

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Příprava PLGA nanočástic s oximovými reaktivátory

Vedoucí diplomové práce:

PharmDr. Šnejdřová Eva, Ph.D.

Hradec Králové 2020

Mimoza Veliu

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

V Hradci Králové 15. 5. 2021

Veliu Mimoza

Poděkování

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování PharmDr. Evě Šnejdrové, Ph.D. za odborné vedení plné podpory, trpělivost, velmi podnětné konzultace a rady při zpracování mé práce, dále Mgr. Juraji Martiškovi za praktické poznámky k experimentální části, skvělý přístup a seznámení s přístrojovým vybavením.

1 ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická Fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické technologie

Školitel: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

Student: Mimoza Velu

Název diplomové práce: Příprava PLGA nanočástic s oximovými reaktivátory

V teoretické části je hlavní pozornost věnována polymerním nanočásticím (NČ) s targetingem do mozku. Jsou popisované vlastnosti léčiva a metody přípravy nanočástic s hydrofilním léčivem. Část je věnována fyzikálně-chemickým vlastnostem, které mají vliv na prostupnost těchto látek přes biologické bariéry na cílené místo. Jsou popisované polymery, které lze použít pro přípravu nanočástic s targetingem do mozku. Experimentální část byla věnována formulaci nanočástic. Nanočástice byly připravené metodou dvojité emulze. Metoda přípravy byla zvolena na základě rozpustnosti léčiva. V systému W/O/W olejová fáze je tvořena lineárním kopolymerem kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) a jeho derivátech větvených na polyakrylové kyselině (A2) nebo tripentaerythritol (T3). Poloxamer 407 a dimethyldidodecylammonium bromid (DDAB) byly zvoleny jako stabilizátory NČ. Byl studován vliv polymerů na velikost nanočástic. Byl studován vliv použitých polymerů a formulačních faktorů na velikost, polydisperzitu a stabilitu NČ. Koncentrace polymeru ve vnitřní fázi a jejich molární hmotnost měly zásadní vliv. Slibné výsledky přinesly nanočástice připravené metodou dvojité emulze z 1% roztoku PLGA 5:5, stabilizované 1% roztokem poloxameru 407. Překvapivě dobré výsledky měly i nanočástice připravené z větveného polymeru A2, stabilizované 0,01% roztokem DDAB.

Klíčová slova: targeting do mozku, HI-6, oximové reaktivátory, polymerní nanočástice, PLGA, zeta potenciál.

2 ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Consultant: PharmDr. Eva Šnejdrová Ph.D.

Student: Mimoza Velu

Title of Thesis: Preparation of oxim reactivators loaded PLGA nanoparticles

In theoretical part the main attention is paid to polymeric nanoparticles (NP) for brain targeting. The drug properties and methods of preparation of the nanoparticles with hydrophilic drugs are presented. The part is devoted to physico-chemical properties that affect the permeability of these substances across biological barriers to the target site. The polymers used for NP preparation for brain targeting are focused. The experimental part deals with the nanoparticle formulation. Nanoparticles were prepared by double emulsion method. The method of preparation was chosen based on the drug solubility. In the W/O/W system oil phase was formed by linear copolymers of poly(lactic-*co*-glycolic) acid (PLGA) and its derivatives branched on polyacrylic acid (A2) or tripentaerythritol (T3). Poloxamer 407 and dimethyldidodecylammonium bromide (DDAB) were chosen for NP stabilization. The effect of the polymers on particle size was studied. The effect the polymers used, and the formulation factors on the size, polydispersity and stability of NP were studied. The concentration of the polymers in the internal phase and their molar weight played a major role. Promising results were obtained by nanoparticles prepared by the double emulsion method from a 1% PLGA 5:5 solution, stabilized with a 1% solution of poloxamer 407. Nanoparticles prepared from a branched polymer A2, stabilized by a 0.01% DDAB solution, also had surprisingly good results.

Key words: brain targeting, HI-6, oxime reactivators, polymeric nanoparticles, PLGA, zeta potential.

3 OBSAH

1	Abstrakt	4
2	Abstract	5
3	Obsah.....	6
4	Zadání.....	8
5	Seznam použitých zkratek.....	9
6	Úvod.....	10
7	Teoretická část.....	11
7.1	Oximové reaktivátory, charakteristika léčiva.....	11
7.2	Vstup látek do CNS	13
7.2.1	Nanočástice pro targeting do mozku.....	13
7.3	Polymery pro formulaci nanočástic	15
7.3.1	Syntetické polymery pro transport léčiv do CNS.....	15
7.3.2	Přírodní polymery pro transport léčiv do CNS	18
7.4	Fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic pro targeting do mozku	19
7.4.1	Velikost	19
7.4.2	Tvar	20
7.4.3	Elasticita	20
7.4.4	Povrchový náboj.....	20
7.4.5	Hydrofobicita	21
7.5	Rozpustnost, disoluce a profil uvolňování léčiva.....	21
7.6	Stabilizace polymerních nanočástic.....	22
7.7	Léčiva pro targeting do CNS	22
7.7.1	Hydrofilní léčiva pro targeting do CNS	Chyba! Záložka není definována.
7.7.2	Metody přípravy nanočástic s hydrofilním léčivem.....	23
7.8	Formulace nanočástic s oximovými reaktivátory	25

8	Experimentální část.....	29
8.1	Seznam přístrojů.....	29
8.2	Materiál.....	29
8.3	Metodika.....	30
8.3.1	Příprava nanočástic metodou dvojité emulze.....	30
8.3.2	Příprava částic nanoprecipitační metodou.....	32
8.3.3	Měření velikosti, polydisperzity a zeta potenciálu nanočástic.....	34
9	Výsledky.....	35
10	Diskuze.....	51
10.1	Vliv polymeru.....	51
10.2	Vliv stabilizátoru.....	53
10.3	Vliv vnitřní fáze W1.....	57
10.4	Stabilita NČ.....	60
11	Závěr.....	61
12	Použitá Literatura.....	62

4 ZADÁNÍ

Zadáním diplomové práce bylo připravit nanočástice cílené do mozku a charakterizovat je pomocí velikosti, polydisperzity a zeta potenciálu.

Zadání diplomové práce je možné specifikovat do následujících bodů:

- Vhodnou metodou připravit nanočástice o velikosti menší než 200 nm za použití dvou lineárních PLGA s různým poměrem mléčné a glykolové kyseliny, a dvou PLGA větvených na tripentaerythritolu nebo kyselině polyakrylové.
- Optimalizovat parametry metody přípravy a vyhodnotit vliv těchto modifikací na charakteristiky nanočástic. Mezi modifikace patří změna koncentrace polymerů, množství léčiva, pH vnější fáze, změna stabilizátorů a jejich koncentrace.
- Charakterizovat připravené částice jejich velikostí, polydisperzitou a zeta potenciálem.
- Sledovat stabilitu částic po určitém čase od přípravy.

5 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A2	- Terpolymer kyseliny D,L-mléčné a glykolové větvený na polyakrylátu
AchE	- Acetylcholinesteráza
AP	- Čištěná voda
BSA	- Bovine serum albumin – Hovězí sérový albumin
CNS	- Centrální nervový systém
CTAB	- Cetyltrimethylammonium bromid
DDAB	- Didodecyldimethylamonium bromid
DMSO	- Dimethylsulfoxid
FDA	- Food and Drug Administration - Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
g'	- Stupeň větvení PLGA
GIT	- Gastrointestinální trakt
HEB	- Hematoencefalická bariéra
HSA	- Human serum albumin
M_n	- Číselně střední molární hmotnost (g/mol)
M_w	- Hmotnostně střední molární hmotnost (g/mol)
NČ	- Nanočástice
NP	- Nanoparticles
PACA	- Polyakryl-kyanoakrylát
PBCA	- Poly-butylcyanoacryláty
PCL	- Poly- ϵ -kaprolakton
PEG	- Poly-ethylenglykol
PEI	- Poly-ethyleniminy
PGA	- Polyglykolid
PHA	- Polyhydroxyalkanoáty
PLA	- Polylaktid
PLGA	- Kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny glykolové
P. 407	- Poloxamer 407
SOP	- Standard operation procedure – Standardní provozní postup
T3	- Terpolymer kyseliny mléčné a glykolové větvený na tripentaerythritolu

6 ÚVOD

Oblast nanotechnologie je jednou z možností pro formulaci částic s řízenými parametry.¹ Nanotechnologie se zabývá vytvářením a využíváním materiálů, zařízení a systémů prostřednictvím kontroly hmoty v měřítku řádově nanometru.² Aplikací principů nanotechnologie v medicíně (věda o materiálech v řádově 10^{-9} - 10^{-7} m) se zabývá vědní obor označován jako nanofarmacie.³ Nanoskopická velikost těchto aplikačních systémů pomáhá při změně aspektů léku, včetně biologické dostupnosti, biologické distribuce a farmakokinetiky. Nanofarmacie je vědní obor slibující rozvoj vysoce účinných sloučenin, které mohou překonat biologické překážky. Zabývá se vývojem systémů cílených na postiženou tkáň, které dokážou sloužit jako inteligentní systémy pro distribuci léčiv, pro diagnostiku a léčbu konkrétních onemocnění.

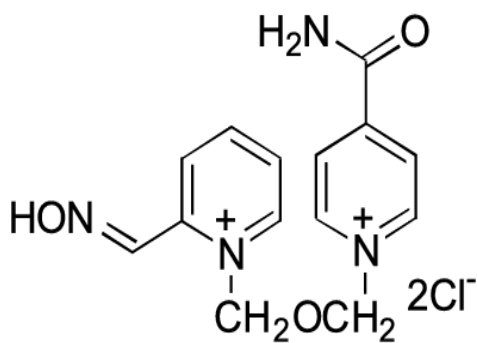
V rámci experimentu bude snaha formulovat nanočástice s hydrofilním léčivem metodou dvojité emulze. Konkrétně se jedná o přípravu PLGA nanočástic s oximovými reaktivátory. Pro distribuci těchto látek do mozkové tkáně je důležité překonat bariéru, která primárně chrání mozek před toxiny i jinými látkami působící škodlivě na danou tkáň. Mezi látky, které nemají schopnost překonat hematoencefalickou bariéru patří i některá léčiva, proto je snaha díky přípravě a modifikaci nanočástic danou bariéru zdotat.

7 TEORETICKÁ ČÁST

7.1 Oximové reaktivátory, charakteristika léčiva

Organofosfáty jsou sloučeniny ovlivňující cholinergní neurotransmisi. Patří mezi látky inhibující enzym acetylcholinesterázu (AChE), který degraduje neurotransmitter acetylcholin v neuronální synapsi.⁴ Organofosfáty vytvářejí akutní cholinergní krizi, která se projevuje muskarinovými, nikotinovými a centrálními příznaky. Obrázek 3 schematicky znázorňuje mechanismus inhibice acetylcholinesterázy a následně jeho reaktivaci.⁴

Obidoxim rovněž známý pod komerčním názvem Toxogonin patří mezi oximy, které se používají pro terapii otrav způsobených organofosfáty.⁵ Mechanismem účinku se jedná o reaktivátor cholinesterázy.⁶ HI – 6 (asoxim) byl navržen jako náhradní látka pro terapii.⁵ HI – 6 se používal bezpečně k léčbě otrav způsobených organofosfáty, stejně jako u dobrovolníků, ačkoli jeho účinnost proti otravě organofosfáty u dobrovolníků kvůli etice nemůže být prokázána. Provádí se zkoušky účinnosti na zvířatech.⁵ V současné době je k dispozici pro vojenské potřeby v Kanadě, Švédsku, USA a v České republice a je ve vývoji v řadě dalších zemí. HI – 6 prokázal, že je vynikajícím reaktivátorem enzymu inhibovaného nervovými látkami, také prokázal lepší ochranné účinky proti smrtelnosti většiny organofosfátů.⁵



HI-6

Registrační číslo CAS: 34433-31-3

Molární hmotnost: 359,2 g/mol

Bod tání: 145 až 147 °C

Sumární vzorec: C₁₄H₁₆Cl₂N₄O₃

Skladovací teplota: -20 °C

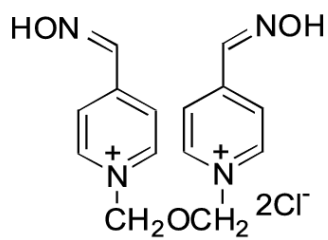
Rozpustnost: Velice dobře rozpustný ve vodě

Léková forma: prášek

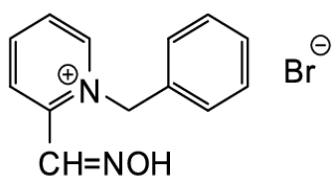
Stabilita: 1 až 10% vodný roztok

Barva: bílá až béžová

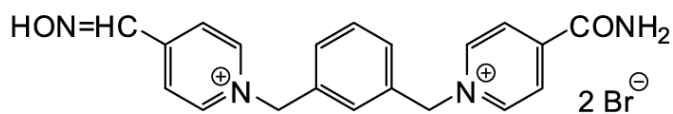
Obr.1 – Strukturní vzorec a charakteristika HI – 6⁷



Obidoxime

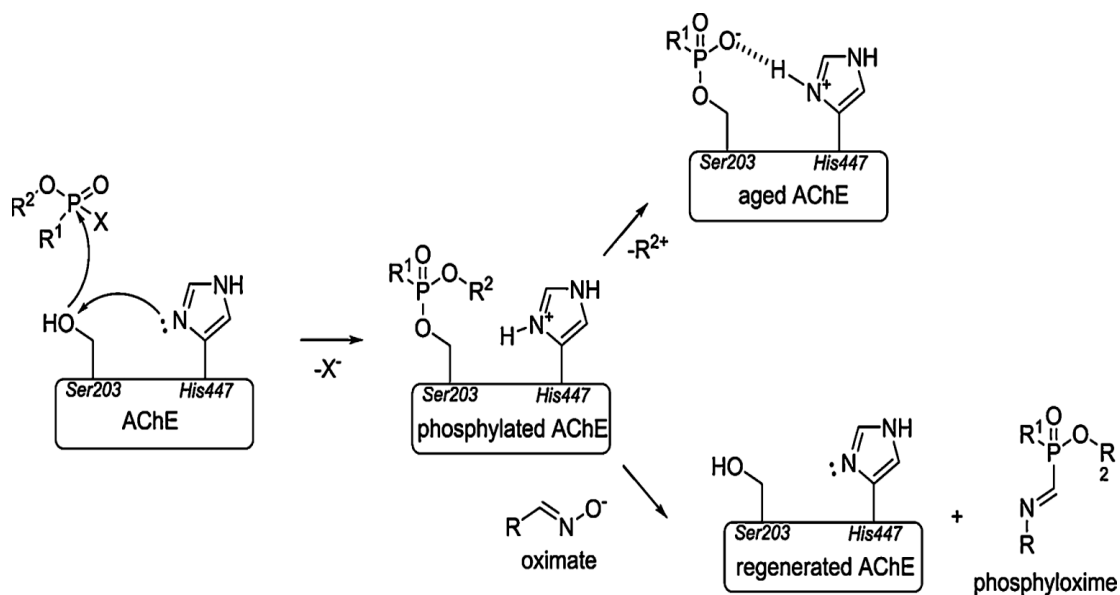


K347



K628

Obr. 2 - Chemická struktura oximů⁷



Obr. 3 - Mechanismus inhibice *AChE* a následně reaktivace enzymu oximem⁵

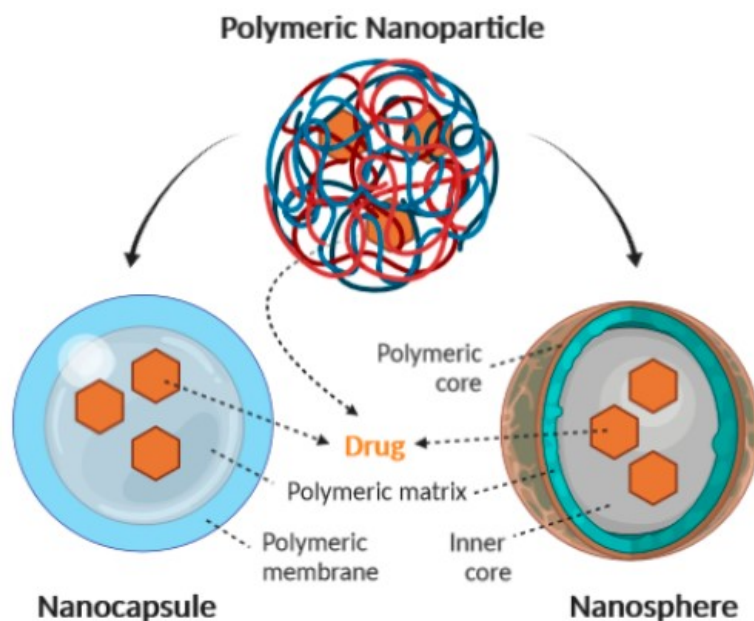
7.2 Vstup látek do CNS

Hematoencefalická bariéra patří mezi velice těžké zdatelné překážky a pro některé látky je nepřekonatelná.⁸ Z morfologického hlediska se hematoencefalická bariéra skládá ze specializovaných buněk, těsných výběžků astrocytů a kontinuálního endotelu kapilár s těsnými spoji.⁹ Hlavní funkcí je zajistit optimální prostředí pro správnou činnost neuronů, udržovat homeostázu mozku, regulovat přítok a odtok tekutin a ochraňovat mozek před patogeny. Jedinečnost spočívá v tom, že danými překážkami neprojdou polární látky, ionty a makromolekuly. Další ochranou bariérou, která má podobné charakteristiky jako hematoencefalická bariéra je hematolivorová bariéra. Průnik molekul je zde omezen těsnými mezibuněčnými spoji, které se nachází mezi buňkami ependymu choroidálního plexu.^{8,9} I když je CNS chráněn speciálními bariérami, z hlediska homeostázy je také důležité udržet určitou propustnost. Pro transport látek mezi hematoencefalickou bariérou a krví existuje několik transportních cest, které umožňují jejich influx a eflux.¹⁰ Tyto cesty umožňují transport látek přes hematoencefalickou bariéru pomocí difúze, mechanismem využívající transcytózu paracelulární a transcelulární, transcytózu zprostředkovanou transportními proteiny, receptorem zprostředkovanou transcytózu, adsorpčně zprostředkovanou transcytózu a buněčně zprostředkovanou transcytózu.¹⁰ Receptorem zprostředkovaná transcytóza je jeden z mechanismů umožňující selektivní absorpci různých makromolekul, které jsou příliš velké pro samovolnou difúzi, a také nejvíce využívaná cesta pro targeting.^{11,12} Pouze malé ve vodě rozpustné molekuly se mohou transportovat paracelulárním prostorem (molekulová hmotnost do 500).¹⁰ Látky, které se transportují pomocí difúze, musí splňovat několik podmínek. Pouze selektivní látky malé velikosti s požadovanou rozpustností v tucích, vysoké hydrofility a neionizované sloučeniny mohou překonat HEB pomocí difúze.¹³ Řada dalších léčiv pro překonání hematoencefalické bariéry a biomembrán využívá pro svůj transport aktivní targeting. Jedná se o transport proti koncentračnímu gradientu, který pro svou činnost potřebuje energii uvolněnou z ATP.⁸ Kromě vstupu může probíhat i opačný děj pomocí efluxní pumpy. Nejvíce zastoupenou efluxní pumpou je P-glykoprotein.¹³ Při zánětlivých onemocnění se schopnost ochrany HEB snižuje a látky mají větší možnost tuto bariéru překonat.⁸

7.2.1 Nanočástice pro targeting do mozku

Nanočástice bývají definované jako polymerní částice, anorganické nebo biomimetické částice o velikosti 1 až 1000 nm s inkorporovanou léčivou látkou. Tato definice se odchyľuje od fyzikální definice, dle které je horní hranice velikosti částic 100 nm.¹⁴ Termín nanočástice

zahrnuje nanotobolky i nanosféry, které se liší morfologií. Rozdíl mezi termínem nanotobolka (kapsule) a nanosféra prezentuje Obrázek 4.



Obr.4 - Schematické znázornění struktury nanotobolek a nanosfér¹⁵

Nanokapsle je tvořená jádrem, ve kterém je obvykle rozpuštěné léčivo, a polymerním obalem, membránou, který zároveň řídí uvolňování léčiva.¹⁵ Nanosféry jsou založeny na kontinuální polymerní síti, ve které může být léčivo zadrženo uvnitř nebo adsorbováno na povrchu.¹⁵ Nanočástice mají mnoho výhod. Mezi pozitiva těchto systémů patří lepší rozpustnost, ochrana léčiv před trávením nebo schopnost cílit na potřebné místo bez poškození zdravé tkáně.^{12, 16} Cílení léčiv do mozku pomocí nanočástic je ovlivněné několika klíčovými faktory. Jedním z nejdůležitějších faktorů je velikost částic. Jako optimální se uvádí velikost částic do 200 nm. Nanočástice, které mají menší velikost než 200 nm, mají větší šanci na efektivní překročení HEB.¹⁶ Pokud se při terapii cílí na nádorové buňky mozku, jako optimální se jeví velikost částic v rozmezí 7-100 nm. Částice o větší velikosti jsou limitované póry nádorových buněk a do těchto buněk nemohou vstupovat.¹⁶

Dalším důležitým faktorem, který ovlivní vstup látek do CNS je náboj NČ. Výhodu mají pozitivně nabitě nanočástice. Bylo zjištěno, že některé nanočástice s vysokým kladným zeta potenciálem procházejí hematoencefalickou bariérou pomocí adsorpční transcytózy, receptorem nebo transporterem zprostředkovanou transcytózou.¹⁷

7.3 Polymery pro formulaci nanočástic

Polymerní nanočástice (PNC) díky svým vhodným vlastnostem jako je biodegradace, biokompatibilita, jednoduchý design a strukturální variabilita představují potenciál pro cílené podávání léků.¹⁸ Polymerní nanočástice slouží v nanomedicině jako nosiče pro cílené podávání léčiv a zároveň k prodloužení uvolňování látek.¹⁸ Využívá se jejich obecné schopnosti zvyšovat stabilitu léčivých látek. Použití polymerních nanočástic umožňuje navrhnout individuální transportní systémy se specifickou aplikací. Specificky navrhované polymerní nanočástice mají schopnost dodávat větší množství léčiva do určitého místa. Toho se využívá při terapii nádorových onemocnění, aplikaci vakcín, nebo pro cílenou terapii antibiotiky.^{19, 20} Mezi metody modifikace polymerních nanočástic patří povrchová úprava, využití různých výrobních metod, výběr již existujících polymerů nebo kopolymerů a jejich formulace do nových polymerů.¹⁹ Hlavním požadavkem na polymerní nanočástice pro transport léčiv do mozku je rychlost biodegradability ne delší než několik dnů.¹⁴

Hlavní složkou při formulaci je polymer.²⁰ Pro přípravu PNC se používají přírodní polymery a syntetické polymery. Mezi polymerní biomateriály lze zahrnout i kombinaci těchto dvou typů.^{21, 22} Mezi důležité fyzikálně-chemické vlastnosti biologicky rozložitelných polymerů patří hydrofobnost, molekulová hmotnost, krystalinita, biologická rozložitelnost, povrchový náboj, složení kopolymeru a teplota skelného přechodu.^{22, 23} Pro úspěšné využití polymerních systému v medicíně a farmacii je důležité vzít v úvahu kromě jejich biokompatibility, biodegradability, také netoxický, neimunogenní a nekarcinogenní charakter.^{22, 23} Podle několika studií dokáží polymerní nanočástice s vysokou hustotou pozitivního náboje překročit HEB. Jako příklad kationtových polymerů lze uvést chitosan. Chitosan je přirozeně se vyskytující biologicky odbouratelný, biokompatibilní polysacharid, který má schopnost efektivně tvořit nanočástice. Podobně jako chitosan s polykationickým charakterem jsou polymery polyethyleniminy.²⁴

7.3.1 Syntetické polymery pro transport léčiv do CNS

Existuje velká škála syntetických polymerů pro přípravu nanočástic, které mají schopnost překonat biologické bariéry a následně sloužit jako nosiče léčiv pro targeting.²⁴ Polyestery z hlediska biokompatibility a biodegradability mají velký potenciál výhod. Monomery i jejich degradační produkty jsou eliminovány metabolickými cestami. Tyto polymery jsou v těle rozloženy bez schopnosti vyvolat zánět nebo imunitní odpověď.²² Pro klinické použití v medicíně a farmacii byly FDA schváleny kyselina polymléčná (PLA), kyselina polyglykolová (PGA) a kopolymer kyseliny glykolové a mléčné (PLGA).²²

Poly-butylcyanoacryláty

Částice připravené z poly-butylcyanoacrylátů (PBCA) byly první nanočástice pro transport léčiv do centrálního nervového systému. První nanočástice z PBCA sloužily jako nosiče pro dalargin, látku s opioidní aktivitou, stabilizované polysorbátem 80, aplikované intravenózně. Částice, které nebyly stabilizované polysorbátem 80, měly významně snížený průnik hematoencefalickou bariérou.²⁴

Polylaktid

Polylaktid (PLA) jako biokompatibilní a biologický rozložitelný polyester získaný z kyseliny mléčné je vhodný pro distribuci léčiv do mozku. Monomer kyseliny mléčné je bezpečný a přirozený meziprodukt pro metabolismus sacharidu.²⁵ Studie porovnávaly PLA s jinými biopolymery jako PHA, PEG, PCL, ve kterých PLA vykazoval lepší tepelnou účinnost, která umožňuje zpracování různými metodami. Byla prokázána nižší toxicita PLA oproti PBCA a díky úpravě povrchových vlastností vysoké vychytávání PLA mozkovými buňkami.^{23,25}

Polyglykolid

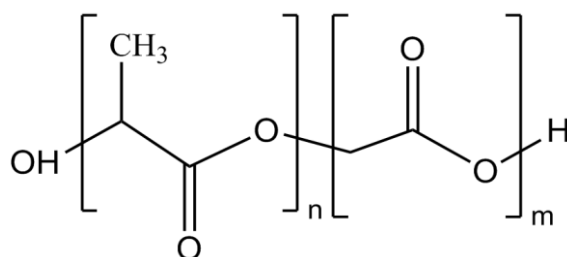
Polyglykolid (PGA) je strukturou podobný PLA, ale vykazuje odlišné vlastnosti. PGA je biodegradabilní polymer s dobrou mechanickou odolností a omezenou propustností pro plyny. Teplota tání PGA je 220 až 230 °C, je rozpustný pouze v hexafluoroisopropanolu. Díky svým hydrofilním vlastnostem je biodegradován hydrolytický. Jako polymer může být prospěšný doplněk PLA. Pro použití v medicíně je intenzivně studována inkorporace PGA do PLA. Nevýhodou PGA je jeho vyšší cena, která brání jeho použití ve srovnání s jinými biologicky odbouratelnými polymery.²⁶

Poly (laktid-ko-glykolid)

Poly(laktid-ko-glykolid) neboli kyselina poly(mléčná-ko-glykolová) (PLGA) je jedním z nejuniverzálnějších biomedicínských polymerů schválených regulačními orgány pro použití ve výzkumu a humánní medicíně.²⁷ PLGA získal pozornost díky svým modifikovatelným vlastnostem, kompletní biodegradabilitě a biokompatibilitě. Má dobře definované formulační techniky a snadné zpracování. V nanomedicíně lze PLGA používat pro transport léčiv, diagnostiku a k monitorování účinnosti terapie.²³

PLGA je kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny glykolové, jehož formy jsou obvykle charakterizovány poměrem těchto dvou monomerů (Obr. 5).²⁷ Různé komerčně dostupné PLGA zahrnující RESOMER[®] RG, DL-PLG a PDLG jsou dostupné v různém poměru monomerů, tj. 50:50, 65:35, 75:25, 85:15, které se liší fyzikálně-chemickými vlastnostmi.²³ Biodegradace probíhá hydrolyticky. Dochází ke štěpení dlouhých polymerních řetězců, zvýší se hydrofilita a následně jsou tyto fragmenty degradovány za vzniku kyseliny glykolové a mléčné. Kyselina glykolová a mléčná jsou vylučovány z těla běžnými metabolickými cestami.²³ Molekulová hmotnost kopolymeru výrazně ovlivňuje fyzikální i chemické vlastnosti PLGA. Pro targeting léčiv se využívá molekulová hmotnost v rozmezí 5000 až 150 000.²³

Metody pro přípravu nanočástic z PLGA zahrnují nanoprecipitační metodu, emulzní difúzní metodu, a metodu dvojité emulze. Každá technika má své vlastní klady a zápory, ale základní volba metody přípravy závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech léčiva, možných interakcích léčiva s polymerem, organickými rozpouštědly, povrchově aktivními látky a finálnímu použití nanosystému.²³



Obr.5 – Struktura PLGA, kde n je počet jednotek kyseliny mléčné a m je počet jednotek kyseliny glykolové²⁸

Polykaprolakton

Polykaprolakton (PCL) je biologický rozložitelný polyester, který se používá ke zvýšení flexibility různých materiálů, jako je například PLA. Protože PCL je rozložen v těle po delší době než PLA, spočívá jeho výhoda ve výrobě nanočástic, u kterých požadujeme prolongované uvolňování léčiva²²

Polyakryl-kyanoakrylát

Nanočástice připravené z PACA zlepšily vlastnosti léčiv, umožnily snížit dávkování a snížit frekvenci vedlejších účinků. Mezi výhody nanočástic z PACA patří lepší biologická dostupnost léčiva a neinvazivní způsob aplikace. PACA se používá pro transport doxorubicinu, methotrexátu, loperamidu, tubokurarinu, dalarginu a NMDA antagonistů do CNS. Mezi výhody nanočástic připravené z PACA patří jejich schopnost překonat lékovou polyrezistenci. Zařazují se mezi vhodné transportní systémy pro léčbu nádorových onemocnění.²²

7.3.2 Přírodní polymery pro transport léčiv do CNS

Přírodní polymery mají své výhody i nevýhody. Jsou biokompatibilní, biodegradabilní, netoxické, lépe tolerované. Z ekologického hlediska pocházejí z obnovitelných zdrojů a většinou jsou dostupné a levné. Mezi přírodní polymery, které se využívají pro transport léčiv do mozku patří HSA, želatina, chitosan.^{22, 29} Nevýhodou přírodních polymerů je odlišnost v kvalitě jednotlivých šarží způsobená původem, klimatickými podmínkami a dalšími vlivy, které lze velice těžce standardizovat. Chemické složení se tedy může lišit.²⁹ Dochází také k jejich snadné mikrobiální kontaminaci. Přírodní polymery pro lepší vlastností mohou být předem technologicky upravené.²⁹

Lidský sérový albumin

Ve vodě rozpustný a nízkomolekulární sérový protein, který je vysoce koncentrovaný a v krvi dlouho cirkuluje, představuje pozoruhodný nosič protinádorových látek.³⁰ Mezi primární funkce HSA patří schopnost zvýšit rozpustnost mastných kyselin s dlouhými řetězci, zajistit transport různých iontů a sloučenin, jako jsou například léky a hormony. Kromě toho HSA má schopnost regulovat osmotický tlak v krevním oběhu.^{22,30} Strategie pro dodání léčiva využívající HSA lze klasifikovat na exogenní nebo *in situ* vazebné formulace, využívající kovalentní připojení, nekovalentní nebo zapouzdření do albuminových nanočástic. Tyto metody přípravy ukázaly pozoruhodné preklinické a klinické úspěchy.³⁰

Chitosan

Chitosan je ve vodě rozpustný kationtový polysacharid, je biokompatibilní a biologicky rozložitelný přírodní polymer. Pro své nealergické a netoxické vlastnosti je vhodný kandidát pro přípravu nanočástic.²² Dokáže interagovat s těsnými spoji epiteliálních buněk, následně otevřením těchto spojů dokáže překonat epiteliální bariéry.²²

Želatina

Z hlediska biokompatibility, biodegradability a nízké cenové dostupnosti má želatina širokou škálu využití ve farmacii včetně formulace NČ.³¹ Ve své struktuře obsahuje řadu dostupných aktivních skupin pro navázání molekul léčiva. Jedná se o čištěnou bílkovinu získávanou hydrolyzou živočišného kolagenu.²⁹ Hydrolyzou vznikají produkty mající nižší molekulovou hmotnost, které mohou být gelující nebo negelující. Gelující želatina ve studené vodě bobtná a následně zahřátím dojde ke vzniku koloidního roztoku, který ochlazením vytvoří gel.²⁹ Negelující želatina je dobře rozpustná ve studené vodě, tak i v teplé vodě a z velké části nerozpustná v organických rozpouštědlech. Mezi důležité vlastnosti patří hodnota izoelektrického bodu, a to z důvodu možných inkompatibilit s jinými látkami.²⁹ Želatina se široce využívá pro dodání hydrofilních i hydrofobních protinádorových léčiv jako methotrexát, cytarabin, paklitaxel, doxorubicin, kamptotecin, cis-platinu a jiné. Velkou výhodou pro targeting léčiv do CNS je nízká toxicita, relativně dobrá cena, jednoduchá a reprodukovatelná produkce.³¹

7.4 Fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic pro targeting do mozku

Formulace částic je ovlivněná fyzikálně-chemickými vlastnosti včetně velikosti, tvaru, hydrofobicity, elasticity a povrchovými vlastnostmi. Fyzikálně chemické vlastnosti nanočástic ovlivňují jejich účinky. Komplexní chování nanočástic *in vivo* ovlivňují biologické faktory a vlastnosti nanočástic. Fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic ovlivňují také stabilitu částic v krvi, v mozkomíšním moku, jejich clearance, kontakt s cílovou buňkou a penetraci nanočástic.^{32, 33}

7.4.1 Velikost

Systémově aplikované nanočástice kromě cílových orgánů se dostávají i do orgánů s větším přítokem krve.³² Proto je důležité navrhnout takové nanočástice, aby se vyhnuly orgánům jako jsou játra, plíce, slezina a ledviny a efektivně dosáhnout účinku v cílové tkáni.³² Z toho vyplývá, že velikost je jeden z důležitých parametrů částic. Velikost ovlivňuje absorpci, distribuci a

clearance nanočástic.³³ Díky tomu velikost společně s morfologií charakterizují částice.³⁴ Velikost nanočástic má zásadní vliv na uvolňování léčiva. Menší nanočástice mají větší povrch, což má za následek rychlejší uvolňování léčiva. Velikost částic ovlivňuje rovněž biodegradaci. Bylo zjištěno, že rychlost degradace PLGA *in vitro* se zvyšuje se zvyšující se velikostí nanočástic.³² Částice menší než 5 nm se mohou snadno eliminovat z cílových tkání a vyloučit ledvinami. Nanočástice větší než 100 nm jsou obvykle z oběhu odstraněny fagocytujícími buňkami.³⁵ PLGA-PEG nanočástice o velikosti 100 nm vykazovaly hlubší průnik do mozku a delší cirkulaci v porovnání s částicemi o velikosti 200 až 800 nm.³³

7.4.2 Tvar

Tvar částic se řadí mezi důležité faktory ovlivňující chování nanosystému v těle.^{32, 33} Tvar je důležitý pro distribuci, cirkulaci, stabilitu, buněčnou absorpci a targeting. Tvar ovlivňuje schopnost přilnout ke stěnám cév, schopnost difúze a interakce s buňkami. Optimální jsou částice sférické a nejnižší buněčnou absorpci měly duté částice.³³ Zajímavé jsou nanokrystaly (osmistěn, dvacetistěn) a další tvary částic, které by mohly být aplikované pro terapeutické účely. Tvar částic lze ovlivnit metodou přípravy „top-down“ nebo „bottom-up“.³²

7.4.3 Elasticita

Flexibilita a elasticita nanočástic přispívá k procesům fagocytózy a endocytózy. Elastičtější NČ vykazovaly delší cirkulaci a vyšší orgánové ukládání. Studie potvrdily, že elasticita částic významně mění vychytávání NČ buňkami, jejich cirkulaci, schopnost cílení a distribuci. Na tento parametr je důležité dbát při vyhodnocování schopnosti nanočástic pronikat HEB.³³

7.4.4 Povrchový náboj

Povrchový náboj může být negativní nebo pozitivní, a to na základě použitého polymeru a metody přípravy. Patří mezi důležité faktory ovlivňující funkci NČ.³⁶ Povrchový náboj a další fyzikální-chemické vlastnosti charakterizující nanočástice ovlivňují fyzikální stabilitu, redispergovatelnost a také jejich účinek *in vivo*. Náboj lze detekovat za použití elektronového mikroskopu.³⁴ Nanočástice mají určitý povrchový náboj, který lze skrývat koncentrací opačného náboje a tato vrstva se pohybuje spolu s nanočásticemi. Tyto dvě vrstvy náboje kolem nanočástice jsou označovány jako elektrická dvojvrstva.³⁷ Ideální nosič pro překonání HEB má hodnotu zeta potenciálu ~35 mV.³⁸

Povrchový náboj a jeho intenzita určují interakce nanočástic s biologickým prostředím i elektrostatickou interakci s bioaktivními sloučeninami. Stabilita koloidního materiálu je

obvykle analyzována prostřednictvím zeta potenciálu nanočástic.³⁴ Jedná se o nepřímé měřítko povrchového náboje. Měření zeta potenciálu probíhá za použití elektrod ze zlata. Povrchový náboj ovlivňuje biologické vlastnosti, mezi které patří rozpustnost, clearance, biodistribuce, stabilita, buněčná absorpce, tkáňová difúze a cytotoxicita.³³ Buňky mají negativně nabitou buněčnou membránu, díky tomu snadněji interagují s kladně nabitými částicemi. Vstup negativně nabitých částic do CNS limituje hematoencefalická bariéra mozku.³³ Přítomnost glykoproteinů a glykolipidů vytváří negativní náboj HEB a tím působí na negativně nabitě částice elektrostatickým odrazem. Pro vstup musí tyto částice využít transportéry nebo receptorem zprostředkovanou endocytózu.³³

7.4.5 Hydrofobicita

Hydrofobicita hraje klíčovou roli v různých biologických procesech, jako je adsorpce proteiny, buněčný uptake a imunitní odpověď. Obecně se hydrofobní nanočástice adsorbují na povrch proteinu více než částice hydrofilní.³³ Tím může dojít k aglomeraci a opsonizaci vedoucí ke kratší systémové cirkulaci v porovnání s hydrofilními nanočásticemi.³³

K charakterizaci hydrofobicity nanočástic je v současné době k dispozici jen několik metod. Dané metody jsou limitované typem nanočástic, cenou a časovou náročností. K překonání limitů, pro měření hydrofobicity, lze danou vlastnost kvantitativně charakterizovat měřením afinity nanočástic k specifickým povrchům. Afinita nanočástic vůči substrátům různé hydrofobicity umožnila přímou charakterizaci NČ, které neměly známou hydrofobicitu a povrchové vlastnosti.³³

7.5 Rozpustnost, disoluce a profil uvolňování léčiva

Účinnosti nosičů nezávisí pouze na terapeutické komponentě, ale také na rozpustnosti a difúzi. Pokud dokážeme kontrolovat velikost částic, lze ovlivnit rychlost uvolňování léčiva.³³ Mechanismy uvolňování léčivé látky z polymerního nosiče jsou stejně důležité jako inkorporace látky do polymeru. Obecně platí, že čím menší velikost částic, tím je větší plocha povrchu, tzn. větší množství léčiva bude na povrchu částic, dojde k rychlejšímu uvolňování. Naproti tomu částice větší velikosti mají větší jádro, více místa pro zapouzdření léčiva. Větší množství zapouzdřeného léčiva poskytuje dlouhodobější uvolňování.³¹ Řízené uvolňování z polymerních nanočástic kromě velikosti lze dosáhnout také rychlosti biodegradace použitého polymeru.³⁹ Existuje pět možných metod pro uvolňování léčiva: desorpce léčiva vázaného na povrch, difúze přes matici nanočástic, difúze skrz polymerní stěnu nanotobolek, erozi nebo

kombinovaný proces eroze – difúze.⁴⁰ Uvolňování léčiva z nosiče také závisí na pH, teplotě, bobtnání a erozi, typu používaných polymerů, metody přípravy a interakci nanočástic s biologickým systémem. Navíc iontové interakce mezi léčivem a polymerním nosičem mohou zpomalit uvolňování léčiva až inhibovat jeho uvolňování.³³

7.6 Stabilizace polymerních nanočástic

Nanočástice jako ostatní koloidní systémy je potřeba stabilizovat, aby nedošlo k fyzikální nebo chemické nestabilitě. Stabilita nanočástic ovlivňuje absorpci, cytotoxicitu, farmakokinetiku a distribuci. Pro omezení fyzikální nestability lze nanočástice stabilizovat sférický, elektrostatický, nebo kombinací těchto mechanismů současně.⁴¹ Sférická stabilizace je nejběžnější postup pro zvýšení stability nanočástic v systémovém oběhu.³³ Mechanismus sférické stabilizace spočívá v odpuzování částic pomocí sférických efektů, za použití neionických tenzidů, polymeru a kasein.⁴¹

Chemická nestabilita se projeví únikem léčivé látky ze systému nebo degradací polymeru. Nanočástice, které jsou připravené hydrolyticky degradovatelnými polymery, budou rozloženy ve vodném prostředí i při nízké teplotě. Bylo prokázáno, že chemická nestabilita a adsorpce nanočástic proteiny je minimalizována nebo není pozorována, pokud jsou částice potažené hydrofilní látkou, neutrálně povrchově aktivní látkou, nebo polymerem jako např. PEG nebo neiontovým trojblokovým kopolymerem poloxamer.³³ Ze studie vyplývá, že PEG-NČ zůstaly stabilnější při malých změnách iontů vápníků a pH mozkomíšního moku oproti jiným NČ.³³

7.7 Léčiva pro targeting do CNS

Dosud značné množství léčiv bylo transportováno ve formě nanočástic přes hematoencefalickou bariéru. Jedná se o léčiva využívaná v léčbě nádorových onemocnění, analgetika, kardiovaskulární léky, inhibitory proteáz a jiné (Tab. 1). Dalargin patří mezi léčiva, která nemají schopnost překonat HEB, poprvé byl do CNS transportován pomocí PBCA nanočástic.⁴² Kromě dalarginu byly do mozku transportovány i další léčivé látky nepřekračující HEB, jako loperamid, tubokurarin nebo doxorubicin.⁴²

7.7.1 Hydrofilní léčiva pro targeting do CNS

Tab.1: Léčiva pro targeting do CNS^{43, 44}

Název léčiva	Charakteristika (účinek)	Polymerní nosič
Doxorubicin	Protinádorový	PACA Chitosan PLGA PBCA
Gemcitabin	Protinádorový Antimetabolit, analog pyrimidinu	PACA PBCA
Kalcitonin	Antagonista parathormonu	PLGA
Vasopressin	Antidiuretický hormon	Chitosan
Methotrexát	Protinádorový	PBCA
Obidoxime	Reaktivátor acetylcholinesterázy	HSA
Rivastigmin	Inhibitor cholinesterázy	PBCA
Tubokurarin	Myorelaxans	PBCA

Hydrofilní látky zůstávají výzvou pro moderní medicínu. Z velké části se jedná o makromolekuly neschopné penetrace. Hydrofilní léčiva jsou také limitovaná nedostatečnou stabilitou vůči proteolytickým a hydrolytickým enzymům, krátkým biologickým poločasem a nízkou propustností přes bariéry.⁴⁴ Jelikož hydrofilní látky z velké části jsou protinádorová léčiva, mají toxické účinky pro zdravou tkáň a nevhodnou biodistribuci.⁴⁴

7.7.2 Metody přípravy nanočástic s hydrofilním léčivem

Příprava PLGA nanočástic pro enkapsulaci hydrofilního léčiva metodou dvojité emulze. Běžné používané techniky pro přípravu nanočástic, jsou nevhodné pro enkapsulaci hydrofilních látek z důvodu rychlého rozdělení léčiva do vnější vodné fáze.⁴⁵ Konkrétní metoda přípravy se volí podle rozpustnosti používaného léčiva a molekulární stability. Příprava nanočástic metodou dvojité emulze byla vyvinutá pro hydrofilní sloučeniny.⁴⁵ Hydrofilní látka se rozpustí ve vnitřní vodné fázi s následnou precipitací polymeru po odstranění ve vodě nerozpustného organického rozpouštědla.⁴⁵ Tato metoda trpí nízkou enkapsulací hydrofilních látek s nízkou molekulovou hmotností. Podle závěru studie vyplývá, že použitím částečně ve vodě rozpustné organické rozpouštědlo, byly získány nanočástice s nižší hodnotou PDI, větším množstvím zapouzdřeného léčiva a více biokompatibilních složek ve srovnání s běžnými metodami

přípravy NČ. Jako rozpouštědlo byl zvolen ethylacetát a hydrofilní léčivo pro přípravu NČ alendronát (bisfosfonát). Uvádí se, že částečně mísitelné rozpouštědlo s vodou, umožňuje rychlou difúzi přes vodní fázi a tvorbu menších částic. Velikost připravených částic byla přibližně 145 nm.⁴⁵

Nanočástice s obsahem doxorubicinu, byly připravené třemi metodami. Jako metoda přípravy byla zvolená emulzní, dvojitě emulzní metoda a metoda nanoprecipitační.⁴⁶ Příprava nanočástic technikou dvojitě emulze probíhala následujícími kroky. Jako polymer pro primární emulzi byl použit PLGA a jako stabilizátor Span 20 v roztoku ethylacetátu. Do roztoku polymeru v ethylacetátu se přidal roztok léčiva a celá směs po promíchání byla smísená s 1% roztokem polyvinylalkoholu obsahující Tween 20.⁴⁶ U všech technik přípravy byla změřená hodnota zeta potenciálu vyšší než ± 30 mV. Daná hodnota naznačuje vysokou stabilitu částicových systémů v důsledku účinného odpuzování elektrostatických částic.⁴⁶ Částice byly charakterizované i hodnotou PDI. PDI je bezrozměrná veličina, která charakterizuje stabilitu nanočástic. Jako kvalitní systémy u polymerních NČ lze uvést systémy s hodnotou polydisperzity nižší než 0,2. Pokud systémy vykazují vyšší hodnoty PDI může dojít k destabilizaci fáze.⁴⁷ Všemi třemi zvolenými technikami byly získány reprodukovatelné nanočástice, nejvyšší kvalitu dosáhly nanočástice připravené technikou emulzně difúzní. Z výsledků disolučních testů ale vyplývá, že uvolňování léčiva a terapeutická účinnost jsou neuspokojivé, je potřeba zdokonalit přípravu nanočástic PLGA s obsahem doxorubicinu pro jejich terapeutické použití.⁴⁷

Tab. 2: Velikost částic, PDI, zeta potenciál pro různé metody přípravy

Metoda přípravy	Velikost částic [nm]	PDI	Zeta potenciál [mV]
Emulzně difúzní	174 ± 6	0,039 ± 0,025	-40,1 ± 2,6
Nanoprecipitační	179 ± 8	0,050 ± 0,027	-31,6 ± 5,2
Dvojitě emulzní	199 ± 2	0,178 ± 0,012	-38,0 ± 1,5

Nanočástice s obsahem obidoximu byly připraveny metodou dvojitě emulze, vody/olej/vody (W/O/W). Pro přípravu daných částic jako nosič byl zvolen PLGA.⁴⁷ Bylo také studováno, zda pegylované PLGA nanočástice dokážou zvýšit transport molekuly HEB. Z připravených nanočástic bylo uvolněno 79,3 ± 4,2 % obidoximu a z PEG-b-PLGA bylo uvolněno 88,2 ± 4,4 %. Ze závěru vyplývá, že PEG-b-PLGA nanočástice jsou ideálním nosičem léčivé látky pro jejich nízkou toxicitu, málo nežádoucích účinků a dobrý profil uvolňování léčiva.⁴⁸

Tab. 3: Charakteristiky PLGA nanočástic s obidoximem

Metoda přípravy	Použitý polymer	Velikost částic [nm]	PDI	Zeta potenciál [mV]
Dvojitě emulze	PLGA	224,6 ± 5,37	0,067 ± 0,03	-16,7 ± 1,0

Nanočástice s léčivem HI-6 byly připravené desolvatací a následným zesítováním lidského sérového albuminu (HSA). Cílem této studie bylo připravit nanočástice v rozmezí velikosti 100 až 300 nm. Jeden z formulačních faktorů, který měl významný vliv na velikost vzniklých nanočástic, byla hodnota pH roztoku HSA. Vyšší hodnoty pH poskytovaly částice v rozmezí 150 až 280 nm.⁶

7.8 Formulace nanočástic s oximovými reaktivátory

Systém W/O/W

Systém W/O/W je modifikovaná původní metoda W/O. Násobná emulze se využívá pro léčiva s vysokou rozpustností ve vodě. Hlavním negativem přípravy částic metodou dvojitě emulze je malá afinita hydrofilních látek k polymeru limitující enkapsulaci léčiva.^{49, 50} Naproti tomu metoda jednoduché emulze je časově méně náročná a měla by poskytnout vyšší enkapsulaci léčiva, avšak danou metodu lze použít pro lipofilnější látky.⁵⁰ Metoda dvojitě emulze spočívá

ve vzniku primární emulze W/O, následuje zpracovávání primární emulze do vnější fáze za vzniku dvojité emulze. Olejová fáze tvoří bariéru proti úniku léčiva z vnitřní vodné fáze do vnější fáze.⁵⁰ Násobnou emulzi W/O/W lze využít pro přípravu PLGA nanočástic s hydrofilním i hydrofobním léčivem. PLGA se rozpustí v organické fázi, která se společně s povrchově aktivní látkou emulguje do vodné fáze.⁵¹ Hydrofobní léčiva lze přidat přímo do organické fáze, zatímco hydrofilní léčiva musí být emulgovaná do roztoku polymeru před tvorbou částic.⁵² Rozpouštědla pro vnitřní i vnější fázi by se částečně mělo mísit s vodou, co nejvíce rozpustit vybraný polymer a mít netoxické vlastnosti.⁵⁰ Volba vnější fáze závisí na použitém léčivu a polaritě obou fází. V systému W/O/W vnější vodnou fází tvoří nejčastěji čištěná voda. Do vnější kontinuální fáze pro zvýšení stability lze přidávat i povrchově aktivní látky.⁵⁰

PLGA polymery lineární a větvené struktury

PLGA je považován za jeden z nejvíce prosperujících biodegradabilních syntetických polymerů. Lineární a větvené polymery kyseliny mléčné a glykolové představují slibné biodegradabilní nosiče pro prodloužené nebo cílené uvolňování léčiv. Kopolymery kyseliny mléčné a glykolové (PLGA), patří mezi polymery schválené FDA, EMA pro použití v medicíně. Mezi hlavní vlastnosti těchto polymerů patří bezpečnost, biodegradabilita, vstřebatelnost a biokompatibilita.⁵³ Uvolňování léčiva závisí na samotných vlastnostech léčivé látky a typech PLGA lišící se molekulovou hmotností a poměrem kyseliny glykolové, mléčné.⁵⁴ Poměr kyseliny mléčné a glykolové ovlivňuje vlastnosti PLGA. Podle poměru kyseliny mléčné a glykolové je ovlivněná mechanická vlastnost, bobtnání, teplota skelného přechodu a hydrolýza.²³

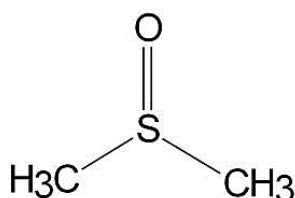
Vhodnými nosiči léčiv jsou lineární a rozvětvené polymery s nižší molekulovou hmotností degradující se během několika dnů nebo hodin. Důležitým parametrem pro rozvětvené polyestery je hydrofilita. Hydrofilní charakter určují volné hydroxylové skupiny se schopností vázat vodu. Hydrofobicitu polymeru klesá v řadě 7:3→5:5→T3→A2. A2 větvený na kyselině polyakrylové, T3 kopolymer kyseliny mléčné a glykolové větvený na tripentaerythritol, PLGA 7:3, 5:5 patří mezi lineární polymery. Bližší charakteristiky polymerů uvádí Tab. 4.

Použité polymery s nízkou molekulovou hmotností byly připravené metodou přímé kondenzace.⁵³

Rozpouštědlo

Dimethylsulfoxid je aprotické polární rozpouštědlo umožňující dobrou rozpustnost iontům, polárním a polarizovatelným molekulám. Vykazuje také farmakologické účinky analgetické a

protizánětlivé, včetně dobrého průniku biologickými membránami pro topické léčivé přípravky.^{55, 56} Molekula DMSO je pyramidová struktura s atomem síry, kyslíkem a dvěma postranními methylovými substituenty. Polární vazba síry s atomem kyslíku dodává kapalině vysokou relativní permitivitu.⁵⁶



Registrační číslo CAS: 67-68-5

Molární hmotnost: 78,14 g/mol

Bod tání: 18,5 °C

Sumární vzorec: C₂H₆OS

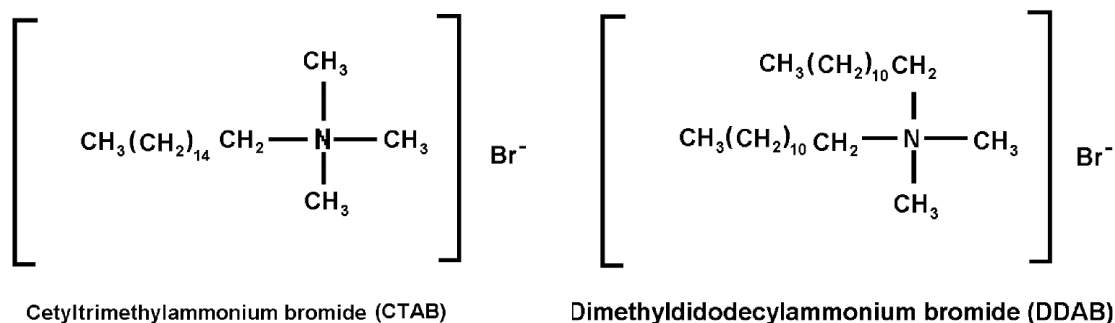
Rozpustnost: Rozpustný v oleji, alkoholu, mísitelný s vodou

Doporučená skladovací teplota: 15 až 25 °C

Obr.8 - Charakteristika DMSO⁵⁵

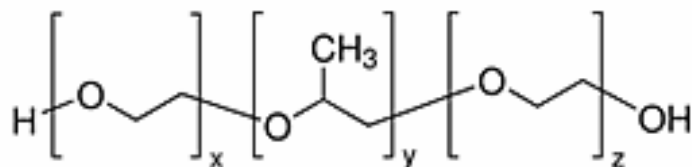
Stabilizátory

Dimethyldidodecylammonium bromid (DDAB) je kationtová povrchově aktivní látka s dvojitým řetězcem poskytující stabilnější systémy než jednořetězcové povrchní aktivní látky jako například cetyltrimethylammonium bromid.⁵⁷ DDAB je velmi efektivní elektrostatický stabilizátor nanočástic a může poskytovat nanočástice už při nízkých koncentracích v rozmezí 0,5% až 0,1%. Podle některých studií nebyl zjištěn významný rozdíl ve velikosti částic stabilizovaných 1% a 0,5% DDAB.⁵⁸ Je také důležité omezit množství používaných kationtových tenzidů. Vysoký obsah povrchově aktivních látek může přispívat ke změnám permeability GIT a způsobit tak podráždění.⁵⁸



Obr. 6 - Struktura jednořetězcového (CTAB) a dvojitěřetězcového (DDAB) stabilizátorů⁵⁸

Poloxamer 407 známý pod komerčním názvem Pluronic F127 je neiontový blokový polymerní tenzid s nízkou toxicitou.⁵⁹ Struktura je znázorněná na Obr. 7. Poloxamer 407 je složen z PEO-PPO-PEO bloků. PEO blok je hydrofilní, zatímco blok PPO je hydrofobní. Ve vodném prostředí vytvoří micely, jejichž jádro je tvořené hydrofobním PPO a vnější obal tvoří hydrofilní PEO.⁶⁰ Jedná se o lékopisnou surovinu s obecným vzorcem $(\text{PEO})_x - (\text{PPO})_y - (\text{PEO})_x$, kde x je 95 až 105 jednotek PEO, y 54 až 60 jednotek PPO.⁶¹



Obr.7 – Poloxamer 407⁶²

8 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8.1 Seznam přístrojů

Analytické digitální váhy, KERN ABS, max. 220 g, d = 0,1 mg

Automatická pipeta, FinnPipette F2 o rozsahu 100 - 1000 μ l

Automatická pipeta Eppendorf research plus o rozsahu 1 - 10 ml

Kyveta PCS 1115, Malvern

Kyveta DTS 1070, Malvern

Magnetická míchačka, Maner

pH meter-Hanna instruments HI221

Zeta Sizer Nano ZS, Malvern

8.2 Materiál

Čištěná voda, Farmaceutická fakulta Hradec Králové

Dimethyldidodecylammonium bromid, Sigma-Aldrich

Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich,

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát p.a., PENTA s.r.o., Mr358,14 CAS: 10039-32-4

Kopolymer kyseliny D,L- mléčné a glykolové (5:5), Faf UK, HK

Kopolymer kyseliny D,L- mléčné a glykolové (7:3), FaF UK, HK

Kyselina citronová monohydrát p.a., PENTA s.r.o., Mr210,14 CAS: 5949-29-1

Léčivo HI-6 (asoxime)

Poloxamer 407 (Pluronic[®] F-127), Merck

Terpolymer kyseliny D,L- mléčné a glykolové větvený na tripentaerythritolu

Terpolymer kyseliny D,L-mléčné a glykolové větvený na polyakrylové kyselině

8.3 Metodika

Metodou dvojité emulze a nanoprecipitační metodou byly připravené nanočástice s oximovým reaktivátorem. Pro přípravu nanočástic byly použity dva lineární PLGA polymery s různým poměrem mléčné a glykolové kyseliny a dva PLGA polymery větvené na tripentaerythritol a kyselině polyakrylové. Nanočástice byly stabilizované vodným roztokem poloxameru 407 a DDAB. Připravené nanočástice jsou charakterizované velikosti, polydisperzitou a zeta potenciálem.

8.3.1 Příprava nanočástic metodou dvojité emulze

Příprava roztoků polymerů, léčiva a stabilizátorů

Nanočástice s hydrofilním léčivem HI-6 byly připravené dvojité emulzní metodou. Byl připraven vodný roztok léčiva (W1), roztoky polymerů T3, PLGA, A2 v dimethylsulfoxidu (DMSO) (O) a vodný roztokem stabilizátoru (W2). Byla připravena primární emulze (PE) W1/O, která se přidala do vnější fáze (W2) za vzniku sekundární emulze W1/O/W2.

Polymery použité k přípravě nanočástic uvádí Tab. 4. Rozpuštěním polymeru v DMSO při pokojové teplotě a míchání na elektromagnetické míchačce byly připraveny 10% zásobní roztoky. 10% zásobní roztok polymeru v DMSO byl naředěn na 1% roztok polymeru v DMSO v čase přípravy. V případě polymeru PLGA 7:3 byl zásobní roztok naředěn na 5% roztok polymeru v DMSO.

Tab. 4: Použité polymery a jejich charakteristika

Polymer	PLGA 5:5	PLGA 7:3		T3		A2
Koncentrace v DMSO	1 %	1 %	5 %	1 %	5 %	1 %
Charakteristika	lineární	lineární		větvený		větvený
M _n [g/mol]	1 700	2 500		5 300		8 600
M _w [g/mol]	2 400	3 300		17 400		14 400
g' (-)	1,0	1,0		0,43		0,54

M_n - číselně střední molární hmotnost, M_w - hmotnostně střední molární hmotnost; g' - větvicí poměr, DMSO – dimethylsulfoxid, T3 – polymer větvený na tripentaerythritolu (1%, 5% v reakční směsi), A2 – polymer větvený na kyselině polyakrylové (1% v reakční směsi)

Byl připraven vodný roztok léčiva o koncentraci 100 mg/ml. Bylo rozpuštěno 50 mg léčiva v 0,5 ml čištěné vodě za míchání na elektromagnetické míchačce po dobu 2 až 3 minuty. Do

2 ml 1% roztoku polymeru v DMSO za míchání se kapalo 0,5 ml vodného roztoku léčiva. Došlo ke vzniku primární emulze (PE).

Vnější fáze (W2) byla tvořena vodným roztokem tenzidu. Koncentrace vodných roztoků tenzidů a charakteristiky použitých tenzidů uvádí Tabulka 5. Roztoky tenzidů byly připraveny za použití 25 ml kádinek. Navážené množství se nechalo rozpustit v 10 ml čištěné vody při pokojové teplotě za míchání na elektromagnetické míchačce.

Tab.5: Charakteristika použitých tenzidů

Druh tenzidu	Pluronic F 127	DDAB
Koncentrace vodného roztoku tenzidu	0,5 %	0,01 %
	1 %	
Charakteristika	Triblokový kopolymer ethylenoxidu a propylenoxidu neiontový tenzid	Kvarterní amoniová báze kationtový tenzid

Pluronic F 127 – poloxamer 407, DDAB – dimethyldidodecylammonium bromid

Příprava fosfát-citrátového pufru pH 5,0

Byl připraven fosfát-citrátový pufr pH 5,0. Vycházelo se ze dvou roztoků A a B. Roztok A vznikl rozpuštěním 21,0 g kyseliny citrónové monohydrátu v 1000 ml. Roztok B vznikl rozpuštěním 35,6 g hydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu v 1000 ml vody. Poté byly roztoky A a B smíseny v poměru 49 dílů roztoku A a 51 dílů roztoku B za vzniku pufru pH 5,0. Kontrola hodnoty pH byla provedena pomocí pH metru. Pro přípravu nanočástic bylo připraveno 200 ml pufru.

Příprava nanočástic

1 ml vodného roztoku léčiva (W1) byl za použití automatické pipety přidán do roztoku polymeru v DMSO (O), který byl umístěn na elektromagnetické míchačce. Špička pipety byla umístěna těsně nad hladinou. Kapala se jedna kapka při jedné otáčce míchadla přibližně 1 s, nakapal se celý objem, který byl pipetou naměřen. Následně se nechalo míchat přibližně 2 minuty.

8.3.2 Příprava částic nanoprecipitační metodou

Příprava vnitřní fáze

Vnitřní fáze byla tvořena roztokem polymeru PLGA 7:3 a léčiva v DMSO. Polymer byl rozpuštěn v DMSO za pokojové teploty a za míchání na elektromagnetické míchačce byl připraven 10% zásobní roztok. V čase přípravy byl naředěn DMSO na 1% roztok. V tomto roztoku bylo rozpuštěno 50 mg léčiva.

Příprava vnější fáze

Vnější fáze byla tvořena vodným roztokem 1% poloxameru 407. Navážené množství tenzidu se nechalo rozpustit v 10 ml čištěné vody při pokojové teploty za míchání na elektromagnetické míchačce.

Nanoprecipitace

Léčivo bylo navážené na analytických vahách v množství 50 mg a bylo přenesené do 10 ml kádinky. Následně pomocí pipety bylo napipetováno 1 ml 1% roztoku polymeru v DMSO. Směs byla ponechána v klidu po dobu 15 minut za pokojové teploty. Do vodného roztoku stabilizátoru tzn. do vnější fáze za míchání byla metodou *dropwise* a metodou *one pot* přidávána vnitřní fáze v množství 1 ml. Vzorek se nechal míchat na magnetické míchačce po dobu 15 minut a poté následovalo měření na Zetasizeru.

Schéma A – znázornění postupu přípravy metodou dvojité emulze

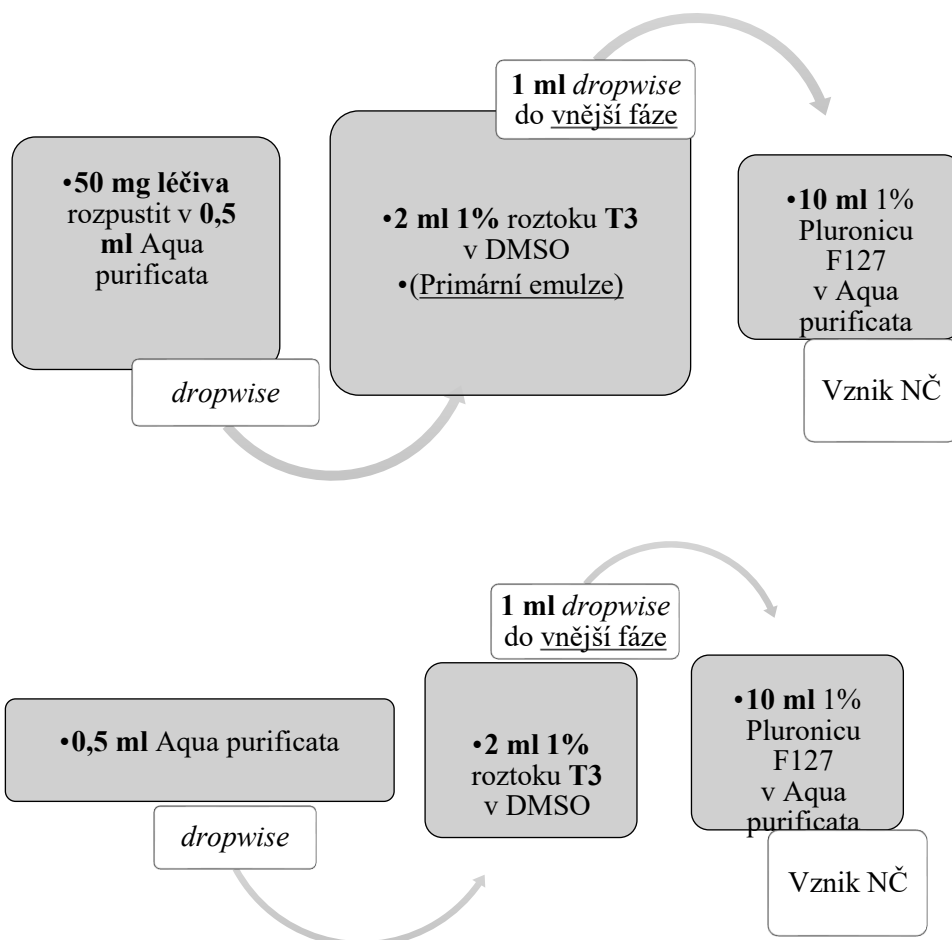
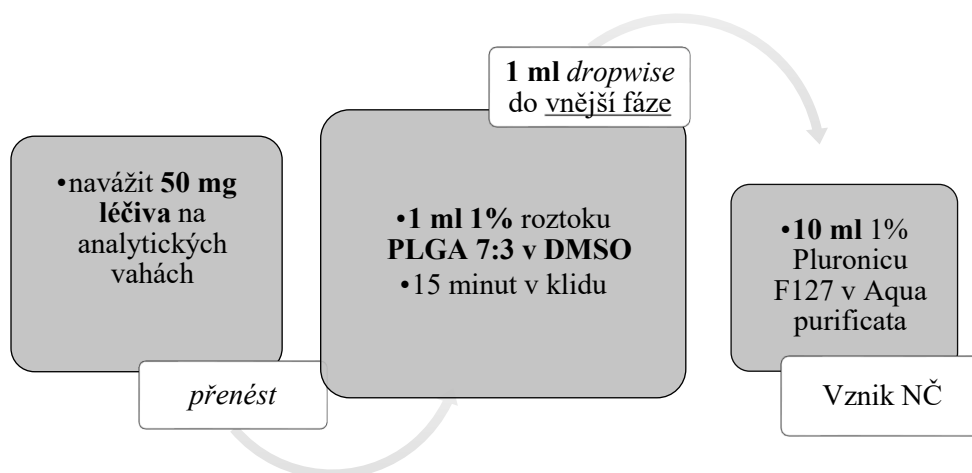
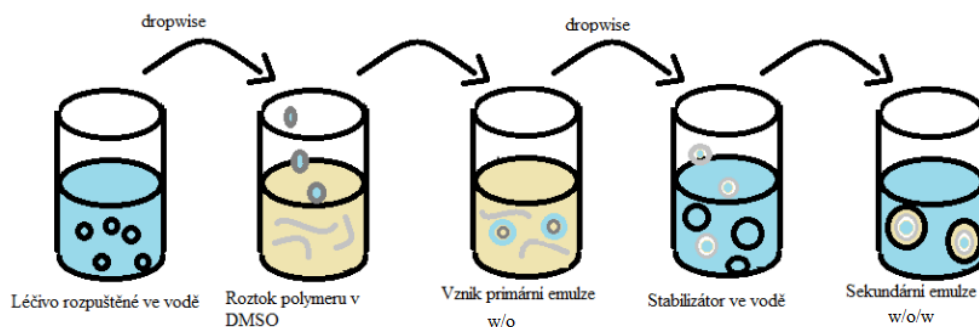
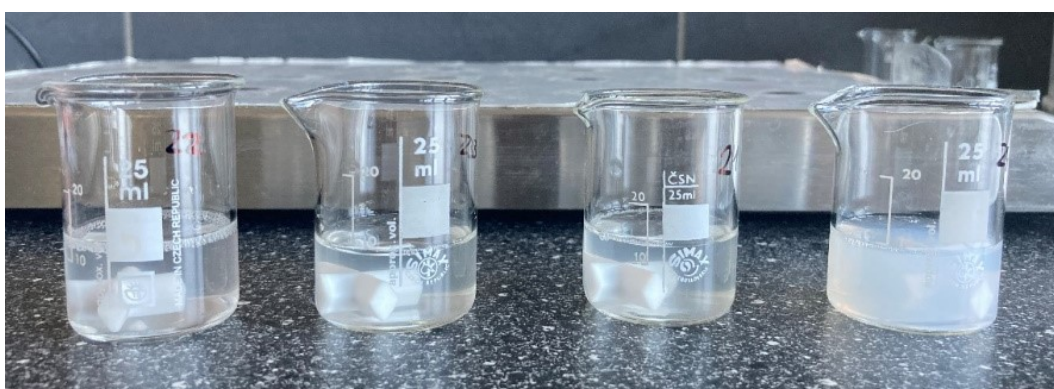


Schéma B – znázornění postupu přípravy nanoprecipitační metodou





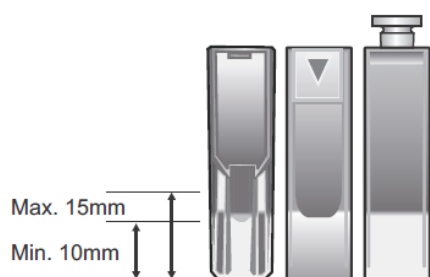
Obr. 7 - Schéma přípravy nanočástic metodou dvojitě emulze



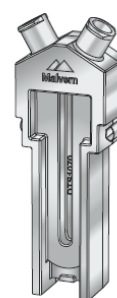
Obr. 8 - Fotodokumentace nanosuspenzí připravených dvojitě emulzní metodou

8.3.3 Měření velikosti, polydisperzity a zeta potenciálu nanočástic

Měření velikosti a zeta potenciálu probíhalo na přístroji Zetasizer Malvern. Kyveta PCS1115 byla použita pro měření velikosti NČ (Obr. 9), pro měření zeta potenciálu byla použita kyveta DTS1070 obsahující dvě kapiláry (Obr. 10). Pro správnou manipulaci s programem a plnění kyvet byl použit návod k přístroji.⁶³ Při plnění kyvety pro měření zeta potenciálu byla kyvetu nakloněna a naplněna pomalu, aby nevznikly bubliny. Měření bylo provedeno pomocí předem nastaveného SOP dle návodu.⁶³ Výsledky jako uvedeny jako aritmetické průměry hodnot z tří měření ($n=3$) s vyjádřením směrodatné odchylky (SD).



Obr. 9 - Kyveta pro měření velikosti⁶³



Obr. 10 - Kyveta pro měření zeta potenciálu⁶³

9 VÝSLEDKY

Tab. 6: Charakteristiky nanočástic 5% T3 - stabilizace 1% roztokem poloxameru 407

Fáze W1	100 mg LL/1 ml			
Fáze O	5% roztok T3 v DMSO 2 ml			
Objem W1/O	0,25 ml	0,5 ml	1 ml	2 ml
Fáze W2	1% roztok poloxameru 407 - 10 ml			
Číslo vzorku	1	2	3	4
Velikost [nm]	273,8	292,7	318,3	370,3
	269,0	289,2	317,9	364,3
	273,9	290,2	315,2	366,6
	průměr ± SD	272,2 ± 2,80	290,7 ± 1,80	317,1 ± 1,69
Polydisperzita	0,104	0,046	0,109	0,175
	0,120	0,119	0,158	0,178
	0,121	0,111	0,158	0,182
	průměr ± SD	0,115 ± 0,01	0,092 ± 0,04	0,142 ± 0,03

Tab. 7: Charakteristiky nanočástic 5% PLGA 7:3 - stabilizace 1% roztokem poloxameru 407

Fáze W1	100 mg LL/1 ml			
Fáze O	5% roztok PLGA 7:3 v DMSO 2 ml			
Objem W1/O	0,25 ml	0,5 ml	1 ml	2 ml
Fáze W2	1% roztok poloxameru 407 - 10 ml			
Číslo vzorku	5	6	7	8
Velikost [nm]	326,5	366,6	362,8	378,2
	322,3	401,8	360,5	387,2
	323,0	488,2	354,3	382,9
	průměr ± SD	323,9 ± 2,3	369,1 ± 1,86	359,2 ± 4,39
Polydisperzita	0,133	0,228	0,134	0,151
	0,140	0,194	0,122	0,131
	0,142	0,207	0,148	0,132
	průměr ± SD	0,138 ± 0,00	0,210 ± 0,01	0,135 ± 0,01

Tab. 8: Charakteristiky nanočástic 1% T3 - stabilizace 1% roztokem poloxameru 407

Fáze W1	50 mg LL/0,5 ml		
Fáze O	1% roztok T3 v DMSO - 2 ml		
Objem W1/O	1 ml		
Fáze W2	1% roztok poloxameru 407 - 10 ml		
Číslo vzorku	9	9 one pot	9 BL
Velikost [nm]	180,5	218,5	137,9
	183,6	221,8	133,6
	182,2	225,2	135,8
průměr ± SD	182,1 ± 1,55	221,8 ± 3,35	135,8 ± 2,15
Polydisperzita	0,227	0,151	0,226
	0,229	0,103	0,270
	0,219	0,126	0,253
průměr ± SD	0,225 ± 0,00	0,127 ± 0,02	0,250 ± 0,02

Tab. 9: Charakteristiky nanočástic 1% PLGA 5:5 - stabilizace 1% roztokem poloxameru 407

Fáze W1	50 mg LL/0,5 ml			
Fáze O	1% roztok PLGA 5:5 v DMSO - 2 ml			
Objem W1/O	1 ml			
Fáze W2	1% roztok poloxameru 407 - 10 ml			
Číslo vzorku	10 one pot	10 B	10 C	10 BL
Velikost [nm]	215,4	186,6	191,9	160,5
	213,2	180,9	188,6	165,0
	208,9	200,9	187,7	149,3
	průměr ± SD	212,5 ± 3,30	189,5 ± 10,3	189,4 ± 2,21
Polydisperzita	0,381	0,437	0,389	0,305
	0,395	0,384	0,375	0,355
	0,325	0,358	0,372	0,380
	průměr ± SD	0,367 ± 0,04	0,393 ± 0,04	0,379 ± 0,01

Tab. 10: Charakteristiky nanočástic 1% T3 - stabilizace 1% roztokem poloxameru 407, pH 5

Fáze W1	50 mg LL/0,5 ml			
Fáze O	1% roztok T3 v DMSO - 2 ml			
Objem W1/O	1 ml			
Fáze W2	1% roztok poloxameru 407 - 10 ml pufr pH 5			
Číslo vzorku	11 one pot	11 B	11 C	11 BL
Velikost [nm]	2985	1411	1514	405,6
	2241	1343	1522	287,3
	4031	1391	1655	292,1
	průměr ± SD	3086 ± 899	1382 ± 35	1564 ± 80
Polydisperzita	1,000	1,000	1,000	0,727
	1,000	1,000	1,000	0,632
	1,000	1,000	1,000	0,740
	průměr ± SD	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Tab. 11: Charakteristiky nanočástic 1% A2 - stabilizace 1% roztokem poloxameru 407

Fáze W1	50 mg LL/0,5 ml		
Fáze O	1% roztok A2 v DMSO - 2 ml		
Objem W1/O	1 ml		
Fáze W2	1% roztok poloxameru 407 - 10 ml		
Číslo vzorku	12 A	12 B	12 BL
Velikost [nm]	227,5	287,5	236,1
	225,2	274,8	239,4
	221,6	255,9	240,6
	průměr ± SD	224,8 ± 2,97	272,7 ± 15,90
Polydisperzita	0,251	0,411	0,127
	0,246	0,347	0,064
	0,227	0,336	0,074
	průměr ± SD	0,241 ± 0,01	0,365 ± 0,04

Tab. 12: Charakteristiky nanočástic 1% T3 - stabilizace 0,5% roztokem poloxameru 407

Fáze W1	50 mg LL/0,5 ml		
Fáze O	1% roztok T3 v DMSO - 2 ml		
Objem W1/O	1 ml		
Fáze W2	0,5% roztok poloxameru 407 - 10 ml		
Číslo vzorku	13 A	13 B	13 BL
Velikost [nm]	217,9	207,5	144,4
	221,3	205,9	139,7
	218,3	209,2	139,9
	průměr ± SD	219,2 ± 1,86	207,5 ± 1,65
Polydisperzita	0,167	0,171	0,349
	0,179	0,172	0,336
	0,159	0,125	0,364
	průměr ± SD	0,168 ± 0,01	0,156 ± 0,03

Tab. 13: Charakteristiky nanočástic 1% A2 - stabilizace 0,5% roztokem poloxameru 407

Fáze W1	50 mg LL/0,5 ml		
Fáze O	1% roztok A2 v DMSO - 2 ml		
Objem W1/O	1 ml		
Fáze W2	0,5% roztok poloxameru 407 - 10 ml		
Číslo vzorku	15 A	15 B	15 BL
Velikost [nm]	1582	1197	360,8
	1273	1210	374,9
	1177	885,2	387,8
	průměr ± SD	1344 ± 211,6	1097 ± 183,9
Polydisperzita	1,000	0,914	0,659
	1,000	0,951	0,498
	0,970	0,849	0,420
	průměr ± SD	0,990 ± 0,02	0,905 ± 0,05

Tab. 14: Charakteristiky nanočástic 1% T3 - stabilizace 0,01% roztokem DDAB

Fáze W1	50 mg LL/0,5 ml		
Fáze O	1% roztok T3 v DMSO - 2 ml		
Objem W1/O	1 ml		
Fáze W2	0,01% roztok DDAB - 10 ml		
Číslo vzorku	14 A	14 B	14 BL
Velikost [nm]	227,6	237,4	228,6
	226,2	236,2	225,6
	222,3	225,6	224,6
	průměr ± SD	225,4 ± 2,75	233,1 ± 6,49
Polydisperzita	0,243	0,304	0,150
	0,211	0,305	0,160
	0,208	0,237	0,163
	průměr ± SD	0,221 ± 0,02	0,282 ± 0,04
Zeta potenciál [mV]	45,2	47,1	32,1
	42,4	46,9	34,8
	41,1	45,7	36,0
	průměr ± SD	43,2 ± 1,71	46,6 ± 0,76

Tab. 15: Charakteristiky nanočástic 1% PLGA 5:5 - stabilizace 0,01% roztokem DDAB

Fáze W1	50 mg LL/0,5 ml	
Fáze O	1% roztok PLGA 5:5 v DMSO - 2 ml	
Objem W1/O	1 ml	
Fáze W2	0,01% roztok DDAB - 10 ml	
Číslo vzorku	16 A	16 B
Velikost [nm] průměr ± SD	173,0	189,0
	175,0	191,7
	168,1	187,1
	172,0 ± 3,56	189,3 ± 2,31
Polydisperzita průměr ± SD	0,207	0,222
	0,239	0,189
	0,186	0,220
	0,211 ± 0,03	0,210 ± 0,02
Zeta potenciál [mV] průměr ± SD	66,3	64,3
	69,4	63,1
	68,3	64,8
	64,1 ± 0,87	64,1 ± 0,76

Tab. 16: Charakteristiky nanočástic 1% A2 - stabilizace 0,01% roztokem DDAB

Fáze W1	50 mg/0,5 ml	
Fáze O	1% roztok A2 v DMSO - 2 ml	
Objem W1/O	1 ml	
Fáze W2	0,01% roztok DDAB - 10 ml	
Číslo vzorku	17 A	17 B
Velikost [nm]	205,6	193,8
	203,7	194,9
	197,1	193,2
průměr ± SD	202,1±4,46	194,0±0,86
Polydisperzita	0,324	0,135
	0,296	0,070
	0,300	0,117
průměr ± SD	0,307±0,02	0,107±0,03
Zeta potenciál [mV]	56,0	42,1
	42,6	41,2
	37,8	40,4
průměr ± SD	45,5±9,43	41,2±0,85

Tab. 17: Charakteristiky nanočástic 1% PLGA 7:3 - stabilizace 0,01% roztokem DDAB, nanoprecipitační metoda

Fáze O	50 mg LL	
	1% roztok PLGA 7:3 v DMSO 1 ml	
Fáze W	0,01% roztok DDAB - 10 ml	
Číslo vzorku	18 A	18 B
Velikost [nm]	221,1	249,4
	223,9	254,9
	227,5	249,6
	průměr ± SD	224,2 ± 3,21
Polydisperzita	0,121	0,181
	0,161	0,198
	0,131	0,191
	průměr ± SD	0,138 ± 0,02
Zeta potenciál [mV]	48,2	47,5
	47,5	48,8
	47,5	48,6
	průměr ± SD	47,9 ± 0,35

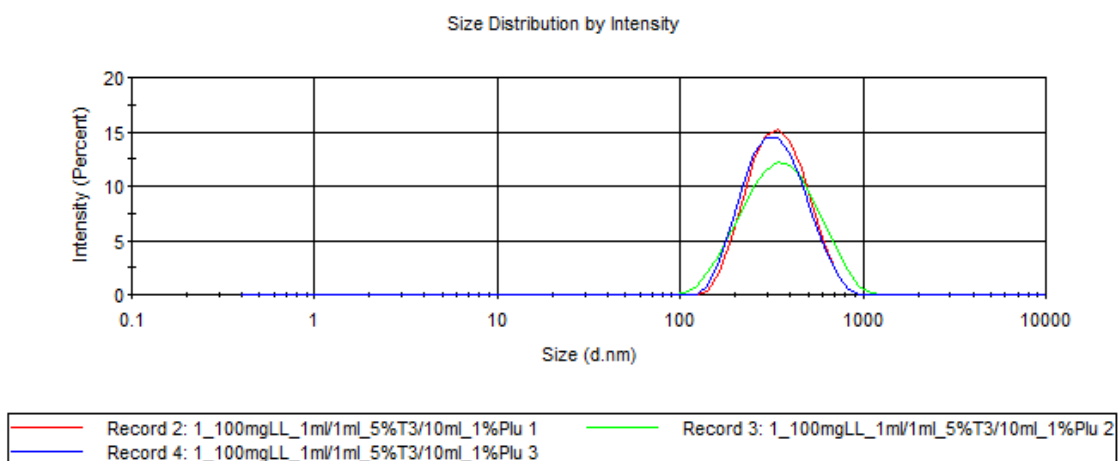
Tab. 18: Stabilita nanočástic 1% T3 - stabilizace 1% roztokem poloxameru

Fáze W1	50 mg LL/0,5 ml			
Fáze O	1% roztok T3 v DMSO - 2 ml			
Množství fáze W1	1 ml			
Fáze W2	1% roztok poloxameru 407 - 10 ml			
Číslo vzorku	9	9 - 1 den	9 - 2 dny	9 - 9 dnů
Velikost [nm]	218,5	224,4	225,9	233,3
	221,8	219,3	223,5	231,7
	225,2	222,4	221,8	231,9
	průměr ± SD	221,8 ± 3,35	222,0 ± 2,57	223,7 ± 2,01
Polydisperzita	0,151	0,063	0,068	0,052
	0,103	0,084	0,056	0,049
	0,126	0,061	0,072	0,036
	průměr ± SD	0,127 ± 0,02	0,069 ± 0,01	0,065 ± 0,01

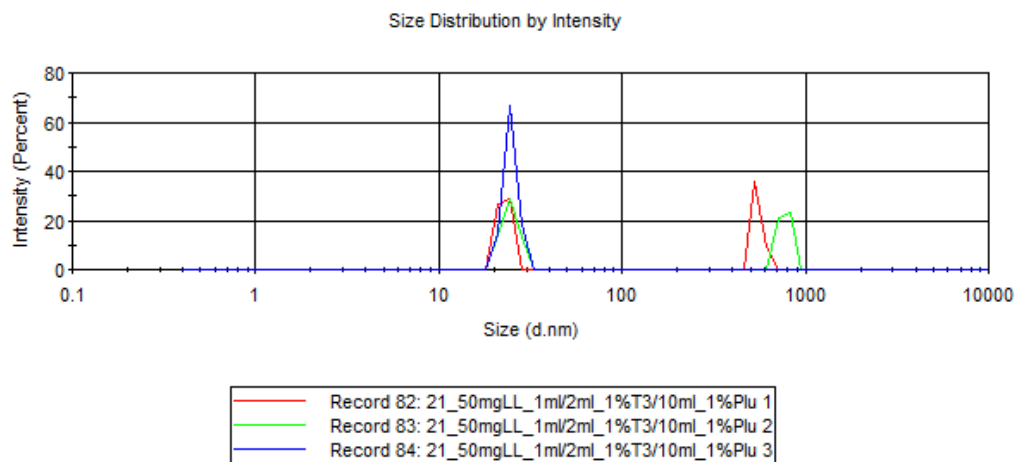
Tab. 19: Stabilita nanočástic 1% PLGA 5:5 - stabilizace 1% roztokem poloxameru

Fáze W1	50 mg/0,5 ml			
Fáze O	1% roztok PLGA 5:5 v DMSO – 2 ml			
Objem W1/O	1 ml			
Fáze W2	1% roztok poloxameru 407 - 10 ml			
Číslo vzorku	10 B	10 B – 1 den	10 B – 7 dnů	10 B – 8 dnů
Velikost [nm]	186,6	154,0	180,5	194,0
	180,9	150,6	179,1	189,7
	200,9	148,9	177,5	180,1
	průměr ± SD	189,5 ± 10,3	151,2 ± 2,60	179,0 ± 1,50
Polydisperzita	0,437	0,191	0,117	0,194
	0,384	0,180	0,168	0,189
	0,358	0,173	0,170	0,180
	průměr ± SD	0,393 ± 0,04	0,181 ± 0,01	0,179 ± 0,03

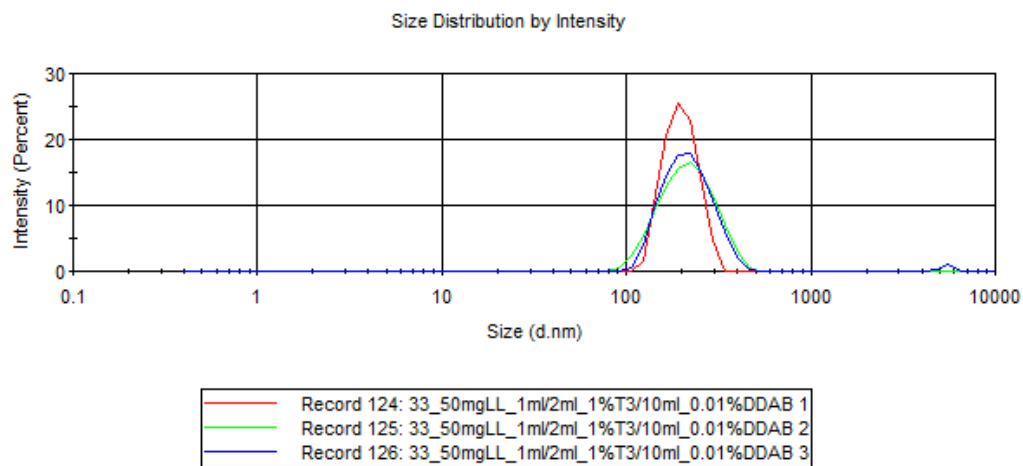
Obr. 11: Ukázka distribuční křivky nanočástic z 5% T3 – stabilizace 1% P. 407



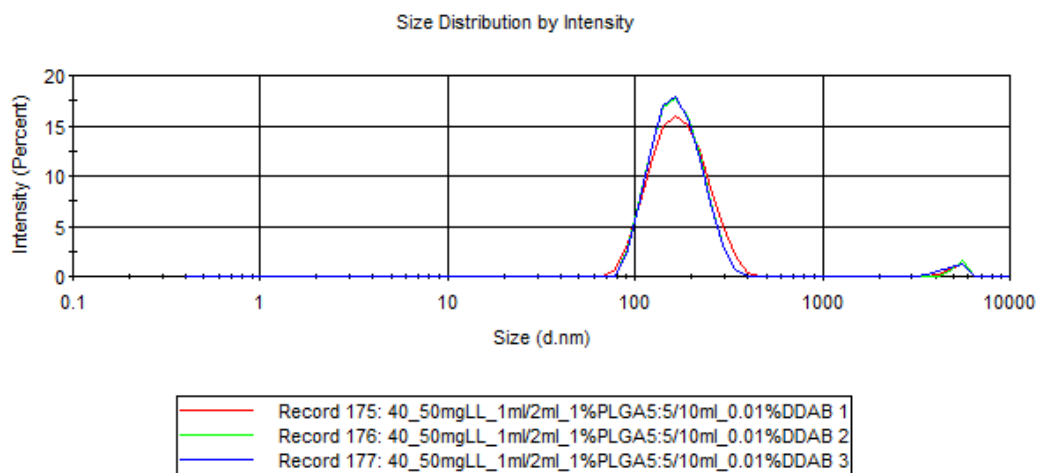
Obr. 12: Ukázka distribuční křivky nanočástic z 1% T3 - stabilizace 1% P. 407, pH 5



Obr. 13: Ukázka distribuční křivky nanočástic z 1% T3 - stabilizace 0,01% DDAB



Obr. 14: Ukázka distribuční křivky nanočástic z 1% PLGA 5:5 - stabilizace 0,01% DDAB



10 DISKUZE

Cílem práce bylo připravit nanočástice s hydrofilním léčivem metodou dvojitě emulze a metodou nanoprecipitace, optimalizovat faktory ovlivňující charakteristiky NČ s cílem získat částice vhodné pro targeting do mozku. Dvojitě emulzní metoda přípravy nanočástic je v literatuře prezentovaná jako metoda vhodná pro přípravu částic s hydrofilním léčivem.⁵⁰ Metodou dvojitě emulze byly získány nanočástice s léčivem HI-6 o velikosti 182,1 – 382,9 nm v závislosti na formulačních podmínkách. Nanočástice se nepodařilo připravit ve dvou případech. Částice okamžitě aglomerovaly při pH 5 a po snížení koncentrace poloxameru 407 z 1% na 0,5% (Tab. 10 a 13). Polydisperzita připravených nanočástic byla nízká, pohybovala se většinou pod hodnotu 0,25.

Pro formulaci částic s hydrofilním léčivem byla také aplikovaná nanoprecipitační metoda za použití 1% roztoku polymer PLGA 7:3 v DMSO. Z některých studií vyplývá, že daná metoda vzhledem k nízké enkapsulaci není vhodná pro přípravu nanočástic s hydrofilním léčivem.⁶⁴ Podle uvedeného postupu přípravy danou metodou byly získány částice velikostí 251,3 nm a 224,2 nm (Tab. 17).

10.1 Vliv polymeru

Pro přípravu nanočástic metodou dvojitě emulze s hydrofilním léčivem pro targeting do mozku byly použity kopolymery a terpolymery PLGA. Pro formulaci NČ byly použity lineární polymery PLGA 5:5 a PLGA 7:3 lišící se poměrem kyseliny glykolové a mléčné a také molární hmotnosti. Dále byly použity dva deriváty PLGA s větvenou strukturou na tripentaerythritol T3 a na kyselině polyakrylové A2. Hydrofobicita polymeru klesá v řadě 7:3→5:5→T3→A2. Bližší charakteristiky použitých polymerů pro přípravu nanočástic jsou uvedeny v Tab. 4. Pro přípravu částic nanoprecipitační metodou byl použit lineární polymer 7:3.

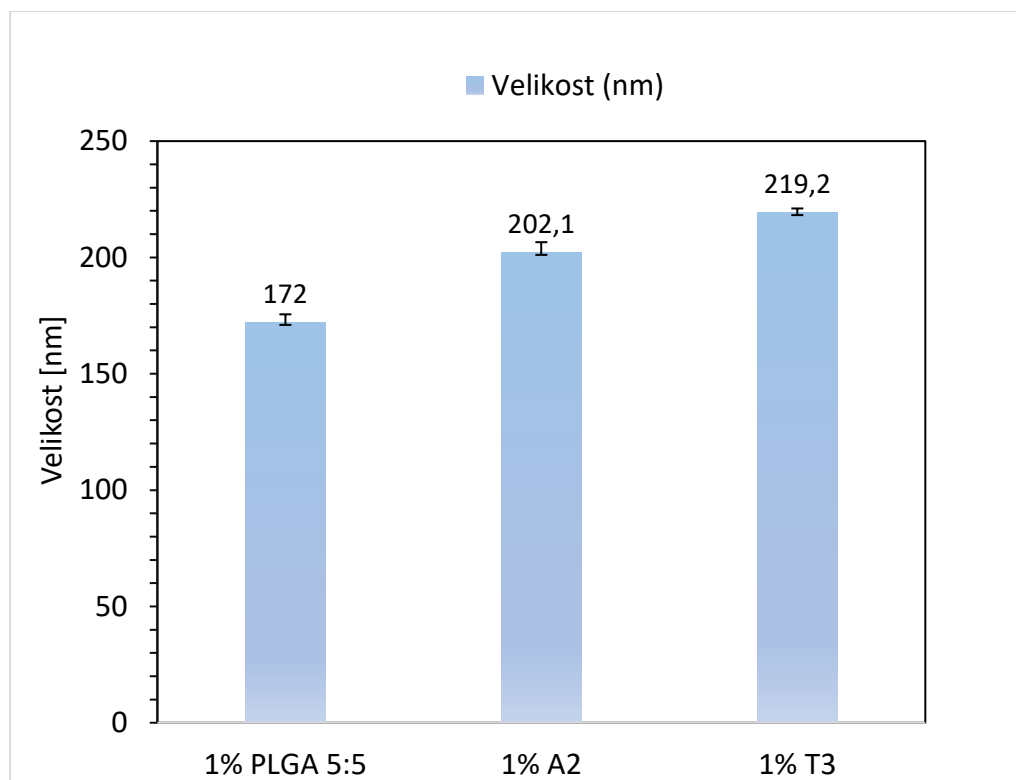
Z Obr. 22 a z Tab. 6 a 7 je patrné, že při použití 5% roztoku T3 a 5% PLGA 7:3 byly získány větší částice, než za použití 1% roztoku těchto polymerů. Důvodem je zvýšení koncentrace polymeru. Částice připravené z PLGA 7:3 stabilizované 1% roztokem poloxameru 407 viz. Tab. 7 vykazovaly větší velikost. Protože daný polymer má větší hydrofobicitu než PLGA 5:5, kvůli vyššímu podílu kyseliny mléčné, předpokládala se menší velikost částic. Jak vyplývá z Obr. 22 nejspíš velikost částic byla ovlivněná koncentrací polymeru i množstvím léčiva, ačkoliv množství léčiva oproti kontrolnímu vzorku nevykazuje významné rozdíly na velikosti

nanočástic. Srovnávání hodnot částic získané z polymeru PLGA 7:3 a PLGA 5:5 mají sníženou validitu srovnávání z důvodu vlivu více formulačních faktorů.

Z Tab. 8 a 9 vyplývá, že velikost částic připravených z různých polymerů nebyla markantní, ačkoliv lepší hodnoty PDI měly částice z polymeru T3, který se také stal předmětem zájmu. Větší koncentrace polymeru poukazuje na větší částice, daný jev se předpokládal.

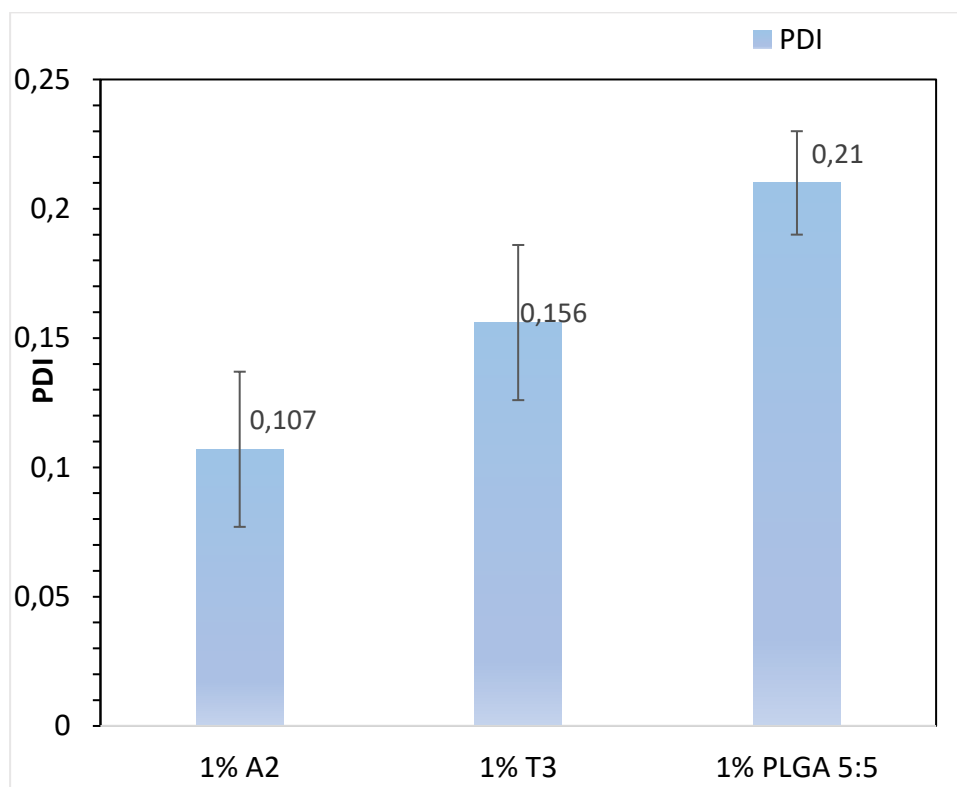
Při přípravě nanočástic s léčivem HI-6 metodou dvojité emulze byl jako stabilizátor použit poloxamer 407 a DDAB, které stabilizovaly NČ sférický a elektrostatický.

Obr. 15: Vliv polymeru na velikost částic



Na obrázku 15 jsou porovnávány velikosti nanočástic připravené za použití polymeru T3, PLGA 5:5 a A2. Velikost získaných částic se pohybovala v rozmezí 172 až 219 nm. Pod hranici 200 nm se dostaly částice připravené 1% PLGA 5:5 stabilizované 0,01% DDAB. Těsně pod 200 nm se také dostaly nanočástice připravené z polymeru A2 stabilizované 0,01% DDAB. Nanočástice připravené z lineárního polymeru PLGA 5:5 měly menší velikost než nanočástice tvořené větveným polyesterem T3. Jak vyplývá i z předchozích diplomových prací nejspíš se projevuje vliv molární hmotnosti.⁶⁵

Obr. 16: Vliv polymeru na polydisperzitu nanočástic

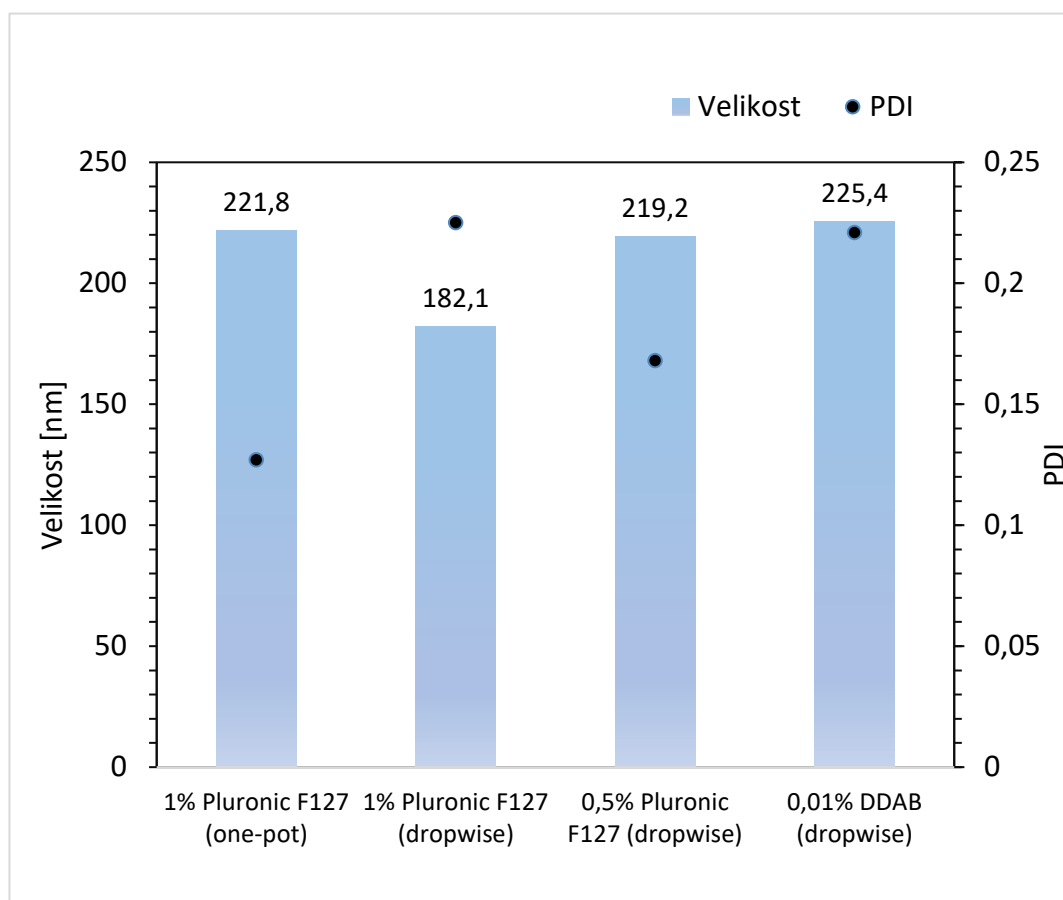


Polydisperzita charakterizuje částice mnoha různých velikostí. Pro polymerní systémy se jako kvalitní považují částice s hodnotou PDI pod 0,2.⁶⁵ Podle hodnoty PDI jako kvalitní lze uvést nanočástice tvořené lineárním polymerem PLGA a větvenými polymery A2, T3 v koncentraci 1% při pH 7.

10.2 Vliv stabilizátoru

Pro přípravu nanočástic byl zvolen jako stabilizátor poloxamer 407 nebo didodecylmethylamonium (DDAB). Nanočástice stabilizované DDAB lze považovat za stabilní, což dokazují vyšší hodnoty zeta potenciálu + 32 mV. Částice z větveného polymeru T3 stabilizované 1% roztokem poloxameru 407 okamžitě aglomerovaly při pH 5 (viz Tab. 10). Aglomeráty poskytly i částice připravené z větveného polymeru A2 po snížení koncentrace roztoku poloxameru 407 na 0,5% (Tab. 13).

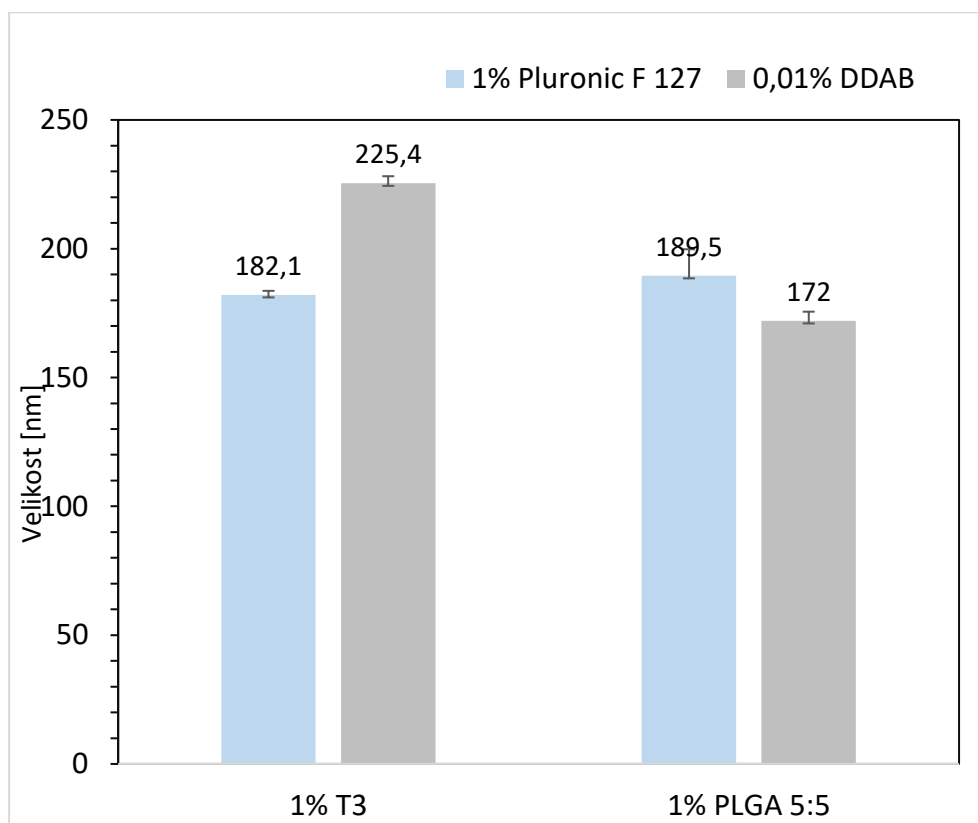
Obr.17: Vliv stabilizátoru na velikost částic připravených 1% T3



Na Obr. 17 jsou porovnávány hodnoty velikosti částic připravené 1% T3 v DMSO stabilizované vodným roztokem 1%, 0,5% Pluronicu F127 a 0,01% DDAB. V závislosti na těchto faktorech byly získány částice v rozmezí přibližně 182 až 225 nm. Částice, u nichž byl jako stabilizátor použit 1% Pluronic F127, vykazovaly menší velikost. Snížením koncentrace Pluronicu F127 na 0,5% nedošlo ke vzniku menších částic. Je zajímavé, že pokud se koncentrace tenzidu snížila z 1% na 0,5% u částic připravené z polymeru A2, došlo ke vzniku aglomerátu. Lze předpokládat, že vznik aglomerátů bylo ovlivněno nedostatečnou koncentrací tenzidu pro stabilizaci částic.

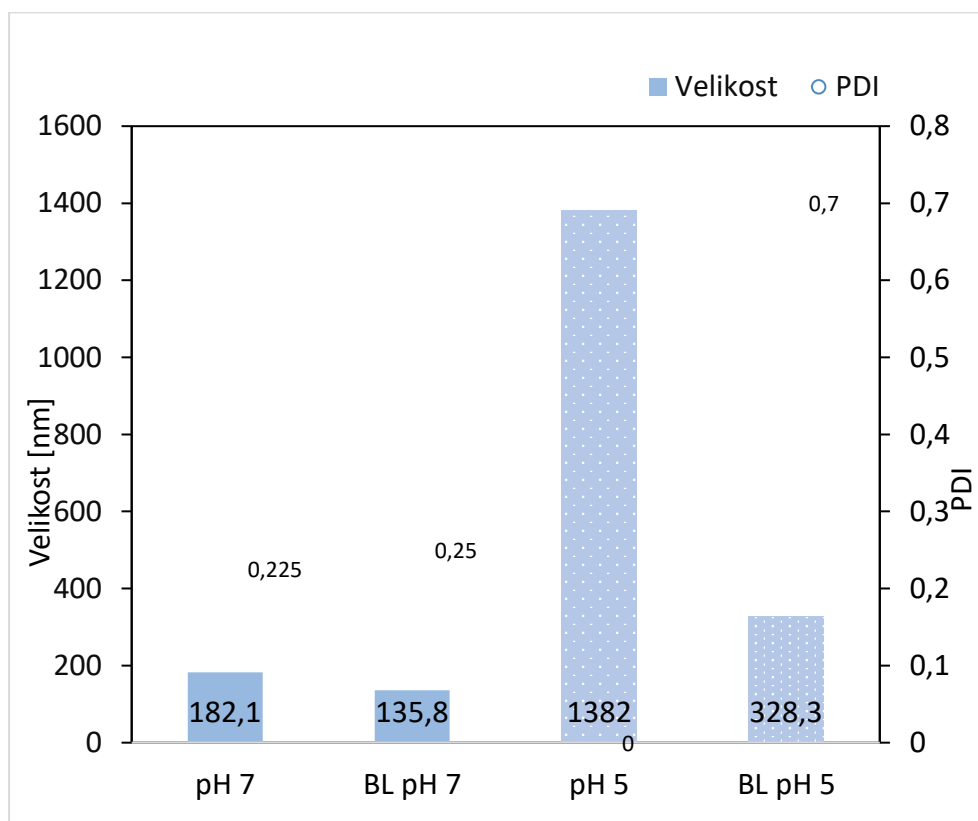
Zároveň bylo studováno, zda způsob, jakým se vnitřní fáze přidává do vnější fáze, může ovlivnit velikost připravených nanočástic. Metoda „*dropwise*“ přidávání jedné kapky v určitém časovém intervalu, nebo metoda „*one-pot*“ celé množství najednou, jak vyplývá z Obr. 17 nepatrně ovlivňuje velikost připravených částic.

Obr. 18: Vliv stabilizátoru na velikost částic připravených 1% T3 a PLGA 5:5



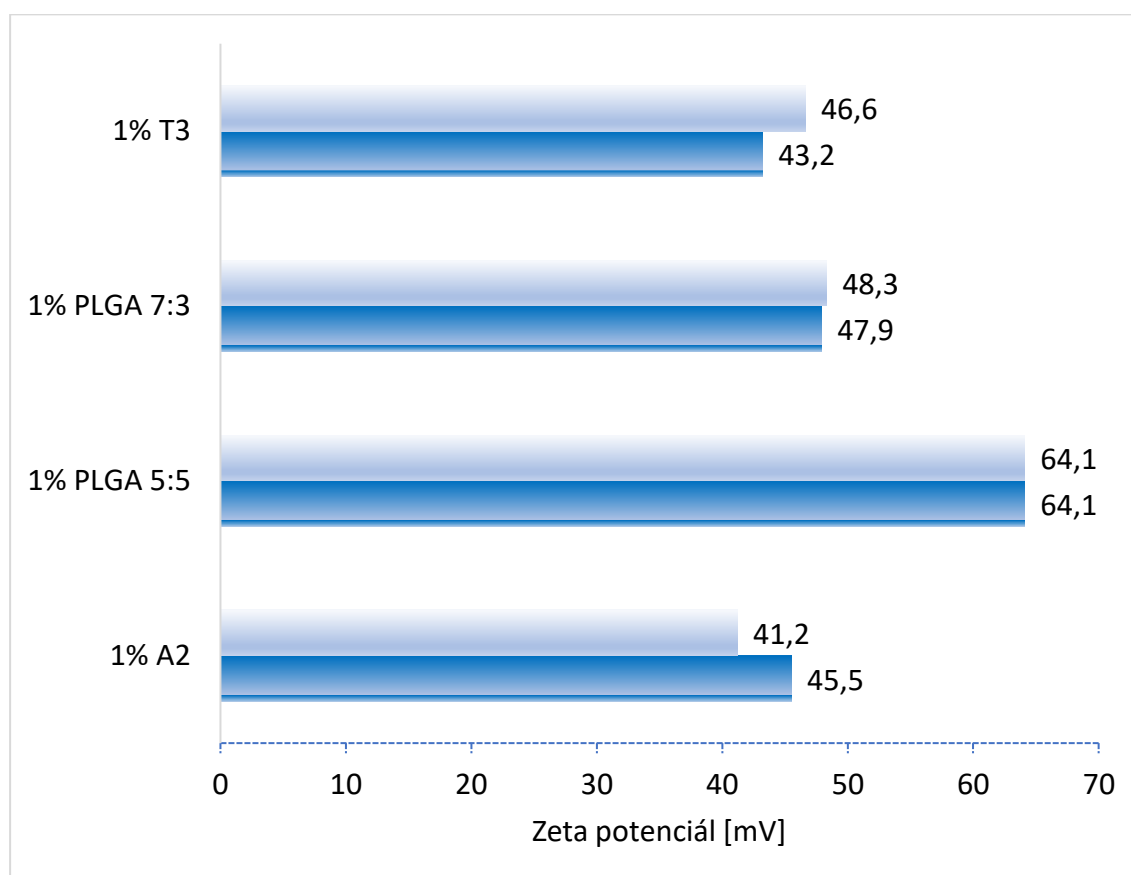
Obr. 18 porovnává vliv stabilizátoru na velikost nanočástic připravené z různých polymerů. Nanočástice, které byly stabilizované 0,01% DDAB a připravené roztokem 1% PLGA 5:5 v DMSO vykazovaly velikost pod 200 nm s hodnotou PDI přibližně 0,2. Jak je patrné velikost pod 200 nm měly i částice připravené 1% T3 v DMSO, stabilizované 1% Pluronicem F127. Na velikost částic se uplatnil i vliv molární hmotnosti PLGA 5:5 s hodnotou M_w 2 400 g/mol, který je menší než u polymeru T3 s hodnotou M_w 17 400 g/mol.

Obr. 19: Vliv pH vnější fáze na velikost částic



Vnější fáze byla tvořena roztokem fosfát-citrátového pufru o pH 5. Při změně pH vnější fáze z hodnoty 7 na hodnotu 5 došlo k okamžitému vzniku aglomerátu. Velikost vzniklých částic s hydrofilním léčivem připravené o pH 5 se pohybovala v rozmezí od 1300 nm až 1564 nm viz Tab. 10. Polydisperzita připravených částic o pH 5 vnější fáze nebyla přístrojem vyhodnocená. Byl také připraven slepý vzorek, který také aglomeroval s hodnotou PDI 0,7. V prostředí roztoku fosfát-citrátového pufru při nižší pH než 7 byla velikost částic výrazně větší.

Obr. 20 Hodnoty zeta potenciálu



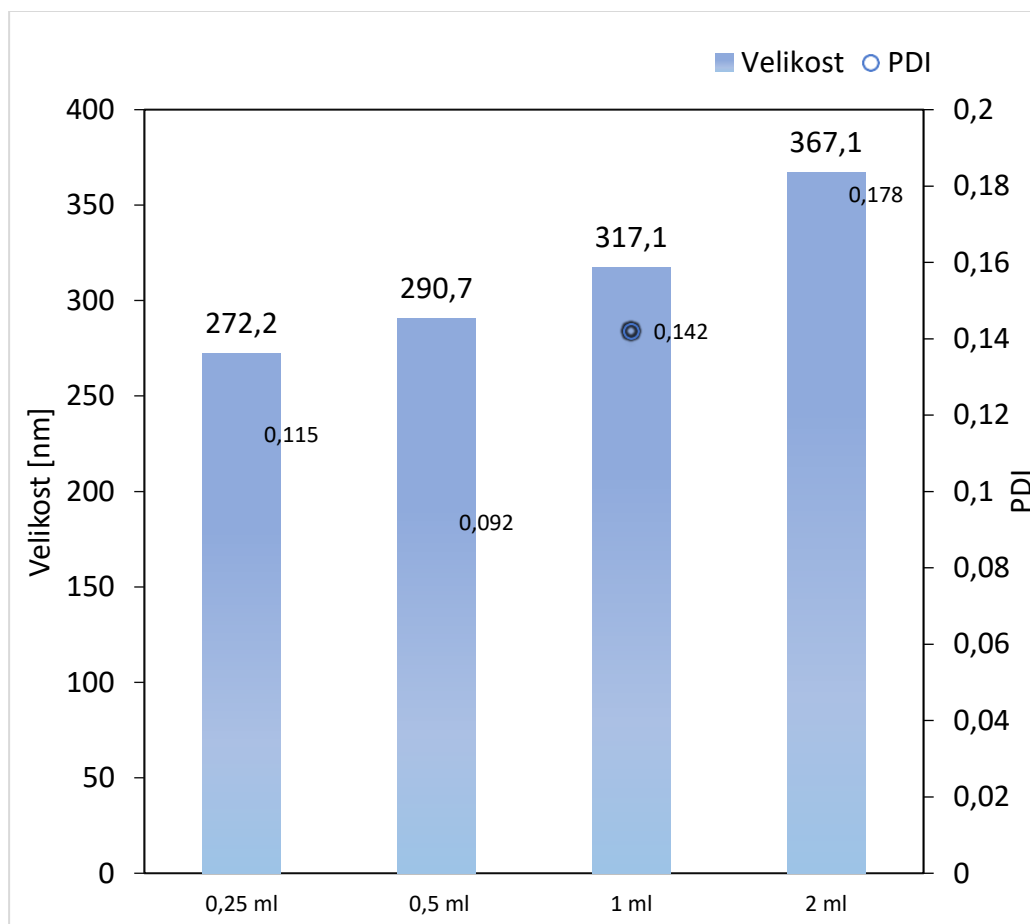
Obr. 20. porovnává hodnoty zeta potenciálu opakovaně připravených vzorků. Hodnoty zeta potenciálu se projeví při použití kationtového stabilizátoru DDAB u částic připravené z A2, T3, PLGA 5:5 a PLGA 7:3. Naměřené hodnoty zeta potenciálu se pohybovaly v přibližném rozmezí 41,2 až 64,1. Naměřené hodnoty překročily hranici +30 mV. Částice s hodnotou +30 mV lze považovat za fyzikálně stabilní a silné kationtové NČ. Nanočástice, které měly hodnotu zeta potenciálu nad 60 mV, lze považovat za částice s vynikající stabilitou. Pokud se hodnota zeta potenciálu pohybuje v hodnotách -10 mV a +10 mV, lze tyto částice považovat za neutrální. Nanočástice s hodnotou zeta potenciálu +30mV nebo -30mV se považují za silně kationtové a aniontové.⁶⁵

10.3 Vliv vnitřní fáze W1

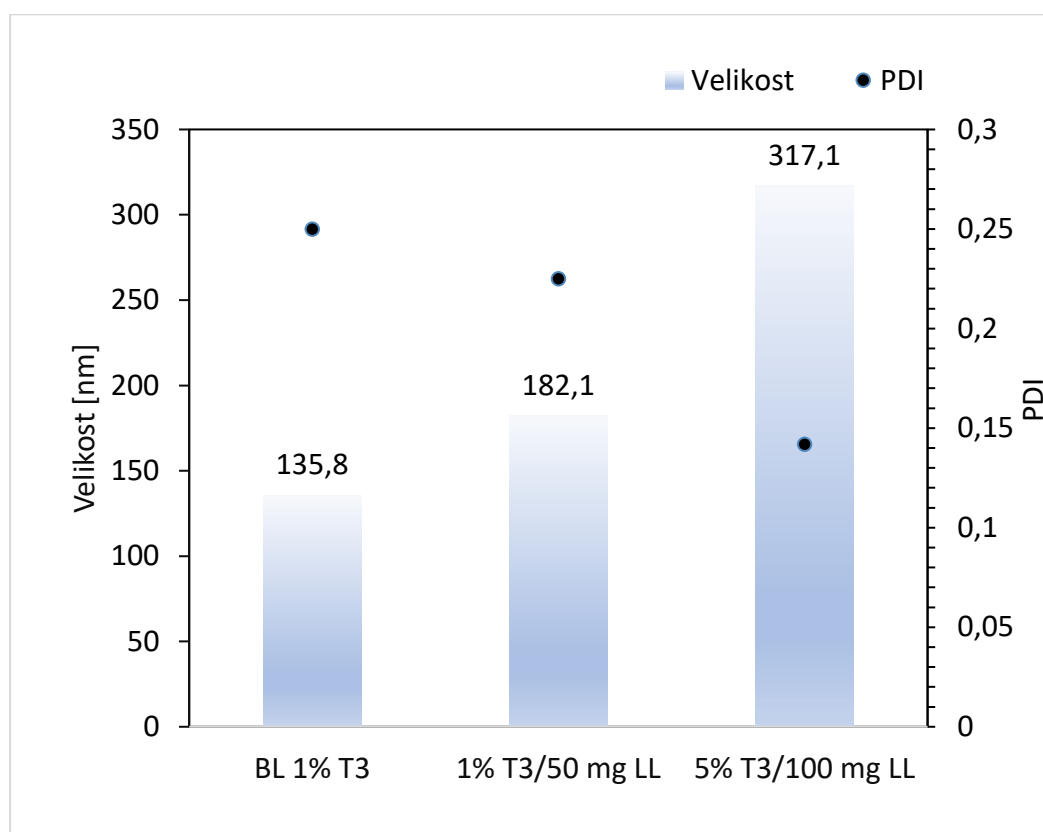
Objem vnitřní fáze jako jeden z dalších formulačních faktorů, který byl studován. Na obrázku 21 jsou porovnány hodnoty částic připravené metodou dvojité emulze z 5% roztoku polymeru T3 v DMSO stabilizované 1% Pluronicem F127. Získané nanočástice byly v rozmezí přibližně 272 až 367 nm s hodnotou PDI pod 0,2. Jak je patrné z obrázku 21, velikost částic závisí na

množství vnitřní fáze. Částice připravené daným postupem nedosáhly požadované hranici pod 200 nm. Vliv objemu vnitřní fáze na velikost byl oproti vlivu koncentrace polymeru menší.

Obr. 21: Vliv objemu vnitřní fáze na velikost částic



Obr.22: Vliv množství léčiva a koncentrace polymeru na velikost částic



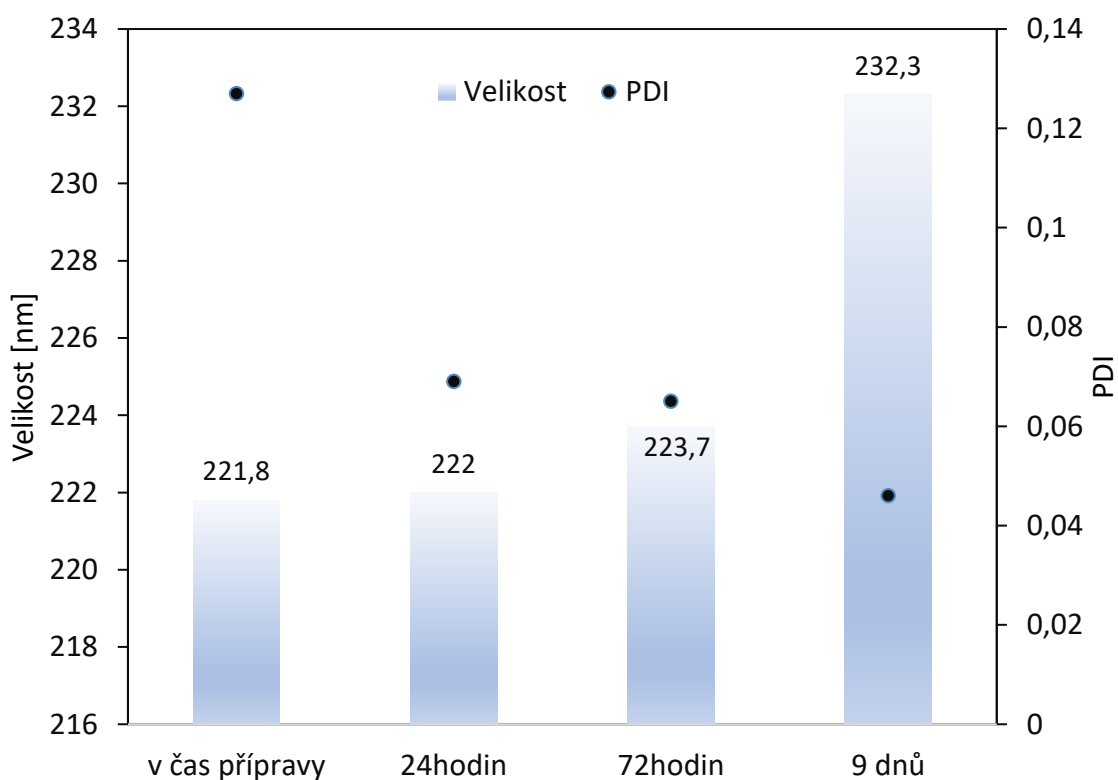
Množství hydrofilního léčiva HI-6 jako jeden z formulačních faktorů, který byl studován na vliv velikosti nanočástic. Jak je zřejmé z Obr. 22 množství léčiva ovlivnilo velikost připravených částic nepatrně. Nanočástice připravené z kontrolního vzorku měly velikost 135,8 nm, nanočástice s 50 mg léčivé látky 182,1 nm.

Jak je patrné z Obr. 22. přibližně dvojnásobně byla velikost ovlivněna koncentrací vnitřní fáze, ačkoliv vzhledem k vlivům více formulačních faktorů (viz. Tab. 6, 8), není validita výsledků zcela přesná. Částice připravené metodou dvojité emulze z 1% roztoku polymeru T3 v DMSO vykazovaly menší velikost, než částice připravené z 5% roztoku polymeru. Jelikož na velikost částic připravených z 5% roztoku T3 se také nejspíš podílelo i větší množství přidávaného léčiva viz Tab. 6, nelze přesně posoudit vliv koncentrace na velikost částic vzhledem ke snížené validitě vlivem více formulačních faktorů. Polydisperzita připravených částic se pohybovala pod hodnotou 0,25.

10.4 Stabilita NČ

Vzhledem ke schopnosti polymerů hydrolyzovat a bobtnat byla studována změna velikosti nanočástic v čase. Na Obr. 23 je porovnávána velikost a polydisperzita NČ připravené 1% T3 stabilizované 1% Pluronicem F127. Hodnoty indexu polydisperzity měřených vzorků nebyly větší než 0,13 s faktorem času se snižovala. Velikost připravených částic se pohybovala v rozmezí přibližně 219 až 232 nm. V závislosti na faktoru času se velikost částic významně nezvyšovala.

Obr. 23: Stabilita částic připravených 1% roztokem T3 v DMSO stabilizované 1% Pluronicem F127



11 ZÁVĚR

Koncentrace polymeru ve vnitřní fázi a molekulová hmotnost polymeru, patří mezi jeden z nejvýznamnějších formulačních faktorů, kterými lze ovlivnit velikost částic. S rostoucí koncentrací polymeru se velikost částic zvyšuje. Podíl vnitřní fáze také ovlivnila velikost připravených částic. S rostoucím objemem vnitřní fáze se velikost nanočástic zvyšovala.

Například vliv tenzidu má jen nepatrný vliv na velikost částic, ale je překvapivé, že je důležité optimalizovat koncentraci podle typu použitého polymeru. Částice připravené 0,5% Pluronicem F127 za použití polymeru A2 aglomerovaly. Na druhou stranu dobré výsledky přinesly částice za použití stejných formulačních faktorů, ale připravené z polymeru T3, jejichž velikost byla v rozmezí 219,1 – 207,5 nm s velice dobrou hodnotou polydisperzity těsně pod 0,2. Velikost částic byla ovlivněná i řadou jiných parametrů, ačkoliv v menší míře.

Perspektivní se ukázala pro formulaci nanočástic metoda dvojité emulze s hydrofilním léčivem připravené z lineárního polymeru PLGA 5:5. Důvodem získání nanočástic menší velikosti lze přisoudit nižší střední molární hmotnosti v porovnání s jinými použitými polymery. Velikost nanočástice získané daným postupem se pohybovala v rozmezí 172 až 189,3 nm s hodnotou PDI 0,2. Těsně pod hranici 200 nm se dostaly částice připravené větveným polymerem A2. Byly získány nanočástice o velikosti 194 nm s výbornou hodnotou polydisperzity (PDI 0,1).

Připravit nanočástice fosfát-citrátovým roztokem o pH 5,0 jako vnější fáze se ukázalo nevhodné, protože částice okamžitě aglomerovaly.

Kladné hodnoty zeta potenciálu byly naměřené při použití didodecylmethylamonium bromidu jako stabilizátor u nanočástic připravené z větveného polymeru A2 v rozmezí 41,2 mV až 45,5 mV, lineárních polymerů PLGA 5:5 64,1 mV, PLGA 7:3 47,9 mV až 48,3 mV a větveného polymeru T3 v rozmezí 34,3 mV až 46,6 mV.

12 POUŽITÁ LITERATURA

1. GHERASIM, Oana, Roxana Cristina POPESCU, Tudor George GHERASIM, Valentina GRUMEZESCU a Ecaterina ANDRONESCU. Pharmacotherapy and nanotechnology. *Nanoparticles in Pharmacotherapy*. Elsevier, 2019, DOI: 10.1016/B978-0-12-816504-1.00002-8. ISBN 9780128165041.

2. JAIN, K.K. Nanomedicine: Application of Nanobiotechnology in Medical Practice. *Medical Principles and Practice*. 2008, **17**(2), 89-101. ISSN 1011-7571. Dostupné z: doi:10.1159/00011296

3. WADHWA, Abishek, Vashish MATHURA a Shaila Angela LEWIS. EMERGING NOVEL NANOPHARMACEUTICALS FOR DRUG DELIVERY. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2018, **11**(7), 35-42. ISSN 2455-3891. doi:10.22159/ajpcr.2018.v11i7.25149

4. KOBRLOVA, Tereza, Jan KORABECNY a Ondrej SOUKUP. Current approaches to enhancing oxime reactivator delivery into the brain. *Toxicology*. 2019, 423, 75-83 ISSN 0300483X. doi:10.1016/j.tox.2019.05.006

5. LUNDY, Paul M., Murray G. HAMILTON, Thomas W. SAWYER a John MIKLER. Comparative protective effects of HI-6 and MMB-4 against organophosphorous nerve agent poisoning. *Toxicology*. 2011, 285(3), 90-96 ISSN 0300483X. doi:10.1016/j.tox.2011.04.006

6. DADPARVAR, Miriam, Sylvia WAGNER, Sascha WIEN, Jürgen KUFLEITNER, Franz WOREK, Hagen VON BRIESEN a Jörg KREUTER. HI 6 human serum albumin nanoparticles—Development and transport over an in vitro blood–brain barrier model. *Toxicology Letters*. 2011, **206**(1), 60-66. ISSN 03784274. doi:10.1016/j.toxlet.2011.06.027

7. KASSA, Jiří, Jana ŽDÁROVÁ KARASOVÁ, Sandra TESAŘOVÁ, Kamil MUSÍLEK a Kamil KUČA. A Comparison of the Potency of Newly Developed Oximes (K347, K628) and Currently Available Oximes (Obidoxime, HI-6) to Counteract Acute Neurotoxic Effects of

Tabun in Rats. *Acta Medica* (Hradec Kralove, Czech Republic) 2010, 53(2), 85-91. ISSN 1211-4286. doi:10.14712/18059694.2016.65

8. ŠVIHOVEC, Jan, Jan BULTAS, Pavel ANZENBACHER, Jaroslav CHLÁDEK, Jan PŘÍBORSKÝ, Jiří SLÍVA a Martin VOTAVA, ed. *Farmakologie*. Ilustroval Miroslav BARTÁK. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-247-5558-8.

9. TELEANU, Daniel, Cristina CHIRCOV, Alexandru GRUMEZESCU, Adrian VOLCEANOV a Raluca TELEANU. Blood-Brain Delivery Methods Using Nanotechnology. *Pharmaceutics*. 2018, 10(4) DOI: 10.3390/pharmaceutics10040269. ISSN 1999-4923.

10. DING, Shichao, Aminul Islam KHAN, Xiaoli CAI, Yang SONG, Zhaoyuan LYU, Dan DU, Prashanta DUTTA a Yuehe LIN. Overcoming blood–brain barrier transport: Advances in nanoparticle-based drug delivery strategies. *Materials Today* DOI:10.1016/j.mattod.2020.02.001. ISSN 13697021.

11. SIM, Tao Ming, Dinesh TARINI, S. Thameem DHEEN, Boon Huat BAY a Dinesh Kumar SRINIVASAN. Nanoparticle-Based Technology Approaches to the Management of Neurological Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, 21(17) ISSN 1422-0067. doi:10.3390/ijms21176070

12. MÄGER, Imre, Axel H. MEYER, Jinghuan LI, Martin LENTER, Tobias HILDEBRANDT, German LEPARC a Matthew J.A. WOOD. Targeting blood-brain-barrier transcytosis – perspectives for drug delivery. *Neuropharmacology*. 2017, 120, 4-7. ISSN 00283908.

13. BERKNER, Silvia, Kathrin SCHWIRN a Doris VOELKER. Nanopharmaceuticals: Tiny challenges for the environmental risk assessment of pharmaceuticals. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2016, 35(4), 780-787 ISSN 0730-7268. doi:10.1002/etc.3039

14. KREUTER, Jörg. Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: What do we know? *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014, 71, 2-14 ISSN 0169409X. doi:10.1016/j.addr.2013.08.008

-
15. ZIELIŃSKA, Aleksandra, Filipa CARREIRÓ, Ana M. OLIVEIRA, et al. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*. 2020, **25**(16) ISSN 1420-3049. doi:10.3390/molecules25163731
16. CEÑA, Valentín a Pablo JÁTIVA. Nanoparticle crossing of blood–brain barrier: a road to new therapeutic approaches to central nervous system diseases. *Nanomedicine*. 2018, **13**(13), 1513-1516. DOI: 10.2217/nmm-2018-0139. ISSN 1743-5889.
17. JIN, Guang-Zhen, Atanu CHAKRABORTY, Jung-Hwan LEE, Jonathan C KNOWLES a Hae-Won KIM. Targeting with nanoparticles for the therapeutic treatment of brain diseases. *Journal of Tissue Engineering*. 2020, **11** ISSN 2041-7314. doi:10.1177/2041731419897460
18. CHOUDHURY, Hira, Bapi GORAIN, Manisha PANDEY, Rajneet Kaur KHURANA a Prashant KESHARWANI. Strategizing biodegradable polymeric nanoparticles to cross the biological barriers for cancer targeting. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019, **565**, 509-522 ISSN 03785173. doi:10.1016/j.ijpharm.2019.05.042
19. REDDY, K. BHASKAR, V VAIJAYANTHI, S.BRITO RAJ, E MOHANAMBAL, R CHARULATHA a Y.MADHUSUDAN RAO. Nanoparticles for Brain Targeting: a road to new therapeutic approaches to central nervous system diseases. *Indian Journal of Novel Drug Delivery*. 2011, 91-97. ISSN 0975-5500. doi/10.2217/nmm-2018-0139
20. EL-SAY, Khalid M. a Hossam S. EL-SAWY. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017, **528**(1-2), 675-691 ISSN 03785173. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.06.052
21. JOSHI, Medha D, Vandana PATRAVALE a Rashmi PRABHU. Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights. *International Journal of Nanomedicine*. ISSN 1178-2013. doi:10.2147/IJN.S56932

-
22. SHAKERI, Shahryar, Milad ASHRAFIZADEH, Ali ZARRABI, et al. Multifunctional Polymeric Nanoplatfoms for Brain Diseases Diagnosis, Therapy and Theranostics. *Biomedicines*. 2020, **8**(1) DOI: 10.3390/biomedicines8010013. ISSN 2227-9059.
23. MIR, Maria, Naveed AHMED a Asim ur REHMAN. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017, **159**, 217-231 ISSN 09277765. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.07.038
24. PATEL, Toral, Jiangbing ZHOU, Joseph M. PIEPMEIER a W. Mark SALTZMAN. Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012, **64**(7), 701-705. ISSN 0169409X. doi:10.1016/j.addr.2011.12.006
25. ZHONG, Yajie, Patrick GODWIN, Yongcan JIN a Huining XIAO. Biodegradable polymers and green-based antimicrobial packaging materials: A mini-review. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*. 2020, **3**(1), 27-35 DOI: 10.1016/j.aiepr.2019.11.002. ISSN 25425048.
26. JEM, K. Jim a Bowen TAN. The development and challenges of poly (lactic acid) and poly (glycolic acid). *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*. 2020, **3**(2), 60-70 DOI: 10.1016/j.aiepr.2020.01.002. ISSN 25425048.
27. MARTINS, Cláudia, Flávia SOUSA, Francisca ARAÚJO a Bruno SARMENTO. Functionalizing PLGA and PLGA Derivatives for Drug Delivery and Tissue Regeneration Applications. *Advanced Healthcare Materials* [online]. 2018, **7**(1). ISSN 21922640. doi:10.1002/adhm.201701035
28. Dostupné 25.12.2020
Poly(lactic-co-glycolic acid). *Poly(lactic-co-glycolic acid)* [online]. Shenzhen, Dostupné z: <https://polylactide.com/polylactic-co-glycolic-acid>
29. ŠNEJDROVÁ, E., I. ČERNÁ a D. SAJKOVÁ. Přírodní polymery v magistraliter přípravě. *Praktické Lékařství*. 2015, **11**(5), 175-179.

-
30. HOOGENBOEZEM, Ella N. a Craig L. DUVALL. Harnessing albumin as a carrier for cancer therapies. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018, 130, 73-89 DOI: 10.1016/j.addr.2018.07.011. ISSN 0169409X.
31. ELZOGHBY, Ahmed O. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research. *Journal of Controlled Release*. 2013, **172**(3), 1075-1091 DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.09.019. ISSN 01683659.
32. JO, Dong Hyun, Jin Hyoung KIM, Tae Geol LEE a Jeong Hun KIM. Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2015, **11**(7), 1603-1611 ISSN 15499634. doi:10.1016/j.nano.2015.04.015
33. AGRAHARI, Vibhuti, Pierre-Alain BURNOUF, Thierry BURNOUF a Vivek AGRAHARI. Nanoformulation properties, characterization, and behavior in complex biological matrices: Challenges and opportunities for brain-targeted drug delivery applications and enhanced translational potential. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2019, 148, 146-180 DOI: 10.1016/j.addr.2019.02.008. ISSN 0169409X.
34. SHARMA, Deepika. POLYMERIC NANOPARTICLES PREPARATION TECHNIQUES AND APPLICATIONS FOR DRUG DELIVERY SYSTEM- A BRIEF REVIEW. *World Journal of Pharmaceutical Research* [online]. 2017, 256-282 ISSN 22777105. Dostupné z: doi:10.20959/wjpr20176-8474
35. BAHRAMI, Behdokht, Mohammad HOJJAT-FARSANGI, Hamed MOHAMMADI, Enayat ANVARI, Ghasem GHALAMFARSA, Mehdi YOUSEFI a Farhad JADIDI-NIARAGH. Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy. *Immunology Letters*. 2017, **190**, 64-83 ISSN 01652478. doi:10.1016/j.imlet.2017.07.015
36. SHAO, Xiao-Ru, Xue-Qin WEI, Xu SONG, Li-Ying HAO, Xiao-Xiao CAI, Zhi-Rong ZHANG, Qiang PENG a Yun-Feng LIN. Independent effect of polymeric nanoparticle zeta potential/surface charge, on their cytotoxicity and affinity to cells. *Cell Proliferation*. 2015, **48**(4), 465-474 ISSN 09607722. doi:10.1111/cpr.12192

-
37. SUR, Srijja, Aishwarya RATHORE, Vivek DAVE, Kakarla Raghava REDDY, Raghuraj Singh CHOUHAN a Veera SADHU. Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system. *Nano-Structures & Nano-Objects*. 2019, **20** ISSN 2352507X. doi:10.1016/j.nanoso.2019.100397
38. TOSI, Giovanni, Teresa MUSUMECI, Barbara RUOZI, Claudia CARBONE, Daniela BELLETTI, Rosario PIGNATELLO, Maria Angela VANDELLI a Giovanni PUGLISI. The “fate” of polymeric and lipid nanoparticles for brain delivery and targeting: Strategies and mechanism of blood–brain barrier crossing and trafficking into the central nervous system. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2016, **32**, 66-76 ISSN 17732247. doi:10.1016/j.jddst.2015.07.007
39. CRUCHO, Carina I.C. a Maria Teresa BARROS. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering: C*. 2017, **80**, 771-784 ISSN 09284931. doi:10.1016/j.msec.2017.06.004
40. Avnesh Kumari, Sudesh Kumar Yadav, Subhash C. Yadav, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Volume 75, Issue 1, 2010, Pages 1-18, ISSN 0927-7765, doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001.
41. Dostupné 23.4.2021
Z., Šklubalová. *Farmaceutické emulze* [Prezentace]. Hradec Králové, 2019, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové
42. BARNABAS, Wilson. Drug targeting strategies into the brain for treating neurological diseases. *Journal of Neuroscience Methods*. 2019, **311**, 133-146 ISSN 01650270. doi:10.1016/j.jneumeth.2018.10.015
43. WOHLFART, Stefanie, Svetlana GELPERINA a Jörg KREUTER. Transport of drugs across the blood–brain barrier by nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2012, **161**(2), 264-273 ISSN 01683659. doi:10.1016/j.jconrel.2011.08.017

-
44. VRIGNAUD, Sandy, Jean-Pierre BENOIT a Patrick SAULNIER. Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. *Biomaterials*. 2011, 32(33), 8593-8604 ISSN 01429612. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.07.057
45. COHEN-SELA, Einat, Michael CHORNY, Nickolay KOROUKHOV, Haim D. DANENBERG a Gershon GOLOMB. A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2009, 133(2), 90-95 ISSN 01683659. doi:10.1016/j.jconrel.2008.09.073
46. PIEPER, Sebastian a Klaus LANGER. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles - a systematic evaluation of preparation techniques and parameters*. *Materials Today: Proceedings*. 2017, 4, S188-S192. ISSN 22147853. doi:10.1016/j.matpr.2017.09.185
47. PHILLIPS, Carolyn L. a Sharon C. GLOTZER. Effect of nanoparticle polydispersity on the self-assembly of polymer tethered nanospheres. *The Journal of Chemical Physics*. 2012, 137(10) ISSN 0021-9606. doi:10.1063/1.4748817
48. SEZIGEN, Sermet, Ozgur ESIM, Meral SARPER a Ayhan SAVASER. In vitro evaluation of two different types of obidoxime-loaded nanoparticles for cytotoxicity and blood-brain barrier transport. *Toxicology Letters*. 2020, 330, 53-58. ISSN 03784274. doi:10.1016/j.toxlet.2020.03.018
49. TEWES, F., E. MUNNIER, B. ANTOON, et al. Comparative study of doxorubicin-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by single and double emulsion methods. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007, 66(3), 488-492. ISSN 09396411. doi:10.1016/j.ejpb.2007.02.016
50. V., JAKUB, KATEŘINA D. a MARTINA K. *PŘÍPRAVA LÉČIVÝCH MIKROČÁSTIC METODOU ODPAŘOVÁNÍ ROZPOUŠTĚDLA*. Brno, 2013 Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/783>. Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno.

51. Carlos E. Astete & Cristina M. Sabliov (2006) Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 17:3, 247-289, DOI: [10.1163/156856206775997322](https://doi.org/10.1163/156856206775997322)

52. MCCALL, Rebecca L. a Rachael W. SIRIANNI. PLGA Nanoparticles Formed by Single- or Double-emulsion with Vitamin E-TPGS. *Journal of Visualized Experiments*. 2013, (82). ISSN 1940-087X. doi:10.3791/51015

53. SNEJDROVA, Eva, Stepan PODZIMEK, Juraj MARTISKA, Ondrej HOLAS a Milan DITTRICH. Branched PLGA derivatives with tailored drug delivery properties. *Acta Pharmaceutica*. 2020, **70**(1), 63-75. ISSN 1846-9558. doi:10.2478/acph-2020-0011

54. HADAR, Justin, Sarah SKIDMORE, John GARNER, et al. Method matters: Development of characterization techniques for branched and glucose-poly(lactide-co-glycolide) polymers. *Journal of Controlled Release*. 2020, **320**, 484-494. ISSN 01683659. doi:10.1016/j.jconrel.2020.02.005

55. Dostupné 25.4.2021

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dimethyl-sulfoxide>

56. MacGregor, W.S. (1967), THE CHEMICAL AND PHYSICAL PROPERTIES OF DMSO. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 141: 3-12. doi.org/10.1111/j.1749-6632.1967.tb34860.x

57. MELANSON, Jeremy E., Nicole E. BARYLA a Charles A. LUCY. Double-Chained Surfactants for Semipermanent Wall Coatings in Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 2000, **72**(17), 4110-4114. ISSN 0003-2700. doi:10.1021/ac000335z

58. P., Khachane, Date A.A. a Nagarsenker M.S. Positively charged polymeric nanoparticles: application in improving therapeutic efficacy of meloxicam after oral administration. *Die Pharmazie [online]*. 2011, 1.5.2011, **66**(5), 5. ISSN 00317144 doi:10.1691/ph.2011.0324

59. MENON, Jyothi U., Soujanya KONA, Aniket S. WADAJKAR, Foram DESAI, Anupama VADLA a Kytai T. NGUYEN. Effects of surfactants on the properties of PLGA

nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2012, 100A(8), 1998-2005. ISSN 15493296. doi:10.1002/jbm.a.34040

60. OTTENBRITE, R.M. a R. JAVAN. *Biological Structures. Encyclopedia of Condensed Matter Physics*. Elsevier, 2005, 2005, s. 99-108. ISBN 9780123694010. doi:10.1016/B0-12-369401-9/00698-7

61. Dostupné 25.4.2021

Český lékopis 2017, První vydání, Grada Publishing a.s., 2017, ISBN: 859-404-924-045-6

62. Dostupné 25.4.2021

https://www.spectrumchemical.com/OA_HTML/chemical-synonym_Pluronic-F127.jsp?pSynonym=Pluronic-F127

63. Dostupné 26.4.2021

Accessories Guide: Zetasizer Nano accessories guide. In: *Zetasizer Nano User Manual*. United Kingdom: Malvern Instruments. Dostupné z: https://www.cif.iastate.edu/sites/default/files/uploads/Other_Inst/Particle%20Size/Accessories%20and%20Cells%20Guide.pdf

64. BARICHELO, Jose Mario, Mariko MORISHITA, Kozo TAKAYAMA a Tsuneji NAGAI. Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1999, **25**(4), 471-476. ISSN 0363-9045. doi:10.1081/DDC-100102197

65. HAMPLOVÁ, Karolína. *Polymerní nanočástice s rifampicinem*. Hradec Králové, 2020. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové. Vedoucí práce PharmDr. Eva Šnejdřová.