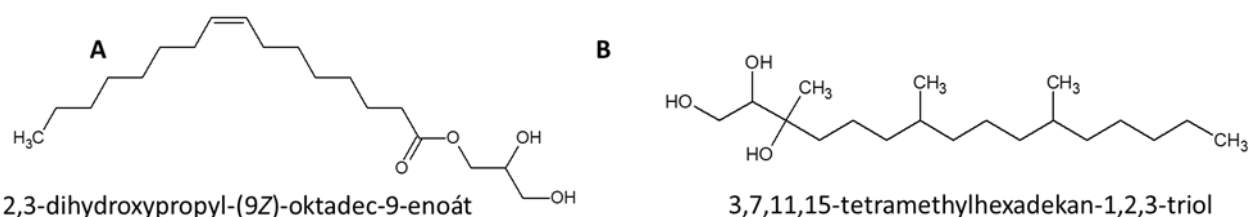
$$CPP = \frac{v}{a_0 l_c}$$

kde v je objem uhlovodíkového řetězce, a_0 je plocha polární části a l_c je délka uhlovodíkového řetězce.

Sférické a válcovité micely se tvoří jak u samouspořádaných útvarů typu 1, tak u inverzního micelárního uspořádání typu 2.



Obr. 1. A) Tvary a B) typy samouspořádaných útvarů amfifilních molekul po kontaktu s vodou



Obr. 2. Struktura A) 1-monooleinu a B) fytantriolu

Amfifily ve vodném prostředí zaujímají prostorové uspořádání, přičemž základní lipidové fáze nazýváme lamelární, hexagonální a bikontinuální kubické fáze. Vlivem přidaných složek do systému se mohou tvořit i jiné fáze⁷.

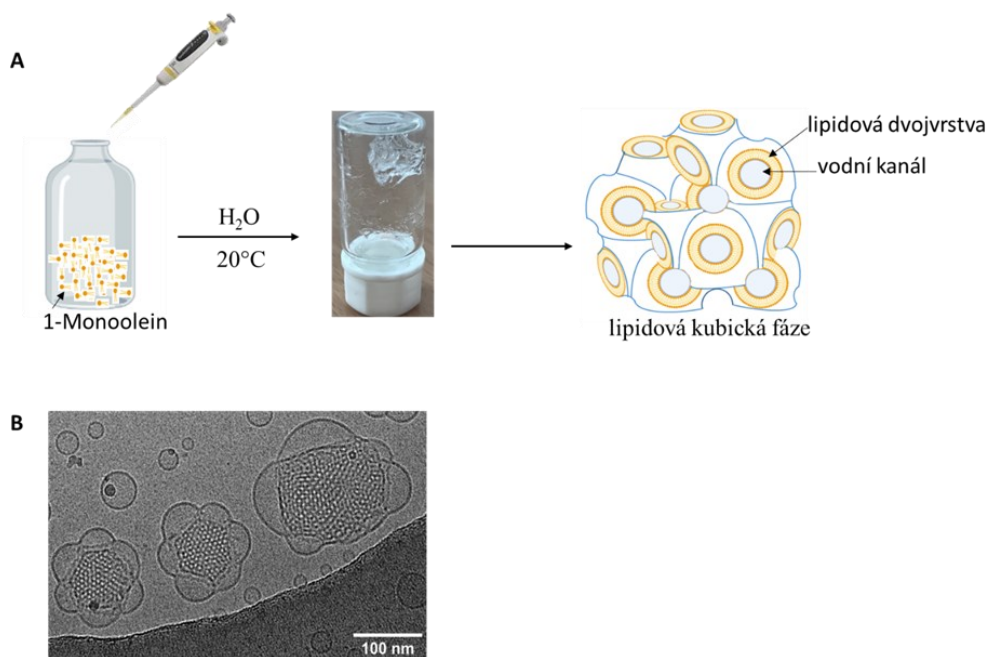
Dobře prostudované mezofázové lipidové struktury jsou založeny na 1-monoacylglycerolu (1-monoolein) a fytantriolu, jejichž struktury jsou zobrazeny na obr. 2.

1-Monoolein (2,3-dihydroxypropyl-(9Z)-oktadec-9-enoát, MO) je viskózní čirá látka s charakteristickým zápachem⁸. MO je nerozpustný ve vodě, ale dobře rozpustný v oleji a nižších uhlovodících např. chloroformu. Zejména díky vysoké rozpustnosti v oleji se MO využívá jako potravinářská emulze. Jde o netoxický, biologicky odbouratelný a biologicky kompatibilní materiál⁹.

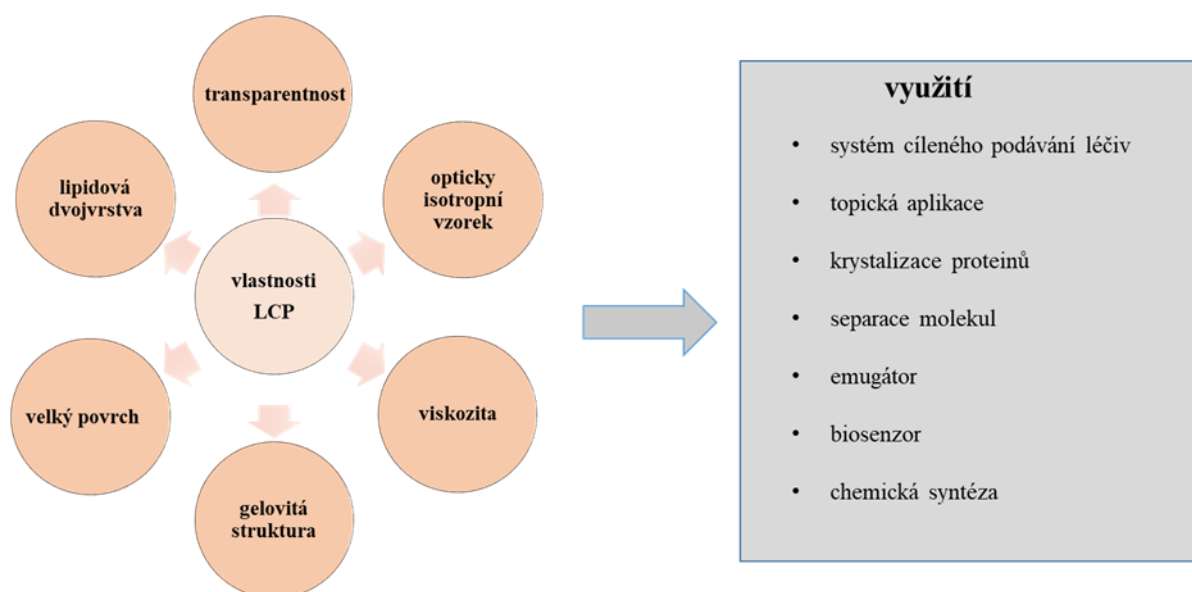
Vlastnosti amfifilních struktur jsou určeny složením jednotlivých fází, z nichž má zejména bikontinuální kubická fáze vysokou prostorovou orientaci^{10,11}. Důležitou podmínkou reprodukovatelnosti vzniku těchto prostorově uspořádaných fází je přesná definice použitých výchozích složek.

Kubická fáze (LCP) je jednou z mnoha kapalných krystalických fází, které se spontánně tvoří po smíchání lipidů s vodou za vhodně zvolených podmínek. Schematické zobrazení přípravy a LCP je ukázáno na obr. 3A.

LCP je termodynamicky stabilní, samostatně sestavená lipidová fáze s unikátními vlastnostmi. Kubická fáze se skládá ze dvou spojených fází, z nichž jednu tvoří lipidová dvojvrstva a druhou voda. LCP je charakterizována krystalografickým prostorovým uspořádáním s *Im3m* (angl. primitive), *Pn3m* (angl. double diamond) a *Ia3d* (angl. gyroid) symetrií⁹. V případě *Im3m* fáze se vodní kanály setkávají v šesticestných spojích pod úhlem 90°. Pro *Pn3m* fázi je charakteristické čtyřcestné křížení vodních kanálů pod úhlem 109,5°. Snímek kuzozomů s *Pn3m* symetrií z transmisní elektronové kryomikroskopie vidíme na obr. 3B. Třícestné „křížovatky“ protínající se pod úhlem 120° jsou typické pro *Ia3d* fázi⁹. Vlastnosti kubické fáze ji činí atraktivním nástrojem pro řadu různých aplikací (obr. 4).



Obr. 3. A) Schématické zobrazení přípravy lipidové kubické fáze a B) snímek kuzozomů z transmisní elektronové kryomikroskopie



Obr. 4. Schématické znázornění vlastností lipidových fází a jejich následné využití (LCP – lipidová kubická fáze)

3. Začlenění proteinů do lipidových kubických fází

Kubická fáze jako matrice pro krystalizaci integrálních membránových proteinů se používá již více jak dvě desetiletí. Landau a Rosenbusch jako první v roce 1996 využili LCP pro krystalizaci membránového proteinu¹². Dnes můžeme najít v proteinové databance (PDB) více jak 700 proteinů, pro jejichž krystalizaci byla využita LCP (cit.¹³). Spadá mezi ně celá řada enzymů, transportérů¹⁴, kanálů, receptorů¹⁵, ale také strukturálních proteinů¹⁶.

Krystalizace proteinů v LCP se ukázala být klíčová pro objasnění struktury několika mikrobiálních rhodopsinů a receptorů spojených s G-proteinem. LCP poskytuje proteinům přírozenější membránové prostředí na rozdíl od uměle vytvořeného prostředí spojeného s přítomností detergentů¹³. Příkladem využití LCP pro krystalizaci polárních, ve vodě rozpustných proteinů je lysozym. Lysozym na rozdíl od membránového bakteriorhodopsinu^{17,18} krystalizuje nezávisle na typu lipidové fáze¹⁹.

LCP byla také použita pro konstrukci biosenzorů, a to především elektrochemických. Viskózní, stabilní trojrozměrná lipidová dvojrstva s inkorporovanými membránovými proteiny se snadno aplikuje na povrch elektrody²⁰. Polární analyty se nacházejí ve vodných kanálcích lipidových mezofází, mají tak volný přístup k povrchu elektrody i k proteinům. Tyto látky snadno komunikují s elektrodou přímo nebo pomocí elektroaktivních značek²¹. V roce 1994 Razumas a spol.²² jako první uvedli práci zabývající se přípravou LCP biosenzorů. První biosenzory založené na bázi enzymů inkorporovaných do LCP byly navrženy pro stanovení glukosy, laktátu, močoviny a kreatininu.

Proudové odezvy závislé na oxidaci H_2O_2 byly detegovány amperometricky. Tabulka I shrnuje publikované elektrochemické enzymové biosenzory založené na LCP.

Uvedené studie ukazují, že proteiny mohou být začleněny do lipidové fáze v poměrně vysokých koncentracích a mohou snadno komunikovat s povrchem elektrody. Co by ale mělo být bráno v úvahu, je vliv fyzikálně-chemických faktorů, jako je podíl vodné fáze, teplota, tlak, složení lipidů a přítomnost jiných látek, na stabilitu LCP při inkorporaci proteinů. Výše zmíněné faktory by mohly ovlivňovat fázový přechod LCP, její destabilizaci a podporovat tak následné uvolnění inkorporovaných enzymů v důsledku přechodu LCP na fázi hexagonální až lamelární.

Kromě krystalizace proteinů a konstrukce biosenzorů může být LCP využita i jako matrice pro výzkum stability, aktivity nebo interakce proteinů s ligandy^{23–25}. Příkladem je stabilitní studie sodno-draselné pumpy (NKA). NKA je membránový protein přenášející sodné a draselné ionty proti jejich koncentračnímu spádu za využití energie z hydrolyzy ATP. Naše práce ukázala stabilizaci NKA v LCP. Po 14 dnech aktivita NKA v LCP dosahovala stále 60 % maximální aktivity, zatímco NKA inkubovaná ve vodném prostředí již nebyla aktivní²⁴.

Modelovým příkladem studií zaměřených na výzkum oxidačně-redukčního chování proteinů inkorporovaných do LCP jsou studie prováděné s cytochromem c (cit.^{25–27}). Interakce cytochromu c s LCP napodobující prostředí vnitřní mitochondriální membrány byla zkoumána pomocí FTIR spektroskopie, diferenciální skenovací kalorimetrie a elektrochemických technik. Difúzní koeficient cytochromu c byl stanoven elektrochemickými metodami a ukázal velmi omezenou mobilitu proteinu v lipidovém prostředí²⁸.

Tabulka I
Elektrochemické enzymové biosenzory na bázi LCP

Enzym/protein	Metoda	Elektroda	Lit.
Glukosaoxidasa, ceruloplasmin	amperometrie	platinový disk	60
Hemoglobin	CV, amperometrie	elektroda ze skelného uhlíku	61
Glukosaoxidasa, laktát oxidasa, ureasa, kreatindeaminasa	amperometrie, potenciometrie	platinová elektroda pH elektroda	22
Glukosaoxidasa, pyranosaoxidasa a lakasa (angl. laccase)	CV	elektroda ze skelného uhlíku	62
Glukosaoxidasa	CV	uhlíková elektroda	63
Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa	SWV	elektroda ze skelného uhlíku	24
Ethanoldehydrogenasa	CV, DPV	elektroda ze skelného uhlíku	64
Lakasa (angl. laccase)	chronoamperometrie, CV, impedance	modifikovaná elektroda ze skelného uhlíku	65
Cellobiosadehydrogenasa	CV, DPV	modifikovaná elektroda ze skelného uhlíku	66
Cholesteroloxidasa	CV	elektroda ze skelného uhlíku, zlatá elektroda	67
Bilirubinoxidasa	CV	rotační uhlíková elektroda	68

CV – cyklická voltametrie, SWV – voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím, DPV – diferenční pulsní voltametrie

4. Začlenění elektroaktivních značek do lipidových kubických fází

Barauskas a spol.²⁹ připravili elektrochemicky aktivní kubickou fázi obsahující různé typy amfifilních látek. Byl pozorován několikanásobný pokles difuzního koeficientu amfifilů inkorporovaných do LCP ve srovnání s difuzním koeficientem stanoveným v acetonitrilových roztocích.

Rowinski a spol.²⁰ zkoumali chování hydrofilních sond v kubické fázi metodami cyklické voltametrie a chronokulometrie. Bylo zjištěno, že difuzní koeficient pro Ru(NH)₆³⁺ a benzochinon v LCP je nižší, resp. v souladu s difuzním koeficientem stanoveným v roztoku. Podobně se Kostela a spol.³⁰ zabývali stanovením difuzního koeficientu hydrofilních, hydrofobních a amfifilních elektroaktivních značek v LCP. Difuzní koeficienty pro tyto elektrochemicky aktivní značky byly také stanoveny v hexagonální fázi pomocí elektrochemických a impedančních metod. Získané výsledky ukazují, že hydrofilní sondy jsou transportovány k povrchu elektrody rychleji než sondy hydrofobní³¹.

5. 3D lipidové nanočástice

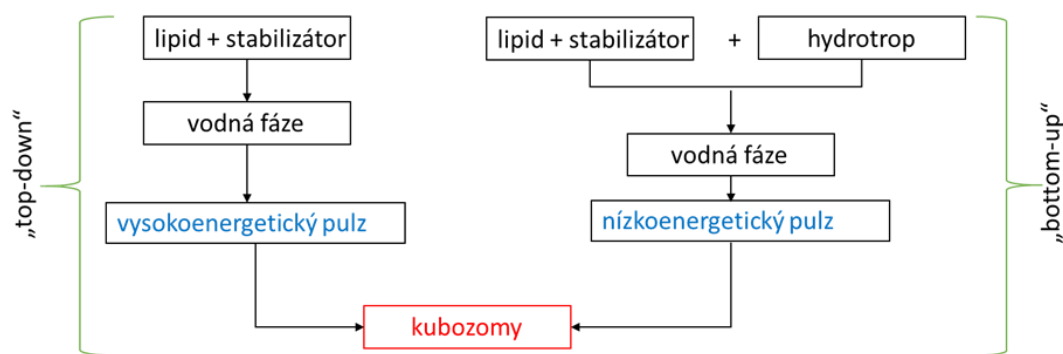
Pro konstrukci biosenzorů a vývoj transportních a aplikačních soustav se stále hledají a vyvíjejí nové nanonosiče na bázi lipidů. Jedna z klíčových výhod použití 3D lipidových nanočástic je účinná solubilizace ve vodě málo rozpustných látek, jak bylo ukázáno např. u kurkuminu³² nebo kvercetinu³³.

Mezi nejprozkoumanější lyotropní nanostrukturální nosiče řadíme kubozomy a hexozomy, které jsou definovány jako koloidní nanočástice s vnitřní bikontinuální kubickou a hexagonální strukturou. Tato skupina koloidních disperzí se nazývá ISAzomy (angl. internally self assembled 'somes' or particles). ISAzomy zahrnují kromě kubozomů a hexozomů také micelární kubozomy³⁴.

První zmínky o existenci kubozomů pocházejí z 80. let 20. století, kdy Larsson zjistil, že disperzí LCP vznikají submikronové částice s identickým vnitřním uspořádáním, jako má nadřazená kubická struktura³⁵. Kubozomy jsou vysoce stabilní nanočástice vytvořené z lipidové kubické fáze a stabilizované vnější polymerní vrstvou. Ve srovnání s lipozomy poskytují kubozomy a hexozomy výrazně větší povrch (až 400 m² g⁻¹) pro inkorporaci jak membránových proteinů, tak malých hydrofilních nebo hydrofobních molekul³⁶. Obecně existují dva hlavní přístupy přípravy kubozomů, přístup „top-down“ a „bottom-up“, přičemž oba vyžadují použití vhodného stabilizátoru (obr. 5).

Metoda „top-down“ je nejpoužívanější a nejstarší technikou v přípravě kubozomů⁸, zahrnuje dva hlavní kroky. Nejprve se připraví LCP, která je následně homogениzována/sonikována za využití vysokoenergetických pulzů. Kubozomy připravené metodou „top-down“ jsou stabilní vůči agregaci až jeden rok. Nevýhodou této metody je využití vysokoenergetických pulzů, které mohou ovlivňovat aktivitu inkorporovaných biologicky aktivních látek citlivých na zvýšenou teplotu³⁶.

Druhý způsob se běžně označuje jako metoda „bottom-up“, zahrnuje disperzi směsi obsahující lipid,



Obr. 5. Postup přípravy kubozomů

stabilizátor, hydrotrop a nadbytek vody (obr. 5)³⁷. Hydrotrop je klíčovým faktorem této metody, pomáhá solubilizaci lipidů za vzniku lipidových prekurzorů³⁸. Mezi nejčastěji používané hydrotrophy patří močovina, alginát sodný a benzoát sodný. Výhodou tohoto přístupu je využití menšího množství energie, takže může být použita i pro přípravu kubozomů s teplotně nestabilními látkami, jako jsou peptidy nebo proteiny⁸. Stejný postup přípravy lze využít i pro hexozomy³⁹.

Některé amfifilní látky – tenzidy (stabilizátory) brání agregaci ISAzomů ve vodném prostředí. V posledním desetiletí byly použity různé typy stabilizátorů pro přípravu kubozomů a hexozomů. Jeden z neúčinnějších a dobře prozkoumaných tenzidů je Poloxamer 407, který je komerčně dostupný pod názvem Pluronic F127 (cit.^{40,41}). Kromě Pluronic F127 se používají i další stabilizační látky včetně jiných polymerů (jako je F128, F108)^{42,43}, PEGylovaných lipidů nebo β -kaseinu⁴⁴. Výběr stabilizátoru pro přípravu ISAzomů je velmi důležitý, stabilizátory mohou modulovat vnitřní lipidovou nanostrukturu a tedy afinitu k hostujícím látkám⁴⁵.

Kapalné krystalické fáze a jejich odpovídající vodné disperze jsou charakterizovány především pomocí dvou technik, a to SAXS (malouhlový rozptyl rentgenového záření) a SANS (malouhlový rozptyl neutronů)⁴⁶. Metody se převážně využívají k popisu vlivu fyzikálně-chemických faktorů na strukturní vlastnosti nanočástic včetně složení lipidů, teploty, pH, tlaku a samotného efektu po inkorporaci cílových látek. Kromě SAXS a SANS se pro morfologickou charakterizaci využívá také cryo-TEM (transmisní elektronová kryomikroskopie)⁴⁷ a AFM (mikroskopie atomárních sil)⁴⁸, pro kontrolu velikosti částic DLS (dynamický rozptyl světla).

Pro demonstraci použití nanonosičů pro konstrukci biosenzorů uvádím práci založenou na kubozomech na bázi fytantriolu stabilizovaných pomocí F127. Pevný zlatý povrch senzoru byl modifikován prostřednictvím biotinylovaných lipidů, které byly součástí kubozomů. Na modifikovaný povrch byla dále aplikována druhá sada kubozomů obohacená o glykolipid (GM1), který umožnil specifickou vazbu cholerového toxinu B z roztoku⁴⁹.

V dnešní době evidujeme rostoucí zájem o využití ISAzomů, zejména kubozomů a hexozomů, jako nanonosičů pro inkorporaci léčiv, zobrazovacích sond a antimikro-

biálních peptidů. Pozornost je věnována zejména solubilizaci a stabilizaci biologicky aktivních látek a vlivu složení lipidů a typu a koncentrace stabilizátoru na strukturní a morfologické vlastnosti těchto nanoforem. Na druhou stranu uvolňování látek z kubozomů/hexozomů nebo vlivu inkorporovaných látek či samotných kubozomů/hexozomů na buněčné signální dráhy se věnuje pouze pár studií. Uvolňování doxorubicinu z kubické lipidové fáze v závislosti na změně pH bylo studováno elektrochemickými metodami⁵⁰. Biodostupnost a cytotoxicita kubozomů byla zkoumána především na nádorových buněčných liniích^{41,51,52}. Kubozomy a hexozomy se začínají uplatňovat v teranostice. DLS, SAXS a cryo-TEM metody ukázaly, že hexozomy jsou schopny začlenit do své struktury jak fluorescenční sondu, tak protinádorové léčivo kamptotecin. Fluorescenční mikroskopii bylo ukázáno, že nádorová buněčná linie HeLa je schopna akumulovat modifikované hexozomy do svých lipidových struktur. Pro fluorescenční mikroskopii byly použité netoxické koncentrace modifikovaných hexozomů⁵³. Práce³⁴ jako první ukazuje využití kubozomů v radioterapii v kombinaci s chemoterapií. Kubozomy na bázi 1-monooleinu byly modifikovány začleněním protinádorového léčiva doxorubicinu a běžně používaného radionuklidu. Cytotoxicita modifikovaných kubozomů byla testována na buněčné lince HeLa. Bylo ukázáno, že kubozomy modifikované doxorubicinem a zároveň radionuklidem jsou toxičtější v porovnání se samotnými kubozomy nebo kubozomy se začleněním chemoterapeutikem/radionuklidem.

Kombinací cryo-TEM a SAXS metod byl studován vliv krevní plazmy na velikost, strukturní a morfologické vlastnosti kubozomů v čase⁵⁵. Pouze několik studií se zaměřuje na výzkum stability lipidových kubických a hexagonálních nanočástic v krevním řečišti, strukturních přeměn kubozomů/hexozomů po kontaktu s buněčnými membránami, krevními buňkami či proteiny, nebo se věnuje jejich buněčnému vychytávání.

Strukturní uspořádání bikontinuálních kubických a hexagonálních fází umožňuje pomalejší (resp. postupné) uvolňování inkorporovaných látek. Také bylo ukázáno, že bikontinuální kubické nanostruktury mají mukoadhezivní vlastnosti^{56,57}. Využití těchto 3D nanolipidových struktur bylo aplikováno především pro orální, subkutánní, transdermální a periodontální podání biologicky aktivních

látek. Lipidové kapalné krystalické fáze jsou vysoce viskózní, a proto mají omezené využití jako intravenózní nanonosiče. Detailnější přehled využití kubo- a hexazomálních/hexazomálních lipidových struktur na bázi 1-monooleinu nebo fytantriolu pro systémy cíleného podávání léčiv je shrnuto v následujících publikacích^{5,8,34,36,39,58}.

6. Závěr

Bylo ukázáno, že vysoce organizované 3D lipidové struktury se mohou využívat jako matrice pro krystalizaci integrálních membránových proteinů nebo při vývoji nových lipidových nanoforem pro transport a stabilizaci biologicky aktivních molekul. Optimální vnitřní lipidové uspořádání a výběr vhodných tenzidů pro stabilizaci nanonosičů jsou nezbytné pro navržení konkrétní využitelné lipidové matrice. Navzdory unikátním vlastnostem kubo- a hexozomů stále existuje řada otázek o osudu nanonosičů po jejich *in vivo* podání. Stejně tak, limitující znalosti shledávám v oblasti buněčného testování, včetně hlubšího pochopení mechanismu interakce s buněčnými membránami nebo receptory, samotného vstupu do buněk nebo uvolnění biologicky aktivních látek z nanonosičů. Zajímavým budoucím směrem výzkumu by mohlo být využití lipidových vehikul pro inkorporaci biologicky aktivních lipidů⁵⁹.

Děkuji prof. Janu Vackovi a doc. Jiřímu Vrbovi (Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci) za diskusi a kritické připomínky k textu.

Práce byla finančně podpořena projektem Grantové agentury České republiky č. 19-21237Y.

Použité zkratky

AFM	mikroskopie atomárních sil
CPP	„critical packing parameter“
cryo-TEM	transmisní elektronová kryomikroskopie
CV	cyklická voltametrie
DLS	dynamický rozptyl světla
DPV	diferenční pulsní voltametrie
KMK	kritická micelární koncentrace
LCP	lipidová kubická fáze
MO	1-monoolein
NKA	sodno-draselná pumpa
SANS	maloúhlový rozptyl neutronů
SAXS	maloúhlový rozptyl rentgenového záření
SWV	voltametrie s vkládaným pravouhlým napětím

LITERATURA

- Kulkarni C. V.: *Nanoscale* 4, 5779 (2012).
- Israelachvili J. N., Mitchell D. J., Ninham B. W.: *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 72, 1525 (1976).
- Patra J. K., Das G., Fraceto L. F., Campos E. V. R., del Pilar Rodriguez-Torres M., Acosta-Torres L. S., Diaz-Torres L. A., Grillo R., Swamy M. K., Sharma S.: *J. Nanobiotechnology* 16, 1 (2018).
- Mitov M.: *ChemPhysChem* 15, 1245 (2014).
- Shanmugam T., Banerjee R.: *Ther. Deliv.* 2, 1485 (2011).
- Nazaruk E., Górecka E., Osornio Y. M., Landau E. M., Bilewicz R.: *J. Electroanal. Chem.* 819, 269 (2018).
- Kulkarni C. V.: *Cosmetics* 3, 37 (2016).
- Gaballa S. A., El Garhy O. H., Abdelkader H.: *JABPS* 3, 1 (2020).
- Kulkarni C. V., Wachter W., Iglesias-Salto G., Engelskirchen S., Ahualli S.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13, 3004 (2011).
- Qiu H., Caffrey M.: *Biomaterials* 21, 223 (2000).
- Barauskas J., Landh T.: *Langmuir* 19, 9562 (2003).
- Landau E. M., Rosenbusch J. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 14532 (1996).
- Li D., Caffrey M.: *J. Mol. Biol.* 432, 5104 (2020).
- Cherezov V., Yamashita E., Liu W., Zhalnina M., Cramer W. A., Caffrey M.: *J. Mol. Biol.* 364, 716 (2006).
- Rasmussen S. G. F., DeVree B. T., Zou Y., Kruse A. C., Chung K. Y., Kobilka T. S., Thian F. S., Chae P. S., Pardon E., Calinski D.: *Nature* 477, 549 (2011).
- Kang Y., Gao X., Zhou X. E., He Y., Melcher K., Xu H. E.: *FEBS J.* 283, 816 (2016).
- Qutub Y., Reviakine I., Maxwell C., Navarro J., Landau E. M., Vekilov P. G.: *J. Mol. Biol.* 343, 1243 (2004).
- Chiu M. L., Nollert P., Loewen M. C., Belrhali H., Pebay-Peyroula E., Rosenbusch J. P., Landau E. M.: *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 56, 781 (2000).
- Landau E. M., Rummel G., Cowan-Jacob S. W., Rosenbusch J. P.: *J. Phys. Chem. B* 101, 1935 (1997).
- Rowiński P., Korytkowska A., Bilewicz R.: *Chem. Phys. Lipids* 124, 147 (2003).
- Nazaruk E., Bilewicz R., Lindblom G., Lindholm-Sethson B.: *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 1569 (2008).
- Razumas V., Kanapienien J. J., Nylander T., Engström S., Larsson K.: *Anal. Chim. Acta* 289, 155 (1994).
- Ericsson B., Larsson K., Fontell K.: *Biochim. Biophys. Acta* 729, 23 (1983).
- Zatloukalová M., Nazaruk E., Novak D., Vacek J., Bilewicz R.: *Biosens. Bioelectron.* 100, 437 (2018).
- Razumas V., Talaikytė Z., Barauskas J., Mieziš Y., Nylander T.: *Vib. Spectrosc.* 15, 91 (1997).
- Razumas V., Larsson K., Mieziš Y., Nylander T.: *J. Phys. Chem. A* 100, 11766 (1996).
- Kraïneva J., Narayanan R. A., Kondrashkina E., Thiagarajan P., Winter R.: *Langmuir* 21, 3559 (2005).
- Vacek J., Zatloukalová M., Novak D.: *Curr. Opin. Electrochem.* 12, 73 (2018).
- Barauskas J., Razumas V., Talaikytė Z., Bulovas A., Nylander T., Tauraitė D., Butkus E.: *Chem. Phys. Lipids* 123, 87 (2003).
- Kostela J., Elmgren M., Kadi M., Almgren M.:

- J. Phys. Chem. B 109, 5073 (2005).
31. Kumar P. S., Lakshminarayanan V.: *Langmuir* 23, 1548 (2007).
 32. Esposito E., Ravani L., Mariani P., Contado C., Drechsler M., Puglia C., Cortesi R.: *Mater. Sci. Eng., C* 33, 4923 (2013).
 33. Linkevičiūtė A., Misiūnas A., Naujalis E., Barauskas J.: *Colloids Surf., B* 128, 296 (2015).
 34. Yaghmur A., Mu H.: *Acta Pharm. Sin. B* 11, 871 (2021).
 35. Larsson K.: *J. Phys. Chem.* 93, 7304 (1989).
 36. Karami Z., Hamidi M.: *Drug Discovery Today* 21, 789 (2016).
 37. Spicer P. T., Hayden K. L., Lynch M. L., Ofori-Boateng A., Burns J. L.: *Langmuir* 17, 5748 (2001).
 38. Mezzenga R., Meyer C., Servais C., Romoscanu A. I., Sagalowicz L., Hayward R. C.: *Langmuir* 21, 3322 (2005).
 39. Hirlekar R., Jain S., Patel M., Garse H., Kadam V.: *Curr. Drug Delivery* 7, 28 (2010).
 40. Tilley A. J., Drummond C. J., Boyd B. J.: *J. Colloid Interface Sci.* 392, 288 (2013).
 41. Murgia S., Falchi A. M., Mano M., Lampis S., Angius R., Carnerup A. M., Schmidt J., Diaz G., Giacca M., Talmon Y.: *J. Phys. Chem. B* 114, 3518 (2010).
 42. Chong J. Y., Mulet X., Waddington L. J., Boyd B. J., Drummond C. J.: *Soft Matter* 7, 4768 (2011).
 43. Yaghmur A., Glatter O.: *Adv. Colloid Interface Sci.* 147, 333 (2009).
 44. Zhai J., Waddington L., Wooster T. J., Aguilar M.-I., Boyd B. J.: *Langmuir* 27, 14757 (2011).
 45. Nilsson C., Østergaard J., Larsen S. W., Larsen C., Urtti A., Yaghmur A.: *Langmuir* 30, 6398 (2014).
 46. Angelova A., Angelov B., Garamus V. M., Couvreur P., Lesieur S.: *J. Phys. Chem. Lett.* 3, 445 (2012).
 47. Helvig S., Azmi I. D., Moghimi S. M., Yaghmur A.: *AIMS Biophys.* 2, 116 (2015).
 48. Neto C., Aloisi G., Baglioni P., Larsson K.: *J. Phys. Chem. B* 103, 3896 (1999).
 49. Fraser S. J., Mulet X., Martin L., Praporski S., Mechler A., Hartley P. G., Polyzos A., Separovic F.: *Langmuir* 28, 620 (2012).
 50. Nazaruk E., Szlęzak M., Górecka E., Bilewicz R., Osornio Y. M., Uebelhart P., Landau E. M.: *Langmuir* 30, 1383 (2014).
 51. Falchi A. M., Rosa A., Atzeri A., Incani A., Lampis S., Meli V., Caltagirone C., Murgia S.: *Toxicol. Res.* 4, 1025 (2015).
 52. Tudose A., Celia C., Belu I., Borisova S., Paolino D.: *Farmacia* 62, 777 (2014).
 53. Caltagirone C., Arca M., Falchi A. M., Lippolis V., Meli V., Monduzzi M., Nylander T., Rosa A., Schmidt J., Talmon Y.: *RSC Adv.* 5, 23443 (2015).
 54. Cytryniak A., Nazaruk E., Bilewicz R., Górzynska E., Żelechowska-Matysiak K., Walczak R., Mames A., Bilewicz A., Majkowska-Pilip A.: *Nanomaterials* 10, 2272 (2020).
 55. Mat Azmi I. D., Wu L., Wibroe P. P., Nilsson C., Østergaard J., Sturup S., Gammelgaard B., Urtti A., Moghimi S. M., Yaghmur A.: *Langmuir* 31, 5042 (2015).
 56. Nielsen L. S., Schubert L., Hansen J.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 6, 231 (1998).
 57. Souza C., Watanabe E., Borgheti-Cardoso L. N., Fantini M. C. D. A., Lara M. G.: *J. Pharm. Sci.* 103, 3914 (2014).
 58. Akbar S., Anwar A., Ayish A., Elliott J. M., Squires A. M.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 101, 31 (2017).
 59. Zatloukalová M., Jedinák L., Riman D., Franková J., Novák D., Cytryniak A., Nazaruk E., Bilewicz R., Vrba J., Papoušková B.: *Redox Biol.* 46, 102097 (2021).
 60. Nylander T., Mattisson C., Razumas V., Mieziš Y., Håkansson B.: *Colloids Surf.* 114, 311 (1996).
 61. Gao F., Yao Z., Huang Q., Chen X., Guo X., Ye Q., Wang L.: *Colloids Surf.* 82, 359 (2011).
 62. Nazaruk E., Bilewicz R.: *Bioelectrochemistry* 71, 8 (2007).
 63. Aghbolagh M. S., Khani Meynaq M. Y., Shimizu K., Lindholm-Sethson B.: *Bioelectrochemistry* 118, 8 (2017).
 64. Wu G., Yao Z., Fei B., Gao F.: *J. Electrochem. Soc.* 164, G82 (2017).
 65. Liu Y., Qu X., Guo H., Chen H., Liu B., Dong S.: *Biosens. Bioelectron.* 21, 2195 (2006).
 66. Grippo V., Ma S., Ludwig R., Gorton L., Bilewicz R.: *Bioelectrochemistry* 125, 134 (2019).
 67. Ropers M.-H., Bilewicz R., Stébé M.-J., Hamidi A., Miclo A., Rogalska E.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 3, 240 (2001).
 68. Rowinski P., Kang C., Shin H., Heller A.: *Anal. Chem.* 79, 1173 (2007).
- M. Zatloukalová** (*Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc*): **3D Lipidic Matrix for Incorporation and Stabilization of Biologically Active Molecules**
- In aqueous media, biologically active substances are usually unstable, poorly soluble compounds with low bioavailability. Incorporation of these compounds into the structure of lipid-based lyotropic liquid crystalline phase or nanoparticles can increase their solubility and subsequent bioavailability. The aim of this review is to clarify the principle of self-assembly of lipidic amphiphilic molecules in the aqueous environment, to present lipid bicontinuous cubic and hexagonal phases and their current biological application.
- Keywords: lipidic nanoparticles, lipidic cubic phase, cubosome, hexosome, biological active compound
- Zatloukalová M.: *Chem. Listy* 116, 172–179 (2022).
 ● <https://doi.org/10.54779/chl20220172>