

**VILNIAUS UNIVERSITETAS**

**MEDICINOS FAKULTETAS**

**Biomedicinos mokslų institutas (Farmacijos ir farmakologijos centras)**

**MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS**

**Adapaleno įterpimo į liposomas ir jo atpalaidavimo  
tyrimas**

**Studentė: Miglė Dainovskytė**

5 kursas, 1 grupė

Darbo vadovė: doc. dr. Rima Budvytytė

.....  
(parašas)

Farmacijos ir farmakologijos centro vadovė: doc. dr. Kristina Garuolienė

.....  
(parašas)

Biomedicinos mokslų instituto direktorius: prof. dr. Algirdas Edvardas Tamošiūnas .....

(parašas)

Darbo įteikimo data: 2023-05-14

Registracijos Nr. \_\_\_\_\_

Studento elektroninio pašto adresas: migle.dainovskyte@mf.stud.vu.lt

2023 m.

# TURINYS

SANTRAUKA.....	4
SUMMARY.....	6
PADĖKA.....	8
SANTRUMPOS.....	9
SĄVOKOS.....	10
ĮVADAS .....	11
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	12
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	13
1.1. Liposomos.....	13
1.2. Liposomų struktūra .....	14
1.3. Liposomų sudėtis .....	14
1.4. Liposomų privalumai ir trūkumai .....	17
1.5. Liposomų gamybos metodai.....	19
1.6. Vaistų pernaša naudojant liposomas.....	21
1.7. Liposominiai vaistai rinkoje .....	23
1.8. Aknė.....	25
1.9. Adapalenas.....	26
1.10. Liposomų įkapsuliavimo efektyvumo įvertinimo metodai.....	27
2. EKSPERIMENTINĖ DALIS .....	31
2.1. Prietaisai ir medžiagos .....	31
2.1.1. Reagentai .....	31
2.1.2. Tirpalai.....	31
2.1.3. Sorbentai .....	31
2.1.4. Laboratorinė įranga ir priedai .....	32
2.2. Metodai .....	32

2.2.1. Liposomų formavimas .....	32
2.2.2. Ekstruzija .....	33
2.2.3. Dinaminė šviesos sklaida.....	33
2.2.3.1. Dinaminės šviesos sklaidos matavimai.....	35
2.2.4. Liposomų su įkapsuliuotu kalceinu formavimas .....	35
2.2.5. Kalceino atpalaidavimas iš liposomų .....	36
2.2.5.1. Kalceino atpalaidavimo iš liposomų matavimai .....	37
2.2.6. Liposomų su įkapsuliuotu adapalenu formavimas.....	37
2.2.6.1. Adapaleno, įterpto į liposomas, fluorescencijos matavimai .....	37
3. REZULTATAI.....	39
3.1. Liposomų stabilumo įvertinimas DLS metodu .....	39
3.2. Kalceino atpalaidavimo iš liposomų stebėjimas .....	43
3.3. Adapaleno atpalaidavimo iš liposomų stebėjimas .....	51
4. IŠVADOS .....	56
LITERATŪROS ŠALTINIAI .....	57

## SANTRAUKA

Miglės Dainovskytės magistro baigiamasis darbas „Adapaleno įterpimo į liposomas ir jo atpalaidavimo tyrimas“. Mokslinė vadovė dr. Rima Budvytytė. Darbas atliktas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biochemijos instituto Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriuje.

**Tyrimo tikslas:** suformuoti ir charakterizuoti liposomas, tinkamas vaistų pernešimui, bei panaudoti jas adapaleno, skirto aknės gydymui, įterpimui.

### **Tyrimo uždaviniai:**

1. Įvertinti skirtingos sudėties liposomų dydį ir stabilumą priklausomai nuo skirtingų laikymo sąlygų (laiko, temperatūros).
2. Nustatyti į liposomas įterpto fluorescuojančio dažo kalceino atpalaidavimą.
3. Įvertinti adapaleno įterpimą į liposomas, matuojant jo fluorescenciją.

**Tyrimo objektas ir metodai:** magistro darbo tiriamasis objektas – suformuoti lipidiniai nanonešikliai – liposomos – be vaistinės medžiagos ir su adapalenu. Skirtingų sudėčių liposomų dydis ir stabilumas charakterizuotas dinaminės šviesos sklaidos metodu, liposomų membranų stabilumas vertintas pagal kalceino atpalaidavimo iš liposomų sukeltos fluorescencijos intensyvumo pokyčius, o į liposomas įterptas adapalenas nustatytas fluorescencijos spektroskopijos būdu.

**Rezultatai ir išvados:** ištyrus keturių skirtingų sudėčių liposomas (DOPC / Chol (6:4), DOPC / DOPG (7:3), DOPC / Chol / DOPG (5:3,5:1,5) ir DOPC / Chol / DSPE-PEG(2000) (5,64;3,83:5,3)) dinaminės šviesos sklaidos metodu skirtingose temperatūrose, nustatyta, jog per savaitę visų sudėčių liposomos stabiliausias buvo kambario (22 °C) temperatūroje dėl mažiausių vidutinio spindulio dydžio pokyčių, o mažiausią stabilumą liposomos rodė 37 °C temperatūroje dėl ryškiausių vidutinio spindulio dydžio pokyčių.

Išmatavus atpalaiduoto kalceino fluorescenciją iš skirtingų sudėčių liposomų, nustatyta, kad nestabiliausias buvo lipidinės vezikulės, sudarytos iš DOPC ir Chol (6:4) dėl didžiausių fluorescencijos intensyvumo pokyčių, o stabiliausias – PEG liekaną turinčios liposomos dėl mažiausiai pakitusio fluorescencijos intensyvumo. Įvertinus skirtingų temperatūrų įtaką liposomų stabilumui, matoma, kad visų keturių sudėčių liposomos nestabiliausias buvo 37 °C

temperatūroje, o 22 °C temperatūra buvo palankiausia lipidinių pūslelių stabilumui dėl išsiskyrusio mažiausio kiekio kalceino.

Pamatavus adapaleno atpalaidavimo sukeltą fluorescenciją iš liposomų, suformuotų iš DOPC / DOPG (7:3) bei PEG liekaną turinčių liposomų, išsiaiškinta, jog didžiausias adapaleno įkapsuliavimo į lipidines vezikules efektyvumas stebėtas 4 °C temperatūroje. Lyginant abi liposomų sudėtis, didesnę stabilumą parodė PEG liekaną turinčios liposomos su įterptu adapalenu dėl didesnio fluorescencinio intensyvumo po tritono pridėjimo.

## SUMMARY

Miglė Dainovskytė's Master's thesis is titled "Study of adapalene encapsulation into liposomes and its release." The supervisor of the research is Rima Budvytytė PhD. Research was carried out at the Department of Bioelectrochemistry and Biospectroscopy at the Institute of Biochemistry in the Life Sciences Center of Vilnius University.

**Aim of the research:** to form and characterize liposomes suitable for drug delivery and to use them for the encapsulation of adapalene for the treatment of acne.

**Objectives of the research:**

1. Evaluate the size and stability of liposomes of different compositions depending on different storage conditions (time, temperature).
2. Determine the release of the fluorescent dye calcein inserted into liposomes.
3. Evaluate the incorporation of adapalene into liposomes by measuring its fluorescence.

**Object and methods of the research:** the object of the Master's thesis was lipid-based nanocarriers - liposomes – with and without the drug substance adapalene. The size and stability of liposomes of different compositions were characterized by the dynamic light scattering method, the stability of liposome membranes was assessed based on changes in the fluorescence intensity of released calcein from liposomes, and the presence of adapalene in liposomes was determined by the fluorescence spectroscopy.

**Results and conclusions:** after examining four different compositions of liposomes (DOPC/Chol (6:4), DOPC/DOPG (7:3), DOPC/Chol/DOPG (5:3.5:1.5), and DOPC/Chol/DSPE-PEG(2000) (5.64:3.83:5.3)) using the dynamic light scattering method at different temperatures, it was determined that all composition liposomes were the most stable at room temperature (22 °C) over a week due to the smallest average radius size changes, while the liposomes showed the least stability at 37 °C due to the most significant changes in radius size.

After measuring the fluorescence of released calcein from different composition liposomes, it was found that the least stable were lipid vesicles composed of DOPC and Chol (6:4) due to the largest fluorescence intensity changes, while the most stable were PEG residue-containing liposomes due to the least change in fluorescence intensity. Evaluating the effect of

different temperatures on liposome stability, it is seen that all four composition liposomes were the least stable at a temperature of 37 °C, while the temperature of 22 °C was the most favorable for the stability of lipid vesicles due to the lowest amount of released calcein.

After measuring the fluorescence induced by the release of adapalene from liposomes formed from DOPC / DOPG (7:3) and from PEG residue-containing liposomes, it was found that the highest efficiency of encapsulation of adapalene into lipid vesicles was observed at a temperature of 4 °C. Comparing both liposome compositions, the PEG residue-containing liposomes with incorporated adapalene showed greater stability due to higher fluorescence intensity after addition of triton.

## **PADĖKA**

Esu nuoširdžiai dėkinga savo darbo vadovei dr. Rimai Budvytytei už suteiktą galimybę atlikti magistro baigiamąjį darbą VU Gyvybės mokslų centro Biochemijos instituto Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriuje. Dėkoju už vertingas žinias ir profesionalius patarimus bei už nuolatinį paskatinimą iškilus abejonėms.

Atskiros padėkos nusipelnė doktorantė Evelina Jankaitytė už skirtą laiką, visapusiškus patarimus dirbant laboratorijoje ir už pagalbą atliekant matavimus bei skaičiavimus.

Taip pat tariau nuoširdų ačiū visam skyriaus kolektyvui už jaukią ir draugišką darbo aplinką, bendradarbiavimą ir pagalbą esant neaiškumams.



## SANTRUMPOS

**Chol** – cholesterolis

**DLS** – (angl. *dynamic light scattering*) – dinaminė šviesos sklaida

**DOPC** – dioleoilfosfatidilcholinai

**DOPG** – dioleoilfosfatidilglicerolis

**DPPC** – dipalmitoilfosfatidilcholinai

**DSPE** – distearoilglicerofosfoetanolaminas

**FDA** – (angl. *U.S. Food and Drug Administration*) – JAV Maisto ir vaistų administracija

**IM** – (angl. *intramuscular*) – į raumenis

**IT** – (angl. *intrathecal*) – į intratekalinėje erdmėje esantį stuburo smegenų skystį

**IV** – (angl. *intravenous*) – į veną

**PAM** – paviršiaus aktyvumo medžiagos

**PC** – fosfatidilcholinai

**PG** – fosfatidilglicerolis

**PE** – fosfatidiletanolaminas

**PEG** – polietilenglikolis

**PS** – fosfatidilserinas

**RES sistema** – retikuloendotelinė sistema

**SM** – sfingomielinas

**SPAN 60** – sorbitano monostearatas

**SPAN 80** – sorbitano monooleatas

**TWEEN 60** – polioksietileno sorbitano monostearatas

**TWEEN 80** – polioksietileno sorbitano monooleatas

## SAVOKOS

**ABC fenomenas** – (angl. *accelerated blood clearance*) – pagreitis kraujo klirensas, imunogeninis atsakas, paskatintas pakartotinai vartojant didelį kiekį PEG konjuguotų medžiagų, įskaitant PEG liekaną turinčius nanonešiklius, dėl ko padidėja PEG konjuguotų medžiagų klirensas ir sumažėja jų efektyvumas;

**amfifilinis** – medžiagos gebėjimas pasižymėti dvejopomis savybėmis, pavyzdžiui, vandenyje tirpios hidrofilinės galvutės ir lipiduose tirpios (lipofilinės) uodegėlės turėjimas;

**Brauno judėjimas** – atsitiktinis šiluminis dalelių judėjimas skystyje arba dujose;

**delnų ir padų eritrodizestezijos sindromas** – (angl. *hand-foot syndrome*) – akumuliacinė dermatologinė toksinė reakcija, susijusi su PEG liekaną turinčio liposominės formos doksorubicino vartojimu, kuriai būdingi skausmingi paraudusios odos iškilimai;

**dispersija** – cheminių medžiagų dalelių pasiskirstymas kitoje medžiagoje;

**ekstruzija** – išstūmimas – metodas, kurio metu liposomų suspensija yra leidžiama per tam tikro porų dydžio membranių filtrą;

*et al.* – ir kiti;

**fazinio virsmo temperatūra  $T_m$**  – temperatūra, virš kurios fosfolipidai egzistuoja skystakristalinėje formoje suformuodami dvisuoksnę membraną;

**hidratacija** – cheminės reakcijos metu medžiagos susijungimas su vandeniu;

*in vivo* – procesas, vykstantis gyvame organizme;

**komplementas** – imuninės sistemos baltymų kompleksas;

**lameliškumas** – lipidinių dvisuoksnų kiekis liposomoje, darantis įtaką įkapsuliavimo efektyvumui ir vaisto išsiskyrimo kinetikai;

**monodispersinis** – kurių labai siauras dalelių dydžio pasiskirstymas;

**retikuloendotelinė sistema** – dabar vadinama mononuklearinių fagocitų sistema, organizmo imuninės sistemos dalis, sudaryta iš fagocituojančių ląstelių, esančių retikuliniame (tinkliniame) audinyje, atliekanti svarbų vaidmenį pašalinant tirpias medžiagas ir kitas daleles iš sisteminės kraujotakos;

**soliubilizuoti** – tirpinti naudojant paviršinio aktyvumo medžiagą;

**sonikavimas** – ardyimas ultragarsu;

**sterinis stabilizavimas** – procesas, kurio metu adsorbuotos nejoninės aktyviosios paviršiaus medžiagos arba polimerai sukuria stiprų atstūmimą dispersijoje tarp dalelių ir lašelių;

**supernatantas** – skystis, liekantis virš nuosėdų po nusodinimo, centrifugavimo ar kito proceso;

**teranostinis** – apjungiantis diagnostiką ir terapiją nanomedicinoje.

## IVADAS

Pastaraisiais keliais dešimtmečiais siekiant pagerinti vaistų pernešimo efektyvumą vis dažniau kuriami liposominės formuluotės vaistai. Liposomos – tai sferinės membraninės pūslelės, turinčios bent vieną fosfolipidų dvisluoksnį apie vandeningą šerdį ir gebančios talpinti savyje tiek hidrofobines, tiek hidrofilines medžiagas [13]. Šiame magistro darbe terminai: liposomos, lipidiniai nanonešikliai, lipidinės pūslelės ir lipidinės vezikulės, yra vartojami kaip sinonimai.

Daugeliu atvejų įrodyta, jog vaistinių preparatų liposominės farmacinės formos turi didesnę pranašumą įprastoms dozavimo formoms, kaip intraveninėms injekcijoms ar vietiniam vaistų vartojimo būdui [1, 3]. Visgi didžiąją liposominių preparatų rinkoje dalį sudaro parenteriniai vaistai, skirti selektyviai vėžio terapijai, antibiotikų ir priešgrybelinių vaistų pristatymui [53]. Vietiniam vartojimui tokių vaistų yra mažiau, o patvirtintų dermatologinių liposominių preparatų tėra tik vienetai [6].

Pagrindiniai vietinių liposominių farmacinių formų pranašumai kyla dėl jų įrodyto gebėjimo įterpti tiek vandenyje, tiek lipiduose tirpias vaistines medžiagas [4], sumažinti šalutinius poveikius, galinčius atsirasti dėl nepageidaujamos sisteminės absorbcijos [1], stabilizuoti nestabilias vaistines medžiagas jas įkapsuliuojant, pagerinti mažai vandenyje tirpių veikliųjų medžiagų biologinį prieinamumą [2], palengvinti junginių įsiskverbimą į gilesnius odos sluoksnius, sumažinti odos dirginimą, palaikant tolygų vaisto atpalaidavimą bei drėkinant epidermį [5]. Be to, pačios liposomos yra netoksiškos, biologiškai skaidžios [22], o pagrindinės jų membranų sudedamosios dalys yra panašios į mūsų organizmo ląstelių membranas.

Šio darbo tiriamoji medžiaga – adapalenas – vietinis retinoidas, skirtas aknės gydymui – gali sukelti tam tikrus šalutinius poveikius, kaip odos sudirginimą [79], tačiau liposominė adapaleno formuluotė galėtų padėti to išvengti. Rinkoje tokio preparato nėra, tad tai dar neišnaudota ir perspektyvi sritis kuriant dermatologinius vaistinius preparatus ir siekiant sumažinti pastarųjų šalutinių efektų riziką.

Šiame baigiamajame magistro darbe bus formuojamos skirtingų sudėčių liposomos, stebimi jų dydžio ir stabilumo pokyčiai priklausomai nuo laikymo sąlygų, kaip temperatūros ir laiko, tuomet į liposomas bus įterpiami kalceinas ir adapalenas ir stebimas jų atpalaidavimas, registruojant jų fluorescenciją.

## **DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI**

**Darbo tikslas:** suformuoti ir charakterizuoti liposomas, tinkamas vaistų pernešimui, bei panaudoti jas adapaleno, skirto aknės gydymui, įterpimui.

### **Darbo uždaviniai:**

1. Įvertinti skirtingos sudėties liposomų dydį ir stabilumą priklausomai nuo skirtingų laikymo sąlygų (laiko, temperatūros).
2. Nustatyti į liposomas įterpto fluorescuojančio dažo kalceino atpalaidavimą.
3. Įvertinti adapaleno įterpimą į liposomas, matuojant jo fluorescenciją.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Liposomos

Liposomos yra sferinės membraninės pūslelės, daugiausia sudarytos iš lipidų. Tai yra viena iš paprasčiausių lipidinių nanonešiklių grupių, formuojamų iš cholesterolio ir natūralių netoksiškų fosfolipidų [4]. Pirmąjį lipidinį nanonešiklį 1961 metais sukūrė britų hematologas dr. Alec'as D. Bangham'as, pastebėjęs, jog vandeninėje terpėje fosfolipidai geba formuoti uždarus pūsleles [7]. Bangham'o garbei šios uždarus sferinės pūslelės buvo pavadintos „bangasomomis“, tačiau 1968 m. mokslininkas G. Weissman'as pasiūlė tinkamesnį terminą – „liposomos“ [8].

Įprastai suformuotų lipidinių vezikulių dydis vandeniniame tirpale svyruoja nuo 25 nanometrų iki kelių mikrometrų. Lipidinės pūslelės yra skirstomos pagal dydį ir fosfolipidų dvisluoksnio skaičių apie skystą vandeninę šerdį:

- daugiasluoksnės pūslelės (angl. *multilamellar vesicles*). Šios pūslelės sudarytos iš kelių fosfolipidų dvisluoksnio sluoksnių, pūslelių skersmuo yra didesnis nei 0,5  $\mu\text{m}$ ;
- didelės vienasluoksnės pūslelės (angl. *large unilamellar vesicles*). Jos sudarytos iš vieno fosfolipidų dvisluoksnio sluoksnio, skersmuo yra didesnis nei 100 nm;
- mažos vienasluoksnės pūslelės (angl. *small unilamellar vesicles*). Sudarytos iš vieno fosfolipidų dvisluoksnio sluoksnio, jų skersmuo yra 20 nm – 100 nm [10].



daugiasluoksnės liposomos

> 0,5  $\mu\text{m}$

didelės vienasluoksnės  
liposomos

> 100 nm

mažos vienasluoksnės

liposomos

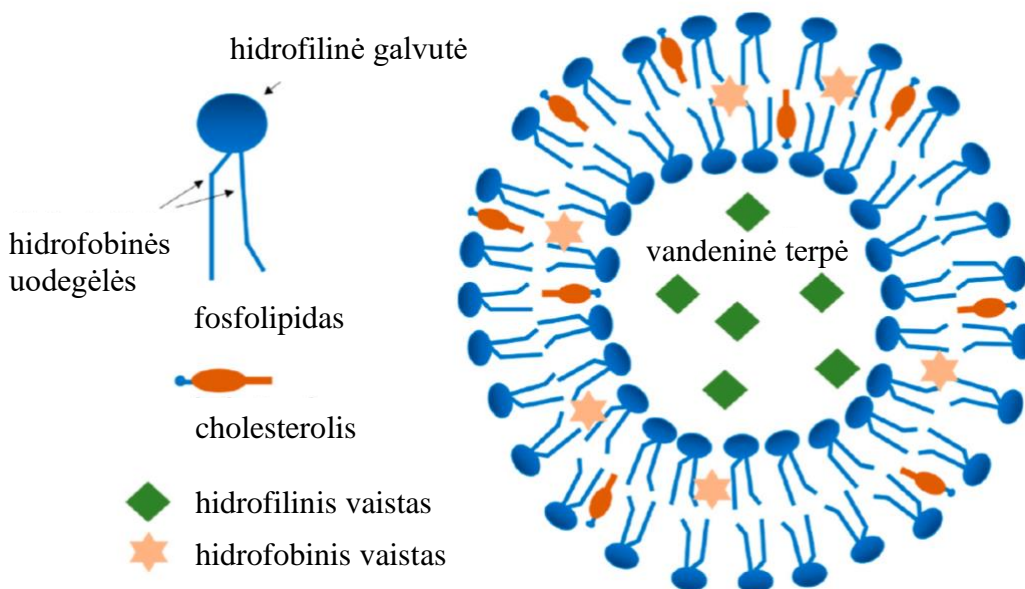
20 nm – 100 nm

1 pav. Lipidinių vezikulių klasifikacija pagal dydį ir fosfolipidų dvisluoksnio kiekį apie vandeninę šerdį. Pritaikyta pagal [11].

## 1.2. Liposomų struktūra

Struktūriškai liposomos yra sferinės pūslelės, kurių membraninis lipidų dvisluoksnis gaubia centre esančią vandeninę terpę. Įprastai dvisluoksnę lipidinę membraną sudaro fosfolipidai, turintys hidrofilinę galvutę ir hidrofobines uodegėles [13]. Į liposomos viduje esančią vandeninę terpę yra talpinamos vandenyje tirpios – hidrofilinės – vaistinės medžiagos, o hidrofobinės, kitaip tariant, riebaluose tirpios – lipofilinės – vaistinės medžiagos įsiterpia į liposomos fosfolipidų dvisluoksnio vidų (2 pav.).

Dėl skirtingo dydžio ir fosfolipidų dvisluoksnio kiekio liposomos yra pritaikytos pernešti specifines vaistines medžiagas, pavyzdžiui, daugiasluoksnės liposomos naudingiausios įterpti lipofilinius vaistus dėl turimo didelio fosfolipidų dvisluoksnio kiekio. Tuo tarpu didelės vienasluoksnės liposomos turi talpią vidinę vandeninę terpę, tinkamą pernešti hidrofilines vaistines medžiagas [14, 19].



2 pav. Į lipidinį nanonešiklį įterptų hidrofilinių ir hidrofobinių vaistinių medžiagų struktūrinis vaizdavimas. Pritaikyta pagal [9].

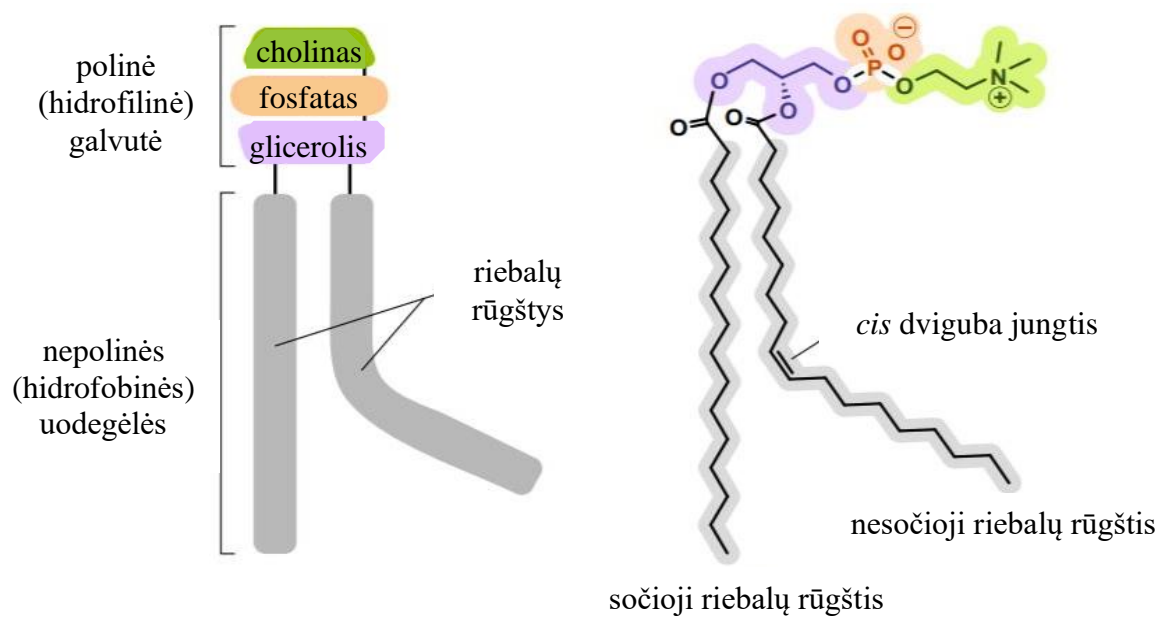
## 1.3. Liposomų sudėtis

Lipidinės vezikulės įprastai gaminamos iš įvairių fosfolipidų, kurių cheminės savybės ir lemia pačių liposomų savybes, bei pridedama kitų medžiagų, kaip cholesterolio ar paviršiaus aktyvumo medžiagų (PAM). Dažniausiai naudojami fosfolipidai yra: fosfatidilglicerolis (PG),

fosfatidilcholiną (PC), fosfatidiletanolaminą (PE), fosfatidilseriną (PS), sfingomieliną (SM) [15]. Būtent neutralų krūvį turintis fosfatidilcholiną yra pagrindinė liposomų membranų sudedamoji dalis daugelyje liposominių vaistinių preparatų [67]. Populiariausios paviršiaus aktyvumo medžiagos – tai natrio cholatas, SPAN 60, SPAN 80, Tween 60 ir Tween 80. Šios medžiagos plačiai naudojamos liposomose, siekiant pagerinti įkapsuliuotų vaistinių medžiagų prasiskverbimą pro odą [16].

## Fosfolipidai

Liposomų pagrindinė sudedamoji dalis yra amfifilinių savybių turintys fosfolipidai, kurių galvutės yra hidrofilinės, o uodegėlės sudarytos iš ilgų hidrofobinių riebalų rūgščių molekulių. Polinė hidrofilinė galvutė sudaryta iš fosfato grupės, prie jo prijungto glicerolio ir polinės grupės [19].

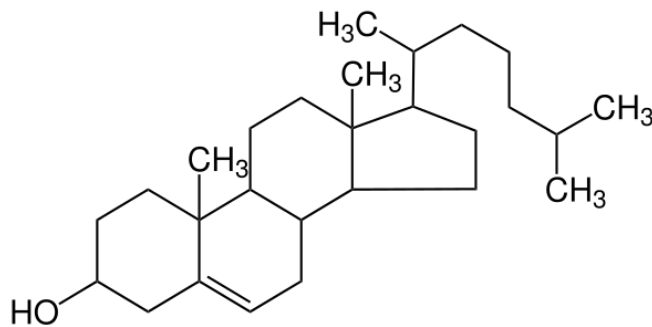


3 pav. Fosfatidilcholino struktūra. Pritaikyta pagal [18].

Liposomų membranoje fosfolipidai išsidėsto dvisluoksniėje struktūroje – hidrofilinės galvutės atsisuka į vandeninę pūslelės šerdį, o vieno sluoksnio riebalų rūgščių uodegėlės – priešingai į kito sluoksnio riebalų rūgščių uodegėles [19]. Taip fosfolipidai savaime suformuoja uždaras dvisluoksnes pūsleles, kurių centre yra vandeninė šerdis. Fosfolipidų kiekis nulemia ir lipidinės vezikulės dydį bei vaisto įterpimo efektyvumą [20]. Priklausomai nuo lipido riebalų rūgščių acilo grandinės ilgio ir lipido struktūros, kiekvienas lipidinis dvisluoksnis yra 3-6 nm storio [67].

Nuo liposomų sudėtyje esančių skirtingų fosfolipidų priklauso ir lipidinių pūslelių fizikocheminės savybės – būtent stabilumas ir laidumas – liposomų sudėtyje esantys nesotieji fosfatidilcholino natūralūs junginiai, kaip kiaušinių ar sojų pupelių fosfatidilcholinai, suteikia liposomų membranoms didesnę pralaidumą, tačiau mažesnę stabilumą. Naudojant sočiuosius fosfolipidus su ilgomis acilo grandinėmis, pavyzdžiui, dipalmitoilfosfatidilcholiną (DPPC), kurio dvi palmitino rūgšties grandinės sudarytos iš po 16 anglies atomų, liposomų membranos bus tvirtesnės ir stabilesnės su beveik nepralaidžiu fosfolipidų dvisluoksniu [13, 41].

### Cholesterolis



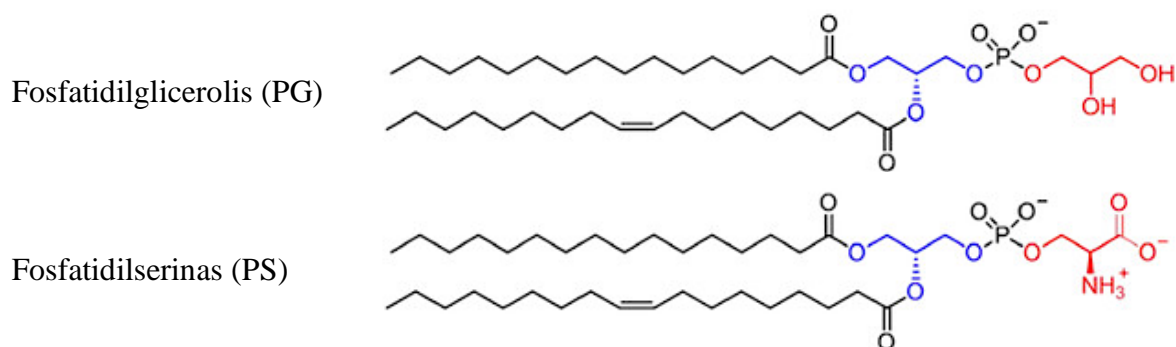
4 pav. Cholesterolio molekulės struktūra [12].

Cholesterolis yra dažniausiai naudojamas sterolis liposomų formuluotėse, galintis užkirsti kelią liposomų agregacijai ir pagerinti liposomų membranos stabilumą [13]. Jis yra ir vienas svarbiausių žinduolių ląstelių plazminės membranos struktūrinių komponentų. Be to, cholesterolio kiekis membranose turi įtakos vaisto įterpimo efektyvumui. Didžiausias poveikis stabilizuojant liposomų membranas stebimas lipidų sudėtyje esant apie 30 – 33 mol% cholesterolio [17, 67]. Be to, į fosfolipidų dvisluoksniu membraną įterptas cholesterolis padidina atskirtį tarp fosfolipidų cholino galvučių grupių ir sumažina vandenilinių jungčių bei elektrostatinę sąveikų stiprumą [15], todėl fosfolipidų dvisluoksniu tampa stabilesnis, mažiau linkęs absorbuoti išorines nanodaleles, sumažėja dvisluoksniu pralaidumas vandeniui. Šis mechaninio standumo padidėjimas yra svarbus liposomos stabilumui ir sumažina sąveiką su serumo baltymais [67], tokiais kaip transferinas, albuminas, taip pat su didelio tankio lipoproteinais, tokiu būdu išvengiant ir galimo jų veikimo sumažėjimo [41]. Dar viena iš cholesterolio funkcijų yra padidinti temperatūros intervalą, reikalingą išlaikyti skystakristalinei lipidų membranos būsenai. Į membraną įterptas cholesterolis sumažina pastarosios takumą, neleidžia fosfolipidams suartėti vieniems su kitais, formuojant kristalinę kietą būseną [21].



## Paviršiaus krūvis

Priklausomai nuo lipidų sudėties ir lipidų galvutės grupės, liposomos gali turėti neigiamą, neutralų arba teigiamą grynąjį krūvį. Bendras grynasis dalelių krūvis paprastai išreiškiamas paviršiaus, arba zeta, potencialu. Liposomos, neturinčios krūvio, yra labiau linkusios agreguotis nei turinčios krūvį [67]. Tirpale esant fiziologiniam pH 7,4 terapinės liposomos, sudarytos iš SM, PC arba PE, turi neutralų grynąjį krūvį, o PG ir PS turi neigiamą grynąjį krūvį (5 pav.).



5 pav. Fosfolipidų (fosfatidilglicerolio ir fosfatidilserino) cheminė struktūra (mėlyna – glicerolis, raudona – alkoholis) ir jų neigiamas krūvis esant fiziologinei pH vertei. Pritaikyta pagal [68].

Paviršiaus krūvis gali turėti įtakos dalelės stabilumui, farmakokinetikai, biopasiskirstymui. Patekusios į kraujotaką, neigiamo krūvio liposomos yra opsonizuojamos – surišamos su baltymais opsoniniais – jas gali atpažinti receptoriai, esantys įvairiose ląstelėse [67]. O turinčios grynąjį teigiamą krūvį – katijoninės – liposomos, yra linkusios sąveikauti su serumo baltymais, kurie gali sukelti komplementų aktyvavimą. Kai kuriais atvejais šis procesas taip pat gali sustiprinti pasisavinimą retikuloendotelinės sistemos ir būti pašalintos plaučių, kepenų ar blužnies [84].

## 1.4. Liposomų privalumai ir trūkumai

### Privalumai

- Liposomos yra biologiškai inertiškos, netoksiškos, nes sudarytos iš natūralių fosfolipidų, kurių struktūra kaip ir mūsų epidermio [22].
- Į liposomas galima įterpti tiek hidrofiliškas, tiek lipofiliškas vaistines medžiagas. Lipofilinius junginius galima soliubilizuoti ir juos švirkšti į veną [4, 23].

- Į liposomas įterpus vaistines medžiagas, gali būti sumažinami šalutiniai poveikiai organizmui – mažinamas toksiškumas – taip padidinamas terapinis indeksas [39, 67]. Liposominio priešvėžinio vaisto doksorubicino Myocet® atveju yra susilpninamas kardiotoksinis poveikis širdžiai mažinant vaisto kaupimąsi miokarde [30].
- Veikliosios medžiagos įterpimas į liposomas gali padidinti jos stabilumą ir skvarbą į odos sluoksnius [5, 29].
- Užtikrinamas lėtas vaistinės medžiagos atpalaidavimas ir ilgas veikimas. Modifikuojant liposomas su PEG, galima keisti į organizmą patenkančių vaistinių medžiagų farmakokinetiką, dėl ko pailgėja pusinis laikas sisteminėje kraujotakoje [25], padidinamas vaisto bioprieinamumas [67] ir pasiekiamas reikiamas gydomas poveikis.
- Į liposomas įterpus antimikrobinius preparatus, veiklioji medžiaga gali būti apsaugoma nuo fermentų skaidymo. Tokie antibiotikai, kaip penicilinai ar cefalosporinai, yra jautrūs  $\beta$ -laktamazės hidrolizuojančiam poveikiui, todėl pastaruosius įterpus į liposomas, šio nepageidaujamo fermento veikimo galima išvengti [24].
- Liposomų paviršiai gali būti lengvai modifikuojami, siekiant kryptingo ir selektyvaus vaistinių medžiagų tiekimo, ypač jų preparatus sušvirkščius parenteraliai. Liposomų paviršinis sluoksnis gali būti padengiamas PEG (liposominis pegilintas doksorubicinas Doxil®) [26], įterpiami specifiniai ligandai ar skvarbą gerinančios medžiagos [27, 28].
- Galimybė tiekti vaistines medžiagas į ląstelių vidų dėl vykstančios liposomų endocitozės [31]. Keliuose tyrimuose buvo pranešta ir apie liposomas, galinčias tiekti įkapsuliuotus junginius tiesiai į citozolį membranos suliejimo būdu, ne vien per endocitotinius kelius [32, 33].

## **Trūkumai**

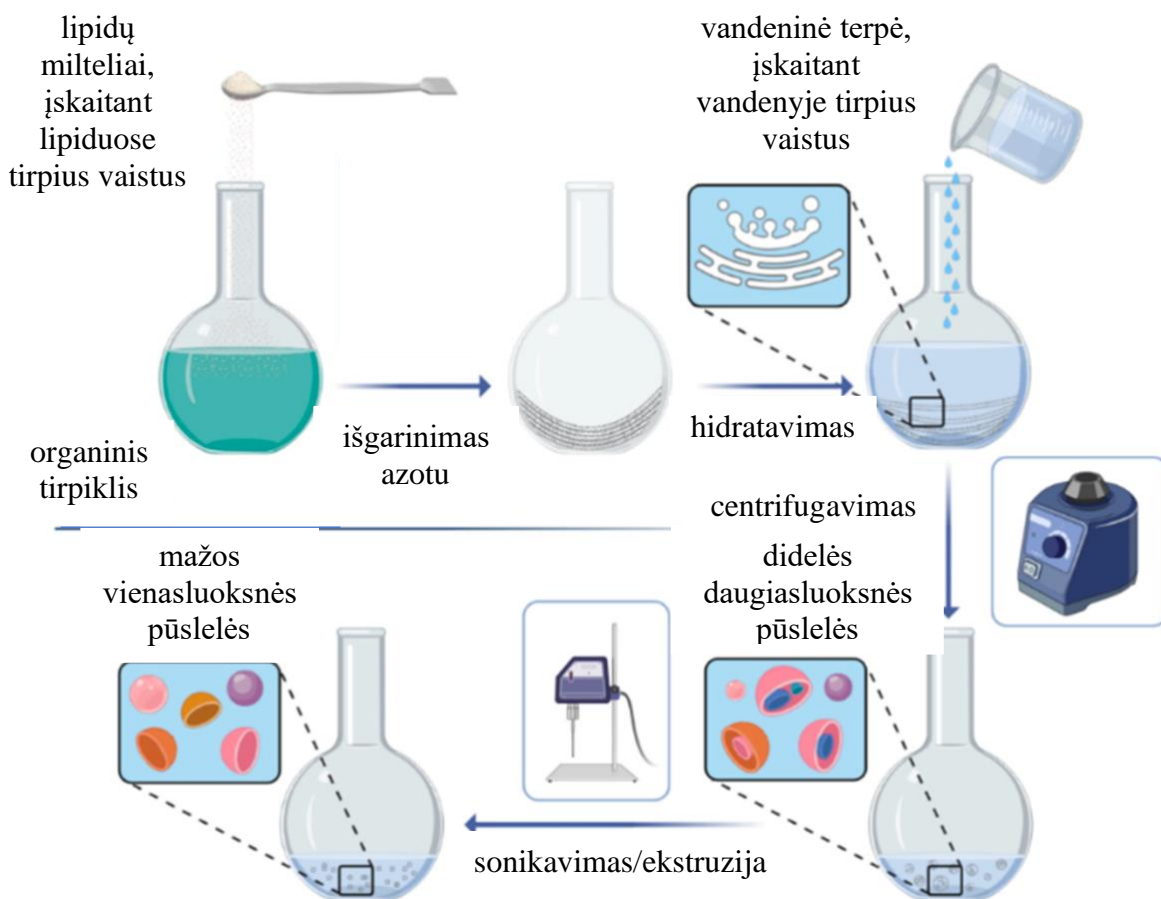
- Brangus gamybos procesas, reikalauja specialių laikymo sąlygų, kaip pvz., žemų temperatūrų, inertinės atmosferos [34, 35, 38].
- Dvisluoksnės membranos fosfolipidai gali oksiduotis ar hidrolizuotis [19, 34, 35], kas gali padidinti membranos pralaidumą ir neigiamai paveikti liposomos stabilumą.
- Liposominės membranos gali neigiamai sąveikauti su paciento kūno baltymais ir skatinti imuninės sistemos atsaką [39].
- Trumpas liposominių vaistų pusinės eliminacijos laikas dėl patekimo į RES sistemą [34, 35].

- Įkapsuliuoti vaistai gali pratekėti nepasiekę taikinio [34, 36].
- Galimas ABC fenomenas, sukeltas PEG modifikuotų liposomų [37].
- Liposomos gali tapti toksiškos, jei suveiks ne taikinio vietoje. Tam tikri chemoterapiniai vaistai, kaip liposominis pegilintas doksorubicinas (Doxil®), gali sukelti dermatologinę toksiinę reakciją – delnų ir padų eritrodizesteziją [40].

## **1.5. Liposomų gamybos metodai**

Pagrindiniai tikslai formuojant lipidines vezikules yra: norimo lameliškumo stabilių monodispersinių dalelių suformavimas, efektyvus vaisto įkapsuliuojimas į liposomas ir kuo ilgesnis produkto išsilaikymas [41]. Įprastai lipidinių nanonešiklių gamyba apima šiuos pagrindinius etapus (6 pav.):

- Lipidų tirpinimas organiniame tirpiklyje;
- Gautų lipidų mišinio džiovinimas iš organinio tirpiklio;
- Lipidų dispersija vandeninėje terpėje;
- Liposomų dydžio ir / ar lameliškumo sumažinimas;
- Galutinio produkto analizė [36, 41].



6 pav. Laboratorinė liposomų formavimo technologija. Po išgarinimo azotu susidaro lipidinė plėvelė, kuri vėliau drėkinama vandeniniu tirpikliu, dažniausiai buferiu. Susidariusios lipidinės pūslelės yra skirtingo dydžio ir daugiasluoksnės, o vėliau apdorojus ultragarsu ir / ar ekstruzija, pasiekiamos norimos liposomų savybės. Pritaikyta pagal [42].

Vienas pagrindinių veiksnių, darančių įtaką liposomų veikimui *in vivo*, yra jų dydis [16]. Anksčiau atliktas tyrimas [43] parodė, kad liposomos, kurių skersmuo yra didesnis nei 0,1  $\mu\text{m}$ , yra greičiau opsonizuojamos, taigi greičiau pašalinamos retikuloendotelinės sistemos. Lipidinių pūslelių dydis taip pat keičia ir jų pasiskirstymą organizme. Todėl siekiant pailginti liposomų cirkuliacijos laiką, sumažinant ir suvienodinant jų dydį, yra naudojami tokie metodai, kaip sonikavimas ultragarsu, ekstruzija ir homogenizavimas. Iš jų ekstruzija turi keletą pranašumų: liposomos gaunamos santykinai vienodo dydžio, procesas yra greitas ir pakankamai švelnus [44, 45].

Liposomų gamyboje ir pritaikyme vaistų pernašai itin svarbus parametras yra fosfolipidų fazinė virsmo temperatūra ( $T_m$ ), virš kurios fosfolipidai egzistuoja skystakristalinėje formoje. Būtent šioje netvarkingoje būsenoje judrios fosfolipidų hidrofobinės

grandinės sudaro lanksčias dvisluoksnes liposomų membranas [19]. Žemiau fazinės virsmo temperatūros fosfolipidai yra išsidėstę termodinamiškai stabiliausioje kristalinėje (arba gelinėje) būsenoje – tvarkingai susispaudę, netinkami formuoti dvisluoksnę membraną [42, 67]. Esant  $T_m$ , abi fazinės būsenos egzistuoja lygiomis proporcijomis. Būtent šioje temperatūroje stebimas didžiausias pratekėjimas pro liposomos membraną.  $T_m$  dar kartais vadinama ir lipidų lydymosi temperatūra [67]. Liposomų membranos fazinė būsena lemia pastarosios pralaidumą, agregaciją, prisijungimą prie baltymų ir kartais liposomų susiliejimą. Pavyzdžiui, serumo baltymų prisijungimas gali turėti įtakos fazių pasikeitimui ir dėl tos priežasties priešlaikiniam vaisto, esančio liposomos vandeninėje terpėje, išsiskyrimo greičiui. Anksčiau minėto cholesterolio įtraukimas į fosfolipidų dvisluoksnį gali sumažinti membranos takumą ir išplėsti temperatūros diapazoną, kuriame lipidų membrana keičia fazes [67]. Taigi, kuriant lipidines vaistų pernešimo sistemas, itin svarbu yra atsižvelgti į tinkamas lipidų kompozicijas, užtikrinančias membranos takumą, o kadangi lipidų mišiniai gali turėti kelias pereinamąsias temperatūras, būtina nustatyti tinkamą temperatūrą naudojant daugiakomponenčius lipidų mišinius.

## **1.6. Vaistų pernaša naudojant liposomas**

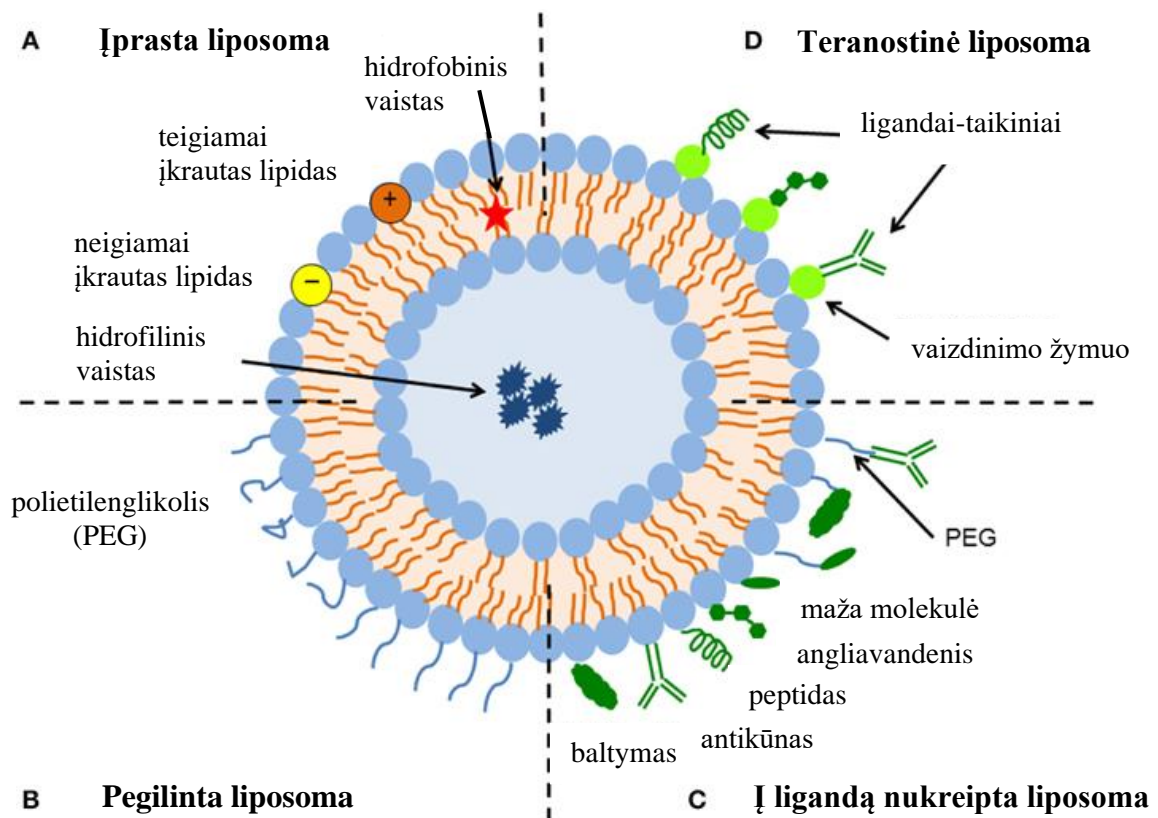
Modernios vaistų pernašos sistemos yra polimerinės arba lipidinės nešiklių sistemos, transportuojančios vaistus į jų taikinius ar receptorių vietas taip, jog būtų pagerintas veikliosios medžiagos veiksmingumas, saugumas, užkertamas kelias vaistinės medžiagos praradimui pernašos į tikslinę vietą metu, kontroliuojant vaisto išsiskyrimo organizme greitį, laiką ir vietą [66]. Liposomos yra labiausiai paplitę ir gerai ištirti nanonešikliai, skirti tikslinei vaistų pernašai. Būtent galimybė pernešti ir hidrofobinius, ir hidrofilinius junginius pavertę liposomas viena iš mėgstamiausių mokslinių tyrimų temų vaistų nešiklių tyrimuose [67]. Liposominės vaistų formulotės leidžia efektyviai pristatyti įkapsuliuotus junginius į tikslines vietas, tuo pat sumažinant sisteminį toksiškumą [69]. Veikliosios medžiagos įkapsuliavimas į liposomas apsaugo junginius nuo ankstyvos inaktyvacijos, skilimo ir praskiedimo kraujotakoje [71].

### **PEG liekaną turinčios liposomos**

Adsorbicija į plazmos baltymus, atpažinimas ir fagocitozė retikuloendotelinės sistemos – esminiai veiksniai, trumpinantys liposomų cirkuliacijos laiką kraujyje [84]. Siekiant sukurti ilgai kraujotakoje cirkuliuojančias liposomas, jų paviršius modifikuojamas su hidrofilinėmis medžiagomis. Plačiausiai naudojamas yra hidrofilinis polimeras – polietilenglikolis (PEG), o

procesas vadinamas pegiliniu. Tyrimais įrodyta, kad PEG liekaną turinčios (pegilintos) liposomos gali veiksmingai sumažinti adsorbciją į plazmos baltymus (opsonizaciją) ir kur kas pailginti cirkuliacijos laiką, lyginant su PEG liekaną neturinčiomis liposomomis. Pegilinimas padeda sumažinti lipidinės dalelės krūvio tankį ir sukurti sterišką barjerą, apsaugantį liposomą nuo sąveikos su RES sistemos ląstelėmis bei nuo tarpusavio liposomų susiliejinimo [85]. Be to, pegilintos liposomos rodo didesnę stabilumą lyginant su nepegilintomis [86, 87].

Pegilinti liposominiai vaistiniai preparatai plačiai naudojami vėžio gydymo terapijoje. Liposominiai preparatai gali užtikrinti didesnę veiksmingumą ir (ar) sumažinti priešvėžinių medžiagų toksiškumą. Tokios nuo RES sistemos poveikio apsaugotos liposomos vadinamos steriškai stabilizuotomis arba „slaptomis“ (angl. *stealth*) liposomomis [67] (7 pav.).



7 pav. Schematinis skirtingų tipų liposominių vaistų pernašos sistemų atvaizdavimas. **A) Įprasta liposoma** – liposomos susideda iš lipidų dvilauksnio, kurį gali sudaryti katijoniniai, anijoniniai arba neutralūs fosfolipidai ir cholesterolis, apsupantys vandeninę šerdį. Hidrofobiniai ar hidrofiliniai junginiai išsidėstę atitinkamai lipidų dvilauksnyje arba vandeninėje erdvėje. **B) PEG liekaną turinti liposoma** – liposomų savybės ir veikimas *in vivo*

gali būti modifikuojami liposomos paviršių padengiant hidrofiline polimerine danga – PEG, siekiant užtikrinti sterinį stabilizavimą. **C) Į ligandą nukreipta liposoma** – liposomos gali būti panaudojamos taikinių terapijai, prijungiant ligandus (pvz., antikūnus, peptidus ar angliavandenius) prie jos paviršiaus arba prie galinio prijungtų PEG grandinių galo. **D) Teranostinė liposoma** – kombinacija nanodalelės, ligando-taikinio, vaizdinimo žymens ir terapinio komponento. Pritaikyta pagal [69].

Sterinis stabilizavimas daro didelę įtaką liposomų farmakokinetikai – jų pusinės eliminacijos laikas žmogaus organizme gali pasiekti net 45 valandas, priklausomai nuo dalelių dydžio ir polimerinės dangos charakteristikų [69]. Vėžio gydymo terapijoje įrodyta, jog pegilintos liposomos geba prasiskverbti pro pakitusias ir dažnai pažeistas naviko kraujagysles bei pasiskirstyti navikiniame audinyje [70]. Pegilintos liposomos gerokai padidino priešvėžinio vaisto doksorubicino pusinės eliminacijos laiką plazmoje, kas sudarė prielaidą sukurti liposominį doksorubicino preparatą Doxil<sup>®</sup> [67].

## 1.7. Liposominiai vaistai rinkoje

Nuo liposomų atradimo praėjo beveik 35 metai, kol jos buvo kliniškai pritaikytos vaistų pernašai. 1995 m. JAV Maisto ir vaistų administracija (FDA) patvirtino pirmąjį liposominį vaistinių preparatą Doxil<sup>®</sup> (pegilintą į liposomas įkapsuliuotą doksorubiciną) kaip tikslinį nešiklį kiaušidžių vėžio ir Kapoši sarkomos gydymui [67]. Buvo pranešta, jog šis preparatas gali apsaugoti pacientus nuo kardiotoksinio antraciklinų poveikio bei pagerinti veikliosios medžiagos doksorubicino kiekį Kapoši sarkomos audiniuose iki 22 kartų, lyginant su sveikais odos audiniais [70].

Kaip pavaizduota 1 lentelėje, žmonėms vartoti yra patvirtinta 14 liposominės formulotės vaistinių preparatų. Dar apie 9 lipidų pagrindu kuriamų vaistų yra II/III klinikinėse fazėse [67].

1 lentelė. Tarptautinėje rinkoje patvirtintų liposominių vaistinių preparatų sąrašas. Pažymėtina, kad į sąrašą neįtraukti generiniai vaistai, lipidiniai kompleksai (pvz., Abelcet<sup>®</sup>, Amphotec<sup>®</sup> ir Onpattro<sup>®</sup>) ir Europoje nacionaliniu mastu leistini liposominiai produktai. Doxil<sup>®</sup> buvo pirmasis liposominis produktas, kurį FDA patvirtino 1995 m. Iš šių rinkoje esančių preparatų 43% jų buvo patvirtinti iki 2000 metų, o 57% – iki 2010 metų. Daugiausia

dėmesio skiriama vėžio terapijai, bet apimamos ir kitos sritys, kaip infekcinės ligos, anestezija, vakcinos, plaučių ligos ir fotodinaminė terapija. Pritaikyta pagal [53, 67].

<b>Preparato pavadinimas</b>	<b>Veikloji medžiaga</b>	<b>Patvirtinimo metai/vieta</b>	<b>Vartojimo būdas</b>	<b>Indikacijos</b>
<i>Priešvėžiniai</i>				
<b>Doxil</b>	Doksorubicino	1995, JAV	IV	Kiaušidžių vėžys,
<b>Caelyx</b>	hidrochloridas (DOX•HCL)	1996, ES		Kapoši sarkoma, mieloidinė melanoma
<b>DaunoXome</b>	Daunorubicinas	1996, JAV	IV	Kapoši sarkoma
<b>DepoCyt</b>	Citarabinas	1999, JAV	IT	Limfomatinis
<b>DepoCyte</b>		2001, ES		meningitas
<b>Myocet</b>	DOX•HCL	2000, ES 2000, JAV	IV	Krūties vėžys
<b>Mepact</b>	Mifamurtidas	2009, ES	IV	Osteosarkoma
<b>Marqibo</b>	Vinkristino sulfatas	2012, JAV	IV	Leukemija
<b>Onivyde</b>	Irinotekano hidrochlorido trihidratas	2015, JAV 2016, ES	IV	Kasos adenokarcinoma
<b>Vyxeos</b>	Daunorubicinas, citarabinas	2017, JAV 2018, ES	IV	Leukemija
<i>Priešgrybeliniai</i>				
<b>AmBisome</b>	Amfotericinas B	1997, JAV	IV	Sisteminė grybelinė infekcija
<i>Vakcinos</i>				
<b>Shingrix</b>	Varicella-zoster viruso glikoproteino E antigenas su adjuvantu	2018, ES	IM	Juostinės pūslelinės ir poherpetinės neuralgijos profilaktika
<i>Analgetikai</i>				



<b>DepoDur</b>	Morfinas	2004, JAV	Epidurinis	Pooperacinis skausmas
<b>Exparel</b>	Bupivakainas	2011, JAV 2020, ES	Švirkštimas vietiškai	Pooperacinė analgezija
<i>Kiti</i>				
<b>Visudyne</b>	Verteporfinas	2000, ES	IV	Amžinė makulos degeneracija
<b>Arikayce</b>	Amikacino sulfatas	2018, JAV 2020, ES	Įkvėpimas pro burną	Plaučių infekcija

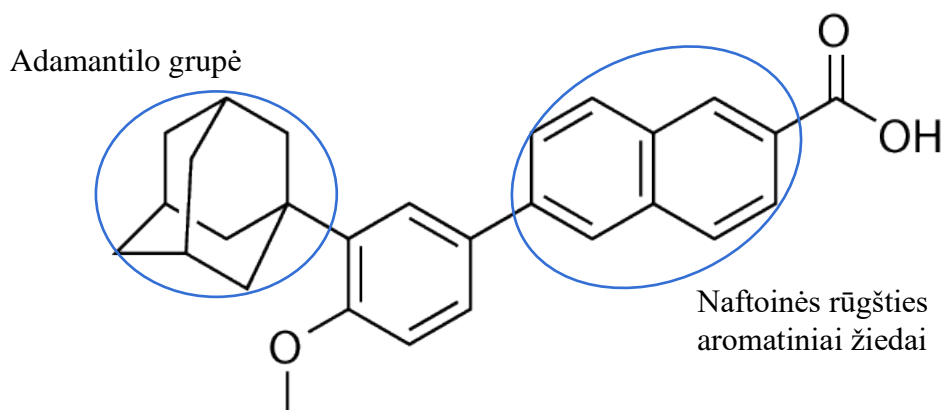
## 1.8. Aknė

Aknė yra odos būklė, dėl kurios atsiranda spuogų [72]. Tai daugiafaktorinė, lėtinė, uždegiminė liga, apimanti pilosebacinį vienetą – riebalinę liauką bei plauko folikulą. Riebalinių liaukų užsikimšimas ir kolonizacija *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) bakterijomis sukelia spuogus [73, 75]. Aknė labiausiai paplitusi paauglystės laikotarpiu, bet pastaruoju metu pasireiškianti ir suaugusiems, praėjusiems lytinį brendimą – tokia aknė vadinama vėlyvąja [74].

Tinkamam ir efektyviam aknės gydymui svarbu įvertinti spuogų sunkumą. Aknė gali būti klasifikuojama į lengvą, vidutinio sunkumo arba sunkią, atsižvelgiant į odos pažeidimų skaičių ir tipą [75]. Spuogų gydymas turi būti pradėtas kuo anksčiau, siekiant sumažinti randų ir neigiamo psichologinio efekto riziką. Gydymas turi būti individualus – pritaikytas konkrečiam pacientui, spuogų tipui, sunkumui bei paciento galimybėms ir preparato toleravimui [73, 75]. Esant lengvo ar vidutinio sunkumo spuogams bei palaikomajam gydymui skiriami vietiniai retinoidai, kaip adapalenas ir tretinoinas. Šie užkerta kelią komedonų susidarymui, mažina esamus komedonus ir veikia priešuždegimiškai. Vietiniai antibiotikai, kaip klindamicinas ir eritromicinas, dažniausiai naudojami lengvo ar vidutinio sunkumo uždegiminei aknei gydyti. Nors jie naudojami ir kaip monoterapija, bet efektyvesni kombinuojant su retinoidais. Sunkios formos spuogams, kuriems kitas gydymas nebepadeda, skiriamas geriamasis izotretinoinas [76].

## 1.9. Adapalenas

Adapalenas yra sintetinis naftoinės rūgšties darinys, pasižymintis retinoidiniu aktyvumu [78], chemiškai neaktyvus, atsparus deguonies ir šviesos poveikiui [79]. Cheminis pavadinimas – 6-[3-(1-adamantil)-4-metoksifenil]-2-naftoinė rūgštis.



8 pav. Adapaleno struktūra. Fenoksi adamantilo grupė yra lipofiliška, leidžianti giliai prasiskverbti į odos poras. Naftoinės rūgšties aromatiniai žiedai suteikia atsparumo šviesos ir deguonies poveikiui. Pritaikyta pagal [77].

Adapalenas vartojamas vietiniam lengvo ar vidutinio sunkumo aknės gydymui [80]. Jis selektyviai jungiasi prie retinoinės rūgšties receptorių ir gali moduluoti genų transaktyvaciją bei genų ekspresiją žmogaus keratinocituose. Taigi, jis gali reguliuoti šių ląstelių, esančių spuogų priežastimi, dauginimąsi ir diferenciaciją, yra sukeliama komedolitinis poveikis [77]. Kai kurie adapaleno biologiniai veikimo mechanizmai yra tokie patys kaip ir kito retinoido – tretinoino – tačiau adapalenas yra chemiškai stabilesnis ir lipofiliškesnis. Tokiu būdu jis gali pasiekti didesnę koncentraciją pilosebaciniam vienete (riebalinėje liaukoje ir plauko folikule) [78].

Lietuvos rinkoje yra šie adapaleno preparatai: Differin<sup>®</sup> gelio arba kremo pavidalu ir Epiduo<sup>®</sup> gelis. Šios formuluotės gali sukelti tam tikrų vartojimo problemų, kaip odos paraudimą, sausumą, niežėjimą [79] – padidinamas odos jautrumas. Liposominės formos adapalenas galėtų sumažinti šalutinius poveikius, nes veiklioji medžiaga būtų nukreipta tiesiai į pilosebacinį vieneta [81]. Literatūroje galima rasti tik keletą atliktų tyrimų su liposominiu adapalenu [81, 82], taip pat kombinacijoje su benzoilo peroksidu [83], todėl tai perspektyvi sritis eksperimentiniams tyrimams.

## 1.10. Liposomų įkapsuliavimo efektyvumo įvertinimo metodai

Vaisto įkapsuliavimo efektyvumas apibrėžiamas kaip vaisto kiekis, esantis sėkmingai įterptas į lipidinę vezikulę. Įprastai įterpimo efektyvumas matuojamas procentais, lyginant vaistinės medžiagos kiekį, esantį liposomose, su pradiniu kiekiu, naudotu gamyboje [62]. Liposominių vaistinių preparatų kokybės kontrolei itin svarbus yra liposomų išgryninimas, atskiriant ar pašalinant neįkapsuliuotus į lipidinę pūslelę vaistus. Tam naudojamos kelios pagrindinės technikos, kaip fluorescencijos metodai, dializė bei centrifugavimas [64].

### Fluorescencijos spektroskopija

Vienas plačiausiai naudojamų metodų – fluorescencijos spektroskopija – leidžia stebėti tiek lipidinių membranų pažeidimus, dėl kurių įterpta vaistinė medžiaga išsiskiria į aplinką ir sukelia fluorescencijos pokyčius, tiek galima nustatyti įterpto vaisto kiekį suardžius lipidinį dvisluoksnį detergentu.

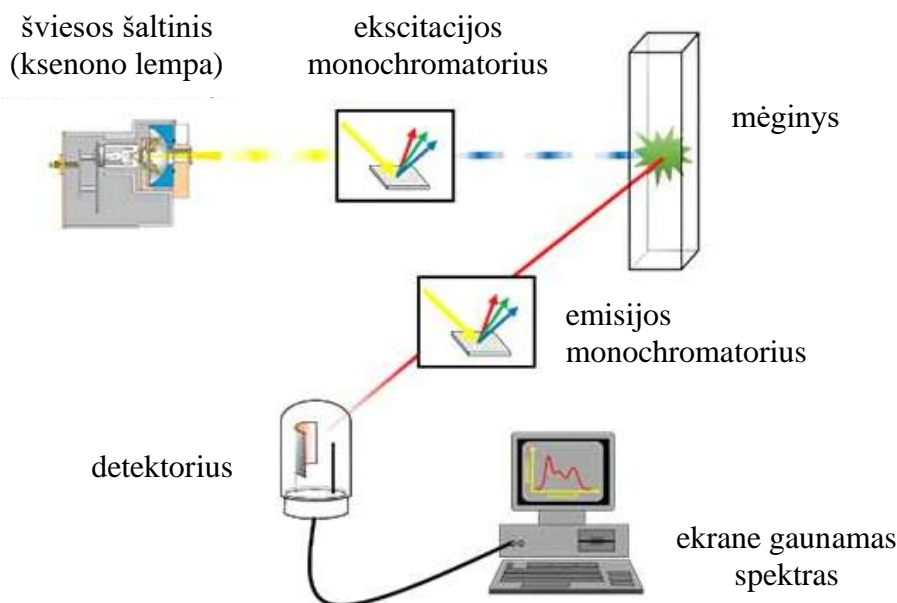
Fluorescencijos spektroskopijos metodo metu mėginys yra apšviečiamas monochromatine šviesa (įprastai ultravioletine arba regimąja), kurią mėginio junginiai gali sugerti (9 pav.). Kai mėginio molekulė sugeria šviesos kvantą, ji yra sužadinama ir iš savo pagrindinės būsenos peršoka į aukštesnę elektroninę būseną. Kadangi sužadintoje būsenoje molekulė būna nestabili, ji grįžta į pradinę būseną, o gauta energija išspinduliuojama kaip fotonas, todėl molekulė fluorescuoja – įvyksta fluorescencija. Sugerties spektroskopija gaunama, kuomet fotonas yra sugeriamas, o emisijos spektroskopija – kai jis išspinduliuojamas [56, 61].

Skirtingos molekulės šviesą sugeria skirtinguose bangos ilgiuose, tad norint gauti fluorescencijos spektrą, molekulę reikia sužadinti tokio bangos ilgio šviesa, kuri sugerinama geriausiai visame emisijos intervale [63]. Fluorescencijos spektras yra fluorescencijos intensyvumo kaip bangos ilgio funkcijos grafikas [61].

Pagrindinį vaidmenį fluorescencijos spektroskopijoje atlieka fluoroforai. Tai yra molekulių komponentai, sukeliantys jų fluorescenciją. Įprastai fluoroforas yra molekulė, turinti aromatinių žiedų, tokių kaip tirozinas, triptofanas, fluoresceinas ir kt. [56]. Kiekvienas fluoroforas turi sau būdingas savybes, kaip fluorescencijos trukmė, intensyvumas, emisijos bangos ilgio padėtis, todėl kiekvienas fluoroforas duoda unikalų fluorescencijos spektrą [55].

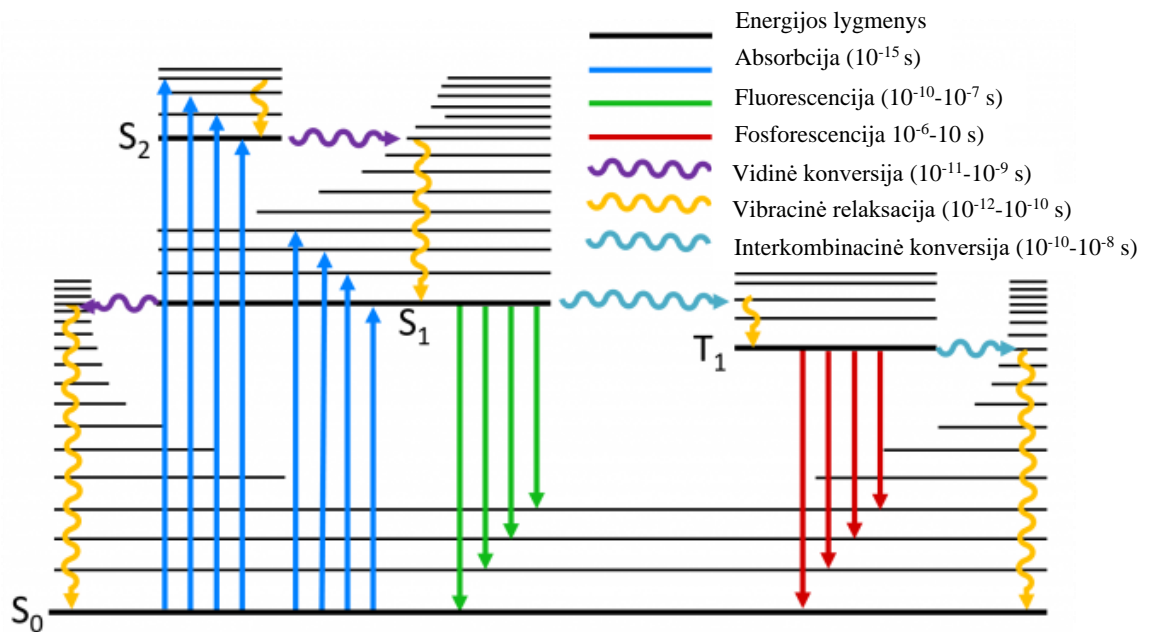
Taigi, iš fluorescencijos spektroskopijos galime sužinoti naudingos informacijos apie tiriamo mėginio sudėtį ir struktūrą.

Emisija paprastai yra jautresnė ir selektyvesnė, nes naudojant atitinkamą sužadavimo bangos ilgį, galima aptikti kiekvieną atskirą fluoroforą, todėl gaunamas tinkamas analizės metodas daugiakomponentei analizei [55].



9 pav. Fluorescenciniame spektrofotometre mėginys apšviečiamas monochromatine šviesa tokia energija, kurią mėginio junginiai gali sugerti. Mėginys išsklaido šviesą visomis kryptimis. Detektorius paprastai nustatomas  $90^\circ$  kampu šviesos šaltinio atžvilgiu, kad būtų išvengta bet kokių trukdžių iš perduodamos sužadavimo šviesos. Detektoriaus sistema analizuoja sklaidžiamos šviesos intensyvumą ir nustato jos bangos ilgio pasiskirstymą. Spektrofotometruose naudojami du atskiri monochromatoriai, iš kurių vienas naudojamas tiksliai parinkti šviesos šaltinio sužadavimo bangos ilgį, o kitas – sklaidžiamai šviesai analizuoti. Pritaikyta pagal [57].

Fluorescencijos spektroskopijoje plačiai naudojama Jablonskio (Perrin-Jablonski) energijos lygmenų diagrama, kuri iliustruoja sužadintas molekules būsenas ir tarp jų galinčius įvykti spindulinius ir nespindulinius perėjimus. Ši diagrama leidžia vizualizuoti galimus perėjimus, galinčius įvykti po molekules fotosužadavimo. Tipiška Jablonskio diagrama pavaizduota 10 paveiksle.

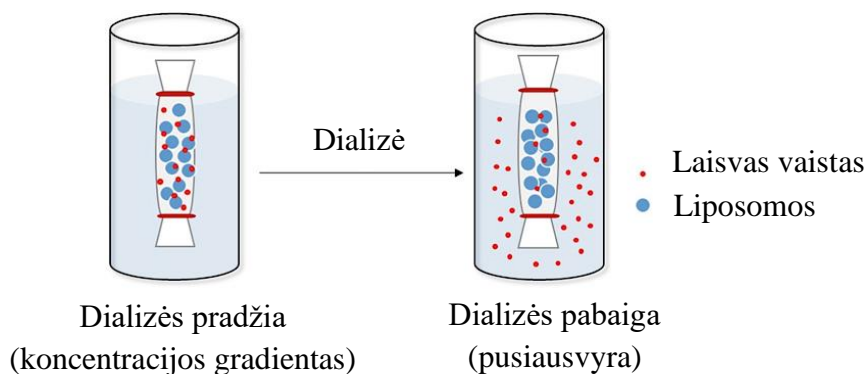


10 pav. Molekulės energijos lygmenų Jablonskio diagrama. Spalvotos rodyklės žymi įvairius spindulinius ir nespindulinius perėjimus, galinčius perduoti energiją tarp molekulių būsenų. Tiesiomis rodyklėmis nurodyti spinduliniai perėjimai tarp dviejų molekulių būsenų, kai energijos skirtumas yra išspinduliuojamas arba sugeriamas fotonų. Banguotomis rodyklėmis nurodyti spinduliniai perėjimai tarp dviejų molekulių būsenų be fotonų emisijos ar sugerties. Pritaikyta pagal [58].

$S_0$  žymima pagrindinė singletinė nesužadinta molekulių būseną,  $S_1$  yra pirmoji sužadinta singletinė būseną,  $S_n$  yra  $n$ -toji sužadinta singletinė būseną. Sužadinta molekulė gali užimti vieną iš tripletinių būsenų, žymimų  $T_1, T_2, \dots, T_n$ . Pirmasis perėjimas daugumoje Jablonskio diagramų yra tam tikros energijos fotono absorbcija tiriamojoje molekulėje (10 paveiksle pažymėta žydros spalvos rodyklėmis). Absorbicija – tai metodas, kuriuo elektronas sužadinas iš žemesnio energijos lygmens į aukštesnį, vykstantis labai greitai ( $10^{-15}$  s eilės) [49]. Tuo metu fotono energija paverčiama vidine molekulių energija [58]. Sugerti galima tik tam tikrus šviesos bangos ilgius – tuos, kurių energija atitinka energijos skirtumą tarp dviejų skirtingų konkretios molekulių savųjų būsenų [49]. Iš sužadinto žemiausio energetinio lygmens molekulė gali sugrįžti į pagrindinę nesužadintą  $S_0$  būseną, išspinduliuodama šviesos kvantą – įvyksta fluorescencija [60].

## Dializė

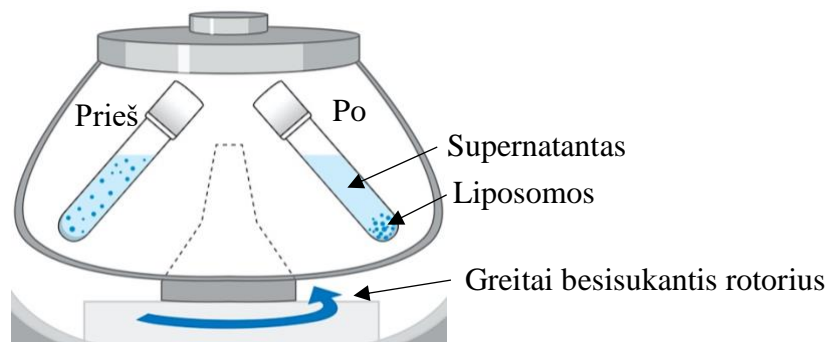
Dializės būdu yra pašalinamos mažos molekulės iš liposomų suspensijos naudojant pusiau pralaidžią membraną su tam tikro dydžio poromis. Kadangi daugumos vaistų molekulinė masė yra mažesnė negu liposomų, jų molekulės laisvai difunduoja pro membraną į buferinį tirpalą, o liposomos su į vidų įterpta vaistine medžiaga lieka dializinėje membranoje [64]. Taip yra atskiriamas laisvas vaistas nuo įkapsuliuoto į lipidinę vezikulę vaisto.



11 pav. Dializės metodas, kurio metu naudojant pusiau pralaidžią membraną iš liposomų suspensijos yra pašalinamos mažos molekulės. Membranos poros leidžia laisvai prasiskverbti mažoms molekulėms, o didelių molekulių difuzija per mėginio kamerą yra apribota. Pritaikyta pagal [64].

## Centrifugavimas

Centrifugavimas yra vienas greičiausių metodų, siekiant tirpale atskirti laisvas vaisto daleles nuo liposomų su įkapsuliuota vaistine medžiaga. Veikiant išcentrinei jėgai, liposomos nusėda mėgintuvėlio apačioje, o neišterpusios vaisto molekulės lieka supernatante. Tačiau didelis sukimosi greitis gali pažeisti liposomos membraną ir sukelti vaisto pratekėjimą, todėl turi būti parenkamas optimalus sukimosi greitis [64].



12 pav. Centrifugavimas centrifugos rotoriuje. Pritaikyta pagal [65].

## 2. EKSPERIMENTINĖ DALIS

### 2.1. Prietaisai ir medžiagos

#### 2.1.1. Reagentai

- Adapalenas (Sigma-Aldrich);
- Azotas 99.999% (Elme Messer);
- Chloroformas (Sigma-Aldrich);
- Dinatrio hidrofosfatas  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Carl Roth);
- Etanolis 96% (Sigma-Aldrich);
- Kalio chloridas KCl (Sigma-Aldrich);
- Kalio dihidrofosfatas  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Carl Roth);
- Natrio chloridas NaCl (Carl Roth);
- Tritonas X-100 (Sigma-Aldrich);
- Lipidai (Avanti Polar Lipids): 1,2-dioleoil-*sn*-glicerolio-3-fosfocholinas (DOPC), cholesterolis, 1,2-dioleoil-*sn*-glicerolio-3-fosfo-(1'-rac-glicerolis) (DOPG), 1,2-distearoil-*sn*-glicerolio-3-fosfoetanolaminas-N-[amino(polietilenglikolis)-2000] (DSPE-PEG(2000)).

#### 2.1.2. Tirpalai

- Fosfato (PBS) buferinis tirpalas: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4;
- 10 mM DOPC tirpalas chloroforme;
- 10 mM cholesterolio tirpalas chloroforme;
- 10 mM DOPG tirpalas chloroforme;
- 10 mM DSPE-PEG(2000) tirpalas chloroforme;
- 60 mM kalceino tirpalas PBS buferyje, pH 7,4.

#### 2.1.3. Sorbentai

- DEAE Sepharose Fast Flow (GE Healthcare)
- Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich).

## 2.1.4. Laboratorinė įranga ir priedai

- Analitinės svarstyklės (Kern);
- Azoto išpūtimo balionas;
- Filtrai 10 mm (Avanti Polar Lipids);
- Magnetinė maišyklė (Cole-Parmer);
- Mikroplokštelių sandarinimo plėvelė (Thermo Scientific);
- Mikroplokštelių skaitytuvas (Clario Star Plus);
- pH-metras (Mettler Toledo);
- Pipetmanai (Fisher Scientific), (Eppendorf Research);
- Polikarbonato membranos 100 nm porų dydžio (Whatman);
- Prastūmimo sistema Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids);
- Maišyklė (IKA KS);
- Spektrofotometras „Zetasizer  $\mu$ V“ (Malvern);
- Spektrofluorimetras „FS5“ (Edinburgh Instruments);
- Termostatas „IB-15G“ (Thermo Scientific);
- Ultragarso vonelė (MRC);
- Vandens valymo sistema (Milli-Q plus);
- 96 šulinėlių mikroplokštelės (Corning).

## 2.2. Metodai

### 2.2.1. Liposomų formavimas

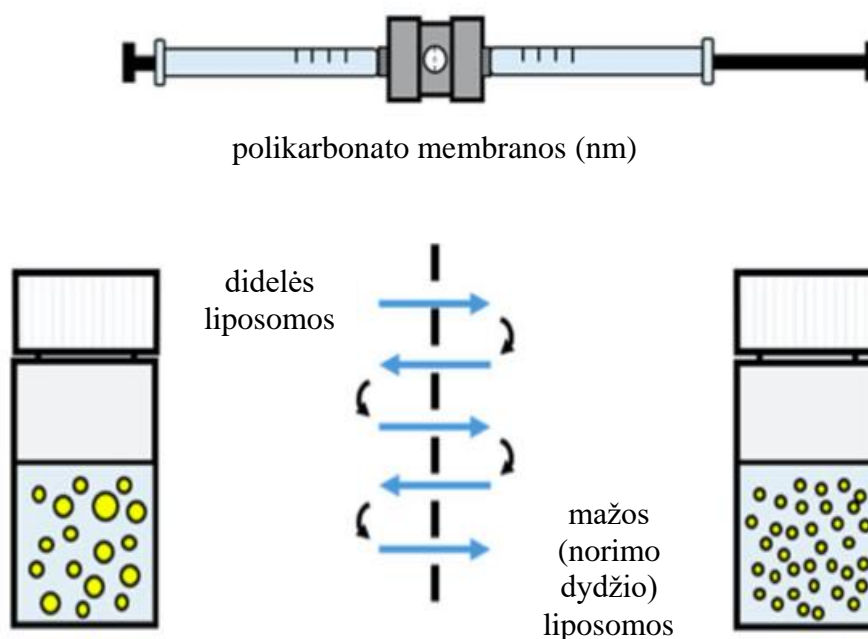
Liposomų paruošimui naudojami jau pagaminti skirtingų lipidų tirpalai organiniame tirpiklyje – chloroforme. Liposomos gamintos iš keturių skirtingų lipidų sudėčių: DOPC/Chol (6:4), DOPC/DOPG (7:3), DOPC/Chol/DOPG (5:3,5:1,5) bei DOPC/Chol/DSPE-PEG(2000) (5,64;3,83:5,3). Komponentai sumaišomi nurodytais santykiais, kad bendras lipidų mišinio tūris būtų 200  $\mu$ l, ir paliekami 40 min po azoto dujų srove tirpikliui išgarinti. Ant susidariusios lipidų plėvelės užpilama 2 ml PBS buferinio tirpalo pH 7,4, suspenduojama ir centrifuguojama. Taip vandeniniame tirpale fosfolipidai savaime suformuoja uždaras lipidines pūsleles, kurias gaunamos polidispersiškos ir daugiasluoksnės. Tuomet liposomų tirpalas 60 min veikiamas ultragarsu, kas padeda sumažinti vezikulių dvisluoksnų skaičių. Siekiant suformuoti vienasluoksnės homogeniškas liposomas, naudojamas ekstruzijos metodas – liposomų tirpalas 21 kartą stumiamas pro ekstruderį su 100 nm porų dydžio polikarbonato membrana (13 pav.).



### 2.2.2. Ekstruzija

Ekstruzija – tai metodas, kurio metu liposomų suspensija yra leidžiama per norimo porų dydžio membraninį filtrą. Procesui naudojamas prastūmimo sistemos aparatas – ekstruderis. Liposomų skersmeniui ir dydžio pasiskirstymui (polidispersiškumui) turi įtakos tiek mechaninė spaudimo jėga, tiek pakartojimų kiekis ar filtro porų dydis [44].

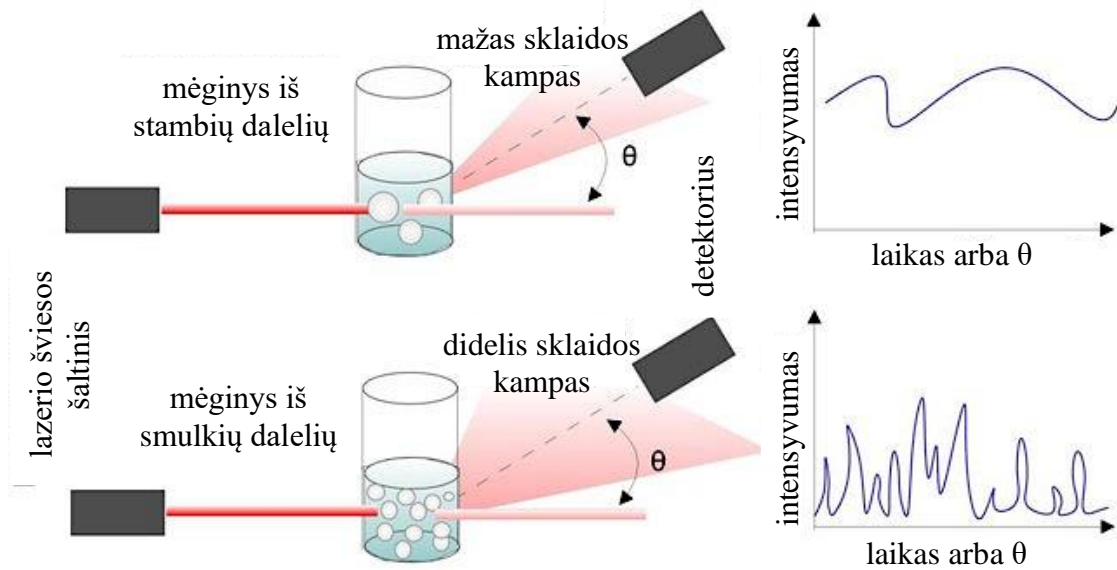
### 2.2.3. Dinaminė šviesos sklaida



13 pav. Ekstruzijos mechanizmas, kurio metu pro norimo dydžio polikarbonato membranas yra leidžiama liposomų suspensija, įprastai 21 kartą, kol iš didelių daugiasluoksnių liposomų gaunamos mažesnės vienasluoksnės liposomos. Pritaikyta pagal [46].

Dinaminė šviesos sklaida – kitaip dar vadinama fotonų koreliacine spektroskopija – tai metodas, kurio metu matuojami šviesos intensyvumo svyravimai, sukelti dalelių Brauno judėjimo. Šis metodas leidžia nustatyti dalelių pasiskirstymą pagal dydį tiriamajame tirpale ar suspensijoje. Mėginys apšviečiamas monochromatine lazerio šviesa ir, esant dalelėms, krintanti šviesa yra išsklaidoma visomis kryptimis skirtingais bangos ilgiais (14 pav.). Sklaidos intensyvumas registruojamas detektoriumi tam tikru kampu, įprastai  $90^\circ$ . Skaitmeninis

autokoreliatorius išanalizuoja išsklaidytos šviesos intensyvumo svyravimus laiko atžvilgiu ir nustato signalo autokoreliacijos funkciją, apibūdinančią makromolekulių judėjimą [48, 49].



14 pav. Dinaminės šviesos sklaidos procesas. Lazerio šviesa apšviečia mėginį ir, priklausomai nuo jame esančių dalelių dydžio, šviesa išsklaidoma skirtingu kampu. Pritaikyta pagal [47].

Stebint dalelių judėjimą tam tikru laiko intervalu, galima gauti informaciją apie makromolekulių dydį, kadangi mažesnės dalelės, judančios didesniu greičiu, rodo intensyvesnius svyravimus nei didesnės dalelės. Ryšys tarp dalelių greičio ir jų dydžio yra pateikiamas Stokso-Einšteino lygtyje (1):

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

kur  $D$  – difuzijos koeficientas,  $k_B$  – Bolcmano konstanta,  $T$  – absoliuti temperatūra,  $\eta$  – terpės klampa,  $R_H$  – hidrodinaminis dalelės spindulys [50].

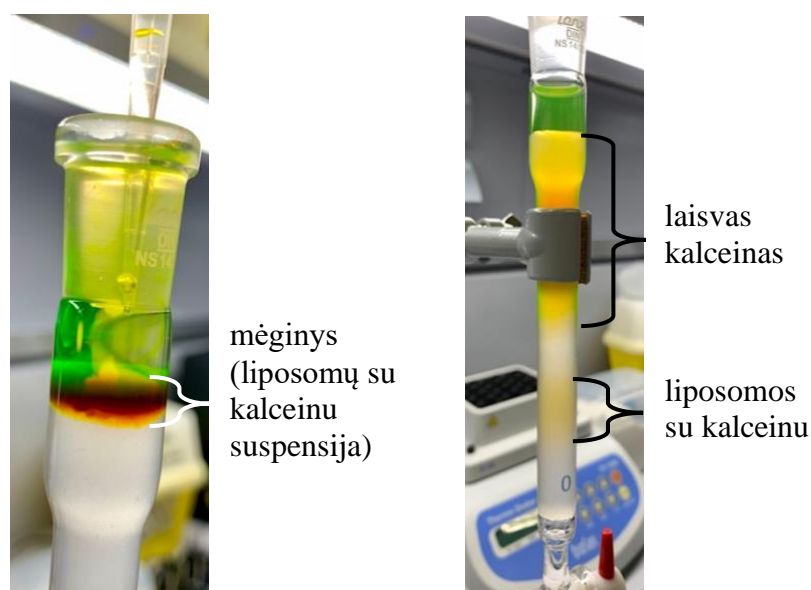
Išanalizavus išsklaidytos šviesos intensyvumo svyravimus, sukeltus makromolekulių Brauno judėjimo tirpale, gaunamas difuzijos koeficientas ( $D$ ), susijęs su dalelių hidrodinaminiu dydžiu. Šis makromolekulių judėjimas priklauso nuo jų dydžio, temperatūros ir tirpiklio klamos.

### 2.2.3.1. Dinaminės šviesos sklaidos matavimai

Nustatyti skirtingų sudėčių liposomų dydžius naudojamas spektrofotometras Zetasizer  $\mu$ V. Temperatūra – 22 °C, lazerio bangos ilgis – 632,8 nm, išsklaidyta šviesa detektuojama 90° kampu lazerio šviesai. Liposomų tirpalo koncentracija – 1 mM, tirpale esančių dalelių dydis matuojamas 2,5 ml tūrio kiuvetėje (naudojama 800  $\mu$ l PBS buferio ir 200  $\mu$ l liposomų tirpalo). Kiekvienos sudėties tirpalas ruošiamas dukart, spektrofotometru mėginių serijos matuojamos po tris kartus. Excel programa iš gautų duomenų apskaičiuojami liposomų spindulio vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai.

### 2.2.4. Liposomų su įkapsuliuotu kalceinu formavimas

Liposomų, į kurių vidų įterpiamas fluorescuojantis dažas kalceinas, paruošimo technologija yra panaši kaip ir anksčiau minėta formuojant įprastas liposomas (2.2.1.), tik ant susiformavusios lipidinės plėvelės užpilama ne 2 ml PBS buferinio tirpalo, o 1 ml šio buferio kartu su 60 mM koncentracijos kalceino. Be to, prieš sonikavimą liposomų tirpalas 5 kartus yra užšaldomas ir atšildomas – šitaip yra pagerinamas liposomų įkapsuliuavimo efektyvumas.



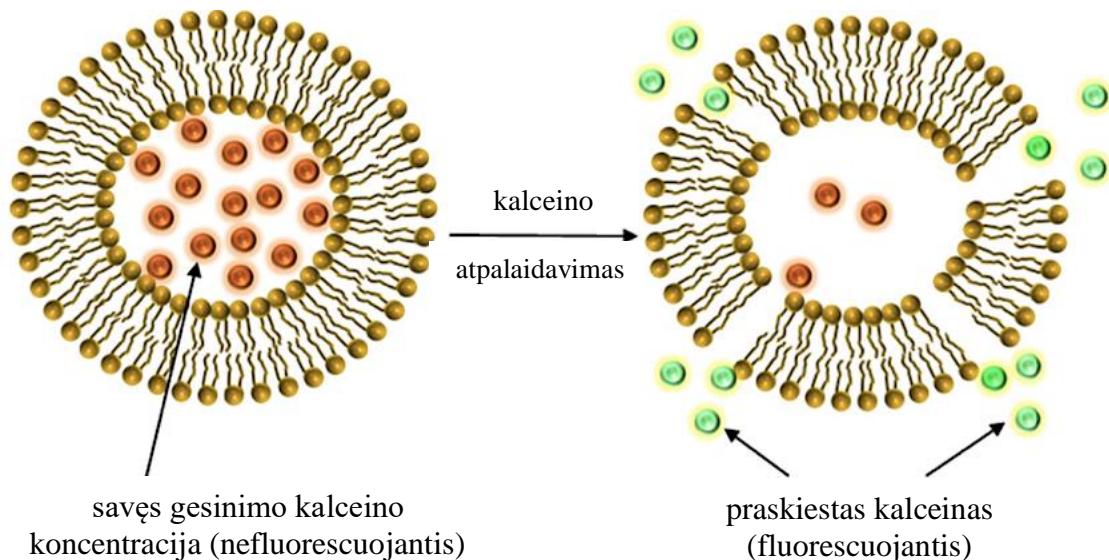
15 pav. Laisvo ir į liposomas įterpto kalceino atskyrimas naudojant gelfiltracijos metodą.

Po ekstruzijos naudojamas gelfiltracijos metodas, siekiant iš išorinės terpės pašalinti į liposomas neįsiterpusį kalceiną. Chromatografinė kolonėlė, užpildyta sorbentu (DEAE sefaroze), pirmiausia yra praplaunama buferiniu tirpalu, siekiant pašalinti likusį neįkapsuliuotą kalceiną. Vėliau į kolonėlę leidžiamas liposomų tirpalas, nuolat praplaunant PBS buferiu.

Kalceino molekulių dydis yra mažesnis negu liposomų, todėl jis difunduoja į sorbento poras ir išteka vėliau. Liposomos dėl didesnio dydžio nepatenka į poras, todėl šios išteka iš kolonėlės pirmiau (15 pav.).

### 2.2.5. Kalceino atpalaidavimas iš liposomų

Kalceinas yra vandenyje tirpus žalias fluorescuojantis dažas, plačiai naudojamas indikuojant lipidinių pūslelių pralaidumą ir vaisto įkapsuliavimo į liposomas efektyvumą [54]. Kalceino atpalaidavimo tyrimai yra pagrįsti kalceino savaiminiu gesinimu: koncentracijai viršijant 50 mM, dažų fluorescencija gesinama. Liposomų viduje yra didelė kalceino koncentracija, todėl jis pats gesina savo fluorescenciją.



16 pav. Liposomų viduje esant didelei kalceino koncentracijai, jis pats save gesina, todėl fluorescencija nėra registruojama. Kalceinas ima fluorescuoti, kai difunduoja į išorę ir prasiskiedžia vandeninėje terpėje. Pritaikyta pagal [52].

Kalceinas turi mažą pralaidumo koeficientą pro lipidų dvisluoksnę membraną, tad kol lipidinės pūslelės yra nepažeistos, vienintelis fluorescencijos intensyvumas, kurį galima užregistruoti, yra sukeltas nedidelių pratekėjimo svyravimų. Keičiant išorines sąlygas, pavyzdžiui, į tirpalą pridėjus detergento (kaip Triton X-100), pakis fluorescencijos intensyvumas – bus stebimas padidėjimas, nes kalceino molekulės ištekės iš pūslelių į aplinką, kur kalceinas ištirps mažesnėje koncentracijoje. Jei taip įvyktų be surfaktanto (detergento) pridėjimo, būtų lipidinių pūslelių membranos pažeidimų ar porų susidarymo požymis [51].

### 2.2.5.1. Kalceino atpalaidavimo iš liposomų matavimai

Fluorescencijos intensyvumo pokyčiai, sukelti kalceino išsiskyrimo iš liposomų vidaus į aplinką, registruojami mikroplokštelių skaitytuvu Clario Star Plus. Naudojamos 96 šulinėlių mikroplokštelės. Į šulinėlius įpilami skirtingų sudėčių liposomų tirpalai po 100 µl, kurių koncentracija 60 mM. Tirpalai paveikiami kalceino žadinimo (470 nm) bangos ilgio šviesa, matuojama emisija ties 510 nm. Visų mėginių serijos matuojamos po tris kartus. Jei atsiranda pažeidimai liposomų membranoje, kalceinas išsiskiria į aplinką, kurioje jis prasiskiedžia. Kadangi kalceino koncentracija nebesiekia 50 mM, dažų fluorescencija nebėra gesinama, todėl registruojama fluorescencija. Vėliau liposomos suardomos į kiekvieną mėginio šulinėlį pridėjus 5 µl detergento Triton X-100. Tai leidžia apskaičiuoti maksimalią fluorescenciją. Excel programa iš gautų duomenų apskaičiuojami fluorescencijos intensyvumo vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai. Iš liposomų ištekėjusio kalceino kiekis nustatomas pagal lygtį (2):

$$IKK(\%) = \left[ \frac{I_t - I_0}{I_{100} - I_0} \right] \times 100 \quad (2),$$

kur  $IKK$  (%) – ištekėjusio kalceino kiekis procentais,  $I_0$ ,  $I_t$ ,  $I_{100}$  – fluorescencijos intensyvumai matuoti liposomų formavimo dieną ( $I_0$ ), po 1, 4 ir 10 dienų nuo formavimo skirtingose temperatūrose ( $I_t$ ), ir pridėjus Triton X-100 ( $I_{100}$ ). Pritaikyta pagal [88].

### 2.2.6. Liposomų su įkapsuliuotu adapalenu formavimas

Pirmiausia pagaminamas 100,0 µg/ml koncentracijos adapaleno tirpalas – tam 1 mg adapaleno ištirpinama 10 ml etanolio naudojant magnetinę maišyklę. Tuomet formuojamos liposomos su į vidų įterptu adapalenu, kurio koncentracija 0,25 µM – technologija yra panaši kaip ir anksčiau minėta formuojant įprastas liposomas (2.2.1.), tik naudojamas didesnis lipidų tūris (400 µl) ir po azoto dujų srove lipidų mišinys išgarinamas kartu su 2 ml adapaleno tirpalo.

#### 2.2.6.1. Adapaleno, įterpto į liposomas, fluorescencijos matavimai

Nustatyti skirtingų sudėčių liposomų su įterptu adapalenu fluorescencijos intensyvumus naudojamas spektrofluorimetras „FS5“. Eksperimente pasiremta anksčiau atlikto tyrimo [89] pakoreguota adapaleno fluorescencija: emisija ( $\lambda = 350$  nm), sužadimas ( $\lambda = 332$  nm). Temperatūra – 22 °C, spektrinė skyra – 1 nm. Liposomų tirpalo koncentracija – 2 mM, adapaleno tirpalo koncentracija – 0,25 µM, matuojama 3,5 ml tūrio kiuvetėje (naudojama 1,6

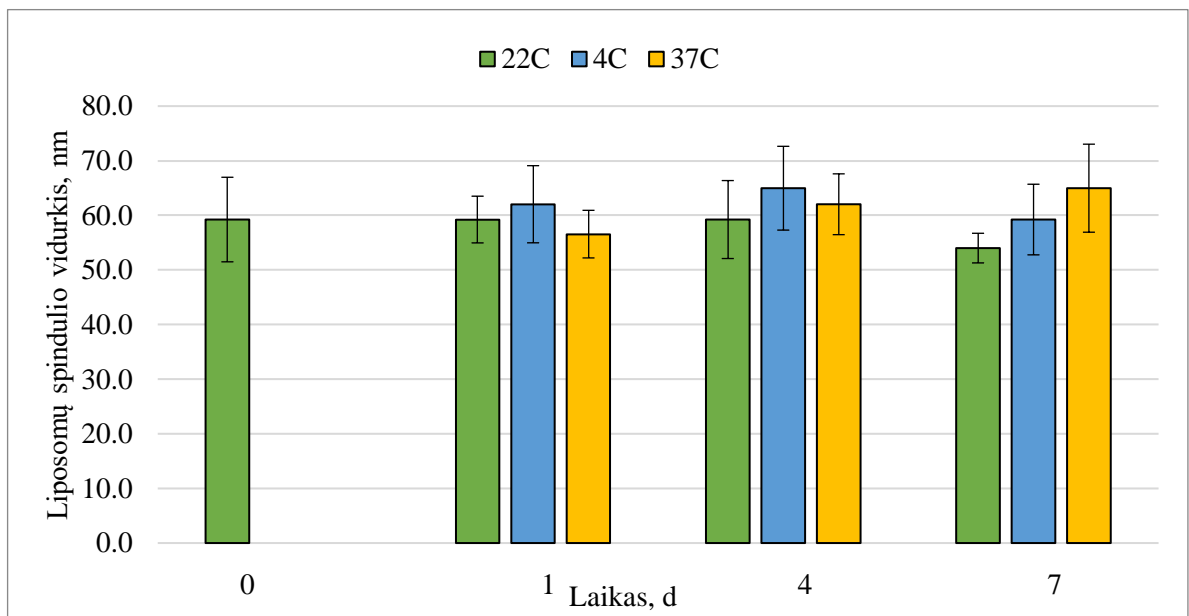
ml liposomų tirpalo ir 1,2 ml PBS buferio). Siekiant nustatyti maksimalią fluorescenciją, vėliau liposomos suardomos į tirpalą kiuvetėje pridėjus 10  $\mu$ l detergento Triton X-100. Excel programa iš gautų duomenų braižomi grafikai, nustatomi adapaleno fluorescencijos intensyvumo pokyčiai priklausomai nuo laiko ir temperatūros.

### 3. REZULTATAI

#### 3.1. Liposomų stabilumo įvertinimas DLS metodu

Siekiant įvertinti skirtingų sudėčių liposomų dydžio pokyčius, priklausomai nuo skirtingų temperatūros ir laiko sąlygų, taikytas dinaminės šviesos sklaidos metodas. Tirtos keturios liposomų sudėtys: DOPC / Chol (6:4), DOPC / DOPG (7:3), DOPC / Chol / DOPG (5:3,5:1,5) bei DOPC / Chol / DSPE-PEG(2000) (5,64;3,83:5,3). Kiekvienos sudėties liposomų tirpalas laikytas trijose skirtingose temperatūrose: 4 °C, 22 °C ir 37 °C. Tirpalai tirti formavimo dieną (0 d.), po 1 dienos, po 4 dienų ir po 7 dienų. Formavimo dieną liposomų tirpalas yra kambario temperatūros (22 °C). Tirpaluose susiformavusių dalelių dydžiai (liposomų spindulio vidurkiai) pateikti 17-20 pav.

Liposomos, suformuotos iš DOPC ir Chol (6:4), (17 pav.) stabiliausios buvo kambario (22 °C) temperatūroje, grafike pavaizduota žalia spalva. Pirmas keturias paras šioje temperatūroje dydis nekito – vidutinis liposomų spindulys buvo  $59,23 \pm 7,14$  nm. Septintą parą stebimas dydžio sumažėjimas 8,83 % iki  $54,0 \pm 2,72$  nm.

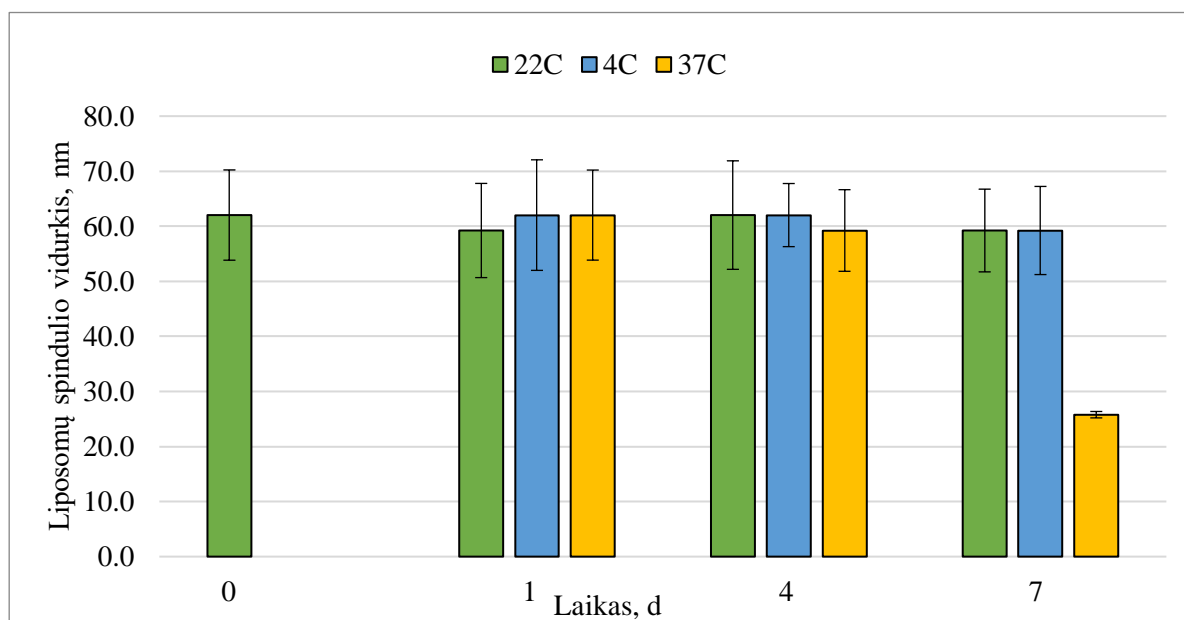


17 pav. DLS metodu nustatyti liposomų, suformuotų iš DOPC ir Chol (6:4), spindulio vidurkio pokyčiai, priklausomai nuo laiko ir temperatūros. Žalia, mėlyna ir geltona spalvos atitinkamai vaizduoja 22 °C, 4 °C ir 37 °C temperatūras.

4 °C temperatūroje, diagramoje atitinkančią mėlyną spalvą, liposomų dydis per savaitę kito nežymiai – nuo pirmos iki ketvirtos paros stebimas padidėjimas 4,74 % nuo  $62,03 \pm 7,06$  nm iki  $64,97 \pm 7,67$  nm, o nuo ketvirtos iki septintos paros – sumažėjimas 8,83 % iki  $59,23 \pm 6,47$  nm.

37 °C temperatūroje, pažymėta geltona spalva, stebimas nuolatinis liposomų dydžio didėjimas – nuo pirmos iki ketvirtos dienos vidutinis spindulys padidėjo 9,67 % nuo  $56,56 \pm 4,36$  nm iki  $62,03 \pm 5,57$  nm, o per sekančias tris dienas padidėjo dar 5 % iki  $64,97 \pm 8,06$  nm. Tad galima daryti prielaidą, jog ši temperatūra yra nepalankiausia liposomų, sudarytų iš DOPC ir Chol (6:4), stabilumui dėl didžiausių liposomų spindulio vidurkio pokyčių.

Liposomų, suformuotų iš DOPC ir DOPG (7:3), (18 pav.) spindulio vidurkio dydžio pokyčiai panašiausi buvo kambario (22 °C) ir 4 °C temperatūrose. Per pirmas keturias paras 22 °C temperatūroje galima pastebėti nežymius dydžio kitimus – po paros spindulio dydis sumažėjo 4,51 %, per sekančias tris paras grįžo į pradinį dydį –  $62,03 \pm 9,85$  nm, o septintą parą dydis vėl šiek tiek sumažėjo iki  $59,23 \pm 7,52$  nm bei susilygino su pirmos paros duomenimis.



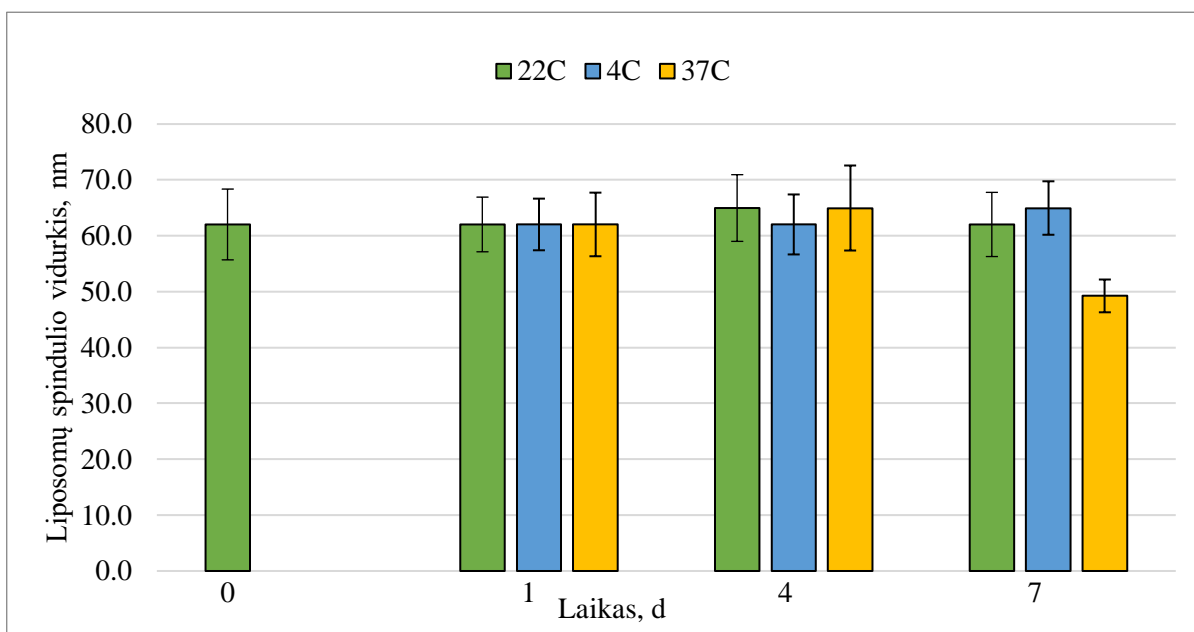
18 pav. DLS metodu nustatyti liposomų, suformuotų iš DOPC ir DOPG (7:3), spindulio vidurkio pokyčiai, priklausomai nuo laiko ir temperatūros. Žalia, mėlyna ir geltona spalvos atitinkamai vaizduoja 22 °C, 4 °C ir 37 °C temperatūras.



4 °C temperatūroje nuo pirmos iki ketvirtos paros dydis nekito – spindulio vidurkis buvo  $62,03 \pm 5,73$  nm, o per kitas tris paras stebimas nežymus dydžio sumažėjimas 4,51 % iki  $59,23 \pm 8,00$  nm. Tad šios sudėties liposomos tiek 22 °C, tiek 4 °C temperatūrose visą savaitę išsilaiko stabiliausiai.

37 °C temperatūroje nuo pirmos iki ketvirtos paros matyti nedidelis spindulio vidurkio sumažėjimas nuo  $62,03 \pm 8,18$  iki  $59,23 \pm 7,41$  nm, tačiau septintą parą stebimas staigus dydžio sumažėjimo šuolis daugiau nei du kartus (58,44 %) iki  $25,78 \pm 0,58$  nm. Taigi, duomenys rodo, jog po savaitės šioje temperatūroje neigiamai įkrautos liposomos dėl sudėtyje esančio DOPG rodo didžiausią nestabilumą.

Liposomos, suformuotos iš DOPC, Chol ir DOPG (5:3,5:1,5), (19 pav.) didžiausią stabilumą rodė kambario (22 °C) temperatūroje – po savaitės jų dydis atitiko formavimo dieną išmatuotą dydį – vidutinis spindulys yra  $62,03 \pm 5,74$  nm.

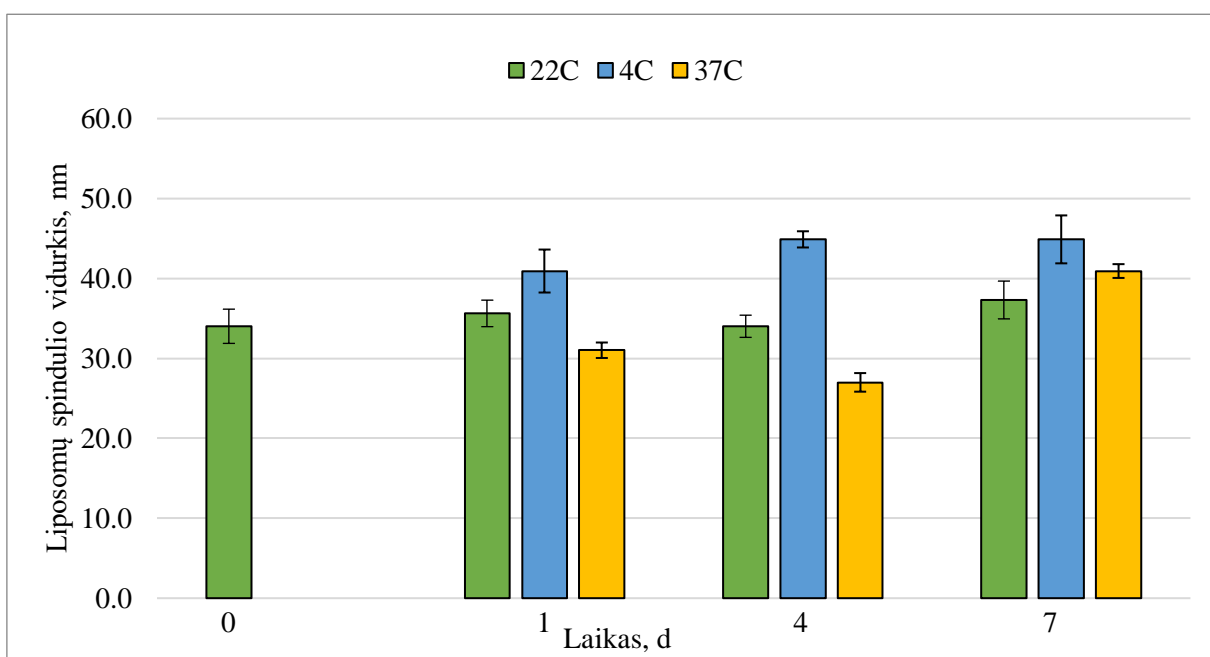


19 pav. DLS metodu nustatyti liposomų, suformuotų iš DOPC, Chol ir DOPG (5:3,5:1,5), spindulio vidurkio pokyčiai, priklausomai nuo laiko ir temperatūros. Žalia, mėlyna ir geltona spalvos atitinkamai vaizduoja 22 °C, 4 °C ir 37 °C temperatūras.

4 °C temperatūroje liposomų dydis per savaitę kito nežymiai – stebimas minimalus spindulio vidurkio padidėjimas 4,74 % – nuo  $62,03 \pm 4,62$  nm iki  $64,97 \pm 4,78$  nm.

37 °C temperatūroje matomi ryškiausi dydžio pokyčiai – nuo pirmos iki ketvirtos paros liposomų spindulio vidurkis padidėjo 4,74 %, tačiau po sekančių trijų parų sumažėjo net 24,21 % – iki  $49,24 \pm 2,93$  nm. Tai rodo, jog 37 °C temperatūroje šios sudėties liposomos yra nestabiliausios.

Liposomų, suformuotų iš DOPC, Chol ir DSPE-PEG(2000) (5,64:3,83:0,53), (20 pav.) didžiausias stabilumas stebimas kambario (22 °C) temperatūroje. Po keturių parų vidutinis liposomų spindulys išliko tokio pačio dydžio kaip po formavimo –  $34,02 \pm 1,39$  nm, o per savaitę dydis padidėjo 9,67 % iki  $37,31 \pm 2,37$  nm.



20 pav. DLS metodu nustatyti liposomų, suformuotų iš DOPC, Chol ir DSPE-PEG(2000) (5,64:3,83:0,53) spindulio vidurkio pokyčiai, priklausomai nuo laiko ir temperatūros. Žalia, mėlyna ir geltona spalvos atitinkamai vaizduoja 22 °C, 4 °C ir 37 °C temperatūras.

4 °C temperatūroje liposomų spindulio dydis nuo pirmos paros iki ketvirtosios padidėjo 9,68 % – nuo  $40,93 \pm 2,69$  nm iki  $44,89 \pm 1,01$  nm, o per sekančias tris dienas išliko pastovus.

37 °C temperatūroje matomi didžiausi spindulio vidurkio pokyčiai – nuo pirmos paros iki ketvirtos paros vidutinis spindulys sumažėjo 12,96 % – nuo  $31,02 \pm 0,97$  nm iki  $27,00 \pm 1,16$  nm, o iki septintos paros staigiai padidėjo apie pusantro karto – 51,59 % – iki  $40,93 \pm 0,86$  nm.

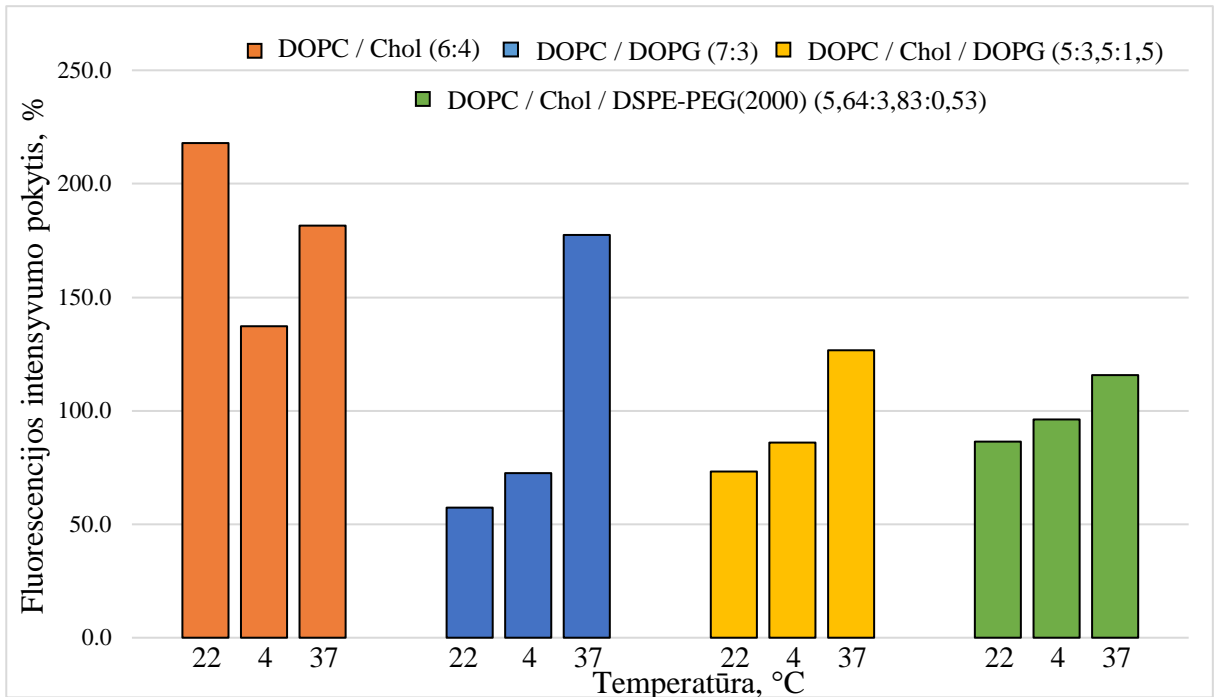
nm. Taigi, matyti, jog šioje temperatūroje dėl didelių vidutinio spindulio dydžio pokyčių liposomos yra nestabiliausios.

Apibendrinant visas keturias liposomų sudėtis, galima teigti, jog iš karto po formavimo liposomų spindulio vidurkis tarp skirtingų sudėčių kito nežymiai: dydžiai varijavo nuo  $59,23 \pm 7,75$  (DOPC / Chol (6:4)) iki  $62,03 \pm 8,19$  (DOPC / DOPG (7:3)) ir  $62,03 \pm 6,34$  (DOPC / Chol / DOPG (5:3,5:1,5)), bet išsiskyrė pegilintų liposomų dydis (DOPC / Chol / DSPE-PEG(2000) (5,64:3,83:0,53)) – pastarųjų spindulio dydis yra maždaug dvigubai mažesnis –  $34,02 \pm 2,14$  nm. Rezultatus palyginus su aprašytais literatūroje [90], matyti, jog PEG liekaną turinčios liposomos yra mažesnio dydžio negu neturinčios PEG liposomos, todėl gauti matavimo duomenys atitinka pateiktus literatūroje. Taip pat galima teigti, jog kambario ( $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) temperatūroje visų sudėčių liposomos rodė didžiausią stabilumą, kadangi jų vidutinis spindulio dydis per savaitę keitėsi mažiausiai. Tuo tarpu aukščiausia tirta temperatūra –  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  – buvo nepalankiausia liposomų stabilumui, ypač praėjus septynioms paroms, kadangi tuo laiku stebimi ryškiausi lipidinių vezikulių vidutinio spindulio dydžio pokyčiai. Dviejų sudėčių – (DOPC / Chol (6:4) bei DOPC / Chol / DSPE-PEG(2000) (5,64:3,83:0,53)) – liposomos po savaitės šioje temperatūroje padidėjo labiausiai, o kitų dviejų sudėčių (DOPC / DOPG (7:3) ir DOPC / Chol / DOPG (5:3,5:1,5)) – priešingai – sumažėjo. Pačios nestabiliausios po savaitės  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje buvo neigiamai įkrautos liposomos (DOPC / DOPG (7:3)), o stabiliausios – DOPC / Chol (6:4), sudėtyje turinčios didžiausią cholesterolio santykinį procentą.

### **3.2. Kalceino atpalaidavimo iš liposomų stebėjimas**

Buvo atlikti kalceino atpalaidavimo iš skirtingai suformuotų liposomų matavimai. Liposomų stabilumas laike ir skirtingose temperatūrose buvo įvertintas stebint atpalaiduoto kalceino fluorescenciją. Šiame eksperimente kalceino molekulė imituoja įterpto vaisto atpalaidavimą. 21 paveikslas vaizduoja kalceino atpalaidavimo priklausomybę nuo temperatūros, priklausomai nuo skirtingų liposomų sudėčių. Fluorescencijos intensyvumo pokytis apskaičiuotas naudojantis anksčiau minėta (2) lygtimi. Likutinis fluorescencijos intensyvumas, matuotas liposomų formavimo dieną ( $I_0$ ), rodo laisvą, į liposomas neįsiterpusį, kalceiną. Išmatuotas fluorescencijos padidėjimas po 10 parų atitinka papildomą kalceino ištekėjimą. Kuo didesnis fluorescencijos intensyvumo pokytis, tuo daugiau kalceino išteka iš liposomų, kas parodo liposomų stabilumo sumažėjimą.

Kaip matyti iš diagramos (21 pav.), labiausiai fluorescencijos intensyvumo pokytis išsiskyrė iš liposomų, sudarytų iš DOPC ir Chol (6:4). 22 °C temperatūroje šios liposomos rodė didžiausią nestabilumą dėl maksimalaus fluorescencijos intensyvumo pokyčio (217,93 %), tuo tarpu kitos trys sudėtys (DOPC / DOPG (7:3), DOPC / Chol / DOPG (5:3,5:1,5) bei DOPC / Chol / DSPE-PEG(2000) (5,64:3,83:0,53)), priešingai, šioje temperatūroje rodė mažiausius intensyvumo pokyčius: 57,32 %, 73,22 %, 86,27 %, atitinkamai.



21 pav. Fluorescencijos intensyvumo pokyčio palyginimas dėl kalceino išsiskyrimo iš skirtingų sudėčių liposomų tirpalų per 10 dienų po formavimo skirtingose temperatūrose: 4 °C, 22 °C ir 37 °C. Oranžinė, mėlyna, geltona ir žalia spalvos atitinkamai vaizduoja skirtingas liposomų sudėtis: DOPC / Chol (6:4), DOPC / DOPG (7:3), DOPC / Chol / DOPG (5:3,5:1,5) ir DOPC / Chol / DSPE-PEG(2000) (5,64;3,83:5,3).

Duomenys rodo, jog 4 °C temperatūroje iš liposomų, sudarytų iš DOPC ir Chol (6:4), ištekėjo mažiausias kalceino kiekis kitų temperatūrų atžvilgiu, o likusių trijų sudėčių rezultatai 4 °C temperatūroje buvo panašūs į kambario temperatūros.

37 °C temperatūra nepalankiausia buvo liposomoms, sudėtyje turinčioms neigiamai įkrauto DOPG (DOPC / DOPG (7:3), kadangi stebimas ryškus fluorescencijos intensyvumo pokyčio padidėjimas – fluorescencija padidėjo daugiau nei tris kartus – net 209,59 %. PEG

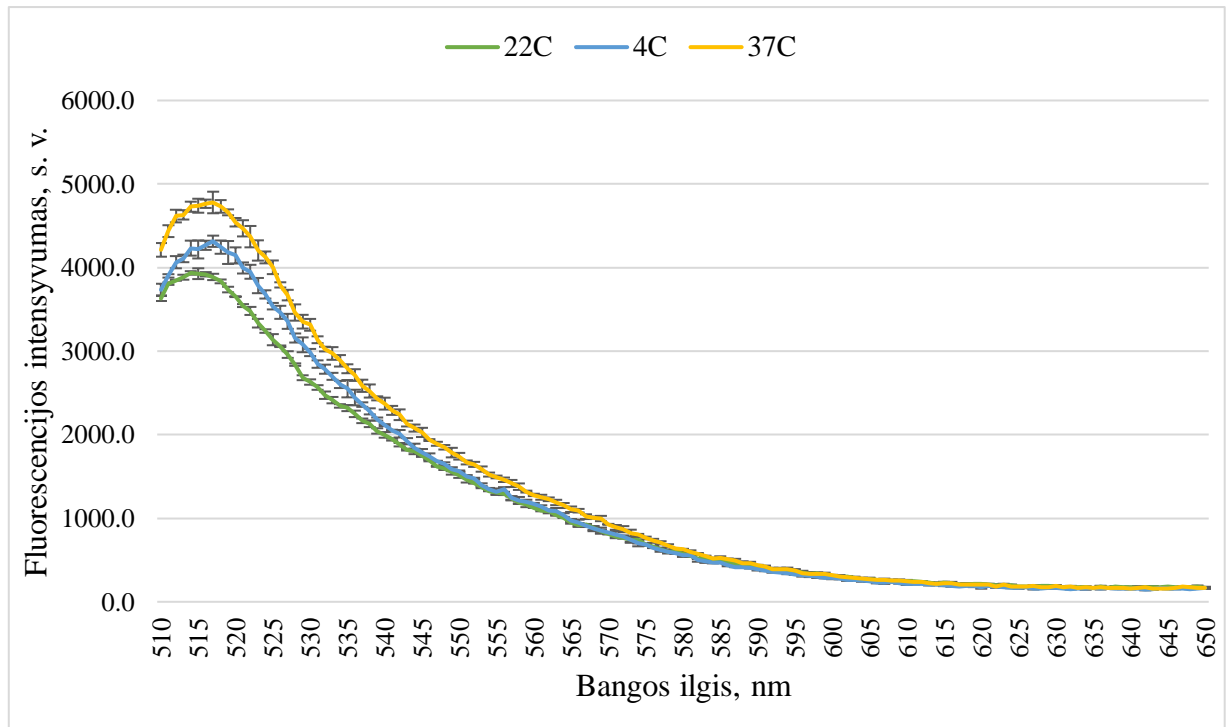
liekaną turinčios liposomos (DOPC / Chol / DSPE-PEG(2000) (5,64:3,83:0,53)) 37 °C temperatūroje buvo gana stabilios, nes fluorescencija, palyginus su 22 °C temperatūra, padidėjo tik 34,11 %, o kitų sudėčių – 73,16 % (DOPC / Chol / DOPG (5:3,5:1,5)) ar kaip anksčiau minėtos sudėties – 209,59%.

Viską apibendrinus, galima teigti, jog didžiausią stabilumą rodė pegilintos liposomos, kadangi skirtingose temperatūrose kalceino atpalaidavimo sukelti fluorescencijos intensyvumo pokyčiai buvo mažiausi, lyginant su kitomis liposomų sudėtimis. Nestabiliausios buvo liposomos, suformuotos iš DOPC ir Chol (6:4), dėl didžiausio ištekėjusio kalceino kiekio.

Žemiau pavaizduoti 22-25 paveikslai rodo po 10 dienų išmatuotus atpalaiduoto kalceino fluorescencijos intensyvumo emisijos spektrus, priklausomai nuo skirtingų sudėčių liposomų ir temperatūrų. Fluorescencija registruota iš ištekėjusio iš liposomų kalceino. Gautos kreivės suteikia informacijos apie liposomų stabilumą – kuo registruojamas didesnis fluorescencijos intensyvumas, tuo liposomos yra mažiau stabilios, kadangi atpalaiduojamas didesnis kiekis kalceino, o tai gali rodyti pažaidas liposomų membranose ir pratekėjimą pro jas.

2-5 lentelės vaizduoja maksimalius fluorescencijos intensyvumus, gautus matuojant skirtingų sudėčių liposomų tirpalus iki ir po suardymo detergentu – tritonu X-100 – priklausomai nuo skirtingų temperatūros sąlygų. Tritono pridėjimas leidžia nustatyti maksimalią fluorescenciją dėl visiško kalceino išsiskyrimo iš liposomų į aplinką, nes liposomos yra pilnai suardomos. Kiekvienos sudėties skirtingų temperatūrų tirpalai matuoti po tris kartus, rezultatams imtas didžiausias fluorescencijos intensyvumų vidurkis ir apskaičiuotas santykis tarp gautų verčių iki ir po tritono pridėjimo. Pagal santykį galima spręsti apie liposomų stabilumą – kuo didesnis santykis, tuo lipidinės vezikulės yra stabilesnės. Taip pat didelės santykio vertės koreliuoja su aukštu kalceino įkapsuliavimo efektyvumu.

Pagal fluorescencijos intensyvumo spektrą (22 pav.), registruotą dėl kalceino išsiskyrimo iš liposomų, suformuotų iš DOPC ir Chol (6:4), matome, jog didžiausias savaiminis kalceino atpalaidavimas iš liposomų įvyksta esant 37 °C temperatūrai, spektre pavaizduota geltona kreivė, taigi galima daryti išvadą, jog šioje temperatūroje liposomos yra nestabiliausios. Kambario (22 °C) temperatūroje, pavaizduota žalia kreivė, registruojama mažiausia fluorescencija, todėl tai yra palankiausias sąlygos lipidinių vezikulių stabilumui dėl mažiausio išsiskyrusio kalceino kiekio. 4 °C temperatūroje, spektre parodyta mėlyna kreivė, fluorescencijos intensyvumas yra tarpinis tarp kitų dviejų temperatūrų.



22 pav. Fluorescencijos intensyvumo spektras, registruotas dėl kalceino išsiskyrimo iš liposomų, sudarytų iš DOPC ir Chol (6:4), priklausomai nuo skirtingų laikymo temperatūrų po 10 parų. Žalia, mėlyna ir geltona spalvos atitinkamai vaizduoja 22 °C, 4 °C ir 37 °C temperatūras.

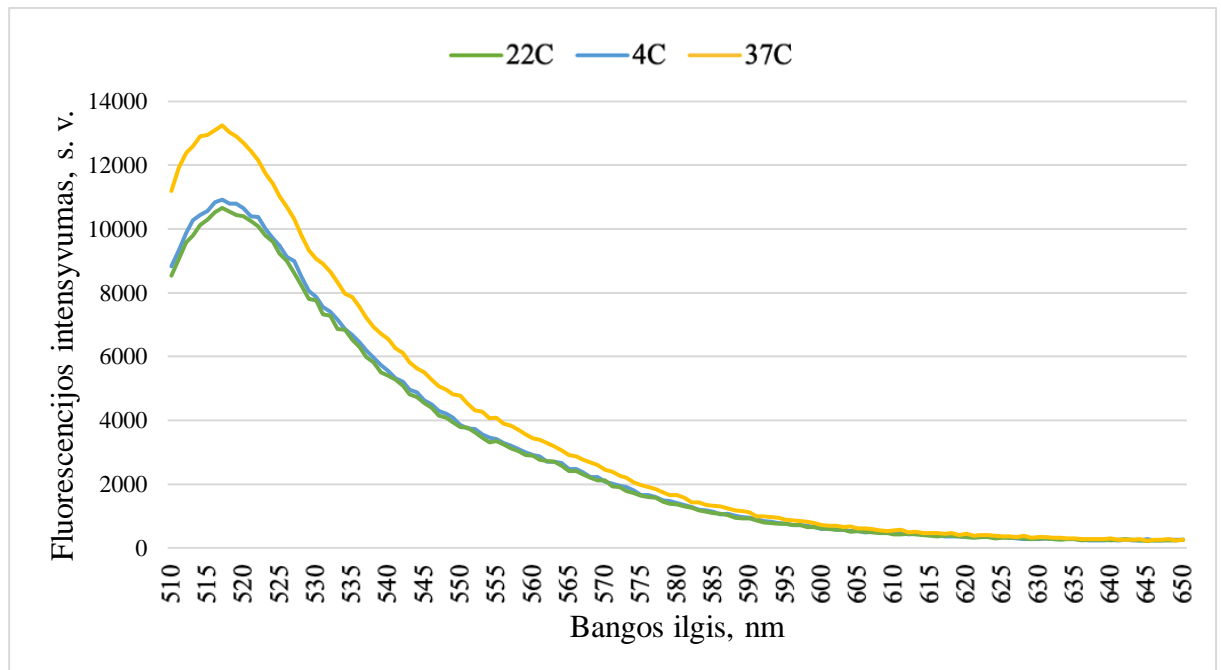
2 lentelė. Maksimalūs fluorescencijos intensyvumai, gauti registruojant liposomų, sudarytų iš DOPC ir Chol (6:4) su į vidų įterptu kalceinu, tirpalus iki ir po suardymo tritonu X-100 bei jų santykiai, priklausomai nuo skirtingų temperatūros sąlygų.

Temperatūra	Iki tritono	Po tritono	Santykis
4 °C	4315,3	8798,3	2,04
22 °C	3936,0	5093,0	1,29
37 °C	4779,3	7423,0	1,55

Pagal 2 lentelės duomenis, mažiausias santykis tarp fluorescencijos intensyvumų, registruotų iki ir po tritono pridėjimo, yra kambario (22 °C) temperatūros liposomų – vertė lygi 1,29, o didžiausias santykis apskaičiuotas esant 4 °C temperatūrai – 2,04. Kaip buvo anksčiau minėta, mažas santykis parodo liposomų nestabilumą, o didelis santykis, priešingai, stabilumą. Taip pat didesnis santykis nurodo ir efektyvesnę kalceino įkapsuliavimą.

Matome, jog lentelės duomenys prieštarauja spektro duomenimis, nes pagal juos kambario temperatūra yra palankiausia liposomų stabilumui, o pagal lentelę – gaunamos nestabiliausios liposomos. Skirtumai tarp spektro ir lentelės duomenų galėjo atsirasti todėl, kad spektre esančios vertės parodo išsiskyrusio kalceino kiekį iš liposomų iki tritono pridėjimo, tačiau nežinome, kiek daugiausia įkapsuliuoto kalceino galėjo išsiskirti visiškai suardžius liposomas. Galimai buvo užregistruotas foninis fluorescencijos fonas, atsiradęs dėl neįsiterpusio kalceino likučių liposomų tirpale.

Fluorescencijos intensyvumo spektras (23 pav.), registruotas dėl kalceino išsiskyrimo iš neigiamai įkrautų liposomų, sudarytų iš DOPC ir DOPG (7:3), rodo, jog 37 °C temperatūroje liposomos yra nestabiliausios – išsiskyrė didžiausias kiekis kalceino. Tarp likusių dviejų temperatūrų fiksuojami minimalūs fluorescencijos intensyvumo skirtumai.



23 pav. Fluorescencijos intensyvumo spektras, registruotas dėl kalceino išsiskyrimo iš liposomų, sudarytų iš DOPC ir DOPG (7:3), priklausomai nuo skirtingų laikymo temperatūrų po 10 parų. Žalia, mėlyna ir geltona spalvos atitinkamai vaizduoja 22 °C, 4 °C ir 37 °C temperatūras.

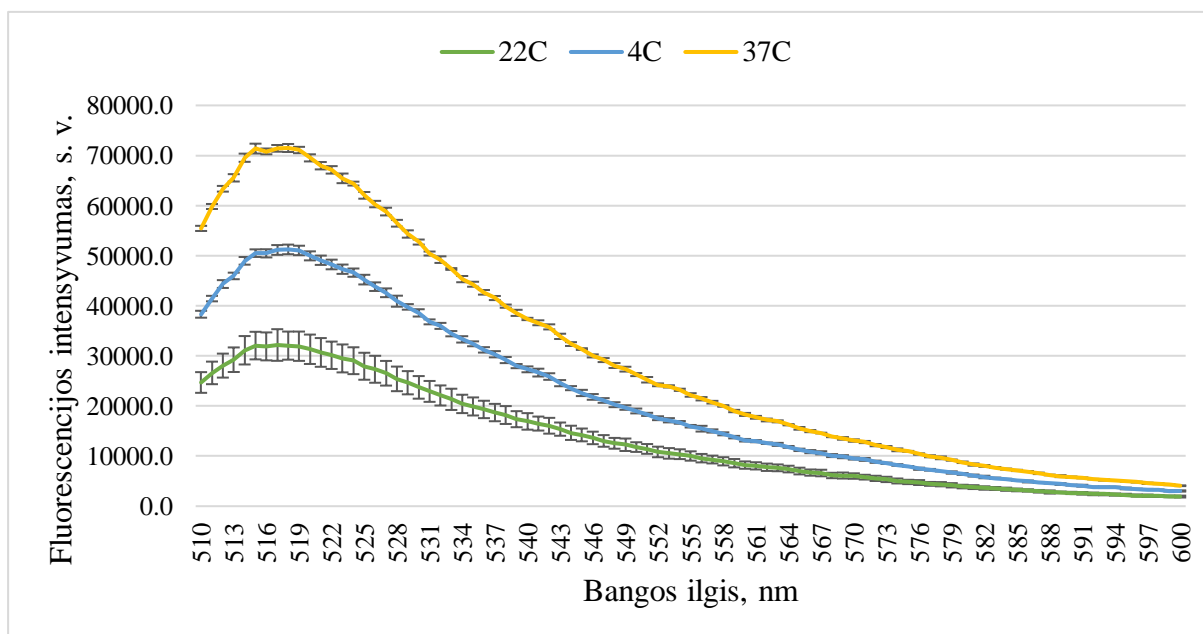
3 lentelės duomenys atitinka spektro (23 pav.) duomenis – matome, jog didžiausias santykis tarp verčių, gautų iki ir po suardymo tritonu, apskaičiuotas kambario temperatūroje (vertė lygi 4,78), kas reiškia, jog iki suardymo tritonu liposomose šioje temperatūroje buvo

išlikęs didžiausias kiekis įkapsuliuoto kalceino. Mažiausiai fluorescencija pakito esant 37 °C temperatūrai – santykis yra 1,54. Taigi, galima daryti išvadas, jog šioje temperatūroje liposomos nėra stabilios, nes nedidelis fluorescencijos pokytis po suardymo tritonu gali rodyti iki to pro membraną pratekėjusį kalceiną bei pastarojo mažą įkapsuliuavimo efektyvumą.

3 lentelė. Maksimalūs fluorescencijos intensyvumai, gauti registruojant liposomų, sudarytų iš DOPC ir DOPG (7:3) su į vidų įterptu kalceinu, tirpalus iki ir po suardymo tritonu X-100 bei jų santykiai, priklausomai nuo skirtingų temperatūros sąlygų.

Temperatūra	Iki tritono	Po tritono	Santykis
4 °C	10921,0	41229,0	3,78
22 °C	10661,0	50920,0	4,78
37 °C	13251,0	20443,0	1,54

Pagal 24 pav. pavaizduotą fluorescencijos spektrą matyti, jog liposomoms, suformuotoms iš DOPC, Chol ir DOPG (5:3,5:1,5), nepalankiausia yra 37 °C temperatūra, kadangi registruotas didžiausias fluorescencijos intensyvumas iki suardymo tritonu.



24 pav. Fluorescencijos intensyvumo spektras, registruotas dėl kalceino išsiskyrimo iš liposomų, sudarytų iš DOPC, Chol ir DOPG (5:3,5:1,5), priklausomai nuo skirtingų laikymo temperatūrų po 10 parų. Žalia, mėlyna ir geltona spalvos atitinkamai vaizduoja 22 °C, 4 °C ir 37 °C temperatūras.

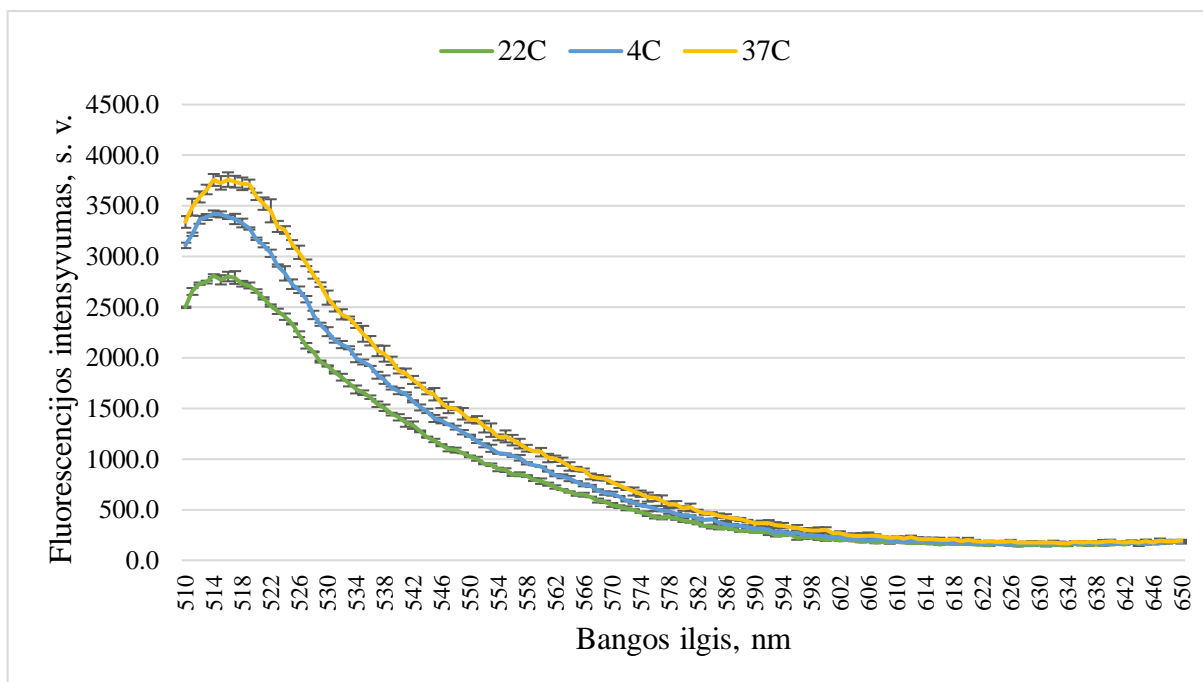


Su šiais duomenimis koreliuoja ir vertės iš 4 lentelės, nes suardžius liposomas tritonu, gautas santykis 37 °C temperatūroje yra pats mažiausias – 2,76, kas rodo, jog iki detergento pridėjimo iš liposomų buvo ištekėjusi didžiausia kalceino dalis, lyginant su kitomis temperatūromis. Tiek spektro, tiek lentelės duomenys rodo, jog 22 °C temperatūroje išsiskyrė mažiausias fluorescuojančio dažo kiekis. Po suardymo tritonu šioje temperatūroje gautas didžiausias santykis – 4,77. Tai rodo aukštą kalceino įkapsuliavimo efektyvumą bei liposomų stabilumą.

4 lentelė. Maksimalūs fluorescencijos intensyvumai, gauti registruojant liposomų, sudarytų iš DOPC, Chol ir DOPG (5:3,5:1,5) su į vidų įterptu kalceinu, tirpalus iki ir po suardymo tritonu X-100 bei jų santykiai, priklausomai nuo skirtingų temperatūros sąlygų.

Temperatūra	Iki tritono	Po tritono	Santykis
4 °C	51255,3	208310,3	4,06
22 °C	32178,0	153563,0	4,77
37 °C	71502,0	197057,0	2,76

Pagal fluorescencijos intensyvumo spektrą, registruotą dėl kalceino išsiskyrimo iš PEG liekaną turinčių liposomų, matyti, jog 37 °C temperatūroje liposomos buvo nestabiliausios dėl didžiausios fluorescencijos, o 22 °C temperatūroje išsiskyrė mažiausias kalceino kiekis. Bendrai iki suardymo tritonu fluorescencijos intensyvumas tarp skirtingų temperatūrų skyrėsi nežymiai – lyginant 37 °C ir 4 °C temperatūras, maksimalus intensyvumas sumažėjo 8,95 % nuo 3759,3 iki 3423,0, o tarp 4 °C ir 22 °C – dar 17,87 % iki 2811,3 (žr. 5 lentelę).



25 pav. Fluorescencijos intensyvumo spektras, registruotas dėl kalceino išsiskyrimo iš liposomų, sudarytų iš DOPC, Chol ir DSPE-PEG(2000) (5,64:3,83:0,53), priklausomai nuo skirtingų laikymo temperatūrų po 10 parų. Žalia, mėlyna ir geltona spalvos atitinkamai vaizduoja 22 °C, 4 °C ir 37 °C temperatūras.

5 lentelė. Maksimalūs fluorescencijos intensyvumai, gauti registruojant liposomų, sudarytų iš DOPC, Chol ir DSPE-PEG(2000) (5,64:3,83:0,53) su į vidų įterptu kalceinu, tirpalus iki ir po suardymo tritonu X-100 bei jų santykiai, priklausomai nuo skirtingų temperatūros sąlygų.

Temperatūra	Iki tritono	Po tritono	Santykis
4 °C	3423,0	9857,3	2,88
22 °C	2811,3	9023,7	3,21
37 °C	3759,3	8997,3	2,39

Tarpusavyje siejasi tiek spektro, tiek 5 lentelės duomenys – matyti, jog 37 °C temperatūroje liposomos yra nestabilios dėl didžiausio išsiskyrusio kalceino kiekio iki suardymo tritonu bei dėl mažiausio apskaičiuoto santykio iki ir po suardymo tritonu (2,39). Kambario temperatūra, kaip ir prieš tai buvusioms visų sudėčių liposomoms, yra palankiausia jų stabilumui – registruotas mažiausias fluorescencijos intensyvumas iki tritono bei didžiausias santykis – 3,21. Tai atitinka ir efektyviausią kalceino įkapsuliavimą į lipidines vezikules.

Taigi, apibendrinus aukščiau pateiktų 22-25 spektrų duomenis, matome, jog visų keturių sudėčių liposomos 37 °C temperatūroje atpalaiduoja didžiausią kiekį kalceino dėl registruotos intensyviausios fluorescencijos, kas parodo liposomų nestabilumą. Kambario temperatūra yra palankiausia lipidinių vezikulių stabilumui dėl išsiskyrusio mažiausio kiekio kalceino. 3-5 lentelių vertės koreliuoja su 23-25 spektrų duomenimis – pagal apskaičiuotus santykius tarp verčių, gautų iki ir po suardymo tritonu, gauta, kad 37 °C temperatūra nėra palanki liposomų stabilumui, nes po suardymo tritonu kalceino atpalaidavimo fluorescencija didėja nežymiai, kas gali rodyti jau ištekėjusią iš liposomų dalį kalceino iki suardymo tritonu. Kambario temperatūra yra palankiausia dėl didžiausio gauto santykio, parodančio, jog iki suardymo tritonu liposomose aptiktas didžiausias įterpto kalceino kiekis. Tad neigiamą krivę bei PEG liekaną turinčios liposomos didžiausią kalceino įterpimo efektyvumą rodo būtent 22 °C temperatūroje. Tuo tarpu liposomų, sudarytų iš DOPC ir Chol (6:4), fluorescencijos spektro ir lentelės duomenys neatitinka vienas kito dėl galimai neįvertinto foninio fluorescencijos fono, kurį galėjo sukelti tirpale esanti neįkapsuliuoto į liposomas kalceino dalis.

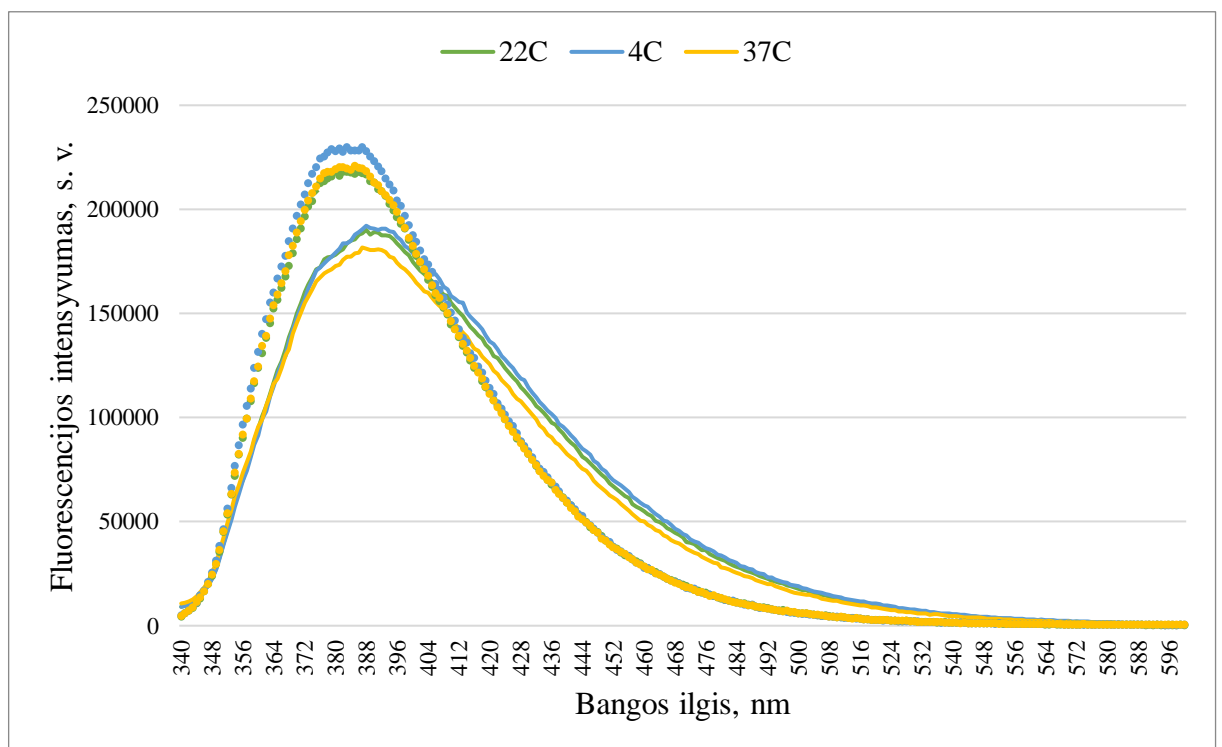
### **3.3. Adapaleno atpalaidavimo iš liposomų stebėjimas**

Atlikus kalceino atpalaidavimo iš liposomų eksperimentus, nuo modelinės sistemos pereita prie potencialaus aknės gydymui skirto vaisto – liposominio adapaleno – fluorescencijos tyrimų. Matuota adapaleno atpalaidavimo sukelta fluorescencija iš skirtingų sudėčių suformuotų lipidinių vezikulių.

26-27 paveikslai vaizduoja adapaleno atpalaidavimo priklausomybę nuo skirtingų temperatūrų atrinktoms liposomų sudėtims po formavimo praėjus 1 parai. Pagal prieš tai atliktus ir aprašytus tyrimus pasirinktos dvi liposomų sudėtys – tai DOPC / DOPG (7:3) ir PEG liekaną turinčios liposomos (DOPC / Chol / DSPE-PEG(2000) (5,64:3,83:0,53)). Liposomų sudėtys buvo pasirenkamos atsižvelgiant į jų stabilumą laike ir skirtingose temperatūrose bei į įkapsuliuoto kalceino atpalaidavimą. Spektrai (26-27 pav.) atspindi liposomų tirpalų matavimus iki ir po tritono pridėjimo trijose temperatūrose (4 °C, 22 °C, 37 °C). Intensyvesnė fluorescencija fiksuojama suardžius liposomas detergentu ir adapalenui išsiskyrus į aplinką. Pagal spektro duomenis galima spręsti apie liposomų su į vidų įterptu adapalenu stabilumą – kuo užregistruojamas didesnis fluorescencijos intensyvumas iki tritono pridėjimo, tuo liposomos yra nestabilesnės dėl didesnio atpalaiduoto adapaleno kiekio. Tai gali rodyti pažeidimus liposomų membranose, dėl ko adapalenas išteka iš lipidinių vezikulių vidaus.

6-7 lentelėse surašyti maksimalūs fluorescencijos intensyvumai, gauti išmatavus skirtingų sudėčių liposomų tirpalus iki ir po suardymo tritonu X-100, priklausomai nuo skirtingų temperatūros sąlygų. Detergento pridėjimas leidžia nustatyti maksimalią fluorescenciją dėl visiško adapaleno išsiskyrimo iš liposomų į aplinką. Pagal fluorescencijos intensyvumus iki ir po tritono pridėjimo apskaičiuotas santykis, kuris leidžia spręsti apie liposomų stabilumą – esant didesniam santykiui, lipidinės vezikulės su į vidų įterptu vaistu yra stabilesnės. Tai rodo ir efektyvesnį adapaleno įterpimą į liposomas. Po suardymo tritonu adapaleno atpalaidavimo sukelta intensyvesnė fluorescencija rodo, jog adapalenui išsiskyrus į aplinką, registruojame didesnę fluorescencijos intensyvumą.

Pagal fluorescencijos intensyvumo spektrą (26 pav.), registruotą dėl adapaleno atpalaidavimo iš liposomų, sudarytų iš DOPC ir DOPG (7:3), matome, jog intensyviausia fluorescencija matuojant tiek iki ir po tritono pridėjimo registruota 4 °C temperatūroje (spektre vaizduojama mėlynos spalvos (linijomis ir taškeliais) kreivėmis).



26 pav. Fluorescencijos intensyvumo spektrai, registruoti dėl adapaleno atpalaidavimo iš liposomų, sudarytų iš DOPC ir DOPG (7:3), priklausomai nuo skirtingų laikymo temperatūrų po 1 paros: iki tritono pridėjimo (linijomis), po tritono pridėjimo (taškeliais). Žalia, mėlyna ir geltona spalvos atitinkamai vaizduoja 22 °C, 4 °C ir 37 °C temperatūras.

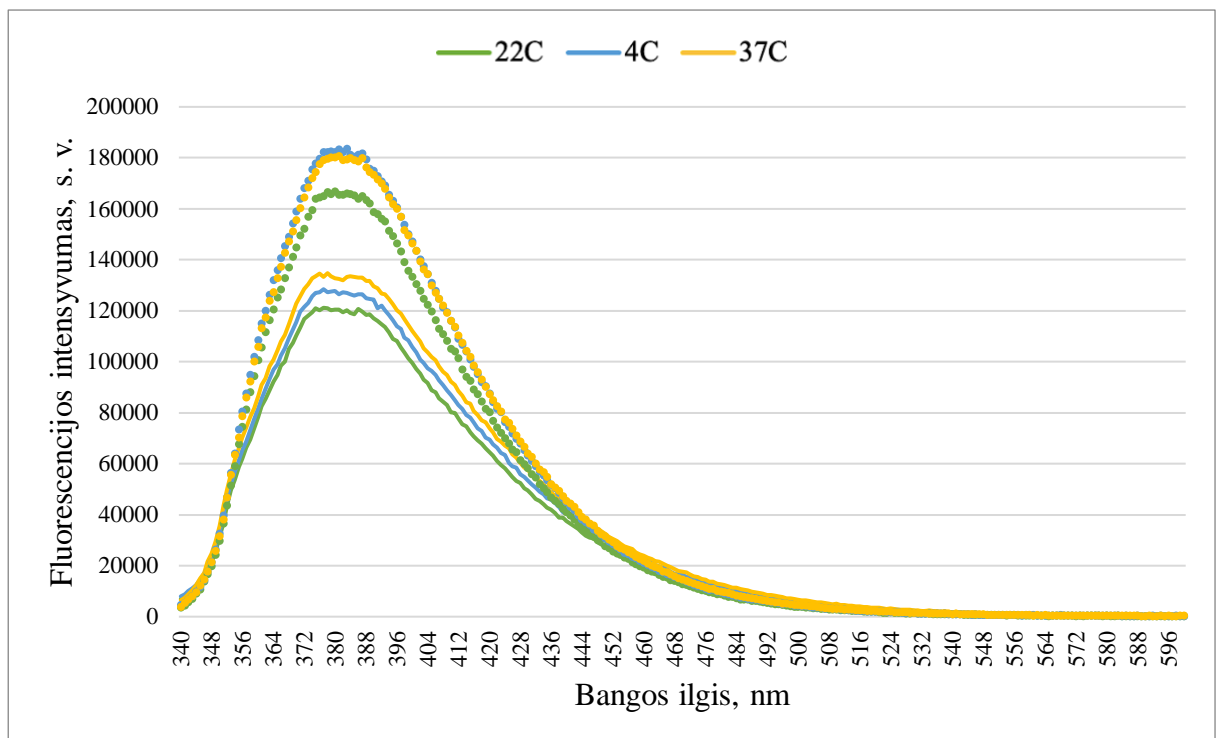
Smailesnis fluorescencijos pikas (didesnis intensyvumas) matomas po liposomų suardymo tritonu, kas rodo išsiskyrusį į aplinką adapaleną – tai įrodo, kad adapalenas buvo įkapsuliuotas į liposomas. Iki detergento pridėjimo mažiausia fluorescencija registruojama 37 °C temperatūroje (spektre vaizduojama geltonos spalvos kreive), tad šioje temperatūroje lipidinės vezikulės su įterptu adapalenu yra stabiliausios. Po suardymo tritonu silpnėjęs adapaleno fluorescencija stebima tiek 22 °C, tiek 37 °C temperatūrose.

Pagal 6 lentelėje apskaičiuotą santykių, gautų iki ir po suardymo tritonu, vertes matyti, jog skirtumai tarp skirtingų temperatūrų yra minimalūs – vertės svyruoja nuo 1,15 22 °C temperatūroje iki 1,21 37 °C temperatūroje. Pastarojoje temperatūroje liposomos yra stabiliausios – tai koreliuoja ir su spektro (26 pav.) duomenimis – bei turinčios didžiausią adapaleno įkapsuliuojimo efektyvumą. Mažesni santykiai apskaičiuoti 4 °C ir 22 °C temperatūrose – šios sąlygos buvo nepalankesnės lipidinių vezikulių stabilumui. Tai gali rodyti, jog po liposomų suardymo tritonu registruota fluorescencija nebuvo stipri dėl galimai iš liposomų jau ištekėjusio tam tikro adapaleno kiekio – įkapsuliuojimo efektyvumas yra mažesnis.

6 lentelė. Maksimalūs fluorescencijos intensyvumai, gauti registruojant liposomas, sudarytas iš DOPC ir DOPG (7:3) su į vidų įterptu adapalenu, iki ir po suardymo tritonu X-100, bei jų santykiai, priklausomai nuo skirtingų temperatūros sąlygų.

Temperatūra	Iki tritono	Po tritono	Santykis
4 °C	192129,4	229822,7	1,2
22 °C	190145,4	218024,6	1,15
37 °C	181690,7	220718,3	1,21

Pagal fluorescencijos intensyvumo spektrą (27 pav.), registruotą dėl adapaleno atpalaidavimo iš PEG liekaną turinčių liposomų, matyti, jog iki detergento pridėjimo didžiausia fluorescencija registruota aukščiausioje tirtoje temperatūroje – 37 °C, kas rodo, jog šiose sąlygose liposomos su įkapsuliuotu adapalenu yra nestabiliausios, nes ištekėjo didžiausias kiekis vaistinės medžiagos. Tuo tarpu silpniausia fluorescencija stebima 22 °C temperatūroje. Po liposomų suardymo intensyviausia fluorescencija stebima esant 4 °C ir 37 °C temperatūroms mažu skirtumu, o silpniausia – kambario temperatūroje.



27 pav. Fluorescencijos intensyvumo spektras, registruotas dėl adapaleno atpalaidavimo iš liposomų, sudarytų iš DOPC, Chol ir DSPE-PEG(2000) (5,64:3,83:0,53), priklausomai nuo skirtingų laikymo temperatūrų po 1 paros: iki tritono pridėjimo (linijomis), po tritono pridėjimo (taškeliais). Žalia, mėlyna ir geltona spalvos atitinkamai vaizduoja 22 °C, 4 °C ir 37 °C temperatūras.

Spekto (27 pav.) duomenis palyginus su esančiais 7 lentelėje matyti, jog didžiausia maksimalių fluorescencijos intensyvumų iki ir po tritono pridėjimo santykio vertė apskaičiuota esant 4 °C, o mažiausia – 37 °C temperatūrai. Iš to galima daryti išvadą, kad 4 °C temperatūroje PEG liekaną turinčios liposomos išlaiko didžiausią kiekį įkapsuliuoto adapaleno – liposomos yra stabiliausios ir turinčios didžiausią vaistinės medžiagos įkapsuliuavimo efektyvumą. Tuo

tarpu 37 °C temperatūroje įterpto į lipidinę vezikulę adapaleno kiekis yra mažiausias – liposomos pasižymi mažiausiu stabilumu – tai koreliuoja ir su spektro (27 pav.) duomenimis.

7 lentelė. Maksimalūs fluorescencijos intensyvumai, gauti registruojant liposomas, sudarytas iš DOPC, Chol ir DSPE-PEG(2000) (5,64:3,83:0,53) su į vidų įterptu adapalenu, iki ir po suardymo tritonu X-100, bei jų santykiai, priklausomai nuo skirtingų temperatūros sąlygų.

Temperatūra	Iki tritono	Po tritono	Santykis
4 °C	128455,0	183476,5	1,43
22 °C	121183,1	166867,9	1,38
37 °C	134765,4	180549,3	1,34

Apibendrinant abiejų sudėčių liposomų su į vidų įterptu adapalenu stabilumus pagal 26-27 pav. spektrų ir 6-7 lentelių duomenis, galima daryti išvadas, jog PEG liekaną turinčios liposomos parodė didesnę fluorescencinį intensyvumą po tritono pridėjimo, kas gali reikšti, jog iki visiško suardymo liposomos savyje išlaikė didesnę procentinį kiekį adapaleno negu įkrautos liposomos (DOPC ir DOPG (7:3)), o tai nurodo didesnę pegilintų liposomų stabilumą. Pagal spektrus (26-27 pav.) matyti, kad abiejų sudėčių liposomos fluorescavo intensyviausiai po suardymo tritonu 4 °C temperatūroje. Duomenys siejasi ir su apskaičiuotais santykiais lentelėse – 4 °C temperatūroje abiejų sudėčių liposomos buvo stabilesnės ir dėl jų fluorescencijos intensyvumo santykių padidėjimo po vezikulių suardymo tritonu adapaleno įkapsuliavimo efektyvumas yra didžiausias.

## 4. IŠVADOS

1. Ištyrus keturių skirtingų sudėčių liposomas (DOPC / Chol (6:4), DOPC / DOPG (7:3), DOPC / Chol / DOPG (5:3,5:1,5) ir DOPC / Chol / DSPE-PEG(2000) (5,64;3,83:5,3)) dinaminės šviesos sklaidos metodu, nustatyta, jog formavimo dieną liposomų spindulio vidurkio dydžiai keitėsi nežymiai, išskyrus PEG liekaną turinčių liposomų, kurių spindulio dydis buvo maždaug du kartus mažesnis. Lyginant skirtingas temperatūras, matoma, jog per savaitę visų sudėčių liposomos stabiliausias buvo kambario (22 °C) temperatūroje dėl mažiausių vidutinio spindulio dydžio pokyčių. O 37 °C temperatūroje liposomos rodė mažiausią stabilumą dėl ryškiausių vidutinio spindulio dydžio pokyčių.
2. Pamatavus atpalaiduoto kalceino fluorescenciją iš skirtingų sudėčių liposomų, nustatyta, kad nestabiliausias buvo lipidinės vezikulės, sudarytos iš DOPC ir Chol (6:4) dėl didžiausių fluorescencijos intensyvumo pokyčių, o stabiliausias – PEG liekaną turinčios liposomos, kurių kalceino atpalaidavimo sukelti fluorescencijos intensyvumo pokyčiai buvo mažiausi. Įvertinus skirtingų temperatūrų įtaką liposomų stabilumui, matoma, kad visų keturių sudėčių liposomos nestabiliausias buvo 37 °C temperatūroje, o 22 °C temperatūra buvo palankiausia lipidinių pūslelių stabilumui dėl išsiskyrusio mažiausio kiekio kalceino.
3. Išmatavus adapaleno atpalaidavimo sukeltą fluorescenciją iš liposomų, suformuotų iš DOPC / DOPG (7:3) bei PEG liekaną turinčių liposomų, išsiaiškinta, jog didžiausias adapaleno įkapsuliavimo į lipidines vezikules efektyvumas stebėtas 4 °C temperatūroje. Lyginant abi liposomų sudėtis, didesnę stabilumą parodė PEG liekaną turinčios liposomos su į vidų įterptu adapalenu dėl didesnio fluorescencinio intensyvumo po tritono pridėjimo.



## LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics*. 2017 Mar 27;9(2):12.
2. Jacob S, Nair AB, Shah J, Gupta S, Boddu SHS, Sreeharsha N, et al. Lipid Nanoparticles as a Promising Drug Delivery Carrier for Topical Ocular Therapy; An Overview on Recent Advances. *Pharmaceutics*. 2022 Feb 27;14(3):533.
3. Rahman SA, Abdelmalak NS, Badawi A, Elbayoumy T, Sabry N, El Ramly A. Tretinoin-loaded liposomal formulations: from lab to comparative clinical study in acne patients. *Drug Delivery*. 2015 May 25;23(4):1184–93.
4. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*. 2013 Feb 22;8(1):102.
5. de Leeuw J, de Vijlder H, Bjerring P, Neumann H. Liposomes in dermatology today. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2009 May 1;23(5):505–516.
6. Schlich M, Musazzi UM, Campani V, Biondi M, Franzé S, Lai F, et al. Design and development of topical liposomal formulations in a regulatory perspective. *Drug Delivery and Translational Research*. 2021 Nov 9;12(8):1811–1828.
7. Duzgunes N, Gregoriadis G. Introduction: The Origins of Liposomes: Alec Bangham at Babraham. *Methods in Enzymology*. 2005 Dec;391:1–3.
8. Deamer DW. From “Banghasomes” to liposomes: A memoir of Alec Bangham, 1921–2010. *The FASEB Journal*. 2010 May;24(5):1308–1310.
9. Lee M-K. Liposomes for Enhanced Bioavailability of Water-Insoluble Drugs: In Vivo Evidence and Recent Approaches. *Pharmaceutics*. 2020 Mar 13;12(3):264.
10. Madhav DNVS, Ojha MA, Saini A. A platform for liposomal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics and Drug Analysis*. 2015 Jan 5;3(1):6–11.
11. Pandey H, Rani R, Agarwal V. Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2016;59(0).
12. Cholesterol (chemical structure) | Wikimedia [Internet]. [žiūrėta 2023 m. vasario 7 d.].  
Prieiga per:  
[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c4/Cholesterol\\_%28chemical\\_structure%29.svg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c4/Cholesterol_%28chemical_structure%29.svg)

13. Nakhaei P, Margiana R, Bokov DO, Abdelbasset WK, Jadidi Kouhbanani MA, Varma RS, et al. Liposomes: Structure, Biomedical Applications, and Stability Parameters With Emphasis on Cholesterol. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021 Sep 9;9:705886.
14. Alexander-Bryant AA, Vanden Berg-Foels WS, Wen X. Bioengineering Strategies for Designing Targeted Cancer Therapies. *Advances in Cancer Research*. 2013;118:1–59.
15. Gbian DL, Omri A. Lipid-Based Drug Delivery Systems for Diseases Managements. *Biomedicines*. 2022 Sep 1;10(9):2137.
16. Nsairat H, Khater D, Sayed U, Odeh F, Al Bawab A, Alshaer W. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon*. 2022 May;8(5):e09394.
17. Kaddah S, Khreich N, Kaddah F, Charcosset C, Greige-Gerges H. Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule. *Food and Chemical Toxicology*. 2018 Mar;113:40–48.
18. Phospholipid structure | Harvard University. LabXchange [Internet]. [žiūrėta 2022 m. lapkričio 10 d.]. Prieiga per: <https://www.labxchange.org/library/pathway/lx-pathway:cdddd795-f333-4ab3-8ebb-9ad3f80dc407/items/lx-pb:cdddd795-f333-4ab3-8ebb-9ad3f80dc407:html:a806ca3c>
19. Khan I, Elhissi A, Shah M, Alhnan MA, Ahmed W. Liposome-based carrier systems and devices used for pulmonary drug delivery. *Biomaterials and Medical Tribology*. 2013;395–443.
20. M. Abdulbaqi I, Darwis Y, Abdul Karim Khan N, Abou Assi R, Ali Khan A. Ethosomal nanocarriers: the impact of constituents and formulation techniques on ethosomal properties, in vivo studies, and clinical trials. *International Journal of Nanomedicine*. 2016 May 25;11:2279-2304.
21. Ragaliauskas T. Lipidinių membranų imobilizavimas ant paviršiaus ir jų tyrimas paviršiaus plazmonų rezonanso metodu. Daktaro disertacija. Fiziniai mokslai, biochemija. Vilnius 2017. Prieiga per: <https://epublications.vu.lt/object/elaba:21080411/21080411.pdf>
22. Prajapati BG, Patel NK, Panchal MM. Topical Liposomes in Drug Delivery: A Review. 2021 Aug;39-44.
23. Kim EM, Jeong HJ. Liposomes: Biomedical Applications. *Chonnam Medical Journal*. 2021 Jan 25;57(1):27-35.
24. Dua JS, Rana AC, Bhandari AK. Liposome: Methods of Preparation and Applications. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*. 2012 Jun;3(2):14-20.

25. Yamauchi M, Tsutsumi K, Abe M, Uosaki Y, Nakakura M, Aoki N. Release of drugs from liposomes varies with particle size. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2007 May 1;30(5):963–966.
26. Gabizon AA. Pegylated Liposomal Doxorubicin: Metamorphosis of an Old Drug into a New Form of Chemotherapy. *Cancer Investigation*. 2001 Feb;19(4):424–436.
27. Garg T, K. Goyal A. Liposomes: Targeted and Controlled Delivery System. *Drug Delivery Letters*. 2014 Apr;4(1):62–71.
28. Čižinauskas V. Liposominių nano-nešiklių su dihidrokvercetinu modeliavimas, charakterizavimas ir galimybių pritaikyti apsaugai nuo UV spinduliuotės poveikio tyrimas. Daktaro disertacija. Biomedicinos mokslai, farmacija. Kaunas 2018. Prieiga per: <https://publications.lsmuni.lt/object/elaba:30219604/index.html>
29. Schaferkorting M, Mehnert W, Korting H. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007 Jul 10;59(6):427–443.
30. Gyongyosi M, Lukovic D, Zlabinger K, Spannbaauer A, Gugerell A, Pavo N, et al. Liposomal doxorubicin attenuates cardiotoxicity via induction of interferon-related DNA damage resistance. *Cardiovascular Research*. 2020 Apr 1;116(5):970-982.
31. Takikawa M, Fujisawa M, Yoshino K, Takeoka S. Intracellular Distribution of Lipids and Encapsulated Model Drugs from Cationic Liposomes with Different Uptake Pathways. *International Journal of Nanomedicine*. 2020 Oct 29;15:8401–8409.
32. Sun L, Gao Y, Wang Y, Wei Q, Shi J, Chen N, et al. Guiding protein delivery into live cells using DNA-programmed membrane fusion. *Chemical Science*. 2018 Jun 15;9(27):5967–5975.
33. Yang J, Bahreman A, Daudey G, Bussmann J, Olsthoorn RCL, Kros A. Drug Delivery via Cell Membrane Fusion Using Lipopeptide Modified Liposomes. *ACS Central Science*. 2016 Aug 22;2(9):621–630.
34. Gosavi A, Salunkhe KK. Updated Review On: Liposome. *International Journal of Technology Enhanced Learning*. 2020 Sep;8(9):12-20.
35. Sufala R, Rubeena K, Deepshikha R, Shyma K, Arvind J, Anushree J. An Integrated Review on Liposomes: a Novel Drug Delivery System. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2022 Oct 24;11(11):683-704.
36. Maja L, Željko K, Mateja P. Sustainable technologies for liposome preparation. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2020 Nov 1;165:104984.

37. Abu Lila AS, Kiwada H, Ishida T. The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: Clinical challenge and approaches to manage. *Journal of Controlled Release*. 2013 Nov 28;172(1):38–47.
38. Rideau E, Dimova R, Schwille P, Wurm FR, Landfester K. Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking. *Chemical Society Reviews*. 2018 Sep 4;47(23):8572–8610.
39. Inglut CT, Sorrin AJ, Kuruppu T, Vig S, Cicalo J, Ahmad H, et al. Immunological and Toxicological Considerations for the Design of Liposomes. *Nanomaterials*. 2020 Jan 22;10(2):190.
40. von Moos R, Thuerlimann BJK, Aapro M, Rayson D, Harrold K, Sehouli J, et al. Pegylated liposomal doxorubicin-associated hand–foot syndrome: Recommendations of an international panel of experts. *European Journal of Cancer*. 2008 Apr;44(6):781–790.
41. Lombardo D, Kiselev MA. Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application. *Pharmaceutics*. 2022 Feb 28;14(3):543.
42. Sforzi J, Palagi L, Aime S. Liposome-Based Bioassays. *Biology*. 2020 Aug 1;9(8):202.
43. Harashima H, Sakata K, Funato K, Kiwada H. Enhanced Hepatic Uptake of Liposomes Through Complement Activation Depending on the Size of Liposomes. *Pharmaceutical Research*. 1994 Mar 1;11(3):402–406.
44. Ong S, Chitneni M, Lee K, Ming L, Yuen K. Evaluation of Extrusion Technique for Nanosizing Liposomes. *Pharmaceutics*. 2016 Dec 21;8(4):36.
45. Talsma H, Özer AY, Bloois L van, Crommelin DJA. The Size Reduction of Liposomes with a High Pressure Homogenizer (Microfluidizer™). Characterization of Prepared Dispersions and Comparison with Conventional Methods. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1989 Jan;15(2):197–207.
46. Dikpati A, Mohammadi F, Greffard K, Quéant C, Arnaud P, Bastiat G, et al. Residual Solvents in Nanomedicine and Lipid-Based Drug Delivery Systems: a Case Study to Better Understand Processes. *Pharmaceutical Research*. 2020 Jul 17;37(8):149.
47. Nikolova M, Bayryamov S. A Review of Methods and Techniques for Characterization of Structure, Morphology and Dispersion Stability of Microcapsules. *Conference: Proceedings of University of Ruse*. 2019 Oct;58(10.1).
48. Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*. 2016 Oct 6;8(4):409–427.

49. Dynamic Light Scattering | Chemistry LibreTexts [Internete]. [žiūrēta 2022 m. lapkričio 14 d.]. Prieiga per: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Physical\\_Methods\\_in\\_Chemistry\\_and\\_Nano\\_Science\\_\(Barron\)/02%3A\\_Physical\\_and\\_Thermal\\_Analysis/2.04%3A\\_Dynamic\\_Light\\_Scattering](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_(Barron)/02%3A_Physical_and_Thermal_Analysis/2.04%3A_Dynamic_Light_Scattering)
50. The principles of dynamic light scattering | Anton Paar Wiki [Internete]. [žiūrēta 2022 m. lapkričio 14 d.]. Prieiga per: <https://wiki.anton-paar.com/en/the-principles-of-dynamic-light-scattering/>
51. Salassi S, Simonelli F, Bartocci A, Rossi G. A Martini coarse-grained model of the calcein fluorescent dye. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2018 Aug 9;51(38):1-10.
52. AlSawaftah NM, Awad NS, Paul V, Kawak PS, Al-Sayah MH, Hussein GA. Transferrin-modified liposomes triggered with ultrasound to treat HeLa cells. *Scientific Reports*. 2021 Jun 2;11(1):11589.
53. Liu P, Chen G, Zhang J. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. *Molecules*. 2022 Feb 17;27(4):1372.
54. Maherani B, Arab-Tehrany E, Kheirilomoom A, Geny D, Linder M. Calcein release behavior from liposomal bilayer; influence of physicochemical/mechanical/structural properties of lipids. *Biochimie*. 2013 Jul 16;95(11):2018–2033.
55. Romani A, Clementi C, Miliani C, Favaro G. Fluorescence Spectroscopy: A Powerful Technique for the Noninvasive Characterization of Artwork. *Accounts of Chemical Research*. 2010 Jun 15;43(6):837–846.
56. Bose A, Thomas I, Kavitha G, Abraham E. Fluorescence spectroscopy and its applications: A Review. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Analysis*. 2018;8(1):1-8.
57. What Is Fluorescence Spectroscopy—FAQ Guide | Agilent [Internete]. [žiūrēta 2022 m. lapkričio 24 d.]. Prieiga per: <https://www.agilent.com/en/support/molecular-spectroscopy/fluorescence-spectroscopy/what-is-fluorescence-spectroscopy-faqs>
58. Jablonski Diagram. What is it? | Edinburgh Instruments [Internete]. [žiūrēta 2023 m. sausio 13 d.]. Prieiga per: <https://www.edinst.com/ko/blog/jablonski-diagram/>
59. Jablonski diagram | Chemistry LibreTexts [Internete]. [žiūrēta 2023 m. sausio 15 d.]. Prieiga per: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbo](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbo)

ok\_Maps/Supplemental\_Modules\_(Physical\_and\_Theoretical\_Chemistry)/Spectroscopy/Electronic\_Spectroscopy/Jablonski\_diagram

60. Dvifotonė sensibilizacija. Laboratorinis darbas | Biofotonika, Fizikos fakultetas [Internete]. [žiūrėta 2023 m. sausio 15 d.]. Prieiga per: [http://www.biofotonika.ff.vu.lt/wp-content/uploads/2012/09/LD\\_Dvifotonė-sensibilizacija.pdf](http://www.biofotonika.ff.vu.lt/wp-content/uploads/2012/09/LD_Dvifotonė-sensibilizacija.pdf)
61. Albani JR. Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy. Chichester: John Wiley & Sons; 2007.
62. Solubility Rules. Solubility of Common Ionic Compounds | Sigma Aldrich [Internete]. [žiūrėta 2023 m. vasario 11 d.]. Prieiga per: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/en/technical-documents/technical-article/genomics/cloning-and-expression/blue-white-screening>
63. Zdanis P. Feofitino-A fototransformacijų tyrimai antioksidantų aplinkoje. Pagrindinių studijų baigiamasis darbas. Modernių technologijų fizikos ir vadybos studijų programa. Vilnius 2016. Prieiga per: <http://talpykla.elaba.lt/elaba-fedora/objects/elaba:20217953/datastreams/MAIN/content>
64. Lin M, Qi X-R. Purification Method of Drug-Loaded Liposome. Springer Reference Technik. 2018 Nov 28;1–11.
65. 37,656 Centrifugation Images, Stock Photos & Vectors | Shutterstock [Internete]. [žiūrėta 2023 m. kovo 9 d.]. Prieiga per: <https://www.shutterstock.com/search/centrifugation>
66. Drug Delivery Systems: An Overview | Pharmapproach [Internete]. [žiūrėta 2022 m. gruodžio 1 d.]. Prieiga per: <https://www.pharmapproach.com/drug-delivery-systems-an-overview/>
67. Kraft JC, Freeling JP, Wang Ziyao, Ho RJY. Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2014 Jan;103(1):29–52.
68. Hoogevest P, Tiemessen H, Metselaar JM, Drescher S, Fahr A. The Use of Phospholipids to Make Pharmaceutical Form Line Extensions. European Journal of Lipid Science and Technology. 2021 Jan 28;123(4):2000297.
69. Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, Wu SY, Sood AK, Hua S. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. Frontiers in Pharmacology. 2015 Dec 1;6:286.

70. Doxil: New drug application | FDA [Internet]. Center for Drug Evaluation & Research—FDA. [žiūrėta 2023 m. sausio 17 d.]. Prieiga per: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2004/050718Orig1s019.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2004/050718Orig1s019.pdf)
71. Ulrich AS. Biophysical Aspects of Using Liposomes as Delivery Vehicles. *Bioscience Reports*. 2002 Apr 1;22(2):129–150.
72. What is Acne? | Penn Medicine [Internet]. [žiūrėta 2022 m. gruodžio 17 d.]. Prieiga per: <https://www.pennmedicine.org/for-patients-and-visitors/patient-information/conditions-treated-a-to-z/acne>
73. Ayer J, Burrows N. Acne: more than skin deep. *Postgraduate Medical Journal*. 2006 Aug 1;82(970):500–506.
74. Lynn D, Umari T, Dellavalle R, Dunnick C. The epidemiology of acne vulgaris in late adolescence. *Adolescent Health, Medicine and Therapeutics*. 2016 Jan 19;7:13-25.
75. Oge LK, Broussard A, Marshall MD. Acne Vulgaris: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*. 2019 Oct 15;100(8):475-484.
76. Titus S, Hodge J. Diagnosis and treatment of acne. *Am Fam Physician*. 2012 Oct 15;86(8):734-740.
77. Czernielewski J, Michel S, Bouclier M, Baker M, Hensby JC. Adapalene biochemistry and the evolution of a new topical retinoid for treatment of acne. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2001 Dec;15(3):5–12.
78. Piskin S, Uzunali E. A review of the use of adapalene for the treatment of acne vulgaris. *Ther Clin Risk Manag*. 2007 Aug 1;3(4):621-624.
79. VVKT | VP peržiūra [Internet]. [žiūrėta 2022 m. gruodžio 21 d.]. Prieiga per: <https://vapris.vvkt.lt/vvkt-web/public/medications/view/10993>
80. Babaeinejad SH, Fouladi RF. The efficacy, safety, and tolerability of adapalene versus benzoyl peroxide in the treatment of mild acne vulgaris: a randomized trial. *J Drugs Dermatol*. 2013 Jul 1;12(7):790-794.
81. Kumar V, Banga AK. Intradermal and follicular delivery of adapalene liposomes. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2015 Sep 7;42(6):871–879.
82. Patel A, Dayaramani R. Novel Formulation for Facial Acne using Liposomal Gel Containing Lipid Soluble Naphthoic Acid Derivative. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 2022 May 16;56(2):245–252.
83. Jain S, Kale DP, Swami R, Katiyar SS. Codelivery of benzoyl peroxide & adapalene using modified liposomal gel for improved acne therapy. *Nanomedicine*. 2018 Jun;13(12):1481–1493.

84. Ren H, He Y, Liang J, Cheng Z, Zhang M, Zhu Y, et al. Role of Liposome Size, Surface Charge, and PEGylation on Rheumatoid Arthritis Targeting Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2019 May 6;11(22):20304–20315.
85. Kolate A, Baradia D, Patil S, Vhora I, Kore G, Misra A. PEG — A versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 2014 Oct 28;192:67–81.
86. Anabousi S, Kleemann E, Bakowsky U, Kissel T, Schmehl T, Gessler T, et al. Effect of PEGylation on the Stability of Liposomes During Nebulisation and in Lung Surfactant. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2006 Sep 1;6(9):3010–3016.
87. Caddeo C, Pucci L, Gabriele M, Carbone C, Fernandez-Busquets X, Valenti D, et al. Stability, biocompatibility and antioxidant activity of PEG-modified liposomes containing resveratrol. *Int J Pharm*. 2018 Mar 1;538(1-2):40-47.
88. Slepushkin V, Simoes S, de Lima MC, Duzgunes N. Sterically stabilized pH-sensitive liposomes. *Methods Enzymol*. 2004;387:134-147.
89. Tolba MM, El-Gamal RM. Determination of adapalene in gel formulation by conventional and derivative synchronous fluorimetric approaches. Application to stability studies and in vitro diffusion test. *Chemistry Central Journal*. 2016 May 28;10(1):33.
90. Paolino D, Accolla ML, Cilurzo F, Cristiano MC, Cosco D, Castelli F, et al. Interaction between PEG lipid and DSPE/DSPC phospholipids: An insight of PEGylation degree and kinetics of de-PEGylation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017 Jul 1;155:266–275.