

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie



HYBRIDNÍ POLYMERNÍ-LIPIDICKÉ NANOČÁSTICE
JAKO NOSIČE LÉČIV

Diplomová práce

Hradec Králové 2020

Žemličková Simona

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 15.5. 2020

Simona Žemličková

Ráda bych poděkovala svému školiteli PharmDr. Ondřeji Holasovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, ochotu, trpělivost a pomoc při realizaci experimentální části.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické technologie
Školitel: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.
Posluchač: Simona Žemličková
Název diplomové práce: Hybridní polymerní-lipidické nanočástice jako nosiče léčiv

Práce je zaměřena na hybridní polymerní-lipidické nanočástice, jejich výhody získané od polymerní i lipidické složky, účel modifikace povrchu, základní vlastnosti nanočástic, metody přípravy a využití nanočástic ve zdravotnictví.

Cílem experimentální části bylo připravit nanočástice složené z polyesteru a lipidu pomocí emulzní odpařovací metody a nanoprecipitace. Byly použity dva typy lineárního polymeru poly(mléčné-ko-glykolové kyseliny) v různém poměru s fosfatidylcholinem. Použitým surfaktantem v různých koncentracích byl poloxamer Pluronic® F127 a organickým rozpouštědlem ethylacetát a aceton. Kurkumin představoval modelovou účinnou látku. Byl hodnocen vliv lipidické části a surfaktantu na velikost a zeta potenciál vzniklých nanočástic. Změny podmínek během přípravy, které zahrnovaly celou řadu procesních parametrů, měly také vliv na sledované parametry. Dále byla hodnocena enkapsulační efektivita a drug loading. V závěru byly provedeny disoluční testy.

V této práci bylo zjištěno, že se zvyšujícím se poměrem polymerní části k lipidické se velikost vzniklých nanočástic zvyšovala. Emulzní odpařovací metoda vedla ke vzniku nanočástic s výhodnějšími výsledky velikostí a zeta potenciálů, než tomu bylo v případě nanoprecipitace. Hodnoty zeta potenciálů se pohybovaly od -21 mV do -42 mV, což je jedním z ukazatelů stability vzniklé nanosuspenze. Nejlepší výsledky velikostí a zeta potenciálu vyšly u přípravy, během které byla vodná fáze rozdělena na dvě poloviny a nedocházelo k ledování během sonifikace. Enkapsulační efektivita kurkuminu se pohybovala v rozmezí od 13 % do 65 %. Vyšší hodnoty enkapsulace vykazovaly nanočástice s převažující polymerní částí, ze kterých se kurkumin uvolňoval rychleji.

Klíčová slova: PLGA, fosfolipid, lipidní-polymerní hybridní nanočástice

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Pharmaceutical Technology
Consultants: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.
Student: Simona Žemličková
Title of thesis: Hybrid polymeric-lipid nanoparticles as drug carriers

The work is focused on hybrid polymer-lipid nanoparticles, their advantages obtained from polymer and lipid part, purpose of surface modification, basic properties of nanoparticles, methods of preparation, modification of preparation conditions and use of nanoparticles in medicine.

The aim of the experimental part was to prepare nanoparticles composed of polyester and lipid by emulsion evaporation method and nanoprecipitation. Two types of linear polymer poly (lactic-co-glycolic acid) and phosphatidylcholine were used in various ratios. The surfactant used for stabilization was poloxamer Pluronic® F127 and the organic solvents were ethyl acetate and acetone. Curcumin served as a model active substance. The effect of lipid and surfactant on the size and zeta potential of nanoparticles was evaluated. Modification of preparation conditions, which included many process parameters, also influenced the monitored parameters. Encapsulation effectivity and drug loading were also tested. Dissolution tests were performed.

It was found that size of nanoparticles increased with increasing polymer to lipid ratio. The emulsion evaporation method led to the formation of nanoparticles with more advantageous results of sizes and zeta potentials than in the case of nanoprecipitation. Values of zeta potential ranged from -21 mV to -42 mV, which is one of the indicators of stability of the resulting nanosuspension. The best results of size and zeta potential were in the preparation during which the aqueous phase was split into two aliquots and without ice during sonication. The encapsulation effectivity of curcumin ranged from 13 % to 65 %. The nanoparticles with higher amount of polymer showed higher values of encapsulation effectivity and faster release of curcumin.

Keywords: PLGA, phospholipid, lipid-polymer hybrid nanoparticles

OBSAH

Úvod a cíl práce	8
Seznam zkratk	9
1 Teoretická část.....	10
1.1 Nanočástice	10
1.2 Struktura hybridních polymerních-lipidických nanočástic	10
1.2.1 Nanočástice typu jádro-obal	10
1.3 Výhody hybridních polymerních-lipidických nanočástic	11
1.4 Modifikace povrchu.....	12
1.5 Vlastnosti nanočástic	13
1.5.1 Velikost.....	13
1.5.2 Zeta potenciál.....	14
1.5.3 Drug loading	15
1.5.4 Stabilita.....	16
1.6 Příprava nanočástic.....	16
1.6.1 Příprava nanočástic z polymeru	17
1.6.2 Příprava nanočástic z monomeru	20
1.7 Využití nanočástic ve zdravotnictví.....	21
1.7.1 Léčba rakoviny.....	22
1.7.2 Léčba diabetu mellitu	23
1.7.3 Léčba revmatoidní artritidy	23
1.7.4 Dodání nízkomolekulárních heparinů	24
1.7.5 Dodání diagnostických činidel.....	24
1.8 Kurkumin	25
2 Praktická část.....	26
2.1 Použité přístroje.....	26

2.2	Použité suroviny	26
2.3	Pracovní postup	27
2.3.1	Příprava vodné fáze	27
2.3.2	Příprava organické fáze	27
2.3.3	Metody přípravy	28
2.3.4	Měření velikosti a zeta potenciálu nanočástic	29
2.3.5	Úprava podmínek přípravy	29
2.3.6	Enkapsulační efektivita, výtěžnost a drug loading.....	30
2.3.7	Disoluce	32
3	Výsledky a diskuze	34
3.1	Měření velikosti částic a zeta potenciálu	34
3.2	Úprava podmínek přípravy	45
3.3	Hodnocení enkapsulační efektivity, výtěžnosti a drug loading.....	55
3.4	Hodnocení disoluce	57
	Závěr.....	59
	Seznam obrázků, tabulek a grafů	60
	Použitá literatura	63

ÚVOD A CÍL PRÁCE

Potenciál cíleného využití léčiv v souvislosti se zefektivněním léčby dal podnět k významnému pokroku ve farmaceutickém inženýrství. Jedná se zejména o přípravu nanočástic o velikosti rozpětí 1-500 nm. (1) Slouží k dodávání řady léčiv zahrnující léčiva s malými molekulami, geny, RNA, peptidy a diagnostická činidla. (2) Mezi výhody nanočástic patří kromě cílení na požadované buňky také lepší stabilita při skladování, delší systémová cirkulace, vyšší účinnost enkapsulovaného léčiva a biokompatibilita. (3)

Velikostí, tvarem a povrchovým nábojem lze upravit cílená místa pro působení léčiv. Jedná se o pasivní targeting. Výhodnějších výsledků dosahují nanočástice s n esférickým tvarem a pozitivně nabitě, jelikož mají vyšší afinitu k záporně nabitým membránám. Naopak aktivní targeting cílí na specifické receptory, které se nacházejí na cílových buňkách, pomocí ligandů umístěných na povrchu nanočástic. Nejběžněji se využívá folátový ligand, dále také epidermální růstový faktor, monoklonální protilátky, transferin atd. (4,5)

Nanočástice se používají k diagnostice a léčbě nádorových onemocnění, AIDS, diabetu mellitu, revmatoidní artritidě a dalších autoimunitních onemocnění. V léčbě jsou preferovány polymerní nanočástice, které nemají tendenci se v organismu kumulovat na rozdíl od anorganických nanočástic. (4,6)

Hybridní polymerní-lipidické částice získaly výhody obou komponent, jak polymeru, tak lipidu. Polymerní jádro zajišťuje mechanickou stabilitu, biodegradabilitu a úzkou distribuční křivku. Lipidový obal je biokompatibilní a vykazuje podobné chování jako buněčné membrány. Amfifilní charakter lipidů usnadňuje adsorpci hydrofilních léčiv na povrch nanočástic a enkapsulaci hydrofobních molekul do hydrofobního jádra. (7)

Cílem práce je optimalizovat podmínky přípravy hybridních polymerních-lipidických nanočástic připravených emulzní odpařovací metodou a nanoprecipitací a porovnání obou metod. Hodnocení je zaměřeno na velikost a stabilitu nanočástic, schopnost enkapsulace požadovaného léčiva a jeho uvolňování.

SEZNAM ZKRATEK

ACE	aceton
DL	drug loading
EE	enkapsulační efektivita
EtAc	ethylacetát
F127	poloxamer, Pluronic® F-127
HPLN	hybridní polymerní-lipidické nanočástice
LMWH	nízkomolekulární hepariny
NČ	nanočástice
PDI	polydisperzita
PEG	polyethylenglykol
PLGA	poly(mléčná-ko-glykolová)
Polysorbát 20	pegylovaný sorbitan monolaurát, Tween® 20
PVA	polyvinylalkohol
RY	výtěžnost
SD	směrodatná odchylka
TNF	tumor nekrotizující faktor
ZP	zeta potenciál

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Nanočástice

Potenciál cíleného využití léčiv v souvislosti se zefektivněním léčby dal podnět k významnému pokroku ve farmaceutickém inženýrství nových lékových forem, jako jsou nanočástice (NČ), což jsou pevné nebo polotuhé koloidní polymerní nebo jiné nosiče o velikosti rozpětí 1- 500 nm.(1) Slouží k dodávání řady léčiv, mezi která patří léčiva s malými molekulami, geny, RNA, peptidy a diagnostická činidla. (2) Mezi požadované vlastnosti těchto NČ patří lepší stabilita při skladování, delší systémová cirkulace, schopnost cílení na požadované buňky, vyšší účinnost enkapsulace léčiva, biokompatibilita a biodegradovatelnost. (3)

1.2 Struktura hybridních polymerních-lipidických nanočástic

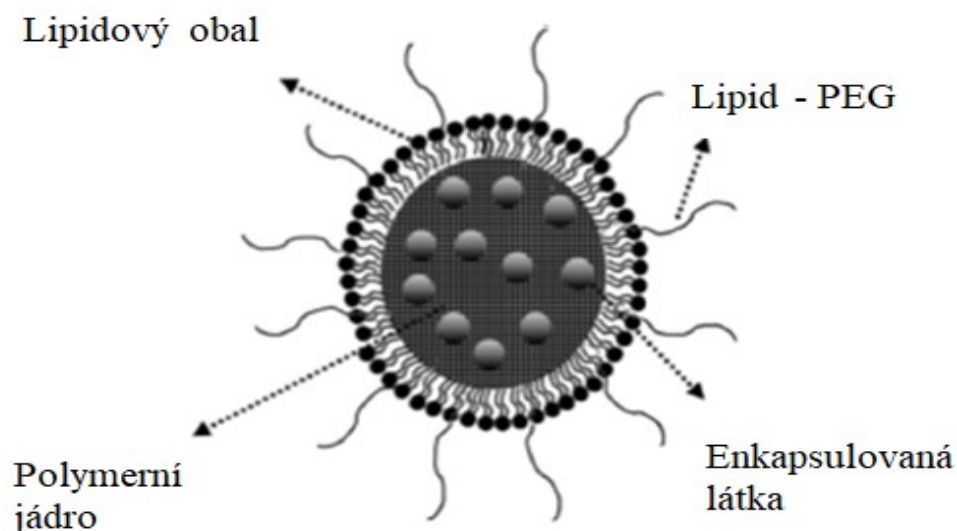
Hybridní polymerní-lipidické nanočástice (HPLN) jsou částice, které kombinují vlastnosti obou polymerních NČ a liposomů. V závislosti na jejich struktuře se mohou rozdělit do čtyř skupin: monolytické, typu jádro-obal, biomimetické NČ lipid-polymer a liposomy umístěné v polymerech. Monolytické NČ jsou tvořeny polymerní maticí, ve které jsou obsaženy lipidové molekuly. Biomimetické hybridní NČ jsou obaleny membránou erytrocytů pro delší cirkulaci v organismu. A polymery zakotvené na povrchu liposomů vytvářejí stabilnější systémy. (8,9)

1.2.1 Nanočástice typu jádro-obal

Skládají se ze tří hlavních komponent: polymerního jádra, lipidového obalu a vnější polyethylenglykolové (PEG) vrstvy. Základní struktura NČ je znázorněna na obrázku 1. Polymerní jádro je složeno z biodegradabilního hydrofobního polymeru a působí jako nosič pro hydrofobní léčiva, v menší míře pro hydrofilní. Polymer může být přírodní i syntetický. Syntetické polymerní NČ mají výhodu v tom, že jsou schopny se syntetizovat podle požadovaných specifikací a mají vysokou čistotu a stabilitu. Mezi nejčastěji používané polymery patří kyselina poly(mléčná-ko-glykolová) (PLGA), polykaprolakton, dextran nebo albumin z důvodu jejich biokompatibility, biodegradovatelnosti, netoxicity a předchozího použití ve schválených přípravcích. (7,10)

Polymerní jádro je obklopeno lipidovým obalem, jehož hlavní funkcí je zprostředkovat biokompatibilitu. Také minimalizuje únik zapouzdřeného léčiva během přípravy NČ, zpomaluje rychlost degradace polymeru zamezováním difuze vody dovnitř částice, což umožňuje kinetiku s konstantní rychlostí uvolňování léčiva. (11) Často používanými lipidy jsou fosfatidylcholin, 1,2- dipalmitoyl-sn-glycero-3- fosfocholin, 1,2- dipalmitoyl-3-trimethylamoniumpropan, 2- dioleoyl-3-trimethylamonium-propan nebo 1,2- dioleoyl-sn-glycero-3- fosfoetanolamin. (7) Polymerní jádro a lipofilní obal jsou spojeny Van der Waalovými a hydrofobními interakcemi. (3)

Použití pegylovaných lipidů napomáhá chránit NČ před vychytáváním mononukleárním fagocytárním systémem a tím prodlužuje jejich cirkulaci v organismu. Také stabilizuje NČ během jejich skladování. (11)



Obrázek 1: Struktura HPLN (11)

1.3 Výhody hybridních polymerních-lipidických nanočástic

HPLN získaly výhody obou komponent, jak polymeru, tak lipidu. Pevné polymerní jádro zajišťuje mechanickou stabilitu, biodegradovatelnost a úzkou distribuci velikosti. Lipidový obal je biokompatibilní a vykazuje podobné chování jako buněčné membrány. Má schopnost interagovat se širokou škálou molekul buď v membráně nebo

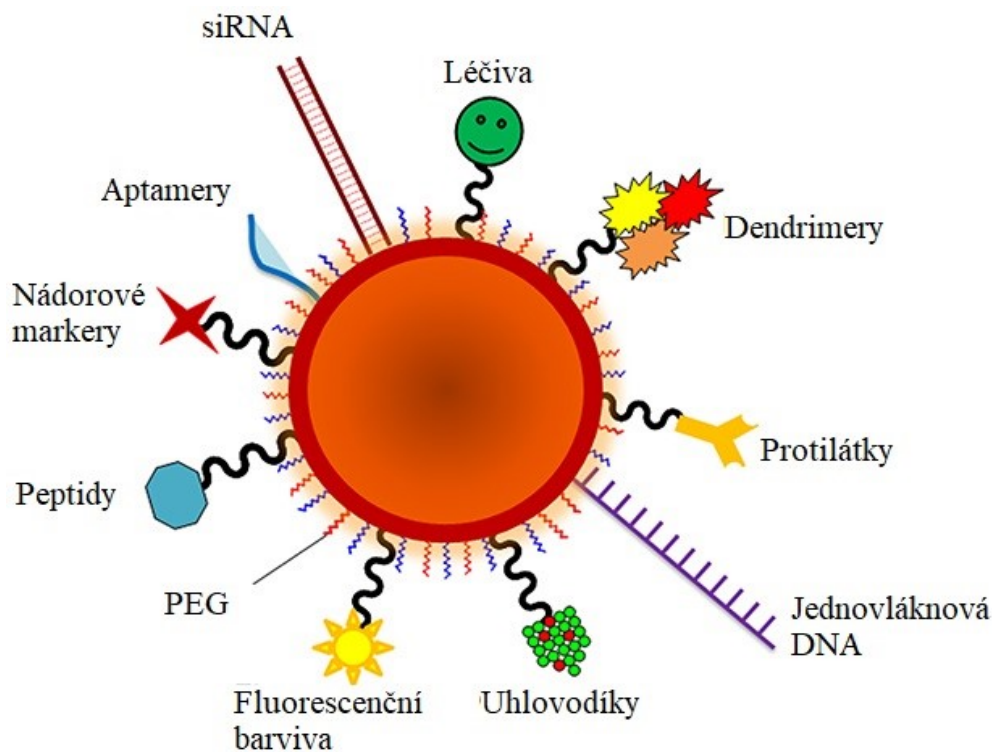
na povrchu. Amfifilní charakter lipidů usnadňuje adsorpci hydrofilních sloučenin na povrch NČ a enkapsulaci hydrofobních molekul do hydrofobního jádra. HPLN vykazují stabilitu po delší čas. Vedle pasivního cílení založeného na velikosti částic mohou být konjugovány s vhodnými cílovými ligandy, jako jsou aptamery, kyselina listová, transferin, jednořetězcový tumor nekrotizující faktor (TNF) pro léčbu rakovin. Částice menší než 100 nm jsou slibné pro intracelulární cílení léčiv. (7)

1.4 Modifikace povrchu

Pokud je částice hydrofobní, je snadněji rozpoznávána a vychytávána fagocyty, a proto je potřeba upravit její povrch. Nejčastější modifikací je použití hydrofilního polymerního řetězce PEG zakotveného v lipidové dvojvrstvě. (12) Tím se stericky stabilizují částice při skladování díky sterickému efektu dlouhých polymerních řetězců. Prodlouží se i doba cirkulace v organismu, kvůli hydrofilní ochranné vrstvě bránící navázání opsoninů, a částice tak zůstane nerozeznatelná pro fagocyty. (13) Touto modifikací se povrchový náboj přesune do zápornějších hodnot, čímž se sníží cytotoxický účinek NČ na buňky. Dalšími používanými polymery jsou poloxamer (F127), polysorbát 20, polysorbát 80, využít lze i polysacharidy jako je dextran. Při použití polysorbátu k povrchové úpravě částic se zlepšil i jejich průchod hematoencefalickou bariérou. (7,12) Další modifikací byl obal tvořen membránami erytrocytů, které opět nebyly rozpoznány mononukleárním fagocytárním systémem. Erytrocyty mají různé povrchové antigeny a pacientům by měli být, před podáním injekcí těchto NČ pokrytých erytrocytární membránou, zkontrolovány krevní skupiny. Povrchy NČ mohou být také modifikovány pomocí kyseliny listové, transferinu, monoklonálních protilátek nebo terapeutických cytokinů (např. TNF α) pro cílení nádorů umístěných v různých částech těla. (7)

Povrchová modifikace vede ke změnám cytotoxicity. Pozitivně nabitě NČ jsou více cytotoxické ve srovnání se zápornými a neutrálními NČ. Například aminoskupiny polyvinylpyrolidinu poskytují NČ kladný náboj, zatímco částice potažené polyvinylalkoholem (PVA) jsou záporně nabitě díky jejich hydroxylové skupině. Pozitivně nabitě NČ mají vyšší afinitu k cílové tkáni, například k plicím. To souvisí

s elektrostatickými interakcemi mezi záporně nabitou buněčnou membránou a kladně nabitými NČ. (14) Souhrn modifikací povrchu je zobrazen na obrázku 2.



Obrázek 2: Modifikace povrchu NČ (15)

1.5 Vlastnosti nanočástic

Mezi nejčastěji sledované vlastnosti NČ patří velikost a polydisperzita (PDI), zeta potenciál (ZP), drug loading (DL), cytotoxicita atd. Ty ovlivňují mimo jiné chování NČ v lidském těle a účinnost léčby.

1.5.1 Velikost

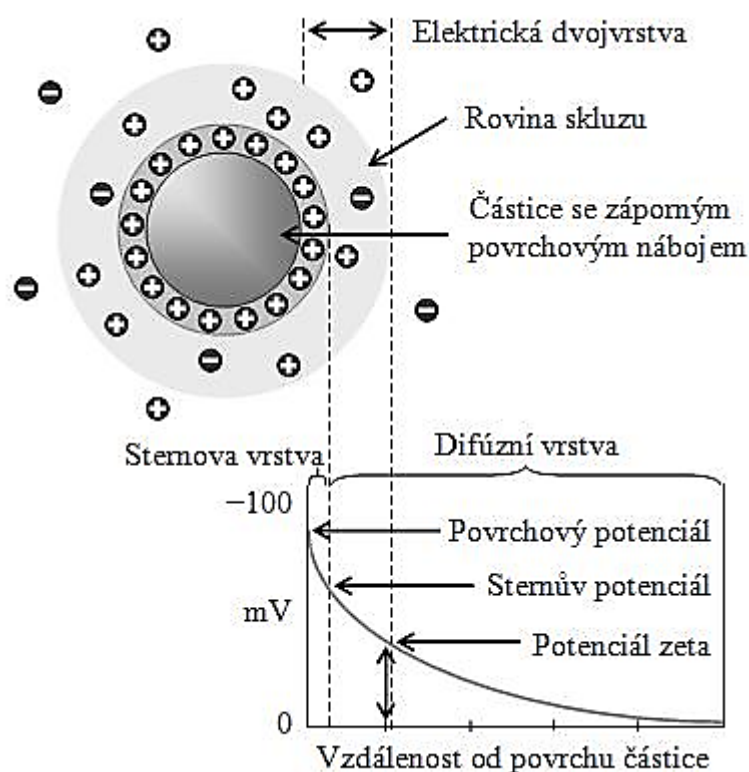
Velikost HPLN se běžně pohybuje kolem 160-300 nm s relativně nízkou PDI. Čím vyšší je velikost NČ, tím se zvyšuje DL. Velikost má vliv na doručení NČ na požadované místo a vstup do buněk spolu s povrchovým nábojem a mechanickými vlastnostmi, a také na kinetiku uvolňování léčiva z NČ. (16) Menší velikost NČ je tedy vyžadována pro biologické prostředí, avšak tím se zvyšuje jejich povrchová aktivita a roste možnost agregace. (17)

S použitím povrchově aktivní látky, jako je PVA, poloxamer a další, a zvyšující se frakcí PEG se velikost snižuje. Rozpouštědlo použité při přípravě polymerního roztoku ovlivňuje morfologii a distribuci velikosti NČ. Doba sonifikace hraje také zásadní roli při řízení velikosti a distribuce. (18) Poměr lipidu vzhledem k polymeru je důležitým parametrem ovlivňujícím velikost a stabilitu NČ. Se zvyšující se koncentrací lipidů se snižuje průměrná velikost částic a zvyšuje se jejich stabilita, zatímco u nízkých koncentrací lipidů dochází k agregaci. Agregáčn chování může být přičítáno vytváření můstků mezi lipidy a polymery a neúplného obalení, které odhaluje aniontovou zónu polymeru. (7)

1.5.2 Zeta potenciál

Vývoj náboje na povrchu částice ovlivňuje distribuci iontů v obklopující mezifázové oblasti, což má za následek zvýšenou koncentraci iontů s opačným nábojem v blízkosti povrchu. Ionty v okolí částice tvoří vrstvy. Vnitřní, nazývaná Sternova vrstva, kde jsou ionty pevně vázány a vnější difuzní vrstva, kde jsou méně vázány. Kolem každé částice tedy existuje elektrická dvojvrstva. Uvnitř difuzní vrstvy je pomyslná hranice, ve které ionty a částice tvoří stabilní entitu. Potenciál, který existuje na této hranici, se nazývá zeta potenciál a je znázorněn na obrázku 3. (19,20)

Velikost ZP informuje o potenciální stabilitě koloidního systému. Pokud všechny částice v suspenzi mají velký negativní nebo pozitivní ZP, budou mít tendenci se navzájem odpuzovat. Pokud však částice mají nízké hodnoty ZP, bude docházet k jejich shlukování. Za stabilní systémy se považují ty, které budou mít hodnoty potenciálu vyšší než + 30 mV nebo nižší než -30 mV. Toto pravidlo platí pouze pro čistou elektrostatickou stabilizaci nebo v kombinaci s povrchově aktivními látkami s nízkou molekulovou hmotností a neplatí, pokud jsou přítomny stabilizátory s vysokou molekulovou hmotností. ZP závisí na teplotě, pH, iontové síle a viskozitě. (21)



Obrázek 3: Princip vzniku ZP (22)

1.5.3 Drug loading

Léčivo může být zabudováno jak do polymerního jádra, tak do lipidového obalu. Kromě toho mohou být do jádra i do obalu vložena dvě různá léčiva. Nejpoužívanější strategií je začlenit léčivo během výroby jádra nebo při vytvoření lipidového filmu. (23,24) Řada výzkumných skupin prokázala, že vysoce hydrofilní léčiva mají nízkou afinitu k polymeru, což vede k neuspokojivé účinnosti enkapsulace. Pokud existuje špatná interakce mezi léčivem a polymerem, bude mít léčivo tendenci difundovat z organické fáze do vnějšího vodného média během přípravy. (25) Proto tvorba komplexů mezi aniontovými polymery a kationtovými léčivy pomohla zvýšit DL. Dalším důvodem špatného DL je nadbytečné množství lipidů, které mohou vytvářet micely a absorbovat léčiva prostřednictvím hydrofobních interakcí a / nebo vodíkových vazeb. Navíc během čištění se tyto micely odplaví, což vede ke ztrátě léčiva. Způsob přípravy, pH vodné fáze a velikost NČ také mohou ovlivnit účinnost DL. (7) Jak již bylo zmíněno, čím jsou NČ větší, tím se zvyšuje DL. Uvolňování léčiva z NČ je mimo jiné řízeno formulací matrice, pH mikroprostředí a teplotou okolního prostředí. (2)

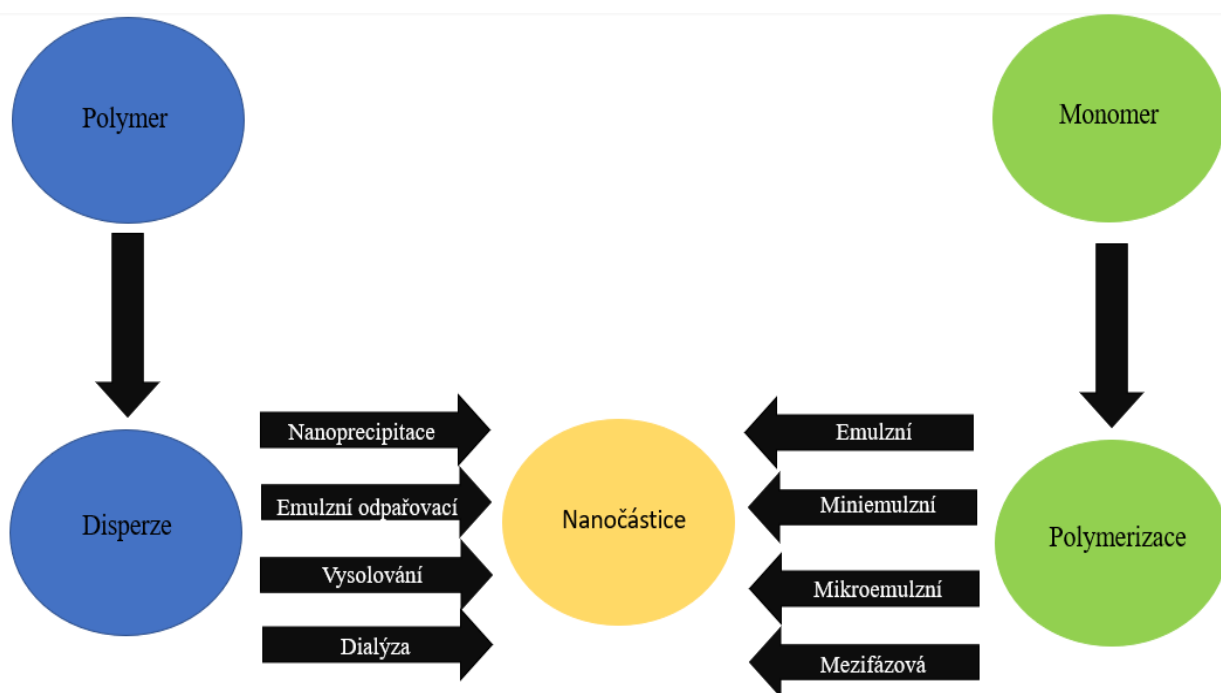
1.5.4 Stabilita

Stabilita je velice důležitým parametrem, který se hodnotí u jakékoliv lékové formy. Fosfolipidy tvořící obal NČ působí jako povrchově aktivní látky ke stabilizaci hybridních systémů. Ke stabilizaci také přispívá elektrostatická interakce mezi záporně nabitými polymery a kladnými lipidy. Často samotné fosfolipidy ke stabilizaci nestačí. Vliv poměru lipidické složky k polymerní části na stabilitu NČ byl popsán v kapitole 1.5.1. Fosfolipidy mohou být rozloženy hydrolyzou a oxidačními reakcemi během skladování ve vodných disperzích. To lze vyřešit lyofilizací připravených NČ. (7)

NČ budou stabilnější s nižší iontovou silou vodné fáze. Pegylovaný obal také zvyšuje stabilitu NČ díky sterickému efektu dlouhých polymerních řetězců. Menší velikost NČ bude také přispívat k lepší stabilitě. Použití surfaktantů, například poloxameru, polysorbátu, PVA, povede ke stabilizaci NČ snížením povrchového napětí. (7)

1.6 Příprava nanočástic

NČ mohou být připraveny řadou metod. Každá z nich má jiný vliv na velikost a povrchové vlastnosti výsledných částic. Metody přípravy lze rozdělit do dvou hlavních skupin, které jsou zobrazeny na obrázku 4. První skupina využívá předem připravených polymerů a druhá polymeraci monomerů. Pro přípravu NČ z předem připravených polymerů lze použít metodu nanoprecipitace, emulzní odpařovací metodu, vysolování, dialýzu. Na druhé straně lze NČ přímo syntetizovat polymerací monomerů za použití různých polymerizačních technik, jako je mikroemulze, miniemulze, mezifázová polymerace. Výběr metody přípravy je proveden na základě řady faktorů, jako je typ polymeru, oblast aplikace, požadavek na velikost atd. (18,23) Mezi nejčastěji využívané metody patří nanoprecipitace, emulzní odpařovací metoda a vysolování. (26)



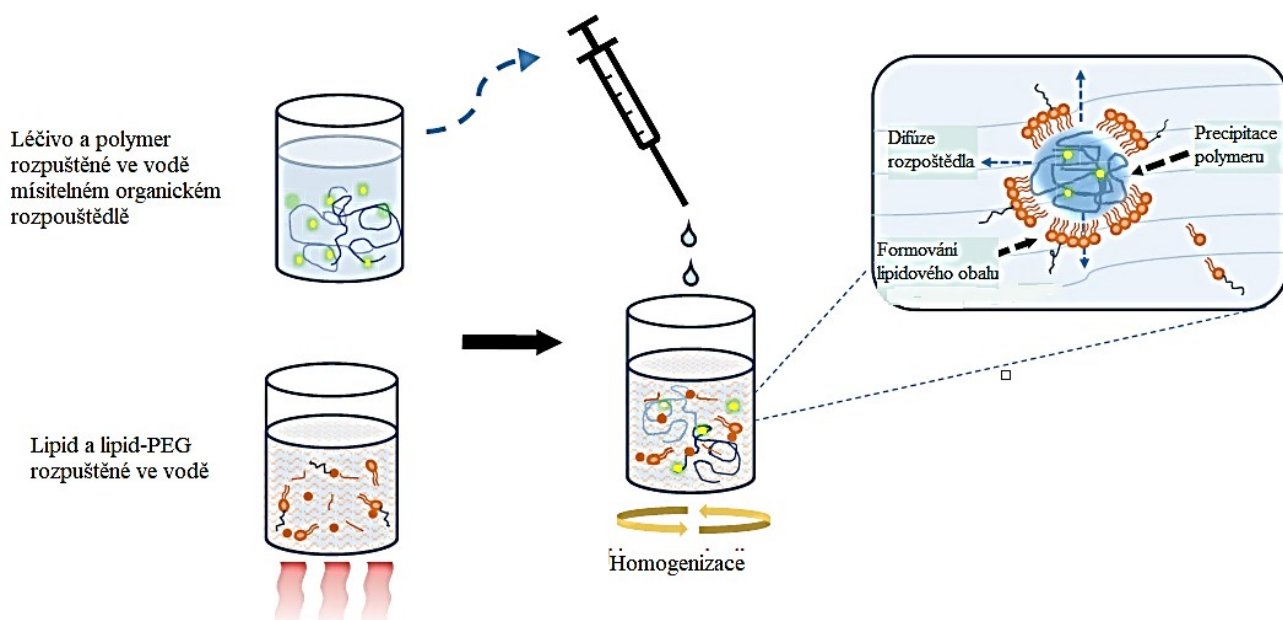
Obrázek 4: Souhrn metod přípravy NČ

1.6.1 Příprava nanočástic z polymeru

1.6.1.1 Nanoprecipitace

Nanoprecipitace je jednoduchá, rychlá a reprodukovatelná metoda, která se široce využívá k přípravě NČ. Celý proces přípravy se odehrává v jednom kroku, NČ vznikají téměř okamžitě. Základní princip metody je vytěsnění rozpouštědla z lipofilního roztoku polymerem. (18,27) Při této metodě se polymer a léčivo rozpustí v organickém rozpouštědle, které je mísitelné s vodou a snadno odpařitelné. Nejčastěji to bývá ethanol, aceton (ACE), hexan. Organická fáze obsahující lipid se po kapkách přidává k vodné fázi, která je umístěná na magnetické míchače. Rychlá difuze organického rozpouštědla do vodné fáze vede ke snížení mezifázového napětí mezi fázemi, což zvětšuje plochu povrchu a vede k tvorbě malých kapiček organického rozpouštědla. Použité rozpouštědlo musí mít dostatečnou rychlost difuze pro vznik NČ požadované velikosti. Rozpouštědlo je poté odstraněno odpařením. Limit této metody je použití léčiva, které je rozpustné v organickém rozpouštědle. Klíčové faktory určující úspěšnost metody a ovlivňující fyzikálně-chemické vlastnosti NČ jsou ty, které jsou spojeny s podmínkami přidání organické fáze do vodné, jako je rychlost vstřikování organické fáze, rychlost míchání

vodné fáze, metoda přidávání organické fáze a poměr organické fáze k vodné fázi. Vlastnosti NČ jsou také ovlivňovány povahou a koncentrací jejich složek. (7,18) Obrázek 5 zachycuje proces nanoprecipitace.

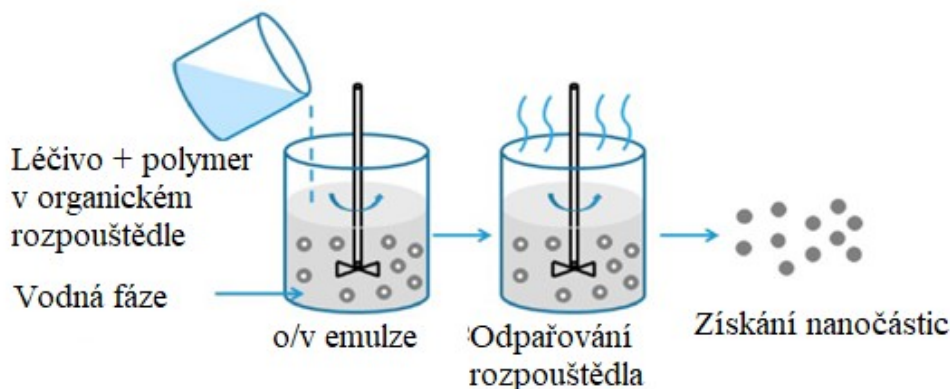


Obrázek 5: Nanoprecipitační metoda (2)

1.6.1.2 Emulzní odpařovací metoda

Emulzní odpařovací metoda je nejběžněji používanou metodou pro přípravu NČ. Polymer a léčivo je rozpuštěno v organickém rozpouštědle, které není mísitelné s vodou. Dříve se široce používal dichlormethan a chloroform, ale nyní byly nahrazeny ethylacetátem (EtAc), který má lepší toxikologický profil. Organická fáze se smísí s vodnou fází obsahující požadované množství lipidu a surfaktantu. Důležité je soustavě dodat energii prostřednictvím ultrazvuku nebo mikrofluidizéru, aby došlo k vytvoření emulze. Poté za stálého míchání dochází k odpaření organického rozpouštědla a formování NČ. Následnou centrifugací a promytím destilovanou vodou se odstraní zbytky surfaktantu. Výslednou velikost NČ ovlivňuje koncentrace použitého surfaktantu. Často se používá PVA s 3% nebo vyšší koncentrací. Pro tvorbu emulzí se používají dvě hlavní strategie: příprava jednoduché emulze nebo dvojité emulze. Emulze typu o/v se používá k inkorporaci pouze hydrofobních léčiv. Vytvořením emulze typu v/o/v

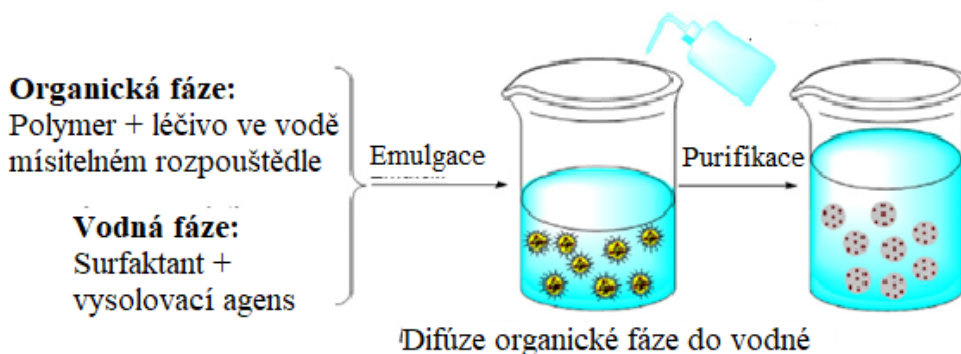
umožňuje inkorporaci hydrofilních léčiv a makromolekul. (7,18,28) Proces metody je zobrazen na obrázku 6.



Obrázek 6: Emulzní odpařovací metoda (29)

1.6.1.3 Vysolování

Dříve zmíněné metody používají organická rozpouštědla, která jsou nebezpečná pro životní prostředí. Tato metoda se vyhýbá chlorovaným rozpouštědlům a velkému množství surfaktantu. Vysolování využívá efekt solí, které jsou schopné vyvézt organické rozpouštědlo z emulze. Vysolovacím činidlem je například chlorid sodný, chlorid hořečnatý, chlorid vápenatý, acetát hořečnatý. Polymer a hydrofobní léčivo se rozpustí v rozpouštědle, které je mísitelné s vodou, nejčastěji v ACE. Poté se vpraví do vodné fáze obsahující surfaktant a sůl. To lze vidět na obrázku 7. K emulzi typu o/v se poté přidá dostatečné množství vody, aby se usnadnila difuze ACE do vodné fáze, čímž vznikají NČ. Pokud je potřeba, sůl se odstraní dialýzou. (18,28,30)



Obrázek 7: Vysolování (31)

1.6.1.4 Dialýza

Dialýza nabízí efektivní přípravu malých a úzce distribuovaných NČ. Mechanismus je podobný jako u nanoprecipitace. Polymer je rozpuštěn v organickém rozpouštědle a umístěn do dialyzační trubice se správnou mezní molekulovou hmotností. Následně je trubice vložena do rozpouštědla, se kterým je rozpouštědlo v trubici mísitelné. Po přemístění rozpouštědla z trubice následuje postupná agregace polymeru v důsledku ztráty rozpustnosti a tvorby homogenní suspenze. (18,30)

1.6.2 **Příprava nanočástic z monomeru**

1.6.2.1 Emulzní polymerace

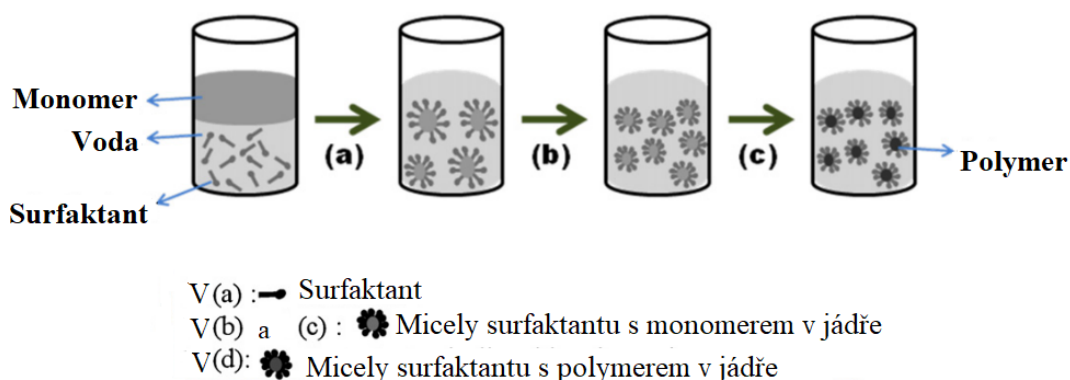
Emulzní polymerace je nejběžněji používanou metodou pro přípravu NČ z monomeru. Na základě využití povrchově aktivní látky můžeme metodu rozdělit na konvenční nebo na emulzní polymeraci bez povrchové aktivní látky. (18)

Konvenční metoda v přípravě převažuje. Hlavní složky systému jsou voda, monomer s nízkou rozpustností ve vodě, iniciátor rozpustný ve vodě a povrchově aktivní látka. K iniciaci dochází, když se molekula monomeru rozpuštěná v kontinuální fázi srazí s molekulou iniciátoru, kterou může být iont nebo volný radikál. Alternativně může být monomerní molekula přeměněna na iniciační radikál vysokoenergetickým zářením. Po polymeraci jsou NČ formovány dispergováním společně se surfaktantem do příslušného rozpouštědla, kterým bývá například cyklohexan nebo toluen. Při konvenční metodě je nakonec nutné odstranit přebytečný surfaktant. (18)

Emulzní polymerace bez povrchové látky zahrnuje pro přípravu NČ deionizovanou vodu, iniciátor rozpustný ve vodě a monomery, nejčastěji vinylové nebo akrylové. Stabilizaci zajišťují ionizovatelné iniciátory, například persíran draselný. Při setkání rozpuštěného polymeru s iniciátorem a dalším navázáním monomerů se formují NČ. (18,32)

1.6.2.2 Miniemulzní metoda

Pro tuto metodu je potřebná voda, směs monomerů, kostabilizátor, povrchově aktivní látky a iniciátor. Klíčovým rozdílem mezi emulzní polymerací a miniemulzní polymerací je využití sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností jako stabilizátoru a také použití ultrazvuku, který stabilizuje vzniklou emulzi. Je potřeba pouze velmi malé množství stabilizátoru. (18) Obrázek 8 zachycuje proces miniemulzní metody.



Obrázek 8: Miniemulzní metoda (18)

1.6.2.3 Mikroemulzní metoda

I když se emulzní a mikroemulzní polymerace jeví jako podobné, protože obě metody mohou produkovat koloidní polymerní částice s vysokou molekulovou hmotností, jsou při kinetickém srovnání zcela odlišné. Iniciátor rozpustný ve vodě je přidáván do termodynamicky stabilní vodné fáze. Částice jsou zcela pokryty povrchově aktivní látkou kvůli jejímu velkému množství. Zpočátku se polymerní řetězce vytvářejí pouze v některých kapičkách, protože iniciace nelze dosáhnout současně ve všech mikrokápkách. Později osmotický a elastický vliv řetězců destabilizuje křehké mikroemulze a obvykle vede ke zvýšení velikosti částic i tvorbě prázdných micel. (18,30)

1.7 **Využití nanočástic ve zdravotnictví**

V poslední době hrají NČ významnou roli v dodávání řady léčiv pro jejich biologickou rozložitelnost, biokompatibilitu, dlouhodobou cirkulaci v organismu a široký rozsah strukturální variability. (4,10) Léčiva, zobrazovací činidla, biomolekuly mohou být pomocí NČ dopraveny na konkrétní místo v určitý čas a příslušné dávce. (5) Aplikace

NČ se používá k diagnostice a léčbě nádorových onemocnění, AIDS, diabetu mellitu, revmatoidní artritidě a dalších autoimunitních onemocnění. (4) V léčbě jsou preferovány polymerní NČ, které nemají tendenci se v organismu kumulovat na rozdíl od anorganických NČ. (6)

1.7.1 Léčba rakoviny

Chemoterapeutická léčba má řadu vedlejších nežádoucích účinků, jelikož nepůsobí jen proti nádorovým buňkám. Proto jsou NČ využívány pro cílenou terapii. Důležité je, aby se léčivo dostalo do místa působení s minimální ztrátou na objemu a působilo jen na nádorové buňky. NČ se dostávají na místo působení pomocí aktivního nebo pasivního targetingu. Pasivní targeting využívá velikosti, tvaru a povrchového náboje NČ. Velikost částic ovlivní nejen absorpci buněk, ale také distribuci, retenci a clearance. NČ větší než 100 nm zůstávají pravděpodobně v místě aplikace, dokud nejsou zachyceny dendritickými buňkami a poté migrují do lymfatických uzlin, kde zahájí imunitní odpověď. Tvar částic je dalším klíčovým faktorem, který může ovlivnit biologickou distribuci, absorpci a toxicitu NČ. Nesférické NČ vykazovaly prodlouženou cirkulaci v organismu, zvýšenou akumulaci v nádorové tkáni s výrazně vyšším protinádorovým účinkem než sférické protějšky. Povrchový náboj NČ také hraje významnou roli v pasivním cílení. Buněčné membrány jsou záporně nabitě, proto přitahují pozitivně nabitě NČ. Každá nádorová buňka má na svém povrchu specifický receptor. Aktivní targeting cílí na tyto receptory pomocí ligandů umístěných na NČ. Nejběžněji se využívá folátový ligand, dále také epidermální růstový faktor, monoklonální protilátky, transferin atd. (4,5,33)

Pro terapii nádorů se využívají různé typy NČ: lipidové, polymerní, hybridní, anorganické, termosenzitivní. Nejčastěji používaným léčivem vázaným na NČ je doxorubicin, daunorubicin, paklitaxel. (33) siRNA inhibuje expresi specifické messengerové RNA prostřednictvím endonukleolytického štěpení v cytoplazmě a používá se k léčbě nádorů. Její nevýhodou je, že nemůže procházet buněčnou membránou kvůli negativnímu náboji. Možnost inkorporace siRNA do NČ řeší potíže s průchodností přes membrány a chrání ji před nukleázami, které by ji deaktivovaly před nádorovou

tkání. (34) NČ také umožňují inkorporaci léčiv s rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. (5)

V současnosti se rozvíjí fotoreaktivní materiály díky vyšší specifičnosti, bezpečnosti a účinnosti, jelikož dochází k jejich aktivaci až na požadovaném místě. NČ citlivé na světlo obsahují fotochromatické skupiny, například o-nitrobenzylovou skupinu, azobenzen, p-hydroxyfenacyl. Po absorpci UV světla dojde k narušení struktury a uvolnění léčiva. (35)

1.7.2 Léčba diabetu mellitu

Inzulín je terapeutická makromolekula, která se subkutánně podává ke snížení glykémie. Aby se předešlo opakovaným injekcím během dne, vědci zkoumali i jiný způsob aplikace, především perorální cestou. V tomto případě musí být překonána řada omezení, jako je degradace léčiva žaludečním pH, inaktivace a proteolytické štěpení inzulínu ve střevě a špatná propustnost přes střevní epitel kvůli velkým rozměrům hydrofilní makromolekuly. (36)

HPLN tato omezení překonala. Polymerní část chrání inzulín před enzymatickým štěpením a zvyšuje propustnost přes epiteliální membrány. Lipidická část simuluje složky buněčných membrán a také chrání před žaludečními enzymy. Doposud bylo testováno pouze omezené množství polymerů, mezi které patří například chitosan, lektin, PLGA. Chitosan má schopnost vázat mastné kyseliny a vytvářet komplexy, které budou stabilní v kyselém prostředí žaludku a zvýší absorpci inzulínu ve střevě. Lektiny jsou odolné vůči trávení a vstupují do krevního řečiště v nezměněné formě, tím také představují vhodný materiál pro dodávání inzulínu. Hypoglykemický účinek orálně podávaných NČ byl navíc udržován po delší dobu ve srovnání se subkutánní injekcí. (36)

1.7.3 Léčba revmatoidní artritidy

Revmatoidní artritida je chronické zánětlivé onemocnění spojené se synoviální hyperplazií a narušováním struktury kostí. Postihuje přibližně 1 % dospělé populace a vede k významné morbiditě a mortalitě. Pacienti vyžadují dlouhodobé užívání methotrexátu, které je následováno rezistencí. Přestože terapeutického účinku lze

dosáhnout zvýšením dávky, tato strategie je spojena s vážnými vedlejšími účinky. Existují studie využívající výhod NČ, do kterých se zabuduje folát umožňující specifickou vazbu na folátový receptor, který se vyskytuje v nadměrném množství na aktivovaných makrofázích. Studie měly dobré výsledky a NČ se tak mohou stát budoucností pro léčbu tohoto onemocnění. (37)

1.7.4 Dodání nízkomolekulárních heparinů

Nízkomolekulární hepariny (LMWH) jsou antitrombotická léčiva mající vysokou molekulovou hmotnost, záporný povrchový náboj a hydrofilní povahu s krátkými poločasy rozpadu. Jsou podávány subkutánně v různých časových intervalech, jelikož se při perorálním podání neabsorbují gastrointestinálním traktem kvůli svým vlastnostem zmíněných výše. Proto bylo navrženo použití NČ jako nosičů na bázi lipidů zvyšující orální dodání makromolekul do systémového oběhu střevním lymfatickým systémem a tím se vyhýbají metabolismu při prvním průchodu játry. Zkoumaným polymerem pro tvorbu NČ byl chitosan. Využila se jeho kationtová aminoskupina pro elektrostatickou interakci se sulfátovou nebo karboxylovou skupinou LMWH. Chitosan zvyšoval jejich transport střevní membránou otevřením těsných spojů. Bude potřeba dalších studií, ale NČ by mohly být budoucností pro podávání LMWH perorální cestou. (38)

1.7.5 Dodání diagnostických činidel

HPLN se stále častěji používají pro dodání kontrastních látek vzhledem ke své stabilitě a biokompatibilitě. Využívají se při vyšetření magnetickou rezonancí nebo výpočetní tomografií. (2) Mohou se společně podávat s léčivem, u kterého se poté dá zjistit jeho terapeutický účinek a vhodnost u daného onemocnění, například u léčby rakoviny. (39)

1.8 Kurkumin

Kurkumin je polyfenolická sloučenina izolovaná z rostliny *Curcuma longa*, která byla použita jako potenciální látka pro léčbu chronických onemocnění, jako je rakovina (tlustého střeva, děložního čípku a prostaty), astma, diabetes a neurodegenerativní poruchy. Svou aktivitu vykonává prostřednictvím antioxidačních a protizánětlivých vlastností. Účinně potlačuje expresi prozánětlivých markerů, jako jsou IL-1 β , IL-6 a IL-8 a TNF- α . Kurkumin navíc chrání buňky před poškozením volnými kyslíkovými radikály. (14)

Lékařským aplikacím kurkuminu však brání jeho fyzikálně-chemické vlastnosti, jako je omezená rozpustnost ve vodě, rychlá systémová clearance a degradace v alkalických podmínkách. K překonání těchto nedostatků byl kurkumin připraven jako nanoformulace, jako jsou liposomy, NČ a micely, aby se zlepšila biologická dostupnost a absorpce kurkuminu v cílových buňkách, čímž se zvyšuje místní terapeutický index. (14)

2 PRAKTICKÁ ČÁST

2.1 Použité přístroje

- analytické váhy Discovery, Ohaus (Greinfensee, Švýcarsko) – max. 210 g, d= 0,1 mg
- váhy Kern 440-53 N, Kern&Sohn (Balingen, Německo) – max. 400 g, d= 0,01 g
- pipety Finnpiquette F2, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
- ultrazvuková sonda Microspitze MS73, Bandelin Electronic (Berlín, Německo)
- magnetická míchačka Variomag telesystem, Thermo Scientific (Waltham, USA)
- Zetasizer Nano series (Nano-ZS), Malvern Panalytical (Malvern, Spojené království)
- centrifuga MPW 260-R (MPW Medical Instruments, Varšava, Polsko)
- spektrofotometr Helios γ , Thermo Scientific (Waltham, USA)
- sušárna Memmert, Memmert (Schwabach, Německo)
- třepací vodní lázeň GFL 1083, GFL (Burgwedel, Německo)
- dialyzační membrána Dialysis tubing Fisher brand, Fisher Scientific (Hampton, USA) – MWCO 6000

2.2 Použité suroviny

- PLGA 50:50 – kopolymer kyseliny DL-mléčné s kyselinou glykolovou 50:50, KFT FaF UK (40)
- PLGA 70:30 – kopolymer kyseliny DL-mléčné s kyselinou glykolovou 70:30, KFT FaF UK (40)
- Aceton, Penta (Chrudim, ČR)
- Pluronic® F127, Merc (Praha, ČR)
- Čištěná voda, příprava na FaF UK
- Tween® 20, Merc (Praha, ČR)
- Ethylacetát, Lachema (Neratovice, ČR)
- Kurkumin, Merc (Praha, ČR)
- Fosfatidylcholin, Merc (Praha, ČR)

2.3 Pracovní postup

V rámci experimentální práce byly sledovány parametry NČ připravených za různých podmínek emulzní odpařovací metodou a nanoprecipitací. Vnitřní organickou fází tvořil 5% roztok PLGA (50:50 a 70:30) v EtAc nebo ACE za přidání fosfatidylcholinu v poměrech 1:1, 2:1, 5:1 a 10:1. Vnější vodná fáze se skládala z čištěné vody a poloxameru v koncentracích 0,1 %, 0,5 % a 1 %. Sledovala se velikost, PDI a ZP. Poté byla provedena enkapsulační efektivita (EE) kurkuminu a test disoluce. Všechny koncentrace jsou uvedeny v % (m/V).

2.3.1 Příprava vodné fáze

Vodné fáze bylo vždy připraveno 10 ml za použití poloxameru v koncentracích 0,1 % a 0,5 %. Surfaktant byl navážen v požadovaném množství a rozpuštěn v čištěné vodě. Roztok byl míchán na magnetické míchače až do přidání organické fáze.

2.3.2 Příprava organické fáze

Byly připraveny čtyři zásobní roztoky 5% polymeru v organickém rozpouštědle. Dva roztoky byly z PLGA 50:50 a dva z PLGA 70:30. Jako organické rozpouštědlo byl použit EtAc u emulzní odpařovací metody a u nanoprecipitace ACE. 2,5 g polymeru bylo rozpuštěno v organickém rozpouštědle a doplněno do 50 ml. Tyto roztoky byly skladovány za snížené teploty.

Při každé přípravě NČ byl k zásobnímu roztoku přidán 5% roztok fosfatidylcholinu v EtAc, aby vznikl 1 ml organické fáze ve čtyřech různých poměrech polymeru k lipidu (P:L): 1:1, 2:1, 5:1, 10:1. Objemy obou částí jsou znázorněny v tabulce 1.

Tabulka 1: Poměr polymerní části k lipidické v organické fázi

Vzorek	P [ml]	L [ml]
1:1	0,50	0,50
2:1	0,67	0,33
5:1	0,83	0,17
10:1	0,90	0,10

2.3.3 Metody přípravy

2.3.3.1 Emulzní odpařovací metoda

Do vodné fáze umístěné na magnetické míchačce byl po kapkách přidáván 1 ml organické fáze tvořené z EtAc za vzniku emulze. Poté byla použita ultrazvuková vysokofrekvenční sonda po dobu 1 minuty při 80 % výkonu přístroje. Emulze byla míchána do odpaření organického rozpouštědla a solidifikace NČ po dobu 2 hod.

2.3.3.2 Nanoprecipitace

Do vodné fáze umístěné na magnetické míchačce byl pipetován 1 ml organické fáze obsahující fosfatidylcholin, PLGA a ACE jako organické rozpouštědlo. Po smíchání obou fází došlo k difuzi ACE do vody a solidifikaci NČ. Opět bylo organické rozpouštědlo odpařeno. Souhrn připravených vzorků je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2: Souhrn složení NČ

vzorek	polymer	metoda	surfaktant	poměr P:L
1	PLGA 50:50	emulzní odpařovací	0,1% poloxamer	1:1
2	PLGA 50:50	emulzní odpařovací	0,1% poloxamer	2:1
3	PLGA 50:50	emulzní odpařovací	0,1% poloxamer	5:1
4	PLGA 50:50	emulzní odpařovací	0,1% poloxamer	10:1
5	PLGA 50:50	emulzní odpařovací	0,5% poloxamer	1:1
6	PLGA 50:50	emulzní odpařovací	0,5% poloxamer	2:1
7	PLGA 50:50	emulzní odpařovací	0,5% poloxamer	5:1
8	PLGA 50:50	emulzní odpařovací	0,5% poloxamer	10:1
9	PLGA 50:50	nanoprecipitace	0,1% poloxamer	1:1
10	PLGA 50:50	nanoprecipitace	0,1% poloxamer	2:1
11	PLGA 50:50	nanoprecipitace	0,1% poloxamer	5:1
12	PLGA 50:50	nanoprecipitace	0,1% poloxamer	10:1
13	PLGA 50:50	nanoprecipitace	0,5% poloxamer	1:1
14	PLGA 50:50	nanoprecipitace	0,5% poloxamer	2:1
15	PLGA 50:50	nanoprecipitace	0,5% poloxamer	5:1
16	PLGA 50:50	nanoprecipitace	0,5% poloxamer	10:1
17	PLGA 70:30	emulzní odpařovací	0,1% poloxamer	1:1

18	PLGA 70:30	emulzní odpařovací	0,1% poloxamer	2:1
19	PLGA 70:30	emulzní odpařovací	0,1% poloxamer	5:1
20	PLGA 70:30	emulzní odpařovací	0,1% poloxamer	10:1
21	PLGA 70:30	emulzní odpařovací	0,5% poloxamer	1:1
22	PLGA 70:30	emulzní odpařovací	0,5% poloxamer	2:1
23	PLGA 70:30	emulzní odpařovací	0,5% poloxamer	5:1
24	PLGA 70:30	emulzní odpařovací	0,5% poloxamer	10:1
25	PLGA 70:30	nanoprecipitace	0,1% poloxamer	1:1
26	PLGA 70:30	nanoprecipitace	0,1% poloxamer	2:1
27	PLGA 70:30	nanoprecipitace	0,1% poloxamer	5:1
28	PLGA 70:30	nanoprecipitace	0,1% poloxamer	10:1
29	PLGA 70:30	nanoprecipitace	0,5% poloxamer	1:1
30	PLGA 70:30	nanoprecipitace	0,5% poloxamer	2:1
31	PLGA 70:30	nanoprecipitace	0,5% poloxamer	5:1
32	PLGA 70:30	nanoprecipitace	0,5% poloxamer	10:1

2.3.4 Měření velikosti a zeta potenciálu nanočástic

Měření velikosti a ZP probíhalo pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS. Vzorek byl naředěn čištěnou vodou v poměru 1:10 a přemístěn do standardní polystyrenové kyvety. Kyveta se vložila do přístroje a měření velikosti a PDI proběhlo v triplicátu.

Následně byl zředěný vzorek přesunut pomocí injekční stříkačky do kyvety se zahnutou kapilárou a elektrodami, která je takto přizpůsobena k měření ZP. Měření bylo opět třikrát zopakováno.

2.3.5 Úprava podmínek přípravy

Po vyhodnocení primárního screeningu pokračovaly experimenty s použitím polymeru PLGA 50:50. NČ byly připraveny podle výše uvedeného schématu s tím rozdílem, že byl použit jen jeden typ polymeru a poloxamer v koncentracích 0,1 %, 0,5 % a 1 %. Opět byly připraveny čtyři poměry polymerní části k lipidické.

2.3.5.1 Metoda 1

První metoda spočívala v tom, že se vodná fáze rozdělila na dvě stejné části, každá o objemu 5 ml. Do první poloviny se po kapkách přidával 1 ml organické fáze. Následovala sonifikace po dobu 1 min na 80 % výkonu přístroje a poté se doplnila druhá polovina vodné fáze. Po odpaření organického rozpouštědla bylo provedeno měření parametrů NČ.

2.3.5.2 Metoda 2

Druhá metoda spočívala v sonifikaci, kdy se organická fáze a polovina vodné fáze chladila pomocí ledové lázně a na závěr se obě poloviny vodné fáze opět spojily.

2.3.5.3 Metoda 3

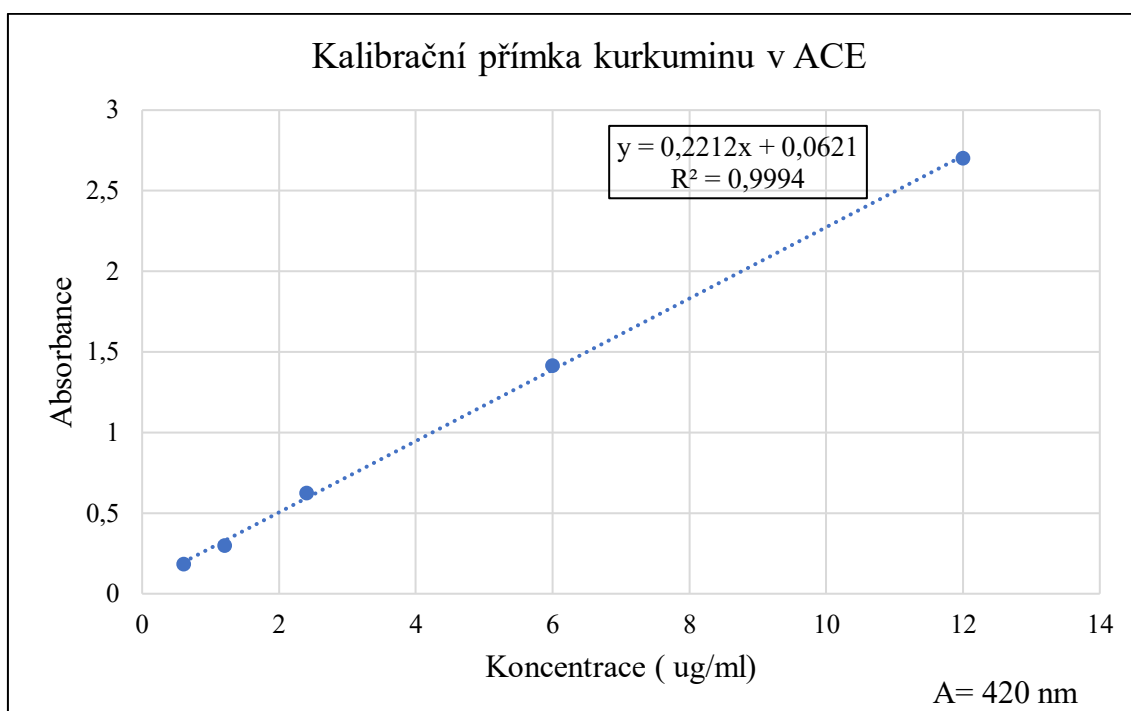
U třetí metody se vodná fáze nerozdělila na dvě poloviny, ale během emulgace sonifikací se lékovka ledovala.

2.3.6 **Enkapsulační efektivita, výtěžnost a drug loading**

Bylo naváženo 50 µg kurkuminu, který se přidal do roztoku polymeru. Zbytek přípravy byl již totožný jako v kapitole 2.3.1, 2.3.2 a 2.3.3. U vzniklé suspenze NČ se změnila velikost a ZP. Následně byla suspenze rozdělena do mikrozkušavek a podrobena třem cyklům centrifugace po dobu 15 min na 7 200 g. Mezi jednotlivými cykly centrifugace byl odebrán supernatant a materiál na dně mikrozkušavky se rozdispergoval po přidání čištěné vody. Po posledním cyklu a odebrání supernatantu se vzorek rozpustil v 1 ml ACE. Následovalo spektrofotometrické měření roztoku v kyvetě z křemenného skla proti ACE jako slepému vzorku. Absorpční maximum roztoku kurkuminu v ACE bylo při vlnové délce 420 nm. Dosazením zjištěné absorbance do rovnice kalibrační přímky (1) byla vypočítána koncentrace kurkuminu v µg/ml a přepočtem bylo zjištěno celkové enkapsulované množství kurkuminu v NČ.

$$(1) \quad y = 0,2212x + 0,0621;$$

kde y je naměřená absorbance a x je koncentrace enkapsulovaného kurkuminu v ACE. Kalibrační přímka kurkuminu v ACE je znázorněna v grafu 1.



Graf 1: Kalibrační přímka kurkuminu v acetonu při 420 nm

Následně byl roztok kvantitativně přesunut do předem zvážené lékovky a vložen do sušárny vyhřáté na 60 °C, aby se přes noc odpařil ACE. Zvážením lékovky byla zjištěna celková hmotnost připravených NČ a po odečtení enkapsulovaného množství kurkuminu byla získána hmotnost polymerů tvořících NČ. Tyto hodnoty pak byly dosazeny do následujících vztahů pro výpočty EE (2), výtěžnosti (RY) (3) a DL (4).

- **enkapsulační efektivita** (encapsulation effectivity; EE) udává, kolik procent z použitého celkového množství účinné látky bylo enkapsulováno ve vzniklých NČ (41)

$$EE (\%) = \frac{\text{hmotnost enkapsulovaného kurkuminu}}{\text{původní navážka kurkuminu}} * 100 \quad (2)$$

- **výtěžnost** (recovery yield; RY) udává procentuální množství polymeru, které bylo využito při tvorbě NČ

$$RY (\%) = \frac{\text{hmotnost polymeru v NČ}}{\text{původní navážka polymeru}} * 100 \quad (3)$$

- **drug loading** (DL) udává, kolik procent představuje enkapsulovaná účinná látka v NČ (41)

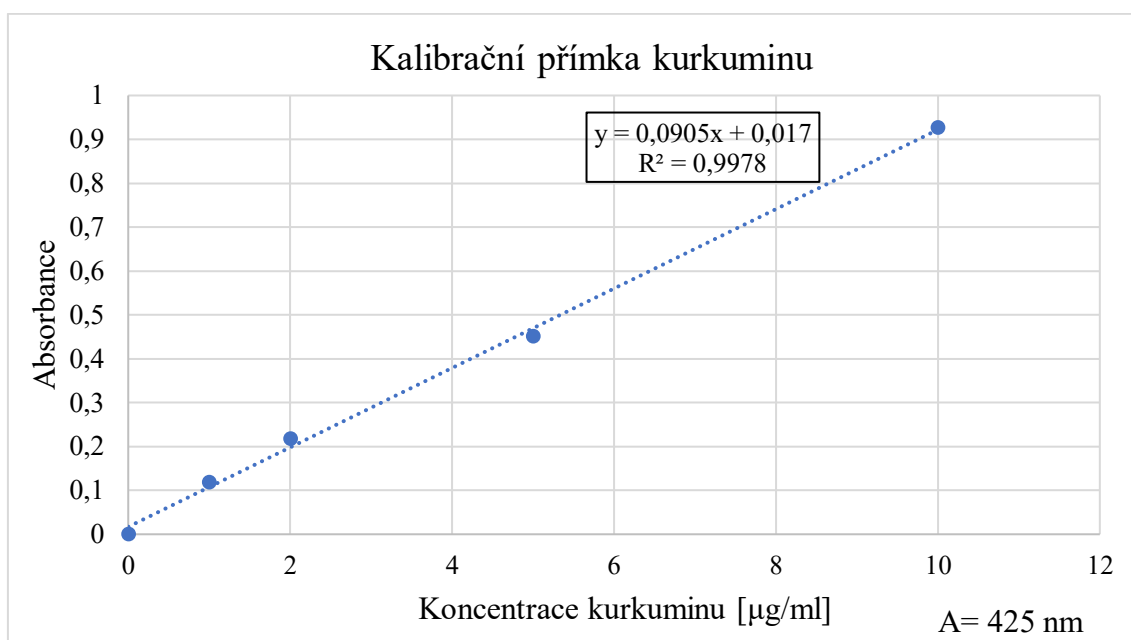
$$DL (\%) = \frac{\text{hmotnost enkapsulovaného kurkuminu}}{\text{hmotnost vzorku}} * 100 \quad (4)$$

2.3.7 Disoluce

Částice pro test disoluce byly tvořeny z 50 µg kurkuminu, 5% PLGA 50:50 v EtAc a 5% roztoku fosfatidylcholinu v EtAc v poměrech 1:1, 2:1, 5:1, 10:1 a jeden vzorek bez fosfatidylcholinu. 10 ml 1% roztoku poloxameru tvořilo vodnou fázi. Vytvořené částice se purifikovaly dvěma cykly centrifugace. Prvním po dobu 15 min na 10 000 RCF při 15 °C a druhým cyklem 10 min na 8 000 RCF. Mezi cykly centrifugace byl odebrán supernatant a sediment se rozpustil ve 2 ml vody, po centrifugaci se rozpustil ve 2 ml 1% roztoku polysorbátu 20.

Následně se připravila dialyzační membrána, která se nastříhala na 10cm části. Vzniklá suspenze NČ byla vpravována do dialyzační membrány a vstupní strana se zalepila akrylátovým lepidlem. Takto připravené membrány se umístily do lékovek, ke kterým se přidalo 10 ml disolučního média, v tomto případě 1% roztoku polysorbátu 20. Lékovky se vložily do třepací vodní lázně vytemperované na 37 °C.

V časových intervalech 0,5 hod, 1 hod, 2 hod, 4 hod, 6 hod, 12 hod, 24 hod, 31 hod a 48 hod se odebíral celý objem disolučního média, který se poté doplnil pro zachování sinkových podmínek. Odebrané vzorky se hodnotily spektrofotometricky při vlnové délce 425 nm, která odpovídá absorpčnímu maximu roztoku kurkuminu v polysorbátu 20. Kalibrační přímka je znázorněna v grafu 2.



Graf 2: Kalibrační přímka kurkuminu v 1% vodném roztoku polysorbátu 20 měřená při 425 nm

Dosažením naměřené absorbance do příslušné rovnice lineární regrese (5) byla zjištěna koncentrace kurkuminu. Ta byla následně přepočítána na uvolněné procentuální množství kurkuminu v příslušném časovém intervalu.

$$(5) \quad y = 0,0905x + 0,017$$

Hodnota x v rovnici představuje koncentraci kurkuminu v $\mu\text{g/ml}$ a y odpovídá naměřené absorbanci.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Měření velikosti částic a zeta potenciálu

Připravené NČ byly nejdříve hodnoceny z hlediska velikosti. Průměrné hodnoty velikosti částic a PDI, včetně směrodatných odchylek (SD), jsou uvedeny v tabulce 3 a 4.

Velikost připravených NČ se pohybovala od 130 do 290 nm. Z tabulky je patrné, že se zvyšujícím se poměrem polymerní části k lipidické se velikost NČ zvyšovala. Fosfatidylcholin působí jako povrchově aktivní látka a snižuje velikost částic. Nejlepší výsledky z hlediska velikosti i PDI měly NČ připravené z roztoku PLGA 50:50 v EtAc s 0,5% roztokem poloxameru. Proto byl využit i u dalších experimentů. U ostatních vzorků byla velikost vyšší a PDI byla nad hranicí 0,2 obecně přijímanou jako monodisperzní (ISO 22412:2017). Zejména u roztoku PLGA 70:30 v EtAc se PDI pohybovala kolem 0,5. To lze vysvětlit agregací NČ.

Tabulka 3: Velikost připravených NČ a jejich PDI u PLGA 50:50

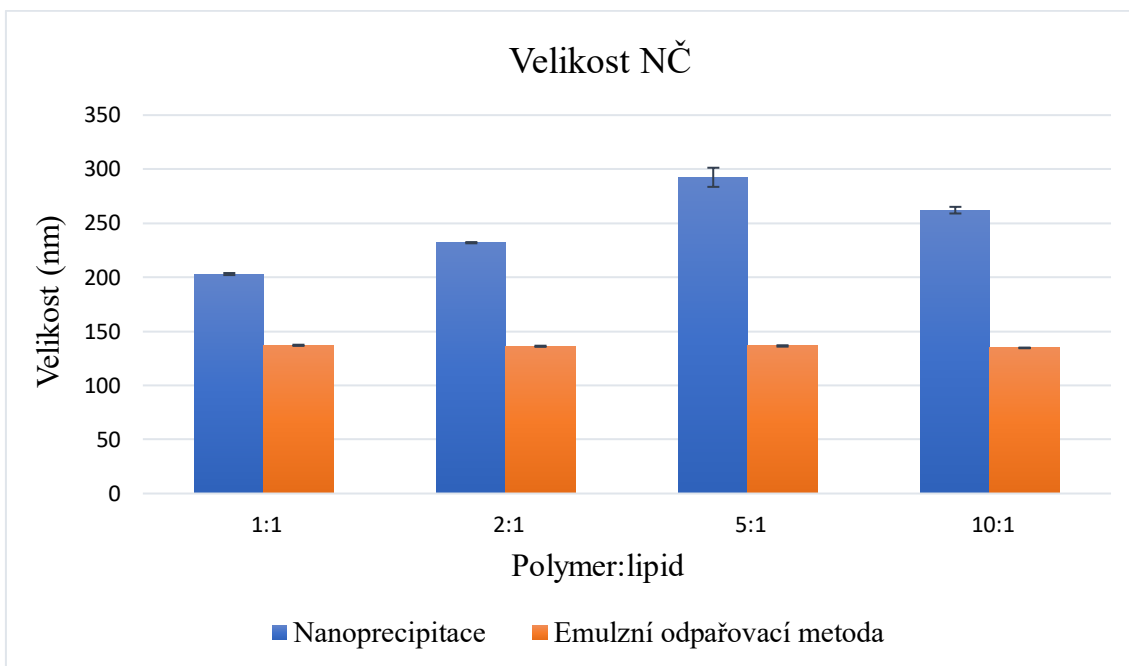
VZOREK		Ø VELIKOST ČÁSTIC [nm]	SD	Ø PDI	SD
PLGA 50:50 s 0,1% F127 emulzní odpařovací m.	1:1	137,07	± 0,551	0,23	± 0,001
	2:1	136,20	± 0,529	0,20	± 0,013
	5:1	136,50	± 0,625	0,20	± 0,002
	10:1	134,70	± 0,300	0,17	± 0,020
PLGA 50:50 s 0,5% F127 emulzní odpařovací m.	1:1	138,33	± 0,907	0,21	± 0,009
	2:1	117,33	± 0,603	0,19	± 0,010
	5:1	160,73	± 1,250	0,19	± 0,013
	10:1	142,97	± 1,150	0,17	± 0,008
PLGA 50:50 s 0,1% F127 nanoprecipitace	1:1	203,00	± 0,954	0,30	± 0,019
	2:1	232,03	± 0,569	0,43	± 0,020
	5:1	292,50	± 8,843	0,49	± 0,022
	10:1	262,10	± 3,079	0,30	± 0,027
PLGA 50:50 s 0,5% F127 nanoprecipitace	1:1	231,43	± 15,751	0,32	± 0,004
	2:1	296,53	± 37,661	0,44	± 0,068
	5:1	257,33	± 6,306	0,30	± 0,024
	10:1	243,83	± 2,060	0,21	± 0,014

Tabulka 4: Velikost připravených NČ a jejich PDI u PLGA 70:30

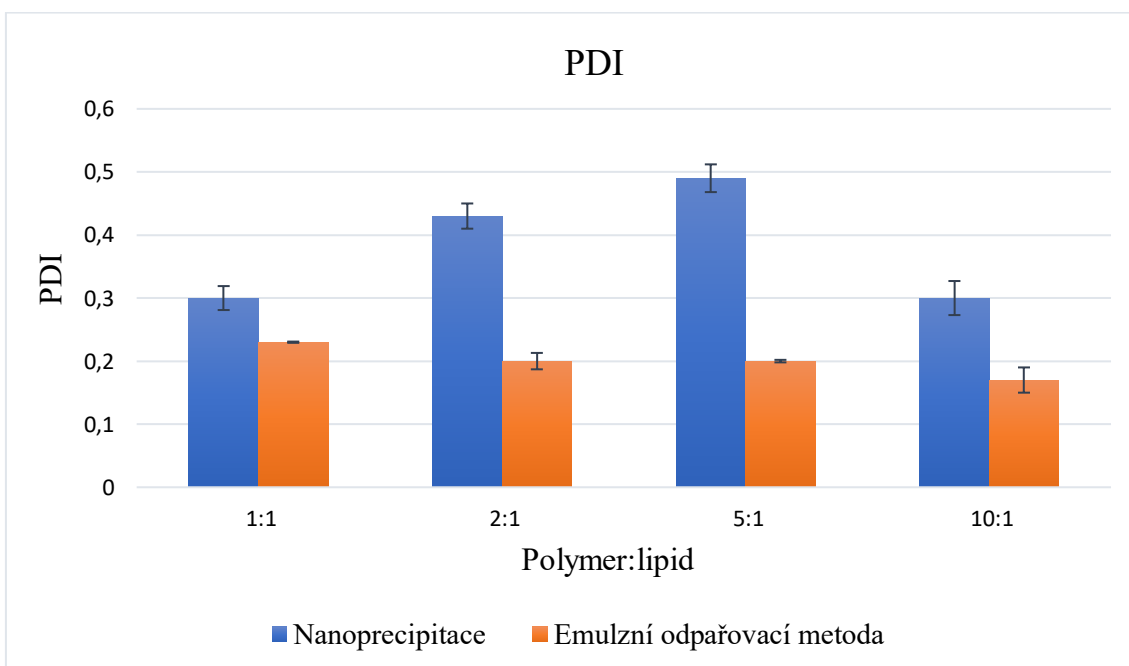
VZOREK		Ø VELIKOST ČÁSTIC [nm]	SD	Ø PDI	SD
PLGA 70:30 s 0,1% F127 emulzní odpařovací m.	1:1	170,63	± 1,550	0,36	± 0,001
	2:1	197,23	± 3,495	0,40	± 0,028
	5:1	204,57	± 4,970	0,30	± 0,034
	10:1	226,37	± 3,729	0,35	± 0,042
PLGA 70:30 s 0,5% F127 emulzní odpařovací m.	1:1	165,33	± 4,718	0,39	± 0,008
	2:1	203,57	± 4,456	0,47	± 0,065
	5:1	238,23	± 1,656	0,53	± 0,050
	10:1	240,10	± 1,510	0,49	± 0,019
PLGA 70:30 s 0,1% F127 nanoprecipitace	1:1	188,63	± 1,966	0,23	± 0,001
	2:1	220,00	± 0,819	0,33	± 0,013
	5:1	281,43	± 1,450	0,30	± 0,013
	10:1	241,97	± 2,761	0,22	± 0,010
PLGA 70:30 s 0,5% F127 nanoprecipitace	1:1	192,93	± 1,935	0,23	± 0,016
	2:1	223,20	± 0,569	0,30	± 0,015
	5:1	270,60	± 1,908	0,28	± 0,027
	10:1	290,77	± 13,655	0,36	± 0,053

V následujících grafech 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 a 10 je zobrazeno porovnání nanoprecipitace a emulzní odpařovací metody z hlediska velikosti NČ a PDI u jednotlivých polymerů s rozdílnou koncentrací poloxameru.

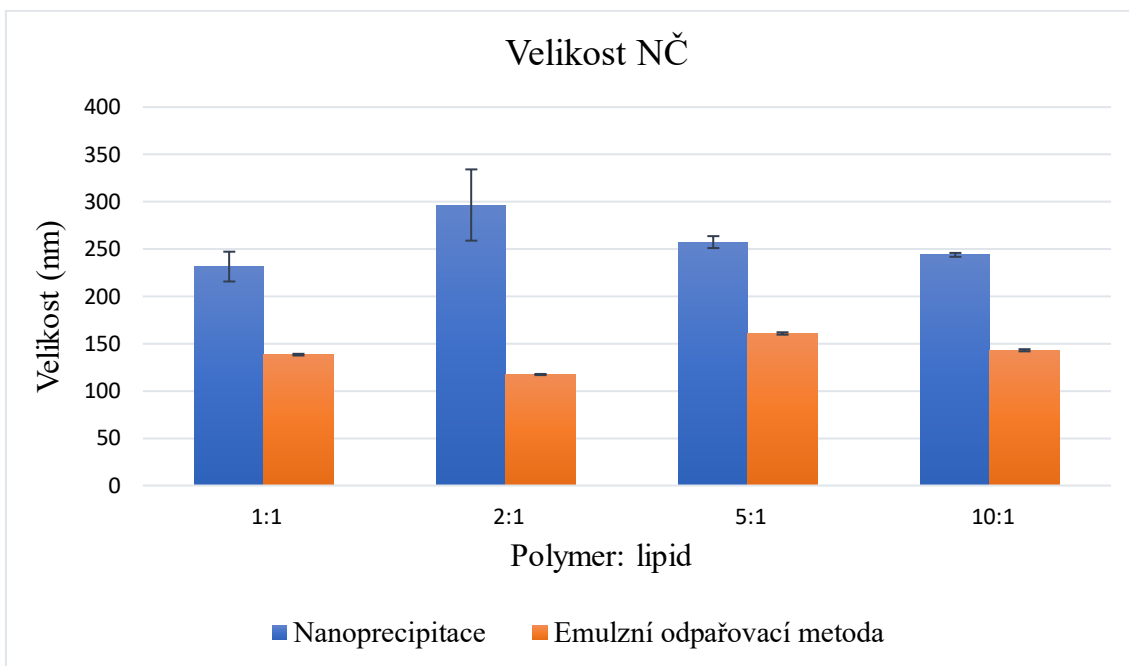
U polymeru PLGA 50:50 vykazovaly NČ připravené emulzní odpařovací metodou menší hodnoty velikosti NČ a PDI. U nanoprecipitace, kde pravděpodobně docházelo k agregaci NČ po jejich bezprostředním vytvoření, hodnoty velikosti dosahovaly až 300 nm a PDI 0,5.



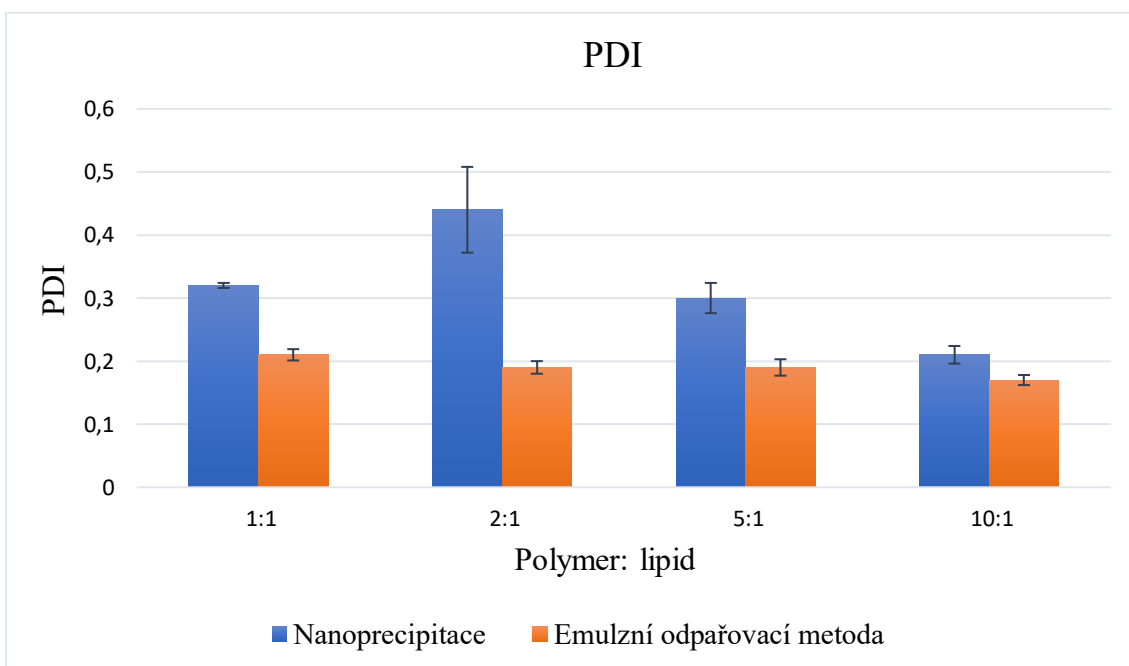
Graf 3: Porovnání hodnot velikosti NČ připravených nanoprecipitací a emulzní odpařovací metodou u PLGA 50:50 s 0,1% roztokem F127



Graf 4: Porovnání hodnot PDI NČ připravených nanoprecipitací a emulzní odpařovací metodou u PLGA 50:50 s 0,1% roztokem F127

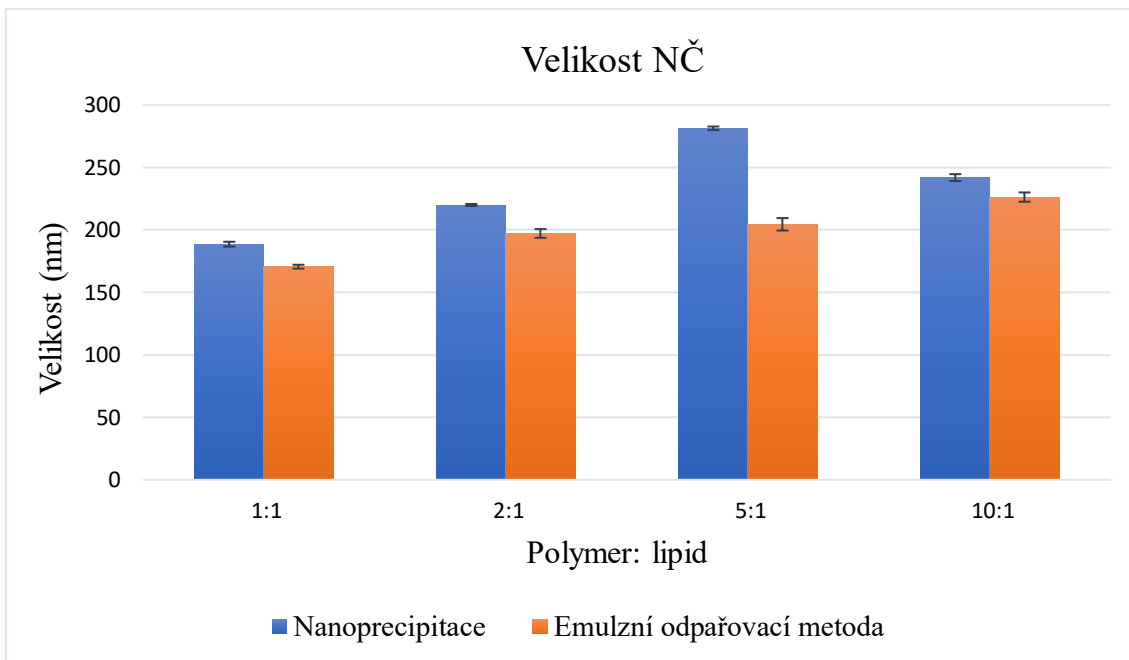


Graf 5: Porovnání hodnot velikosti NČ připravených nanoprecipitací a emulzní odpařovací metodou u PLGA 50:50 s 0,5% roztokem F127

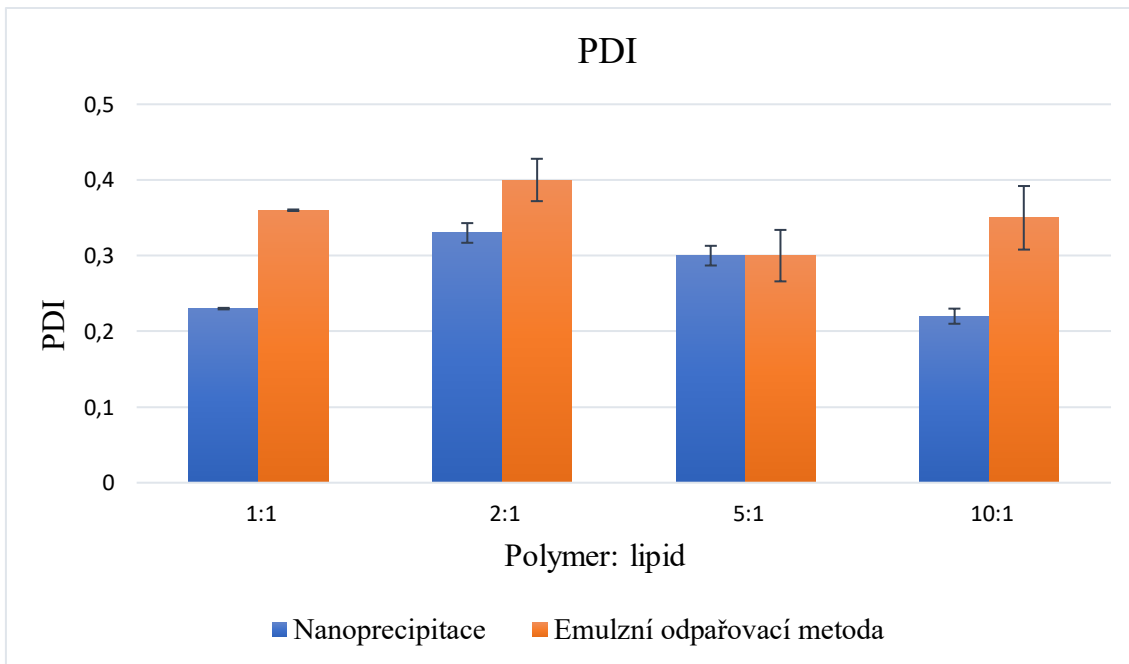


Graf 6: Porovnání hodnot PDI NČ připravených nanoprecipitací a emulzní odpařovací metodou u PLGA 50:50 s 0,5% roztokem F127

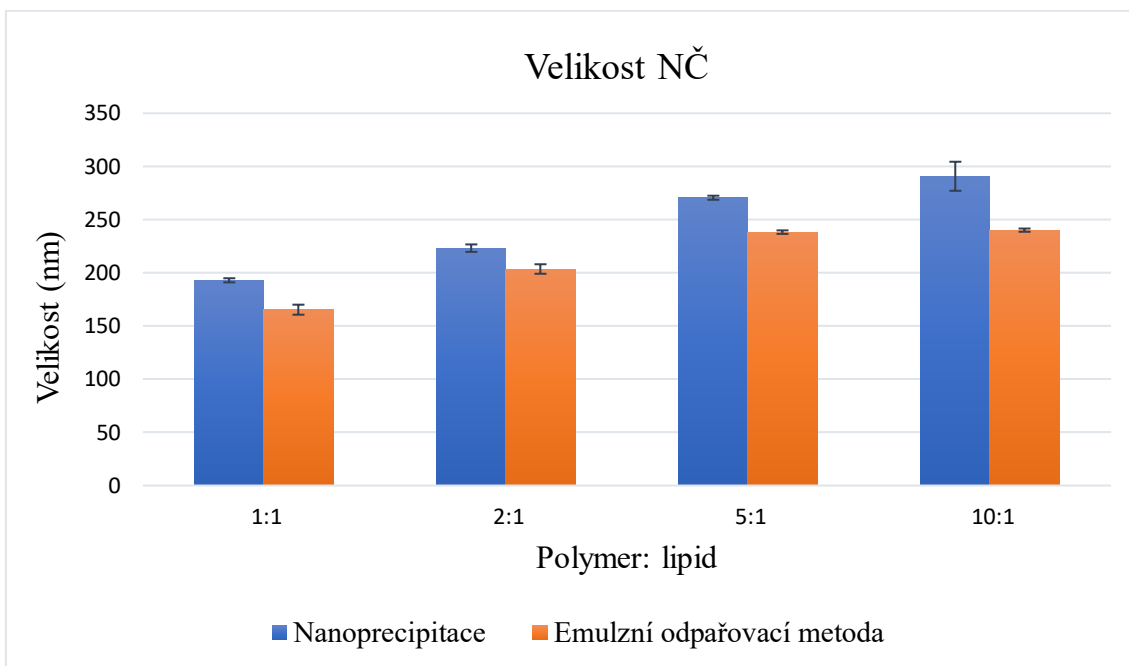
U polymeru PLGA 70:30 nebyly rozdíly mezi metodami tolik výrazné jako u PLGA 50:50. NČ připravené nanoprecipitací měly i s tímto polyesterem vyšší hodnoty velikostí, naopak i u emulzní odpařovací metody se zvýšila PDI až k hodnotám 0,4.



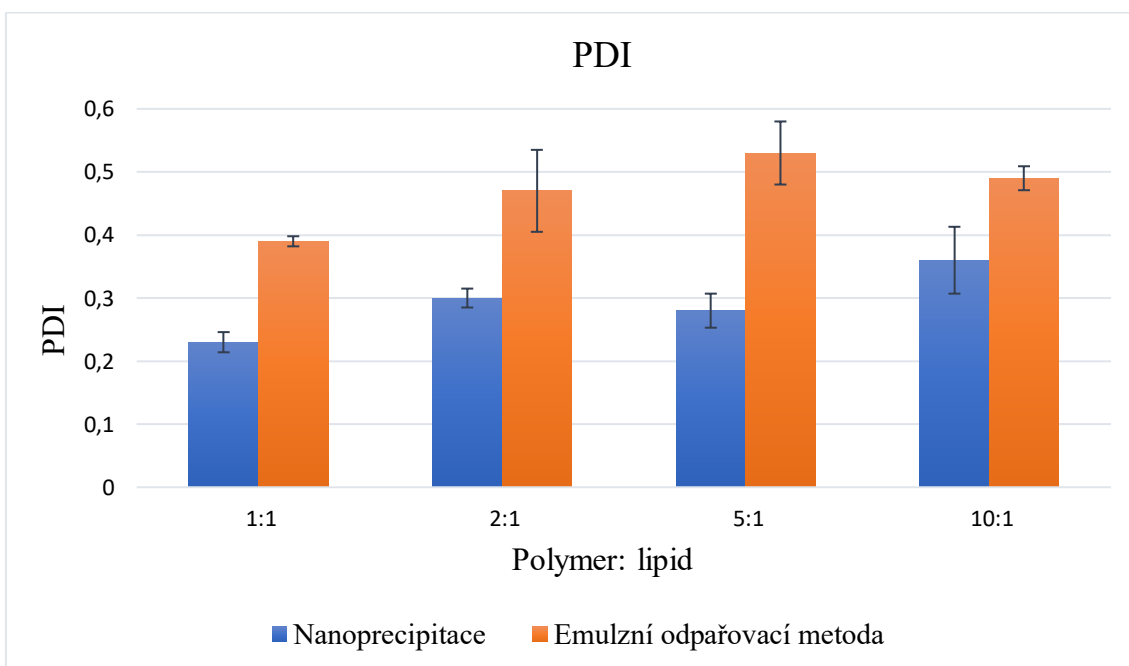
Graf 7: Porovnání hodnot velikosti NČ připravených nanoprecipitací a emulzní odpařovací metodou u PLGA 70:30 s 0,1% roztokem F127



Graf 8: Porovnání hodnot PDI NČ připravených nanoprecipitací a emulzní odpařovací metodou u PLGA 70:30 s 0,1% roztokem F127



Graf 9: Porovnání hodnot velikosti NČ připravených nanoprecipitací a emulzní odpařovací metodou u PLGA 70:30 s 0,5% roztokem F127



Graf 10: Porovnání hodnot PDI NČ připravených nanoprecipitací a emulzní odpařovací metodou u PLGA 70:30 s 0,5% roztokem F127

Lipofilnější polymer PLGA 70:30 se tedy jeví jako méně vhodný pro konstrukci HPLN. Důvodem byly vyšší hodnoty PDI i velikosti vzniklých částic. Toto lze vysvětlit prudší změnou mezipovrchového napětí ve fázi emulze. Lipofilnější polymer může vést k vyššímu mezipovrchovému napětí, vyšší energii systému a tím i zvýšené tendenci částic ke zmenšení celkového povrchu. (42) Proto nebyl v dalších experimentech použit.

Dalším sledovaným parametrem byl ZP. ZP udává informace o stabilitě koloidního systému. Aby byl systém stabilní, musí mít hodnoty vyšší než +30 mV nebo nižší než -30 mV, při kterých dochází k vzájemnému elektrostatickému odpuzování NČ. Případně je třeba stabilitu zajistit jiným způsobem, např. použitím vhodných polymerních stabilizátorů. Průměrné hodnoty ZP připravených NČ a jejich SD jsou uvedeny v tabulce 5.

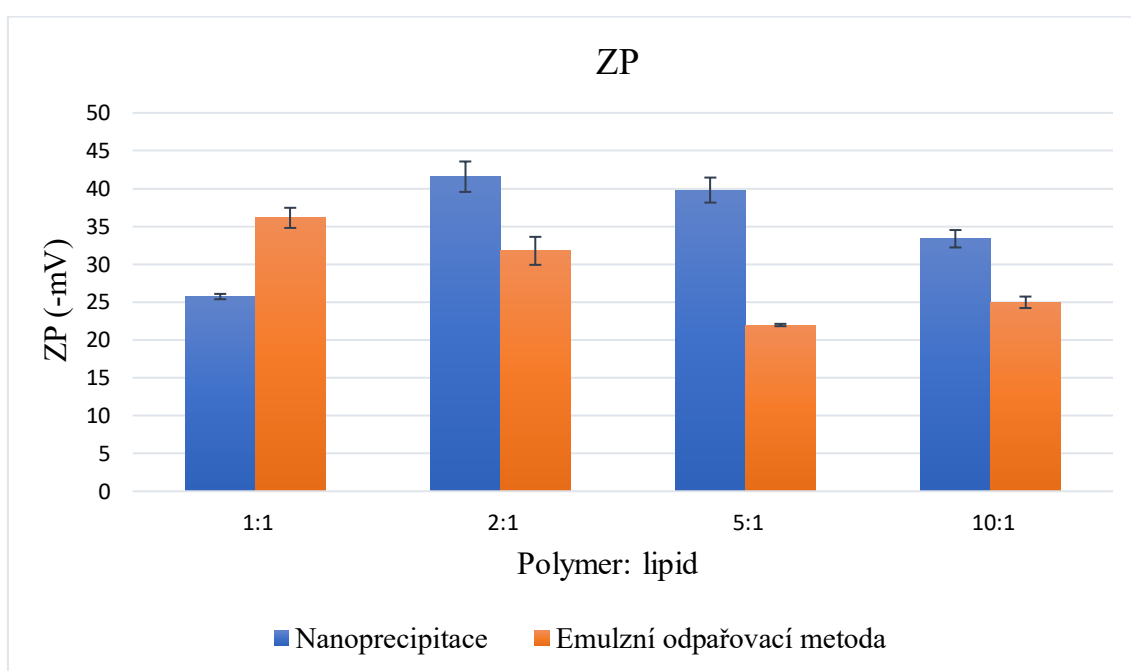
Naměřené hodnoty ZP se pohybovaly od -21 mV do -42 mV. NČ tvořené z polymeru PLGA 70:30 mají zápornější hodnoty, tudíž by se dalo předpokládat, že budou koloidně stabilnější. Je to dáno tím, že u tohoto polymeru vznikaly větší NČ, které mají menší plochu povrchu, kde je větší hustota náboje. U těchto NČ se nacházejí nejzápornější hodnoty u vzorků s poměrem polymerní části k lipidické 2:1. Vzorky s nižší koncentrací poloxameru mají též zápornější hodnoty ZP z důvodu vzniku menších NČ a zřejmě i díky menšímu maskujícímu efektu poloxameru na povrchu vzniklých NČ. (42)

Tabulka 5: Hodnoty ZP připravených NČ

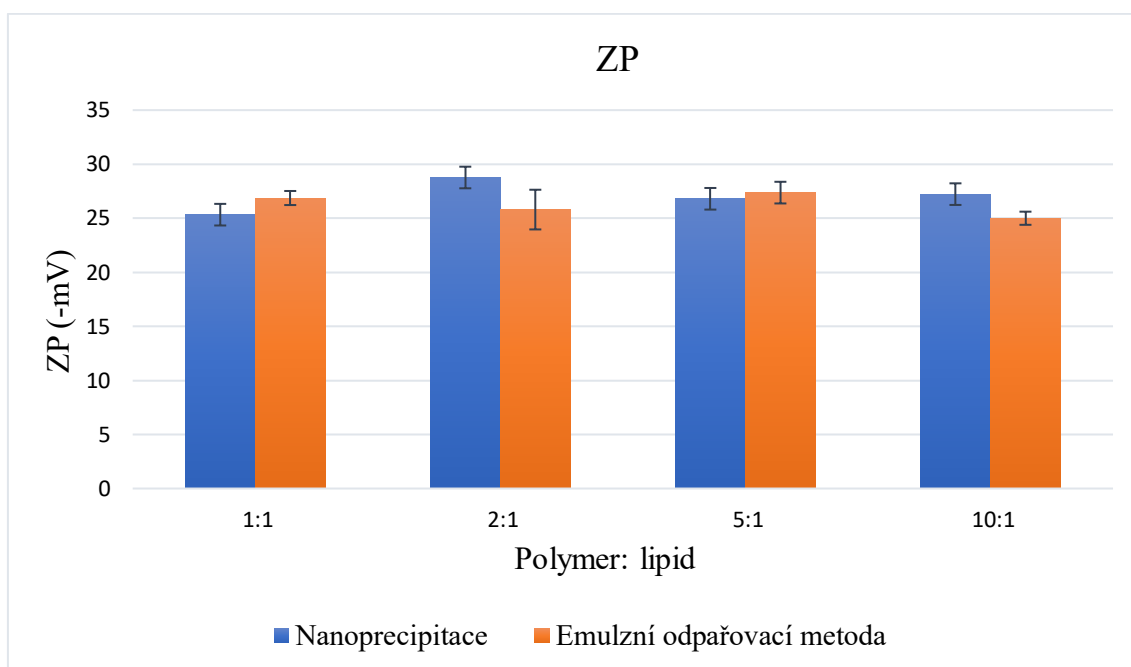
Vzorek		\varnothing ZP [mV]	SD
PLGA 50:50 s 0,1% F127 emulzní odpařovací metoda	1:1	-36,13	$\pm 1,332$
	2:1	-31,77	$\pm 1,850$
	5:1	-21,97	$\pm 0,153$
	10:1	-24,97	$\pm 0,757$
PLGA 50:50 s 0,5% F127 emulzní odpařovací metoda	1:1	-26,87	$\pm 0,651$
	2:1	-25,80	$\pm 1,836$
	5:1	-27,37	$\pm 1,002$
	10:1	-25,00	$\pm 0,608$
PLGA 50:50 s 0,1% F127 nanoprecipitace	1:1	-25,73	$\pm 0,351$
	2:1	-41,57	$\pm 2,011$
	5:1	-39,80	$\pm 1,652$
	10:1	-33,37	$\pm 1,150$
PLGA 50:50 s 0,5% F127 nanoprecipitace	1:1	-25,33	$\pm 1,201$
	2:1	-28,77	$\pm 0,851$
	5:1	-26,80	$\pm 0,458$
	10:1	-27,23	$\pm 0,815$
PLGA 70:30 s 0,1% F127 nanoprecipitace	1:1	-34,63	$\pm 0,351$
	2:1	-39,83	$\pm 1,904$
	5:1	-32,80	$\pm 0,100$
	10:1	-27,87	$\pm 0,902$
PLGA 70:30 s 0,5% F127 nanoprecipitace	1:1	-32,60	$\pm 1,300$
	2:1	-35,97	$\pm 2,548$
	5:1	-29,77	$\pm 0,764$
	10:1	-28,60	$\pm 1,0149$
PLGA 70:30 s 0,1% F127 emulzní odpařovací metoda	1:1	-38,73	$\pm 1,026$
	2:1	-35,23	$\pm 0,971$
	5:1	-36,57	$\pm 1,601$
	10:1	-33,10	$\pm 0,700$
PLGA 70:30 s 0,5% F127 emulzní odpařovací metoda	1:1	-34,93	$\pm 1,021$
	2:1	-40,30	$\pm 1,300$
	5:1	-34,13	$\pm 1,069$
	10:1	-35,93	$\pm 1,904$

V následujících grafech 11, 12, 13 a 14 je znázorněno porovnání nanoprecipitace a emulzní odpařovací metody z hlediska ZP u jednotlivých polymerů s rozdílnou koncentrací poloxameru.

U polymeru PLGA 50:50 s nižší koncentrací poloxameru měla nanoprecipitace zápornější hodnoty až na částice připravené z roztoku s poměrem polymeru k lipidu 1:1. U 0,5% roztoku poloxameru byly hodnoty vyrovnanější, ale ne tolik záporné pro potřebnou stabilitu.

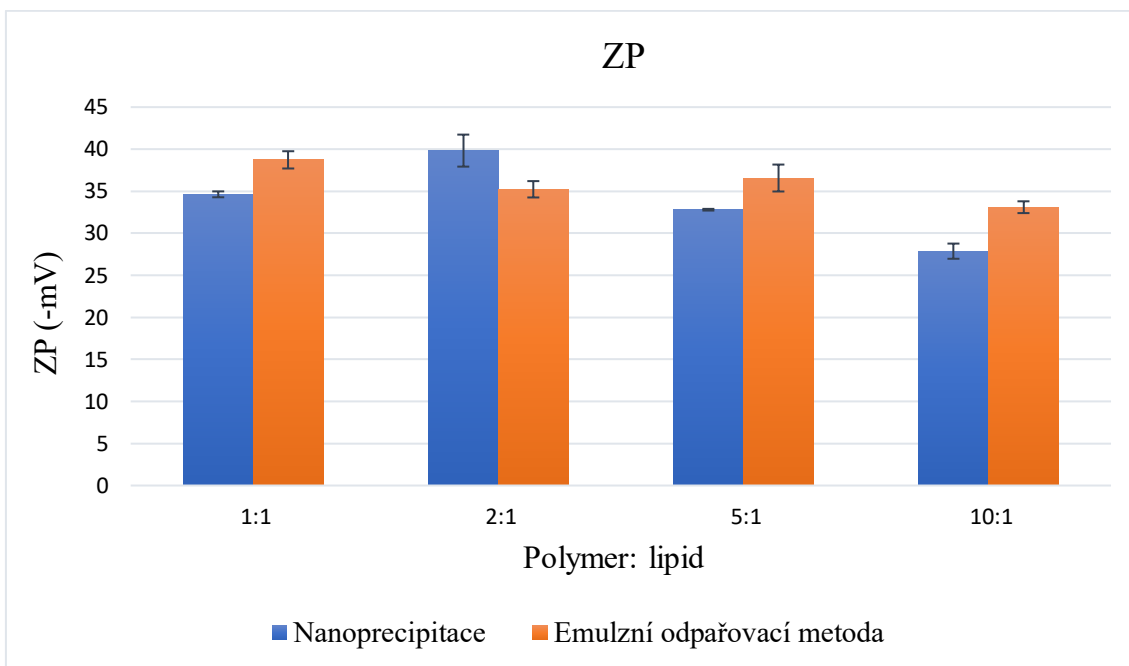


Graf 11: Porovnání hodnot ZP NČ připravených nanoprecipitací a emulzní odpařovací metodou u PLGA 50:50 s 0,1% roztokem F127

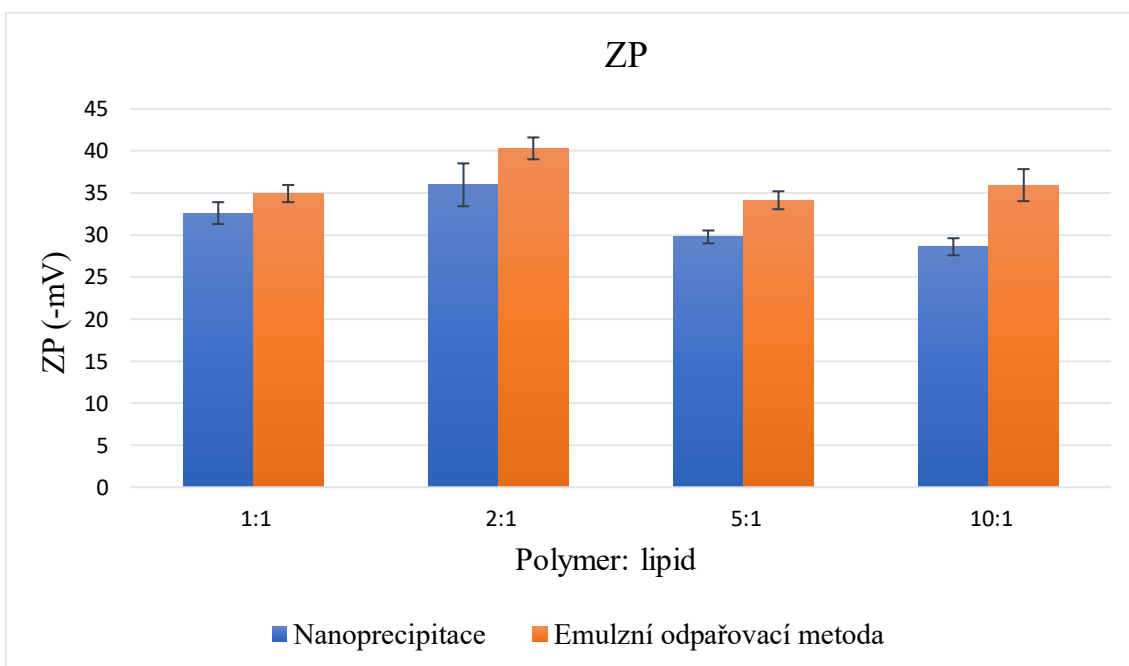


Graf 12: Porovnání hodnot ZP NČ připravených nanoprecipitací a emulzní odpařovací metodou u PLGA 50:50 s 0,5% roztokem F127

Nepatrně vyšších hodnot ZP u polymeru PLGA 70:30 dosahovala emulzní odpařovací metoda. Zápornější výsledky měly NČ s nižší koncentrací poloxameru z důvodu absence sterického maskujícího efektu. Polymer PLGA 70:30 oproti polymeru PLGA 50:50 vykazoval výraznější ZP. Z výsledků si lze povšimnout, že vyšší hodnoty ZP často korelují s vyššími hodnotami velikosti částic, což vede k závěru, že s klesající celkovou plochou fázového rozhraní dochází k tvorbě povrchového náboje s větší hustotou, než je tomu v porovnání s menšími částicemi. Jiným vysvětlením může být to, že v procesu tvorby NČ došlo k méně efektivnímu zakotvení poloxameru na povrch vzniklých NČ. Poloxamer může povrchový náboj částečně maskovat, proto jsou hodnoty ZP u těchto částic výraznější.



Graf 13: Porovnání hodnot ZP NČ připravených nanoprecipitací a emulzní odpařovací metodou u PLGA 70:30 s 0,1% roztokem F127



Graf 14: Porovnání hodnot ZP NČ připravených nanoprecipitací a emulzní odpařovací metodou u PLGA 70:30 s 0,5% roztokem F127

3.2 Úprava podmínek přípravy

Pro tento experiment byl využit roztok PLGA 50:50 v EtAc, jelikož NČ připravené emulzní odpařovací metodou s tímto polymerem vykazovaly optimální hodnoty velikosti, PDI a ZP. Vodná fáze obsahovala poloxamer ve třech různých koncentracích. Hodnotil se vliv podmínek přípravy na velikost připravených NČ a hodnoty ZP. Naměřené hodnoty velikosti částic, PDI a ZP, včetně SD, jsou uvedeny v následujících tabulkách 6, 7, 8, 9, 10, 11.

Metoda 2, kde se emulze připravená z jedné poloviny vodné fáze během sonifikace chladila pomocí ledové lázně a poté k ní byla přidána druhá polovina vodné fáze, produkovala nejmenší NČ. Velikost NČ připravených metodou 1 byla velice podobná velikosti NČ připravených metodou 2. Největší NČ vznikly metodou 3, kde byla použita jedna vodná fáze a roztok se během sonifikace ledoval. S rostoucí koncentrací poloxameru se zmenšovala velikost připravených NČ. Poloxamer je povrchově aktivní látka a vede k nižším hodnotám velikosti NČ. Důvodem je stabilnější fázové rozhraní s nižším mezipovrchovým napětím (voda-EtAc) ve fázi tvorby nanoemulze. Grafické znázornění velikosti NČ se nachází v grafech 15, 17, 19.

Nejnižší hodnoty PDI měly částice u metody 1 s nejnižší koncentrací poloxameru. Obdobné výsledky vycházely i u NČ připravených metodou 2. NČ připravené metodou 3 byly s hodnotami PDI nad hranicí přijatelnosti velmi pravděpodobně z důvodu agregace NČ. Porovnání metod z hlediska PDI je zobrazeno v grafech 16, 18, 20.

Tabulka 6: Velikost a PDI NČ připravených metodou 1

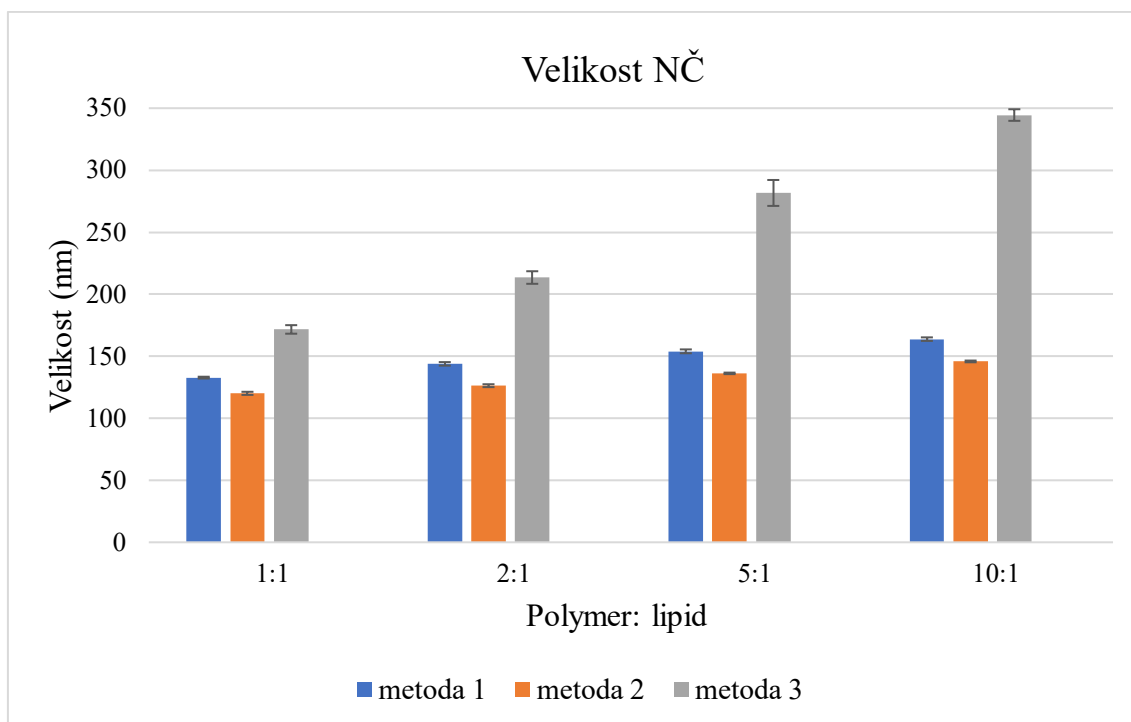
VZOREK		Ø VELIKOST ČÁSTIC [nm]	SD	Ø PDI	SD
PLGA 50:50 s 0,1% F127 emulzní odpařovací m.	1:1	132,77	± 0,723	0,15	± 0,020
	2:1	143,87	± 1,419	0,12	± 0,019
	5:1	153,97	± 1,557	0,12	± 0,012
	10:1	163,80	± 1,411	0,11	± 0,017
PLGA 50:50 s 0,5% F127 emulzní odpařovací m.	1:1	110,30	± 0,200	0,19	± 0,008
	2:1	116,23	± 0,577	0,17	± 0,015
	5:1	121,03	± 0,404	0,19	± 0,014
	10:1	123,50	± 1,249	0,18	± 0,008
PLGA 50:50 s 1% F127 emulzní odpařovací m.	1:1	88,71	± 0,381	0,25	± 0,011
	2:1	96,71	± 0,332	0,25	± 0,005
	5:1	108,80	± 0,436	0,24	± 0,011
	10:1	106,90	± 1,300	0,22	± 0,003

Tabulka 7: Velikost a PDI NČ připravených metodou 2

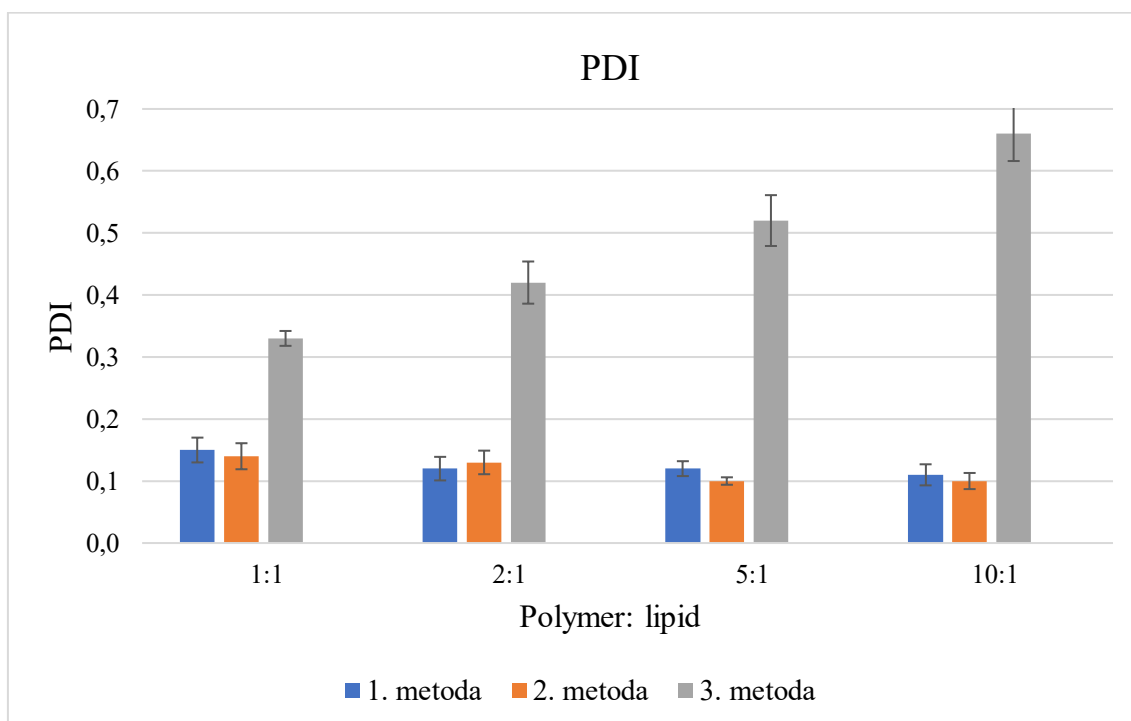
VZOREK		Ø VELIKOST ČÁSTIC [nm]	SD	Ø PDI	SD
PLGA 50:50 s 0,1% F127 emulzní odpařovací m.	1:1	120,10	± 1,249	0,14	± 0,021
	2:1	126,27	± 1,168	0,13	± 0,019
	5:1	136,20	± 0,608	0,10	± 0,006
	10:1	145,83	± 0,702	0,10	± 0,013
PLGA 50:50 s 0,5% F127 emulzní odpařovací m.	1:1	91,90	± 0,387	0,23	± 0,004
	2:1	85,45	± 0,450	0,24	± 0,009
	5:1	100,67	± 0,643	0,21	± 0,014
	10:1	102,70	± 1,473	0,20	± 0,001
PLGA 50:50 s 1% F127 emulzní odpařovací m.	1:1	69,64	± 0,393	0,28	± 0,004
	2:1	80,20	± 0,481	0,26	± 0,009
	5:1	98,27	± 0,997	0,25	± 0,002
	10:1	93,69	± 0,377	0,26	± 0,007

Tabulka 8: Velikost a PDI NČ připravených metodou 3

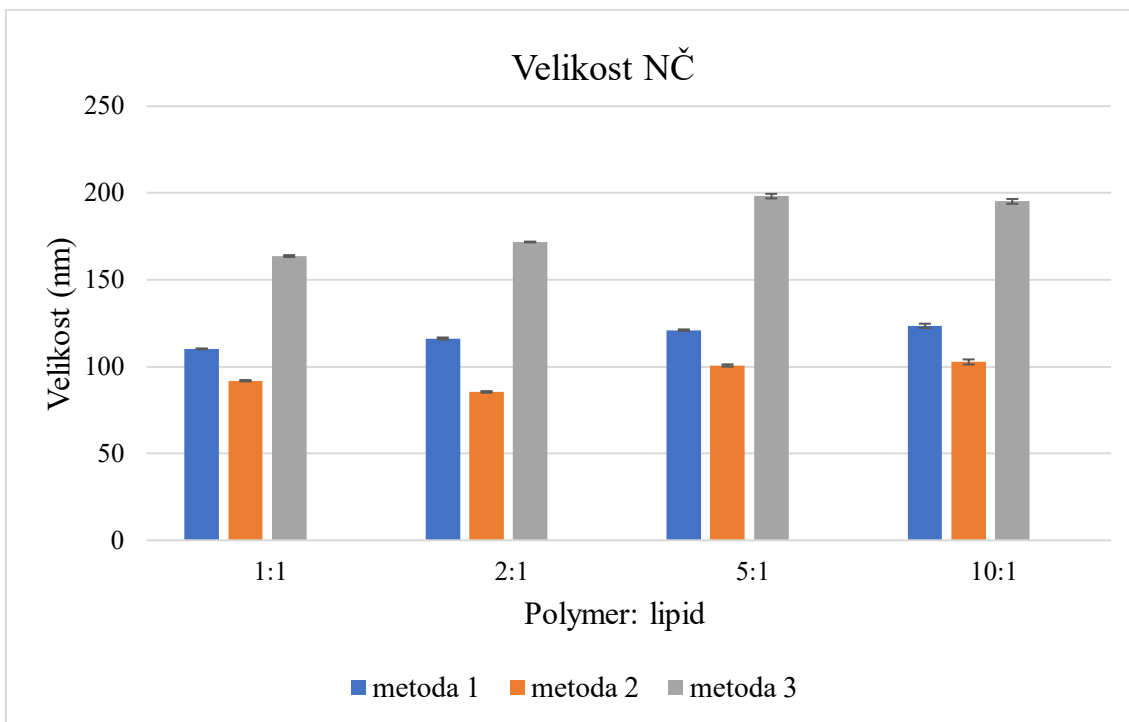
VZOREK		Ø VELIKOST ČÁSTIC [nm]	SD	Ø PDI	SD
PLGA 50:50 s 0,1% F127 emulzní odpařovací m.	1:1	171,63	± 3,444	0,33	± 0,012
	2:1	213,47	± 5,064	0,42	± 0,034
	5:1	281,67	± 10,454	0,52	± 0,041
	10:1	344,47	± 4,661	0,66	± 0,044
PLGA 50:50 s 0,5% F127 emulzní odpařovací m.	1:1	163,67	± 0,551	0,26	± 0,011
	2:1	171,77	± 0,252	0,22	± 0,007
	5:1	198,20	± 1,323	0,26	± 0,006
	10:1	195,20	± 1,389	0,23	± 0,006
PLGA 50:50 s 1% F127 emulzní odpařovací m.	1:1	174,03	± 1,210	0,35	± 0,018
	2:1	189,67	± 2,909	0,29	± 0,019
	5:1	217,07	± 4,723	0,35	± 0,016
	10:1	167,53	± 2,201	0,18	± 0,012



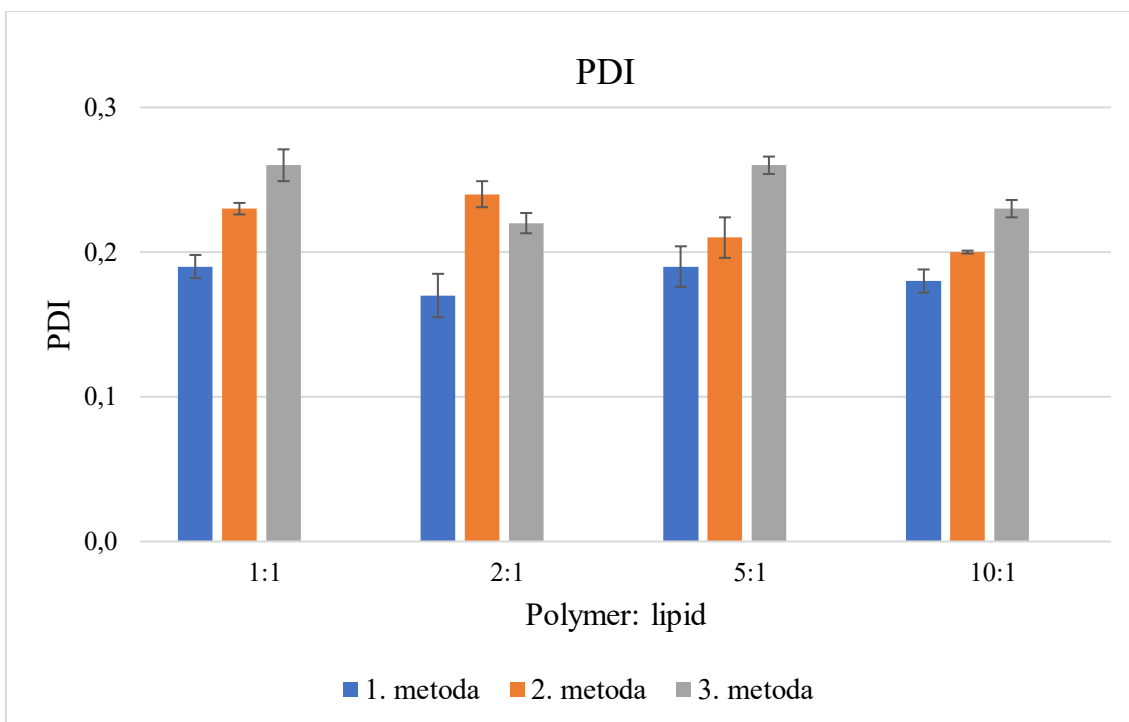
Graf 15: Porovnání hodnot velikostí NČ při změně podmínek u PLGA 50:50 s 0,1% roztokem F127



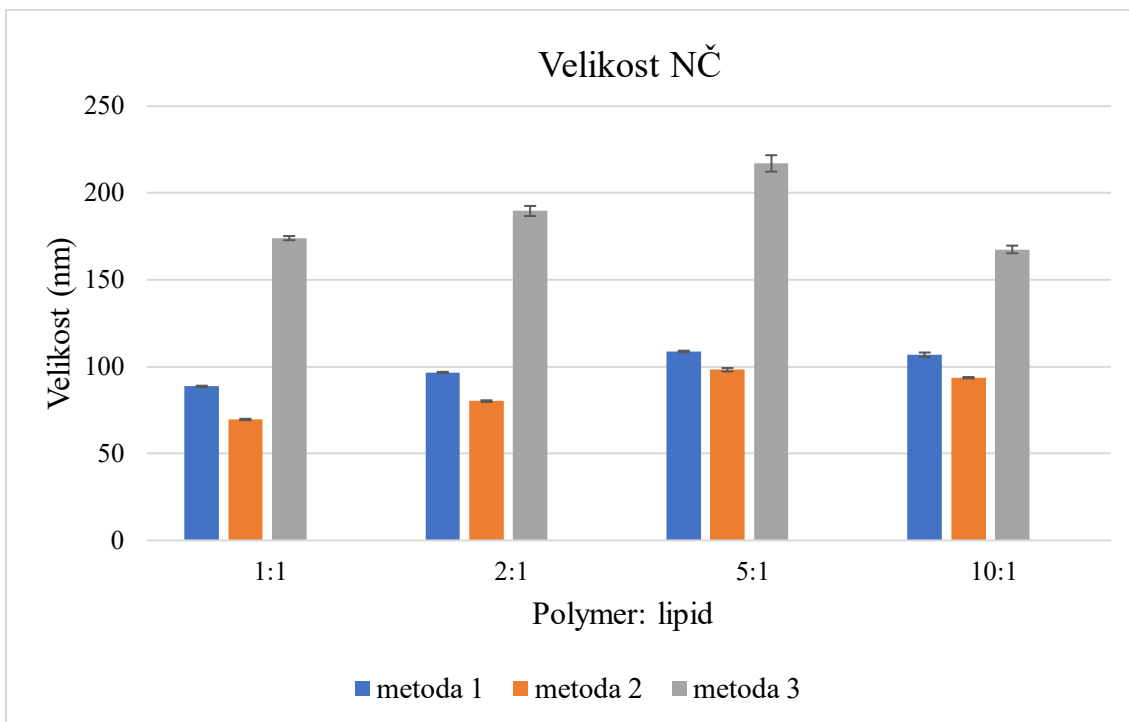
Graf 16: Porovnání hodnot PDI NČ při změně podmínek u PLGA 50:50 s 0,1% roztokem F127



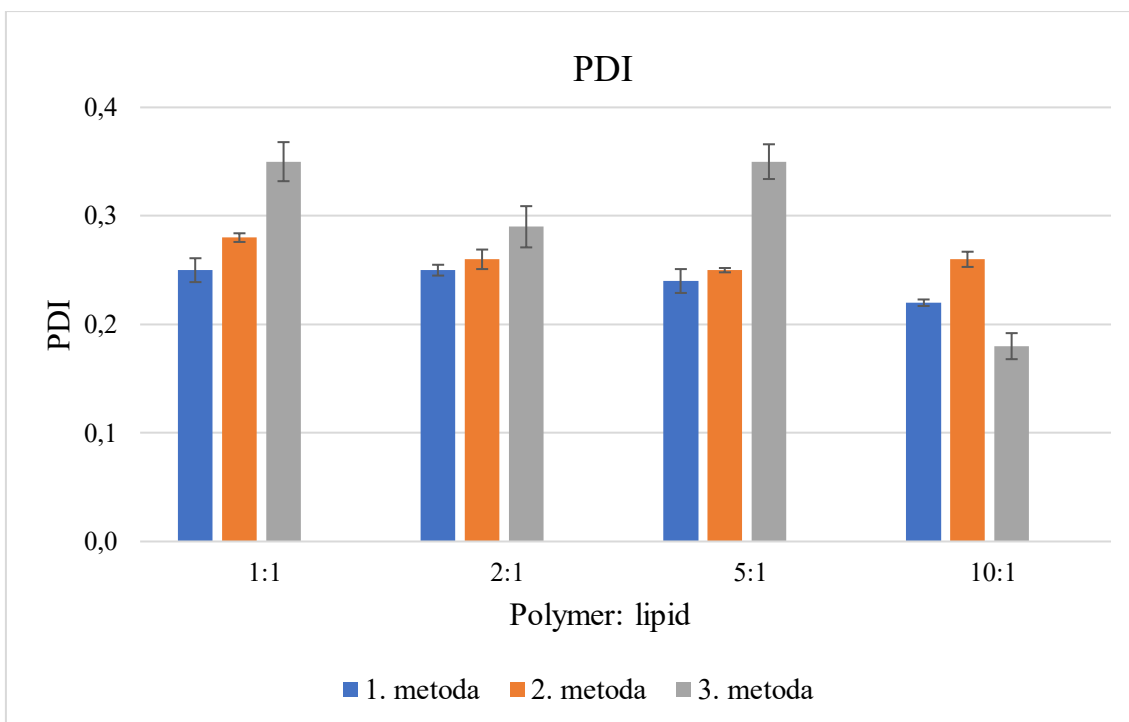
Graf 17: Porovnání hodnot velikostí NČ při změně podmínek u PLGA 50:50 s 0,5% roztokem F127



Graf 18: Porovnání hodnot PDI NČ při změně podmínek u PLGA 50:50 s 0,5% roztokem F127



Graf 19: Porovnání hodnot velikostí NČ při změně podmínek u PLGA 50:50 s 1% roztokem F127



Graf 20: Porovnání hodnot PDI NČ při změně podmínek u PLGA 50:50 s 1% roztokem F127

Výsledky ZP u metody 1 jsou opět podobné výsledkům, kde byly NČ připraveny s jednou vodnou fází. Hodnoty se pohybovaly od -34 do -24 mV. NČ se mohou považovat za stabilní. To vychází z menší velikosti NČ, které mají větší plochu povrchu, a tedy menší hustotu náboje. U metody 2 byly hodnoty méně záporné. Nezápornější hodnoty vykazovaly NČ připravené metodou 3. Dosahovaly až -40 mV z důvodu větší velikosti NČ a tím větší hustoty náboje. Nejméně záporné byly vždy NČ s největší koncentrací poloxameru, protože poloxamer je povrchově aktivní látka, která vede k tvorbě menších NČ a zároveň může maskovat povrchový náboj NČ svou kumulací na rozhraní fází. Grafické znázornění hodnot ZP se nachází v grafech 21, 22, 23.

Tabulka 9: ZP NČ připravených metodou 1

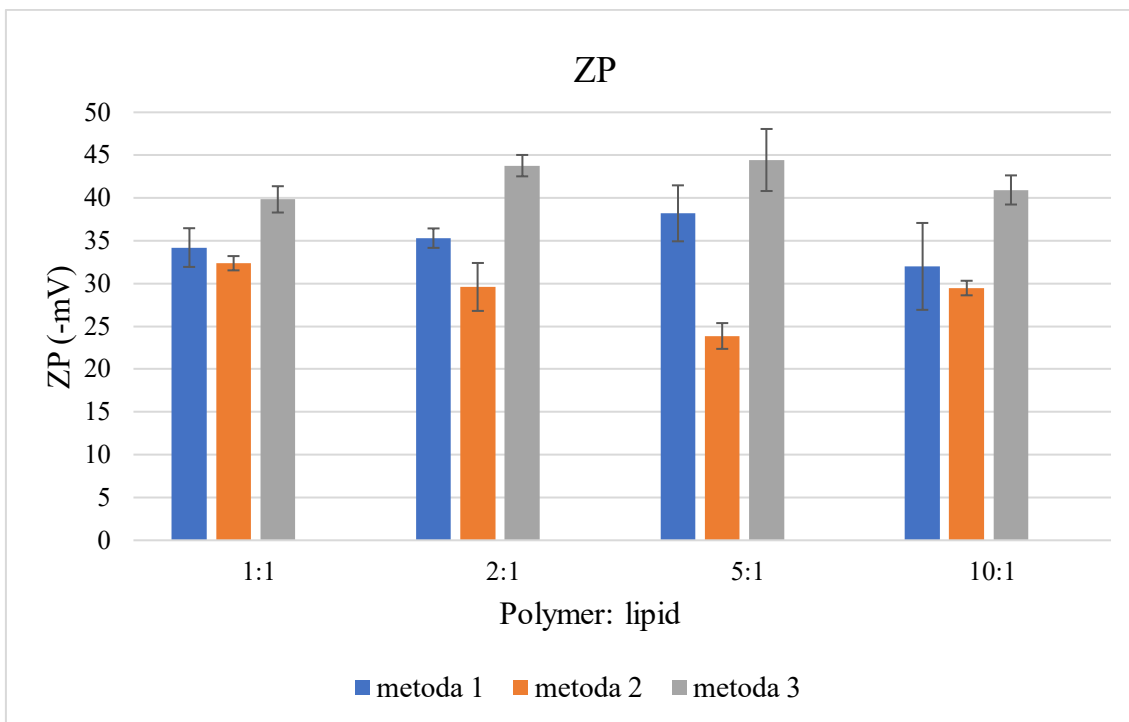
Vzorek		Ø ZP [mV]	SD
PLGA 50:50 s 0,1% F127 emulzní odpařovací m.	1:1	-34,20	± 2,261
	2:1	-35,30	± 1,136
	5:1	-38,20	± 3,270
	10:1	-32,00	± 5,076
PLGA 50:50 s 0,5% F127 emulzní odpařovací m.	1:1	-30,07	± 2,695
	2:1	-30,47	± 2,540
	5:1	-26,47	± 0,462
	10:1	-33,03	± 0,815
PLGA 50:50 s 1% F127 emulzní odpařovací m.	1:1	-24,13	± 1,115
	2:1	-29,60	± 4,204
	5:1	-28,67	± 0,950
	10:1	-29,83	± 2,380

Tabulka 10: ZP NČ připravených metodou 2

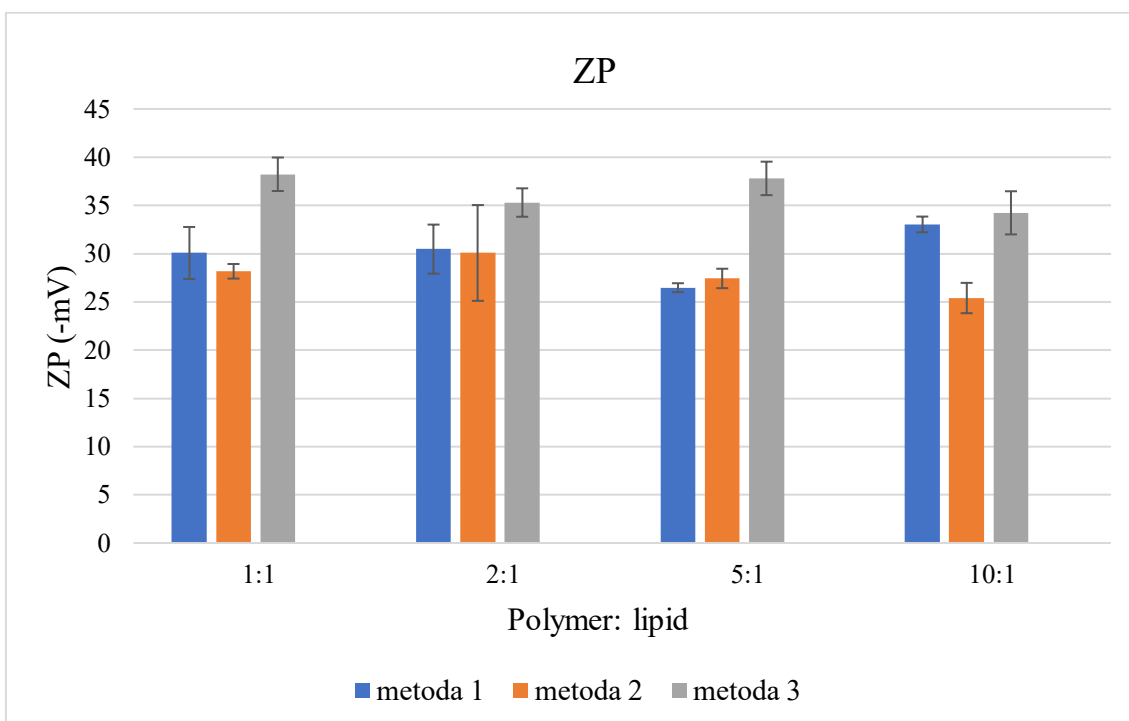
Vzorek		\emptyset ZP [mV]	SD
PLGA 50:50 s 0,1% F127 emulzní odpařovací m.	1:1	-32,37	$\pm 0,833$
	2:1	-29,60	$\pm 2,800$
	5:1	-23,87	$\pm 1,504$
	10:1	-29,47	$\pm 0,851$
PLGA 50:50 s 0,5% F127 emulzní odpařovací m.	1:1	-28,17	$\pm 0,757$
	2:1	-30,07	$\pm 4,966$
	5:1	-27,43	$\pm 1,007$
	10:1	-25,40	$\pm 1,572$
PLGA 50:50 s 1% F127 emulzní odpařovací m.	1:1	-27,83	$\pm 1,504$
	2:1	-20,23	$\pm 4,382$
	5:1	-25,33	$\pm 2,631$
	10:1	-23,73	$\pm 1,701$

Tabulka 11: ZP NČ připravených metodou 3

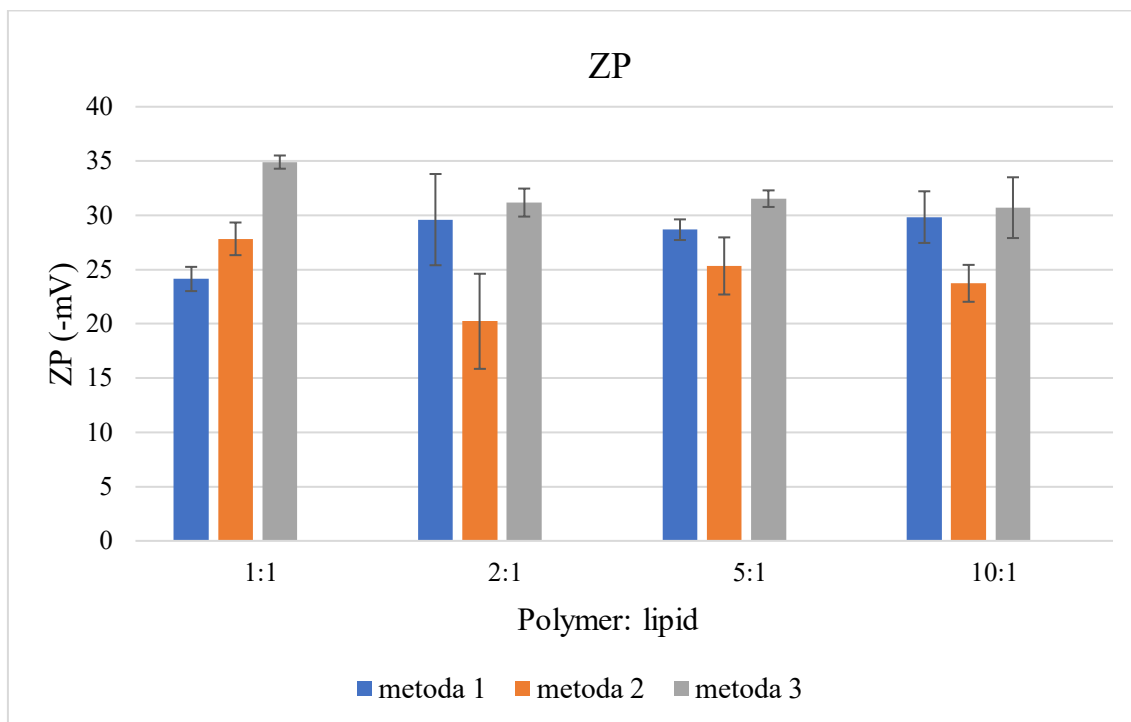
Vzorek		\emptyset ZP [mV]	SD
PLGA 50:50 s 0,1% F127 emulzní odpařovací m.	1:1	-39,83	$\pm 1,537$
	2:1	-43,77	$\pm 1,250$
	5:1	-44,43	$\pm 3,625$
	10:1	-40,93	$\pm 1,701$
PLGA 50:50 s 0,5% F127 emulzní odpařovací m.	1:1	-38,23	$\pm 1,739$
	2:1	-35,30	$\pm 1,473$
	5:1	-37,80	$\pm 1,735$
	10:1	-34,23	$\pm 2,237$
PLGA 50:50 s 1% F127 emulzní odpařovací m.	1:1	-34,90	$\pm 0,608$
	2:1	-31,17	$\pm 1,290$
	5:1	-31,53	$\pm 0,764$
	10:1	-30,70	$\pm 2,800$



Graf 21: Porovnání hodnot ZP při změně podmínek u PLGA 50:50 s 0,1% roztokem F127



Graf 22: Porovnání hodnot ZP při změně podmínek u PLGA 50:50 s 0,5% roztokem F127



Graf 23: Porovnání hodnot ZP při změně podmínek u PLGA 50:50 s 1% roztokem F127

Nejlepších hodnot z hlediska granulometrie a stability dosahovaly NČ připravené metodou 1 a 2, kde byla vodná fáze rozdělena na dvě části během sonifikace. Menší objem vodné fáze vede k homogennějším podmínkám během ultrazvukování a vzorkům s nižší PDI a menší velikostí. Vliv chlazení pomocí ledové lázně se nepodařilo prokázat. Mezi hodnotami ZP připravených různými metodami byl pozorován fenomén nižšího ZP u částic, které byly během přípravy chlazeny ledovou lázní. Tento fenomén nebyl dosud v literatuře nijak popsán a k jeho objasnění nemáme v tuto chvíli dostatek informací. Nabízí se souvislost mezi rozdílným teplotním režimem během přípravy a variabilitou v chování některých poloxamerů při různých teplotách.

Při porovnání hodnot velikosti výsledných částic vzniklých za rozdílných koncentrací poloxameru ve vnější fázi se ukazuje, že se zvýšením koncentrace nad 0,5 % lze touto metodou připravit částice menší než 100 nm při zachování velmi dobré polydisperzity. To souvisí s efektivní stabilizací fázového rozhraní při přípravě NČ, kdy dochází ke kumulaci poloxameru na mezifázi a jeho vyšší koncentrace je schopna stabilizovat větší plochu fázového rozhraní.

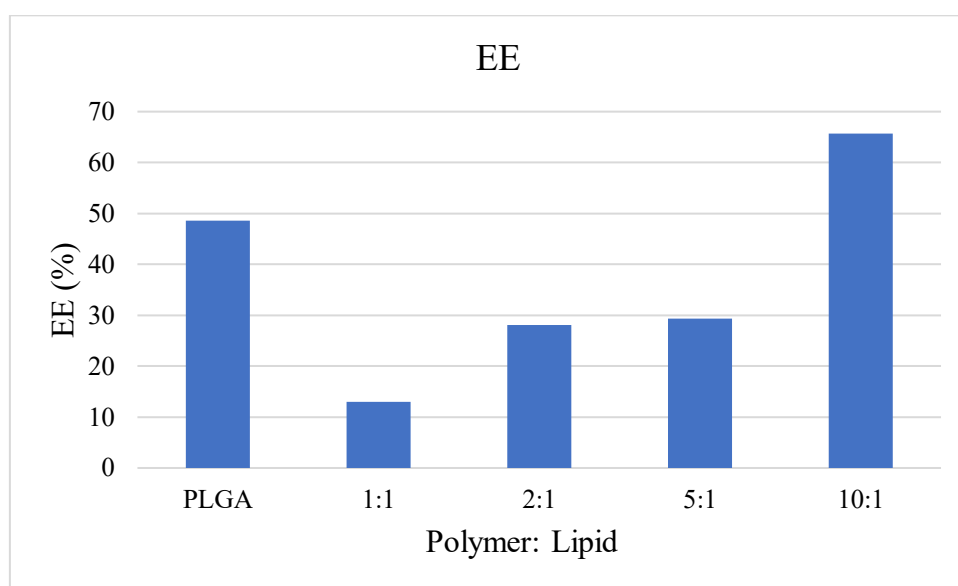
3.3 Hodnocení enkapsulační efektivity, výtěžnosti a drug loading

U roztoku tvořeného z PLGA 50:50 v EtAc s 1% roztokem F127 ve vodné fázi se pomocí spektrofotometrického měření stanovila koncentrace kurkuminu v $\mu\text{g/ml}$ a následně byla vypočítána EE, DL a RY. Význam těchto parametrů a jejich výpočet byl popsán v kapitole 2.3.6. Výsledné hodnoty jsou zaznamenány v tabulce 12 a porovnány v grafu 24.

Nejvyšší hodnotu EE a DL vykazoval roztok s poměrem 10:1, kde převažuje polymerní část. Druhé nejvyšší hodnoty dosahoval roztok, který lipid vůbec neobsahoval. Amfifilní charakter lipidu napomáhá usnadnit enkapsulaci hydrofobních molekul do hydrofobního jádra, pokud budeme předpokládat, že se vytvořila core-shell struktura NČ. Kurkumin je lipofilní látka, ve vodě téměř nerozpustná, která se tedy bude enkapsulovat do polymerního jádra, které bude formováno v iniciální fázi tvorby částic. Až v další fázi bude obklopeno amfifilním lipidem. (23) Při vyšším množství použitého polymeru vznikne větší jádro, které je schopné enkapsulovat vyšší množství kurkuminu. Druhým vysvětlením může být tvorba micel fosfatidylcholinu při jeho vyšších koncentracích, které absorbují kurkumin a poté dojde k jejich odstranění během purifikace. (7) S klesající koncentrací fosfatidylcholinu se zvyšuje RY. Důvodem může být, že menší koncentrace fosfatidylcholinu méně ovlivní proces supersaturace a nukleace a ten probíhá efektivněji s vyšší výtěžností celého procesu. Jiným vysvětlením může být nižší hustota částic s vyšším obsahem fosfatidylcholinu. Tyto „lehčí“ částice se budou v gravitačním poli při centrifugaci separovat méně ochotně a více jich bude odstraněno s odebraným supernatantem, tak jak tomu je pravděpodobně u vzniklých micel. Pro tyto parametry jsou tedy výhodnější NČ s nižším obsahem fosfatidylcholinu.

Tabulka 12: Hodnoty EE, DL a RY

Vzorek		% EE	% DL	% RY
PLGA 50:50 s 1% F127 emulzní odpařovací metoda	PLGA	48,57	0,99	49,25
	1:1	13,01	1,72	7,57
	2:1	28,10	1,55	18,08
	5:1	29,35	1,08	27,19
	10:1	65,73	1,75	37,57



Graf 24: Porovnání hodnot EE

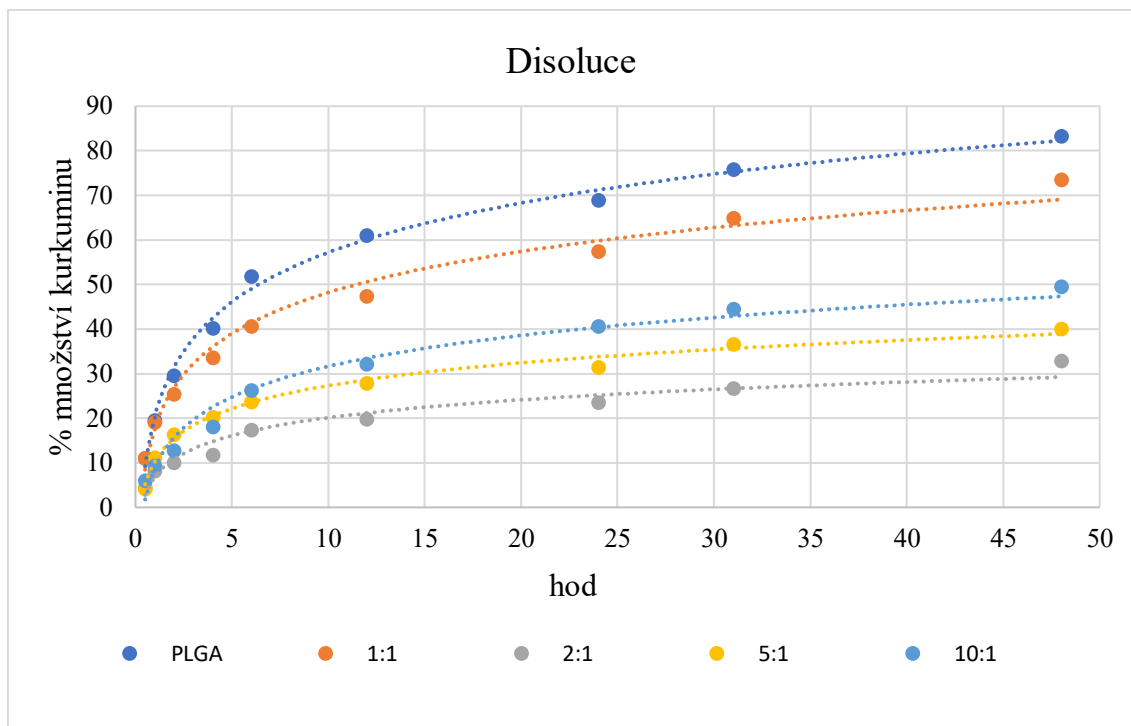
3.4 Hodnocení disoluce

Byl proveden test disoluce probíhající 48 hod. Procentuální množství uvolněného kurkuminu je uvedeno v tabulce 13. Průběh disoluce pro polymer PLGA 50:50 s rozdílným poměrem polymerní části k lipidické je znázorněn v grafu 25.

V prvních 6 hod je pozorovatelné uvolňování kurkuminu burst efektem, které může být zapříčiněno uvolňováním kurkuminu z obalu. Následně přechází do lineárního uvolňování kinetikou 0.řádu. Nejvíce kurkuminu se za 48 hodin uvolnilo z NČ tvořených pouze polymerní částí a dále z NČ obsahující poměr polymeru k lipidu 1:1.

Tabulka 13: Disoluce PLGA 50:50 v EtAc s 1% roztokem F127

Čas	% množství kurkuminu				
	PLGA	1:1	2:1	5:1	10:1
0	0	0	0	0	0
0,5	11,0	11,1	4,4	4,2	6,0
1	19,5	19,1	8,2	11,2	9,3
2	29,6	25,5	10,1	16,4	12,7
4	40,2	33,6	11,7	20,3	18,1
6	51,9	40,6	17,3	23,7	26,2
12	61,0	47,4	19,8	27,9	32,1
24	69,0	57,4	23,5	31,4	40,6
31	75,8	64,9	26,7	36,6	44,6
48	83,2	73,6	32,8	40,1	49,5



Graf 25: Disoluční profil NČ PLGA 50:50 připravené emulzní odpařovací metodou s rozdílným poměrem polymeru k lipidu

Nejpomaleji se kurkumin uvolňoval z formulací s poměrem polymeru k lipidu 2:1 a 5:1. To ukazuje na to, že se u těchto NČ vytvořila typická core-shell architektura částic s lipidovým obalem a polymerním jádrem. Lze se domnívat, že se kurkumin, jako látka ve vodě prakticky nerozpustná, bude enkapsulovat přednostně do polymeru, protože PLGA během přípravy nukleuje jako první a až poté je obklopena amfifilním lipidem. Pro potvrzení této core-shell architektury by bylo zapotřebí kryo-TEM mikroskopie, kterou jsme bohužel v čase řešení této práce nedisponovali. Lipidická korona bude zpomalovat difuzi léčiva z matrice, a proto formulace s výraznou korunou uvolňují léčivo pomaleji. Formulace s poměrem 1:1 zřejmě vytvořila něco jako směsnou matici, která neměla typickou core-shell architekturu, a proto docházelo k uvolňování kurkuminu bez zpomalujícího efektu viditelného u výše popsanych formulací. Z PLGA NČ se léčivo uvolňuje nejrychleji s ohledem na naprostou absenci lipidu a ničím neomezený přístup molekul vody k polymerní matici bohaté na kurkumin.

ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na využití hybridních polymerních-lipidických nanočástic jako nosičů léčiv ve zdravotnictví, jejich vlastnosti důležité pro přípravu a aplikaci a metody přípravy.

V rámci experimentální části byly připraveny nanočástice emulzní odpařovací metodou a nanoprecipitací. Byl sledován vliv lipidické části na velikost nanočástic a zeta potenciál. U emulzní odpařovací metody byly upraveny podmínky přípravy – rozdělení vodné fáze a chlazení v ledové lázni během sonifikace, kde se také pozoroval vliv na velikost a zeta potenciál. Dalšími zkouškami byly enkapsulační efektivita a disoluce, které poskytovaly údaje o enkapsulaci a uvolňování účinné látky z nanočástic.

Nanočástice připravené emulzní odpařovací metodou dosahovaly optimálních hodnot velikostí a polydisperzity a byly stabilnější z hlediska zeta potenciálu, než tomu bylo v případě nanoprecipitace. Se zvyšujícím se množstvím lipidické části se velikost nanočástic snižovala a zvyšoval se zeta potenciál. Nejlepší výsledky velikosti a zeta potenciálu byly zjištěny u metody s rozdělením vodné fáze na dvě alikvotní části během sonifikace. Vliv chlazení pomocí ledové lázně se nepodařilo prokázat. Vyšší enkapsulační efektivita a disoluce byly prokázány u vzorků s menším zastoupením lipidické části. Tloušťka lipidické korony na povrchu nanočástic je řídicím mechanismem pro rychlost uvolňování léčiva, proto probíhala disoluce pomaleji z formulací s vyšším zastoupením lipidu.

Připravené nanočástice vznikly jako součást širší problematiky cílené distribuce léčiv. Jejich vlastnosti jsou vhodné pro distribuci do buněk mononukleárně fagocytického systému a efekt takto enkapsulovaného kurkuminu může být využit v léčbě některých zánětlivých nebo autoimunitních onemocnění.

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

Obrázky

Obrázek 1: Struktura HPLN (11).....	11
Obrázek 2: Modifikace povrchu NČ (15).....	13
Obrázek 3: Princip vzniku ZP (22)	15
Obrázek 4: Souhrn metod přípravy NČ.....	17
Obrázek 5: Nanoprecipitační metoda (2)	18
Obrázek 6: Emulzní odpařovací metoda (29).....	19
Obrázek 7: Vysolování (31).....	19
Obrázek 8: Miniemulzní metoda (18).....	21

Tabulky

Tabulka 1: Poměr polymerní části k lipidické v organické fázi	27
Tabulka 2: Souhrn složení NČ.....	28
Tabulka 3: Velikost připravených NČ a jejich PDI u PLGA 50:50.....	34
Tabulka 4: Velikost připravených NČ a jejich PDI u PLGA 70:30.....	35
Tabulka 5: Hodnoty ZP připravených NČ.....	41
Tabulka 6: Velikost a PDI NČ připravených metodou 1	46
Tabulka 7: Velikost a PDI NČ připravených metodou 2	46
Tabulka 8: Velikost a PDI NČ připravených metodou 3	47
Tabulka 9: ZP NČ připravených metodou 1.....	51
Tabulka 10: ZP NČ připravených metodou 2.....	52
Tabulka 11: ZP NČ připravených metodou 3.....	52
Tabulka 12: Hodnoty EE, DL a RY	56
Tabulka 13: Disoluce PLGA 50:50 v EtAc s 1% roztokem F127	57

Grafy

Graf 1: Kalibrační přímka kurkuminu v acetonu při 420 nm.....	31
Graf 2: Kalibrační přímka kurkuminu v 1% vodném roztoku polysorbátu 20 měřená při 425 nm.....	33
Graf 3: Porovnání hodnot velikosti NČ připravených nanoprecipitací a emulzní odpařovací metodou u PLGA 50:50 s 0,1% roztokem F127.....	36
Graf 4: Porovnání hodnot PDI NČ připravených nanoprecipitací a emulzní odpařovací metodou u PLGA 50:50 s 0,1% roztokem F127.....	36
Graf 5: Porovnání hodnot velikosti NČ připravených nanoprecipitací a emulzní odpařovací metodou u PLGA 50:50 s 0,5% roztokem F127.....	37
Graf 6: Porovnání hodnot PDI NČ připravených nanoprecipitací a emulzní odpařovací metodou u PLGA 50:50 s 0,5% roztokem F127.....	37
Graf 7: Porovnání hodnot velikosti NČ připravených nanoprecipitací a emulzní odpařovací metodou u PLGA 70:30 s 0,1% roztokem F127.....	38
Graf 8: Porovnání hodnot PDI NČ připravených nanoprecipitací a emulzní odpařovací metodou u PLGA 70:30 s 0,1% roztokem F127.....	38
Graf 9: Porovnání hodnot velikosti NČ připravených nanoprecipitací a emulzní odpařovací metodou u PLGA 70:30 s 0,5% roztokem F127.....	39
Graf 10: Porovnání hodnot PDI NČ připravených nanoprecipitací a emulzní odpařovací metodou u PLGA 70:30 s 0,5% roztokem F127.....	39
Graf 11: Porovnání hodnot ZP NČ připravených nanoprecipitací a emulzní odpařovací metodou u PLGA 50:50 s 0,1% roztokem F127.....	42
Graf 12: Porovnání hodnot ZP NČ připravených nanoprecipitací a emulzní odpařovací metodou u PLGA 50:50 s 0,5% roztokem F127.....	43
Graf 13: Porovnání hodnot ZP NČ připravených nanoprecipitací a emulzní odpařovací metodou u PLGA 70:30 s 0,1% roztokem F127.....	44
Graf 14: Porovnání hodnot ZP NČ připravených nanoprecipitací a emulzní odpařovací metodou u PLGA 70:30 s 0,5% roztokem F127.....	44
Graf 15: Porovnání hodnot velikostí NČ při změně podmínek u PLGA 50:50 s 0,1% roztokem F127.....	48
Graf 16: Porovnání hodnot PDI NČ při změně podmínek u PLGA 50:50 s 0,1% roztokem F127.....	48

Graf 17: Porovnání hodnot velikostí NČ při změně podmínek u PLGA 50:50 s 0,5% roztokem F127.....	49
Graf 18: Porovnání hodnot PDI NČ při změně podmínek u PLGA 50:50 s 0,5% roztokem F127	49
Graf 19: Porovnání hodnot velikostí NČ při změně podmínek u PLGA 50:50 s 1% roztokem F127	50
Graf 20: Porovnání hodnot PDI NČ při změně podmínek u PLGA 50:50 s 1% roztokem F127	50
Graf 21: Porovnání hodnot ZP při změně podmínek u PLGA 50:50 s 0,1% roztokem F127..	53
Graf 22: Porovnání hodnot ZP při změně podmínek u PLGA 50:50 s 0,5% roztokem F127..	53
Graf 23: Porovnání hodnot ZP při změně podmínek u PLGA 50:50 s 1% roztokem F127.....	54
Graf 24: Porovnání hodnot EE.....	56
Graf 25: Disoluční profil NČ PLGA 50:50 připravené emulzní odpařovací metodou s rozdílným poměrem polymeru k lipidu	58

POUŽITÁ LITERATURA

1. GOVENDER, T., S. STOLNIK, M. C. GARNETT, L. ILLUM a S. S. DAVIS. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: Drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of Controlled Release* [online]. 1999, **57**(2), 171–185 [cit. 2020-03-22]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-3659(98)00116-3
2. MUKHERJEE, A., A. K. WATERS, P. KALYAN, A. S. ACHROL, S. KESARI a V. M. YENUGONDA. Lipid–polymer hybrid nanoparticles as a next-generation drug delivery platform: state of the art, emerging technologies, and perspectives. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2019, **14**, 1937–1952 [cit. 2020-03-22]. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S198353
3. JOSE, C., K. AMRA, CH. BHAVSAR, M. MOMIN a A. OMRI. Polymeric lipid hybrid nanoparticles: Properties and therapeutic applications. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* [online]. 2018, **35**(6), 555–588 [cit. 2020-03-22]. ISSN 2162660X. Dostupné z: doi:10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2018024751
4. CHOUDHURY, H., B. GORAIN, M. PANDEY, R. K. KHURANA a P. KESHARWANI. Strategizing biodegradable polymeric nanoparticles to cross the biological barriers for cancer targeting. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2019, **565**, 509–522 [cit. 2020-03-23]. ISSN 18733476. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2019.05.042
5. KOSEVA, N. S., J. RYDZ, E. V. STOYANOVA a V. A. MITOVA. Hybrid protein-synthetic polymer nanoparticles for drug delivery. *Advances in protein chemistry and structural biology* [online]. 2015, **98**, 93–119 [cit. 2020-03-23]. ISSN 18761623. Dostupné z: doi:10.1016/bs.apcsb.2014.12.003
6. TAMMAM, S. N., H. M.E. AZZAZY a A. LAMPRECHT. Biodegradable particulate carrier formulation and tuning for targeted drug delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology* [online]. 2015, **11**(4), 555–577 [cit. 2020-03-24]. ISSN 15507041. Dostupné z: doi:10.1166/jbn.2015.2017

7. MANDAL, B., H. BHATTACHARJEE, N. MITTAL, H. SAH, P. BALABATHULA, L. A. THOMA a G. C. WOOD. Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* [online]. 2013, **9**(4), 474–491 [cit. 2020-03-24]. ISSN 15499634. Dostupné z: doi:10.1016/j.nano.2012.11.010
8. DATE, T., V. NIMBALKAR, J. KAMAT, A. MITTAL, R. I. MAHATO a D. CHITKARA. Lipid-polymer hybrid nanocarriers for delivering cancer therapeutics. *Journal of Controlled Release* [online]. 2018, **271**, 60–73 [cit. 2020-03-27]. ISSN 18734995. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2017.12.016
9. WAKASKAR, R. R. General overview of lipid–polymer hybrid nanoparticles, dendrimers, micelles, liposomes, spongosomes and cubosomes. *Journal of Drug Targeting* [online]. 2018, **26**(4), 311–318 [cit. 2020-03-27]. ISSN 1061-186X. Dostupné z: doi:10.1080/1061186X.2017.1367006
10. BOSE, R. J.C., R. RAVIKUMAR, V. KARUPPAGOUNDER, D. BENNET, S. RANGASAMY a R. A. THANDAVARAYAN. Lipid–polymer hybrid nanoparticle-mediated therapeutics delivery: advances and challenges. *Drug Discovery Today* [online]. 2017, **22**(8), 1258–1265 [cit. 2020-03-27]. ISSN 18785832. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2017.05.015
11. HADINOTO, K., A. SUNDARESAN a W. S. CHEOW. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2013, **85**(3), 427–443 [cit. 2020-03-27]. ISSN 18733441. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2013.07.002
12. KUMARI, A., S. K. YADAV a S. C. YADAV. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2010, **75**(1), 1–18 [cit. 2020-03-29]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.001
13. OWENS, D. E. a N. A. PEPPAS. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2006, **307**(1), 93–102 [cit. 2020-03-29]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2005.10.010

14. LEE, W. H., CH. Y. LOO, P. M. YOUNG, R. ROHANIZADEH a D. TRAINI. Curcumin Nanoparticles Attenuate Production of Pro-inflammatory Markers in Lipopolysaccharide-Induced Macrophages. *Pharmaceutical Research* [online]. 2016, **33**(2), 315–327 [cit. 2020-03-29]. ISSN 1573904X. Dostupné z: doi:10.1007/s11095-015-1789-9
15. CONDE, J., J. T. DIAS, V. GRAZÚ, M. MOROS, P. V. BAPTISTA a J. M. DE LA FUENTE. Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. *Frontiers in Chemistry* [online]. 2014, **2**, 48 [cit. 2020-05-6]. ISSN 22962646. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2014.00048
16. XIONG, X. Y., M. K.C. TAM a L. H. GAN. Release kinetics of hydrophobic and hydrophilic model drugs from pluronic F127/poly(lactic acid) nanoparticles. *Journal of Controlled Release* [online]. 2005, **103**(1), 73–82 [cit. 2020-04-02]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2004.11.018
17. HICKEY, J.W., J. L. SANTOS, J. M. WILLIFORD a H. Q. MAO. Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery. *Journal of Controlled Release* [online]. 2015, **219**, 536–547 [cit. 2020-04-02]. ISSN 18734995. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2015.10.006
18. RAO, J. P. a K. E. GECKELER. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science* [online]. 2011, **36**(7), 887–913 [cit. 2020-04-02]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001
19. ASTETE, C. E. a C. M. SABLIOV. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 2006, **17**(3), 247–289 [cit. 2020-04-05]. ISSN 15685624. Dostupné z: doi:10.1163/156856206775997322
20. MALVERN. Zetasizer Nano User Manual [online]. 2007 [cit. 2020-04-05]. Dostupné z: [https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern Zetasizer ZS DLS user manual.pdf](https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern_Zetasizer_ZS_DLS_user_manual.pdf)
21. SMITH, M. C., R. M. CRIST, J. D. CLOGSTON a S. E. MCNEIL. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2017, **409**(24), 5779–5787 [cit. 2020-04-05]. ISSN 16182650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-017-0527-z

22. Zeta potenciál zeta [online]. [cit. 2020-04-22]. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>
23. DAVE, V., K. TAK, A. SOHGAURA, A. GUPTA, V. SADHU a K. R. REDDY. Lipid-polymer hybrid nanoparticles: Synthesis strategies and biomedical applications. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2019, **160**, 130–142 [cit. 2020-04-08]. ISSN 18728359. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2019.03.017
24. HANS, M. L. a A. M. LOWMAN. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* [online]. 2002, **6**(4), 319–327 [cit. 2020-04-08]. ISSN 13590286. Dostupné z: doi:10.1016/S1359-0286(02)00117-1
25. BARICHELLO, J. M., M. MORISHITA, K. TAKAYAMA a T. NAGAI. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Development and Industrial Pharmacy* [online]. 1999, **25**(4), 471–476 [cit. 2020-04-08]. ISSN 03639045. Dostupné z: doi:10.1081/DDC-100102197
26. TYAGI, S. a V. K. PANDEY. Nanoparticles: An Overview of Preparation. *Research and Reviews: Journal of Pharmaceutics and Nanotechnology* [online]. 2016, **4**(2) [cit. 2020-04-11]. ISSN 2347-7849. Dostupné z: doi:10.7897/2230-8407.04408
27. BILATI, U., E. ALLÉMANN a E. DOELKER. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2005, **24**(1), 67–75 [cit. 2020-04-11]. ISSN 09280987. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2004.09.011
28. QUINTANAR-GUERRERO, D., E. ALLÉMANN, H. FESSI a E. DOELKER. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy* [online]. 1998, **24**(12), 1113–1128 [cit. 2020-04-11]. ISSN 03639045. Dostupné z: doi:10.3109/03639049809108571
29. WANG, Y., P. LI, T. T. D. TRAN, J. ZHANG a L. KONG. Manufacturing techniques and surface engineering of polymer based nanoparticles for targeted drug delivery to cancer. *Nanomaterials* [online]. 2016, **6**(2), 26 [cit. 2020-04-12]. ISSN 20794991. Dostupné z: doi:10.3390/nano6020026

30. NAGAVARMA, B.V.N., K.S. H. YADAV, A. AYAZ, L.S. VASUDHA a H.G. SHIVAKUMAR. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- a review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* [online]. 2012, **5**(3), 16-23 [cit. 2020-04-12]. ISSN 0974-2441 Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Rafik_Karaman/post/Is_there_any_possible_way_to_obtain_different_nanostructures_except_hydrothermal_method/attachment/59d63b5979197b8077998665/AS:410309996105732@1474836934832/download/Nano+4.pdf
31. CRUCHO, C. I. C. a M. T. BARROS. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering C* [online]. 2017, **80**, 771–784 [cit. 2020-04-12]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2017.06.004
32. REIS, C. P., R. J. NEUFELD, A. J. RIBEIRO a F. VEIGA. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* [online]. 2006, **2**(1), 8–21 [cit. 2020-04-12]. ISSN 15499634. Dostupné z: doi:10.1016/j.nano.2005.12.003
33. JIA, Y., A. OMRI, L. KRISHNAN a M. J. MCCLUSKIE. Potential applications of nanoparticles in cancer immunotherapy. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* [online]. 2017, **13**(1), 63–74 [cit. 2020-04-15]. ISSN 2164554X. Dostupné z: doi:10.1080/21645515.2016.1245251
34. WANG, L., B. GRIFFEL a X. XU. Synthesis of PLGA–lipid hybrid nanoparticles for siRNA delivery using the emulsion method PLGA-PEG–lipid nanoparticles for siRNA delivery. *Methods in Molecular Biology* [online]. 2017, **1632**, 231–240 [cit. 2020-04-15]. ISSN 10643745. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-7138-1_15
35. YAO, C., M. WU, C. ZHANG, X. LIN, Z. WEI, Y. ZHENG, D. ZHANG, Z. ZHANG a X. LIU. Photoresponsive lipid-polymer hybrid nanoparticles for controlled doxorubicin release. *Nanotechnology* [online]. 2017, **28**(25). [cit. 2020-04-15]. ISSN 0957-4484. Dostupné z: doi:10.1088/1361-6528/AA702A
36. GRIGORAS, A. G. Polymer-lipid hybrid systems used as carriers for insulin delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* [online]. 2017, **13**(8), 2425–2437 [cit. 2020-04-20]. ISSN 15499642. Dostupné z: doi:10.1016/j.nano.2017.08.005

37. ZHAO, J., X. ZHANG, X. SUN, M. ZHAO, Ch. YU, R. J. LEE, F. SUN, Y. ZHOU, Y. LI a L. TENG. Dual-functional lipid polymeric hybrid pH-responsive nanoparticles decorated with cell penetrating peptide and folate for therapy against rheumatoid arthritis. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2018, **130**, 39–47 [cit. 2020-04-21]. ISSN 18733441. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2018.06.020
38. HALLAN, S. S., V. KAUR, V. JAIN a N. MISHRA. Development and characterization of polymer lipid hybrid nanoparticles for oral delivery of LMWH. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* [online]. 2017, **45**(8), 1631–1639 [cit. 2020-04-22]. ISSN 2169-1401. Dostupné z: doi:10.1080/21691401.2016.1276920
39. ZHANG, R. X., T. AHMED, L. Y. LI, J. LI, A. Z. ABBASI a X. Y. WU. Design of nanocarriers for nanoscale drug delivery to enhance cancer treatment using hybrid polymer and lipid building blocks. *Nanoscale* [online]. 2017, **9**(4), 1334–1355 [cit. 2020-04-22]. ISSN 20403372. Dostupné z: doi:10.1039/c6nr08486a
40. SNEJDROVA, E., S. PODZIMEK, J. MARTISKA, O. HOLAS a M. DITTRICH. Branched PLGA derivatives with tailored drug delivery properties. *Acta Pharmaceutica* [online]. 2020, **70**(1), 63–75 [cit. 2020-04-25]. ISSN 18469558. Dostupné z: doi:10.2478/acph-2020-0011
41. SARKAR, P., S. BHATTACHARYA a T. K. PAL. Application of statistical design to evaluate critical process parameters and optimize formulation technique of polymeric nanoparticles. *Royal Society Open Science* [online]. 2019, **6**(7). [cit. 2020-03-28] ISSN 20545703. Dostupné z: doi:10.1098/rsos.190896
42. NEL, A. E., L. MÄDLER, D. VELEGOL, T. XIA, E. M.V. HOEK, P. SOMASUNDARAN, F. KLAESSIG, V. CASTRANOVA a M. THOMPSON. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Materials* [online]. 2009, **8**(7), 543–557 [cit. 2020-05-10]. ISSN 14761122. Dostupné z: doi:10.1038/nmat2442