

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

POLYMERNÍ ČÁSTICE PRO CÍLENOU TERAPII
ZÁNĚTLIVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Hradec Králové, 2022

Karolina Santarius

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

V Hradci Králové

.....

Karolina Santarius

Děkuji svému školiteli PharmDr. Ondřeji Holasovi Ph.D. a konzultantce Mgr. Barboře Boltnarové za odborné vedení, trpělivost, přátelský přístup a cenné připomínky při zpracování této práce.

1 OBSAH

1	OBSAH.....	4
	ABSTRAKT	6
	ABSTRACT.....	7
2	ÚVOD A CÍL PRÁCE.....	8
3	Teoretická část	9
3.1	Nanočástice jako nosiče léčiv	9
3.2	Polymerní nanočástice	10
3.3	Biodegradovatelné polymery	10
3.3.1	Polyestery.....	10
3.3.2	Polysacharidy.....	14
3.4	Nanočástice v léčbě zánětlivých onemocnění.....	16
3.4.1	Patogeneze NAFLD	17
3.5	Targeting a distribuce nanočástic.....	23
3.5.1	Aktivní targeting	23
3.5.2	Pasivní targeting a biodistribuce.....	24
3.6	Metody přípravy nanočástic.....	26
3.6.1	Metody využívající předem připraveny polymer.....	26
3.7	Metody měření charakteristik nanočástic.....	28
3.7.1	Metoda měření velikosti	28
3.7.2	Index polydisperzity	30
3.7.3	Zeta potenciál.....	30
4	EXPERIMENTÁLNÍ část	33
4.1	Použité suroviny.....	33

4.1.1	Surfaktanty.....	33
4.2	Použité přístroje	36
4.3	Použité metody.....	36
4.3.1	Postup přípravy:.....	36
4.3.2	Charakterizace nanočástic.....	38
4.3.3	Enkapsulační efektivita.....	38
5	Výsledky a diskuze	40
5.1	Velikost částic a polydisperzita.....	42
5.2	Zeta potenciál.....	46
5.3	Enkapsulační efektivita	50
6	Závěr	54
7	Seznam grafů	56
8	Seznam obrázků.....	57
9	Seznam rovnic.....	58
10	Seznam tabulek	59
11	Seznam zkratk	60
12	Bibliografie	62

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Školitel: PharmDr. Ondřej Holas

Konzultant: Mgr. Barbora Boltarová

Posluchač: Karolina Santarius

Název diplomové práce: Polymerní částice pro cílenou terapii zánětlivých onemocnění

Makrofágy jsou heterogenní skupinou buněk, které hrají klíčovou úlohu při zánětlivých onemocněních jako je NASH. Bylo zjištěno, že hlavním faktorem progresu NASH je polarizace jaterních makrofágů na fenotyp M1. Zdá se, že indukovaná přeměna prozánětlivých makrofágů na protizánětlivé je jedním z potenciálních terapeutických cílů. Této přeměny můžeme dosáhnout pomocí transportních systémů, konkrétně nanočástic s enkapsulovaným léčivem.

Cílem této práce bylo připravit a optimalizovat přípravu formulace nanočástic na bázi polymerních nanočástic, kde modelovou látkou byl glukokortikoid dexametazon. Formulace nanočástic byla připravená nanoprecipitační metodou s využitím tří polymerů PLGA s různým poměrem kyseliny mléčné a glykolové. Pro optimalizaci přípravy bylo použito několik povrchově aktivních látek v různých koncentracích. U připravených nanočástic s enkapsulovaným dexametazonem byly pomocí dynamického rozptylu světla zjišťované parametry jako je velikost a index polydisperzity. Zeta potenciál nanočástic byl stanoven pomocí elektroforetického rozptylu světla a množství enkapsulovaného dexametazonu bylo získané pomocí HPLC. Pro rozvětvený polymer se nejlepšího výsledku dosáhlo při použití kombinace surfaktantů 0,5 % cholátu sodného s 1 % Pluronic®F-127, pro lineární polymer PLGA 50:50 byl nejlepší vzorek připravený 0,1 % Tweenem®20 a pro PLGA 75:25 0,5 % Pluronic® F-127. Připravené nanočástice vykazovaly přijatelné vlastnosti pro cílení na makrofágy.

Klíčová slova: PLGA, nanosféry, kortikosteroidy, targeting, zánět

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Mentor: PharmDr. Ondřej Holas, PhD.

Consultant: Mgr. Barbora Boltnarová

Student: Karolina Santarius

Title of thesis: Polymeric particles for targeted anti-inflammatory therapy

Macrophages are heterogenous population of cells, that play crucial role in inflammatory diseases like NASH. It was found that liver macrophages polarization into phenotype M1 is major factor in NASH progression. It seems that induced conversion from proinflammatory macrophages into anti-inflammatory is one of the potential therapeutic target. This macrophages polarization can be achieved by drug delivery system based on drug-loaded nanoparticles.

The aim of this work was to prepare and optimize the preparation of nanoparticles formulation based on polymeric nanoparticles loaded dexamethasone as model substance. The nanoparticles formulation was prepared by nanoprecipitation method using three PLGA polymers with different lactic/glycolic acid ratios. Several surfactants in various concentrations were used to optimize preparation. Prepared dexamethasone-loaded nanoparticles were characterized in terms of their size and polydispersity index using dynamic light scattering. Zeta potencial of nanoparticles was determine by electrophoretic light scattering and encapsulation efficiency was obtained by HPLC. The best results were obtained by using branched polymer PLGA A2 in combination with 0,5% cholate sodium and 1% Pluronic as surfactants, for linear polymer PLGA 50/50 combination of 0,1% Tween and for PLGA 75/25 0,5% Pluronic F-127. Produced nanoparticles showed acceptable properties for macrophage targeting.

Keyword: PLGA, nanospheres, corticosteroids, targeting, inflammation

2 ÚVOD A CÍL PRÁCE

V posledních letech jsme svědky obrovského nárůstu zájmu v oblasti nanotechnologie a nanovědy. Nanotechnologie, jakožto progresivní a rychle se rozvíjející vědní obor, našel uplatnění v různých odvětvích. Výjimkou není ani zdravotnictví. Aplikace nanotechnologie přinesla zdravotnictví celou řadu benefitů.

Ve zdravotnických vědách se nanočástice a nanomateriály využívají k celé řadě aplikací. Anorganické částice jako metalické nanočástice a kvantové tečky se s výhodou využívají pro moderní zobrazovací a diagnostické nástroje. Organické a biokompatibilní částice se využívají jako nosiče léčiv, které mohou modulovat rychlost uvolňování, omezit nebo limitovat toxicitu léčiva, zvýšit biodostupnost a v neposlední řadě zajistit cílenou distribuci léčiva do specifických orgánů, tkání a buněk. Tento typ nano-nosičů léčiv, často také označovaný jako „trojský kůň“, se využívá při terapii onemocnění, jejichž terapie je spojená s výraznými a pro pacienta mnohdy likvidačními nežádoucími účinky. Příkladem je terapie onkologických onemocnění a chronických zánětů.

Materiály používané pro přípravu částic pro opakovanou aplikaci by měly být netoxické, neimunogenní, biokompatibilní a v ideálním případě i biodegradovatelné. Nejčastěji se jedná o lipidické nanočástice, nanočástice z přírodních polysacharidů jako je například chitosan a nanočástice z biodegradovatelných polyesterů jako jsou polymery a kopolymery kyseliny mléčné, glykolové nebo kaprolaktonu.

Cílem této práce bylo připravit nanočástice na bázi poly(mléčné-ko-glykolové kyseliny) pro cílenou terapii zánětlivých onemocnění. Léčivem volby byl protizánětlivý a imunosupresivní glukokortikoid dexametazon.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Nanočástice jako nosiče léčiv

Hlavním problémem v léčbě celé řady závažných onemocnění je nedostatečné dodání účinné látky do cílového místa. Je to dáno charakterem konvekční aplikace léčiv, která se opírá o perorální a parenterální cestu aplikace léčiva v jeho volné formě. Mezi nevýhody běžných lékových forem patří nízká efektivita, nevýhodná biodistribuce a nedostatečná selektivita pro cílovou tkáň. [1] Vhodným řešením těchto potíží jsou právě transportní systémy, které by doručily účinnou látku do cílového místa a zároveň by omezily interakce léčiva se zdravou tkání. [2]

Dle definice WHO nanočástice jsou struktury o velikosti do 1 μm . Běžně v praxi se však předpona *nano-* používá pro částice, které mají do několika stovek nanometrů. [1] Hlavní předností nanočástic je malá velikost, která umožňuje doručení účinné látky do buněk, tkání nebo orgánů, za situací, kdy běžné lékové formy selhávají. [2]

Cílem částicových lékových forem je zlepšit biologickou dostupnost léčivé látky, zvýšit účinnost a selektivitu léčby a zmírnit systémové a lokální nežádoucí účinky léčiva. Nanočástice jako transportní systémy ochraňují léčivo před rychlou degradací, jako je tomu v případě léčiv s rychlou clearance (např. genomická a proteomická léčiva), zvyšují koncentraci léčiva v cílové tkáni a snižují množství léčivé látky potřebné pro efektivní léčbu. [1]

Farmaceutické nanočástice se podle svého složení řadí do několika základních skupin:

- Polymerní částice
- Lipidické částice
- Liposomy
- Metalické částice
- Dendrimery

Tato diplomová práce je zaměřená na polymerní nanočástice, proto jim je v další části věnováno více prostoru.

3.2 Polymerní nanočástice

V posledních letech se polymerní nanočástice staly jednou z nejatraktivnějších skupin lékových forem ve výzkumu ve farmaceutické technologii. [3] Mezi jejich výhody, ve srovnání s ostatními skupinami, patří biokompatibilita, možnost kontroly velikosti, schopnost inkorporace široké palety léčiv včetně těch genomických a proteomických a fakt, že celá řada polymerních materiálů pro jejich přípravu je biodegradovatelná. [4]

Polymerní nanočástice můžeme připravit z přírodních nebo syntetických polymerů. Mezi přírodní polymery řadíme proteiny (např. albumin, kolagen) a polysacharidy (např. chitosan, agar), které nejsou, z důvodu své rozdílné čistoty a potřeby zesíťování, preferovány. [4] Nicméně větší pozornosti se dočkaly nanočástice připravené ze syntetických polymerů, které se dají rozdělit na rozložitelné a nerozložitelné [1].

Mezi biologicky nerozložitelné polymery řadíme například poly(metakrylát), polyakrylamid, polyuretan. Pro přípravu částic se daleko častěji používají rozložitelné materiály jako je kyselina polylactonová (PLA), polyglykolová (PGA) a kopolymer kyseliny mléčné a glykolové (PLGA). [5] Jejich biokompatibilita a biodegradace patří mezi jejich hlavní přednosti. Polymerní částice rovněž prokázaly lepší vstřebatelnost a průchodnost tkáněmi než lipozomy. Výhodou je možnost ovlivnit rychlost degradace změnou poměru kyselin mléčné a glykolové v kopolymeru. [4]

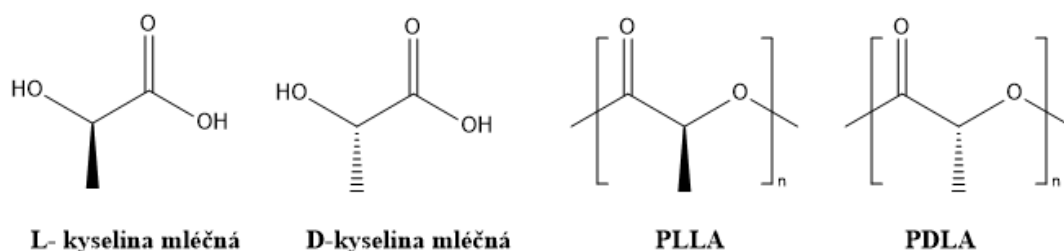
3.3 Biodegradovatelné polymery

3.3.1 Polyestery

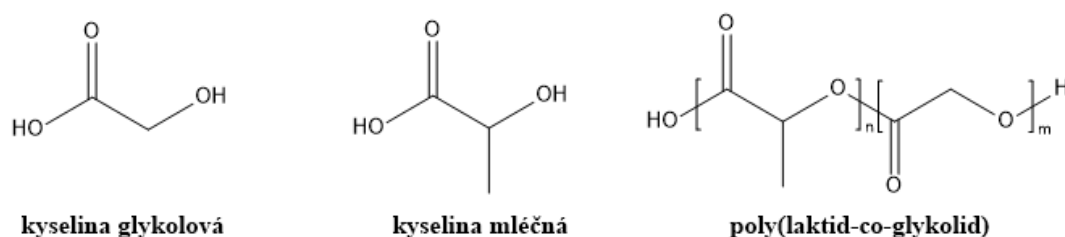
3.3.1.1 Kyselina polylactonová a kopolymer kyseliny mléčné/glykolové

Poly α -hydroxykyseliny jsou nejvíce využívanými polymery v přípravě nanočástic. Jedná se o lineární, alifatické řetězce polyesterů, které vykazují hydrofobní vlastnosti. PLA je homopolymerem, který se skládá z monomerů kyseliny mléčné. Kyselina mléčná je opticky aktivní molekulou, protože obsahuje chirální uhlík. Díky jeho přítomnosti se molekula vyskytuje ve dvou enantiomerních formách

D- a L- mléčná kyselina (Obr. 1). Vysoce optický čisté homopolymery PLA (PLLA, PDLA) jsou krystalické struktury na rozdíl od racemické směsi, která je amorfní strukturou. Krystalické struktury PLA mají konkrétní teplotu tání (~175°C) a hodnotu skelného přechodu (60-65°C), kdežto u amorfní struktury teplotu tání nelze určit, protože se taví v širokém teplotním rozmezí. Z toho důvodu je potřeba odlišovat produkty odvozené od optický čisté L-kyseliny mléčné (poly(L-kyselina mléčná)) nebo od její racemické směsi (poly(DL-kyselina mléčná)). [6; 7] PLA je hydrofobnější než kopolymer PLGA, který navíc obsahuje druhou monomerní jednotku, kyselinou glykolovou (Obr. 2). [8] Přítomnost hydrofilnějšího monomeru glykolové kyseliny ve struktuře PLGA nám přináší řadu výhod ve srovnání s homopolymerem PLA. Nejenom, že snížíme hydrofobicitu polymeru, ale také získáme schopnost modulovat rychlost degradace, krystalinitu a mechanické vlastnosti. Výhody jsou dány ovlivněním poměru kyseliny mléčné a glykolové ve struktuře polymeru. [9]



Obr. 1 Schematická struktura optických izomerů kyseliny mléčné (vlevo) a PLA (vpravo)

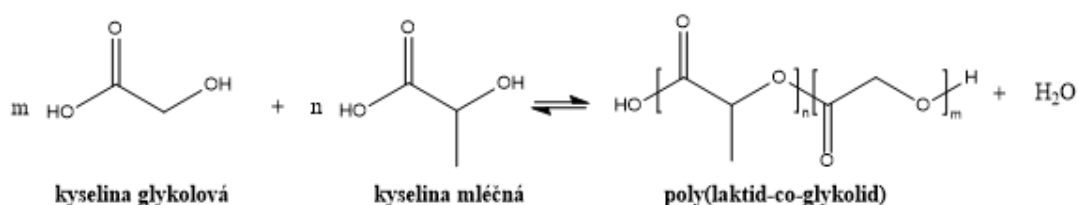


Obr. 2 Schematická struktura kyseliny glykolové, mléčné a kopolymeru PLGA

V diplomové práci se setkáme s poměrem kyseliny mléčné a kyseliny glykolové 50:50, respektive 75:25.

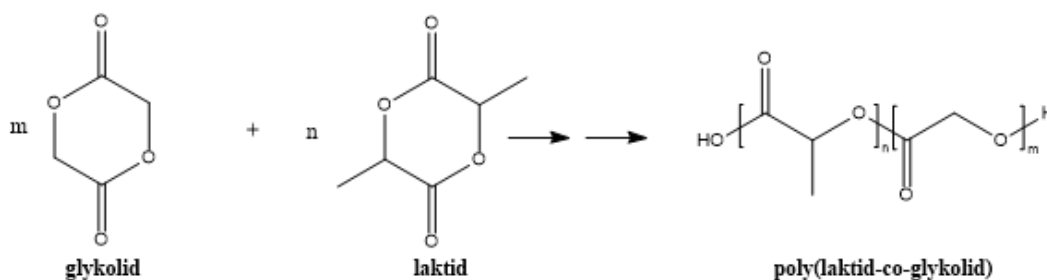
Polymery se hydrolytickým štěpením esterových vazeb odbourávají na netoxické a ve vodě rozpustné produkty. Kyseliny mléčná a glykolová jako degradační produkty hydrolytického štěpení přecházejí do Krebsova cyklu, kde podléhají metabolizaci na oxid uhličitý a vodu. [10]

Polyestery lze syntetizovat dvojím způsobem: polykondenzační reakcí nebo polyadící za otevření kruhu cyklického monomeru (laktidu). [10] Polykondenzace je reakce, při níž dochází ke spojení dvou monomerních jednotek za současného odštěpení vedlejšího produktu, kterým může být voda, amoniak nebo chlorovodík (Obr. 3). [11]



Obr. 3 Schéma polykondenzační reakce

Polymerizace za otevření kruhu cyklického monomeru je v současnosti preferovanou metodou přípravy polyesterů (Obr. 4). Během této metody dochází k tvorbě vysokomolekulární látek z cyklických monomerů za otevření jejich kruhů. Pro průběh reakce je důležitý iniciátor a katalyzátor, vysoká teplota a nízký tlak. Dle typu použitého iniciátoru může být polymerační reakce klasifikovaná jako aniontová, kationtová nebo koordinačně-inzerční. Mezi používané katalyzátory se řadí alkoxidy kovů (Mg, Zn, Si). Hnací silou této polymerace je uvolnění pnutí v kruhu cyklického monomeru. Výhodou reakce je menší množství vedlejších produktů a kratší reakční doba. [12; 13; 6]



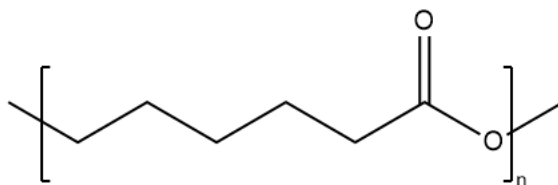
Obr. 4 Schéma polymerizace za otevření kruhu cyklických monomerů

Tyto polymery byly jako první v 70. letech 20. století schváleny FDA pro výrobu bioresorbovatelných chirurgických šicích materiálů. [10] Z výše uvedeného plyne, že se polyestery jeví jako vysoce atraktivní a lety osvědčené materiály pro tvorbu transportních systémů.

3.3.1.2 Poly(ϵ -kaprolakton) (PCL) (Obr. 5)

PCL je alifatický hydrofobní netoxický polyester, který lze získat polyadící za otevření kruhu ϵ -kaprolaktonu. Jedná se o materiál, který je rovněž schválený FDA [8]. V medicíně se uplatňuje jako šicí materiál na rány a také jako nosič kontracepční látky levonogestrelu. Díky vysoké biokompatibilitě je široce používán jako scaffoldy pro tkáňové inženýrství. [9]

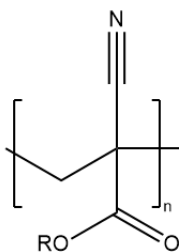
Hydrolyza polymeru poskytuje kyselinu 6-hydroxykapronovou, která je rozpustná ve vodě a vylučuje se močí. [8] Samotný proces degradace je ve srovnání s časem degradace PLGA (11-15 týdnů) pomalý, protože trvá přibližně 2-3 roky. Důvodem je hydrofobicita polymeru. A proto se někdy PCL kombinuje s dalšími odbouratelnými polymery. [10; 14; 15]



Obr. 5 Struktura poly(ϵ -kaprolaktonu)

3.3.1.3 Poly(alkylkyanoakrylát) (PAC)

Polymery ze skupiny polyalkylakrylátů jsou biodegradovatelné a biokompatibilní (Obr. 6). Ethylkyanoakrylát, N-butylykyanoakrylát, octylkyanoakrylát byly schválené FDA pro klinické užití. PAC lze využít v medicíně jako chirurgické a kožní lepidlo. Z důvodu adhezivních vlastností jsou považovány za slibné materiály pro tvorbu transportních systémů. [8; 10]



Obr. 6 Obecná struktura poly(alkyl kyanoakrylátu)

Tyto polymery jsou připravované nejčastěji aniontovou polymerizací z akrylových monomerů. Pro iniciaci polymerní reakce je nutná přítomnost alespoň stopového množství vody. [9]

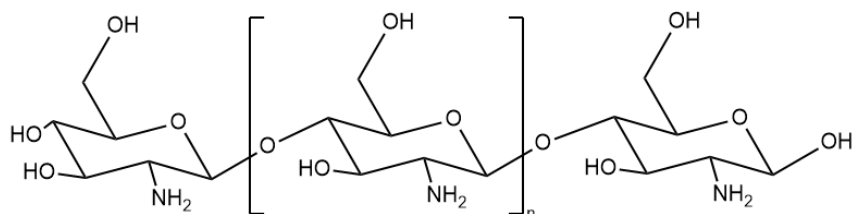
Degradace těchto polymerů je jedna z nejrychlejších reakcí. Časy degradace jsou závislé na délce řetězce příslušného alkyly. Nižší alkylové deriváty se rozpadnou ve vodném prostředí během hodin, nicméně nejsou využívány z důvodu uvolnění toxických produktů jako je formaldehyd a kyselina kyanoacetátová. Proto se výzkum soustředil na vyšší deriváty jako je octylkyanoacetát nebo isobutylkyanoacetát. Jejich hydrolyza vede ke sloučeninám ve vodě rozpustným - octanolu, isobutylalkoholu a kyselině polykyanoakrylové. Tyto sloučeniny jsou poté eliminovány renálně. [9]

Výhodou polykyanoakrylátů je schopnost absorbovat a enkapsulovat širokou škálu léčiv (hormony, cytostatika, proteiny a další). PACA nanočástice byly použité pro enkapsulaci antibiotik jako je ampicilin a ciprofloxacin. Bylo zjištěno, že enkapsulace zvýšila účinnost ampilicinu 120krát na modelu salmonelózy. Studie in vivo ukazují, že nanočástice PACA se daleko více kumulují v lymfatických uzlinách, než jiné transportní systémy jako jsou například lipozomy. [9]

3.3.2 Polysacharidy

3.3.2.1 Chitosan

Lineární polysacharid vyráběný deacetylací chitinu. Chitosan, jako přirozeně se vyskytující kationický polymer, se používá v mnoha medicínských aplikacích jako je například tvorba obvazů nebo částicových lékových forem (Obr. 7). [9]



Obr. 7 Struktura chitosanu

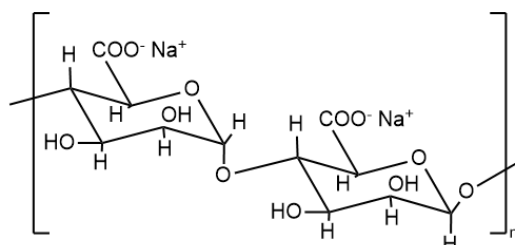
Jeho degradace in vivo probíhá pomocí enzymů, které hydrolyzují vazby: glukosamin-glukosamin, N-acetylglukosamin-N-acetylglukosamin nebo glukosamin-

N-acetylglukosamin. U obratlovců probíhá degradace pomocí bakteriálních enzymů tlustého střeva v lyzozomálních buňkách. [8]

Díky výraznému kladnému náboji může velice dobře interagovat ze záporně nabitou sliznicí, a tím pádem působit jako mukoadhezivum. Navíc chitosan je schopen vyvolat přechodné otevření těsných spojů a tím zvyšovat permeabilitu sliznic zejména pro polární léčiva. Díky mukoadhezivním vlastnostem chitosanových částic došlo ke zlepšení absorpce insulinu ze střev po perorálním podání. Rovněž částice s inkorporovaným cyklosporinem A zvýšily doručení léčiva do vnějších částí oka. [9]

3.3.2.2 *Alginát*

Alginát je biodegradovatelný a biokompatibilní polysacharid skládající se z kyseliny L-glukuronové a D-mannurové (Obr. 8). Jedná se o anionický polymer, který vykazuje řadu specifických vlastností, kterými jsou citlivost na pH, biologická odbouratelnost, netoxičita, neimunogenita, mukoadhezivita, nízká cena a dostupnost materiálu. Výhodou je, že nedráždí horní gastrointestinální trakt, takže může být aplikován perorálně. Jedná se o běžnou pomocnou látku, která v přítomnosti vícemocných iontů gelovatí. Samotný alginát se využívá v léčbě refluxní ezofagitidy. [16]



Obr. 8 *Struktura alginátu*

Algináty mají široké uplatnění v potravinářském průmyslu. Používají se jako stabilizátory nápojů, zmrzliny nebo želé. Ve farmaceutickém průmyslu 1-5% kyselina alginová má uplatnění jako pojivo a rozvolňovadlo, pak jako stabilizátor v emulzních systémech o/v a viskozifiant u krémů, past a gelů. Její sodná sůl se používá v přípravě perorálních lékových forem s prodlouženým uvolňováním. Alginátové nanočástice byly testovány jako potenciální nosiče chemoterapeutik. Alginát sodný byl komplexován s doxorubicinem a stabilizován povrchově aktivní látkou Aerosol OT.

Ze studie Transwell® bylo zjištěno, že tyto nanočástice zlepšují transport doxorubicinu přes buňky, které vykazují nadměrnou expresi P-glykoproteinu. [16]

3.4 Nanočástice v léčbě zánětlivých onemocnění

Chronická jaterní onemocnění související kromě jiného i s pandemií obezity představují v dnešní době celosvětový zdravotní problém. Jedná se o onemocnění, která mohou být infekčního (virová hepatitida A-F, infekční mononukleóza apod.) nebo neinfekčního původu (nadměrná konzumace alkoholu, obezita, otrava houbami nebo chemikáliemi). Specifickou skupinou onemocnění jater jsou vrozené, či nabyté poruchy, které souvisejí s výživou a metabolismem.

Nealkoholické ztučnění jater (NAFLD – non-alcoholic fatty liver disease) je skupinou onemocnění, pro která je charakteristické ztukovatění jater vyskytující se u osob bez významné konzumace alkoholu. Odhadovaná globální prevalence činí kolem 25 %. [17] Progresí NAFLD je nealkoholová steatohepatitida (NASH – non-alcoholic steatohepatitis), která kromě prostého NAFLD, zahrnuje zánětlivé změny. NASH dále může progredovat do fibrózy, cirhózy a často též do hepatocelulárního karcinomu. [18] Z důvodu vysoké prevalence je nejčastějším důvodem pro transplantaci jater. [19]

Bylo zjištěno, že NAFLD se daleko častěji vyskytuje v kombinaci s rizikovými faktory metabolického syndromu. Mezi rizikové faktory metabolického syndromu řadíme obezitu, dyslipidémii, inzulínovou rezistenci, hyperglykémii a hypertenzi. O metabolickém syndromu hovoříme až tehdy, kdy u pacienta nacházíme tři a více zmíněných rizikových faktorů. Nemocní s metabolickým syndromem mají 2-3x vyšší riziko pro vznik kardiovaskulárních, cerebrovaskulárních onemocnění a 5x vyšší riziko rozvoje diabetu mellitu 2. typu. [20]

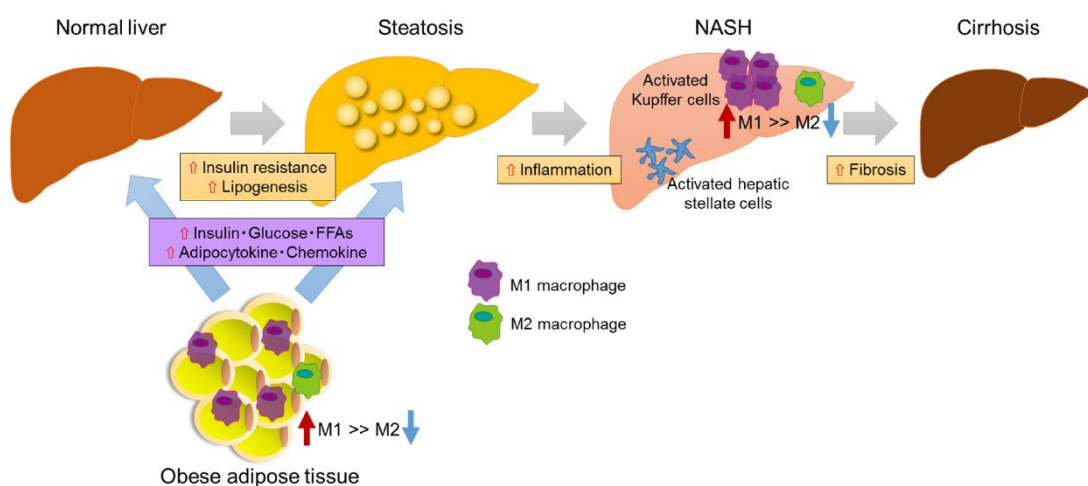
Zmíněné rizikové faktory MS lze ovlivnit jak nefarmakologickou, tak farmakologickou léčbou. Bohužel z důvodu neúplného porozumění mechanismu patogeneze NAFLD, je léčba založená pouze na nefarmakologickém podkladě. Cílem léčby je motivace pacienta k úpravě životního stylu a dietních zvyklostí s redukcí hmotnosti. [21] Nicméně, nefarmakologická léčba nemusí být účinná zvláště u pacientů u nichž stav progredoval v jaterní fibrózou nebo cirhózou. A proto je

v poslední dekádě výzkum zaměřen na vývoj nových léčiv, které by cílily na doposud zjištěné patologické dráhy NASH.

3.4.1 Patogeneze NAFLD

Jak bylo zmíněno dříve, mechanismy patogeneze a progresu NAFLD nejsou úplně pochopeny. Na základě současného stavu poznání patologických pochodů byla formulovaná teorie, která se skládá ze dvou částí.

První část popisuje vznik NAFLD. Výskyt inzulinové resistance a nadměrného množství mastných kyselin v krevním oběhu jsou klíčovými prvky pro nadměrnou akumulaci tuků v játrech, a to zejména v hepatocytech, ale také v rezidentních jaterních makrofázích, Kupfferových buňkách. Druhá část popisuje vývoj NAFLD k závažnějším formám (Obr. 9). Progrese NAFLD je založená na výskytu oxidativního stresu, peroxidaci lipidů a mitochondriální dysfunkci. [22]



Obr. 9 Patogeneze progresu NAFLD [22]

3.4.1.1 Od inzulinové resistance po steatózu

Hlavní charakteristikou NAFLD je přítomnost ektopického tuku v jaterních buňkách. Hepatocyty jsou parenchymatické jaterní buňky, které mohou tvořit kolem 80 % objemu jater. V hepatocytech se lipidová složka ukládá ve formě triacylglyceridů (TAG), nicméně můžou se objevit i jiné formy lipidů jako jsou například volné mastné kyseliny (FFA), diacylglycerol (DAG), cholesterol, cholesterol ve formě esterů, ceramidy a fosfolipidy. [19]

Nadměrný energetický příjem a nedostatečný pohyb vedou ke kalorickému nadbytku, který se projevuje zvětšením tukových zásob. Jedná se o hlavní faktory, které jsou příčinou vzniku inzulínové rezistence.

Inzulín je hormon sekrenovaný β -buňkami pankreatu, který umožňuje transport glukózy do buněk. Následkem IR stoupá v játrech glukoneogeneze a výdej glukózy hepatocyty. Nicméně IR je charakterizována sníženou schopností jaterní, tukové a svalové tkáně reagovat na inzulín. Tudíž buňky nedostávají energetický přísun glukózy. Výsledkem toho procesu je nárůst glykémie, čímž dochází ke stimulaci β -buněk pankreatu a vzniku hyperinzulinémie, která je schopná, i přes IR, krátkodobého udržování normoglykémie. V určitém stavu kompenzační mechanismus nestačí a β -buňky pankreatu se funkčně vyčerpají. [23] Výsledkem je hyperglykémie a rozvoj diabetu mellitu 2. typu.

Z důvodu vyčerpání β -buněk pankreatu, dochází k minimální produkci inzulínu. Výsledkem je ztráta schopnosti inzulínu, potlačit tvorbu glukózy v játrech a uplatnit své antilipolytické účinky na tukovou tkáň. Zvýšená lipolýza tukové tkáně vede ke zvětšenému uvolňování FFA, které přecházejí do jater, kde se po metabolizaci na TAG, ukládají v cytosolu hepatocytů ve formě tukových kapiček. [19] O steatóze mluvíme tehdy, kdy je poškozeno tukem více než 5 % hepatocytů. [18]

3.4.1.2 *Steatohepatitida neboli NASH*

Nadměrná akumulace tuků v játrech je úzce spjatá s výskytem zánětlivé reakce. Klíčovou úlohu při přechodu ze steatózy k zánětu jater hrají tuková tkáň a oxidativní stres.

Tuková tkáň, kromě toho, že se uplatňuje jako rezervoár energie, je rovněž endokrinním orgánem vylučujícím hormony (leptin, adiponektin) a skupinu cytokinů neboli adipokinů. Mezi adipokiny řadíme tumor nekrotizující faktor (TNF- α), rezistin, a angiotensin II, které jsou schopné indukovat IR a zánětlivou reakci v játrech, prostřednictvím kaskád c-Jun NH₂-terminalní kinázy-1, IkappaB kinázy (IKK)/ nukleárního transkripčního faktoru κ B (NF- κ B). Indukce kaskády IKK/NF- κ B vede ke zvýšenému uvolňování prozánětlivých cytokinů jako je interleukin-6 (IL-6), interleukin 1-beta (IL1 β), TNF- α a aktivací jaterních makrofágů neboli Kupfferových buněk. [24] Zmiňované prozánětlivé cytokiny aktivují zánětlivé odpovědi

v endoteliálních buňkách, podporují lipolýzu v adipocytech, inhibují tvorbu adiponektinu. [25] Adiponektin je hormon, který reguluje β -oxidaci MK a omezuje akumulaci lipidů v játrech a tukové tkáni. Ochraňuje před zánětem a fibrotizací jater, protože antagonizuje účinky TNF- α , inhibuje lipogenezi a zvyšuje inzulínovou senzitivitu. Druhý sekrenovaný hormon tukové tkáně, leptin, má imunomodulační efekt, stimuluje tvorbu mediátorů zánětu, čímž přispívá k progresi NAFLD. [25]

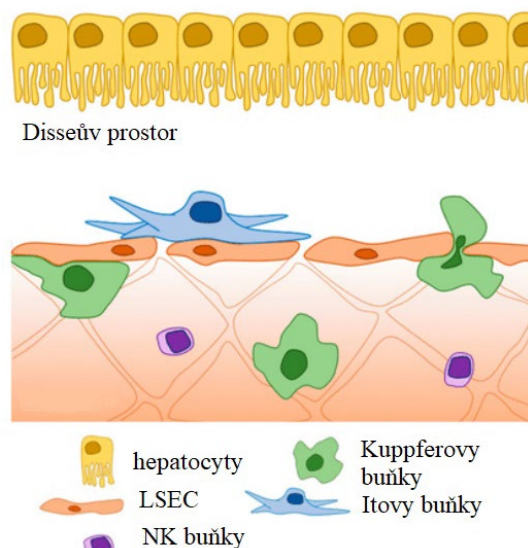
Dalšími faktory vedoucími k progresi NAFLD jsou oxidativní stres a mitochondriální dysfunkce.

Hlavním původcem oxidativního stresu jsou reaktivní formy kyslíku (ROS), které vznikají v malém množství během glykolýzy a β -oxidace MK. Tyto metabolické dráhy pro vznik energie, spotřebují kyslík. Z kyslíku vznikají toxické látky označované jako kyslíkové radikály, které jsou silnými oxidativními a reaktivními látkami schopnými poškodit buňky. [26] Vznik a přítomnost ROS v buňce je přísně regulována pomocí antioxidantních systémů (superoxiddismutáza, peroxidáza vitamín E, redukovaný glutation). [27]

Ovšem v patologickém stavu NAFLD dochází ke zvýšenému přísunu FFA do hepatocytů a ztrátě schopnosti inzulínu inhibovat β -oxidaci MK. To se projeví zvýšeným uvolňováním ROS, které jsou mimo kontrolu antioxidantních ochranných systémů. Mitochondrie jsou jako první vystaveny účinkům ROS, které způsobují rozpojení procesu oxidace a fosforylace. ROS aktivují zánětlivé dráhy, které vedou k produkci TNF- α a iniciaci peroxidaci lipidů, čímž způsobí poškození v první řadě mitochondrii, pak celé buňky. Následuje buněčná smrt. Apoptóza hepatocytů způsobená peroxidací nadbytečných triacylglyceridů, je kritickým krokem v progresi NAFLD k NASH. Poškozené hepatocyty jsou dále fagocytovány Kupfferovými buňkami. Tento děj vede k aktivaci hvězdicovitých buněk a fibrogenézi. [24]

3.4.1.3 Buňky spojené s progresí onemocnění NAFLD

Játra jsou tvořena čtyřmi hlavními typy buněk, mezi které řadíme hepatocyty, Kupfferovy buňky (KC), jaterní hvězdicovité buňky (hepatic stellate cells (HSC), Itovy buňky) a sinusoidální endoteliální buňky (LSEC) (Obr. 10). Tyto buňky se zásadním způsobem podílejí na složitém procesu, jakým je iniciace zánětu, jeho progresse a rozvoj jaterní fibrózy.



Obr. 10 Schematický obrázek jaterních buněk

Itovy buňky se nacházejí v perisinusoidálním prostoru, mezi hepatocyty a endoteliálními buňkami krevních sinusoid, což popisujeme jako Disseův prostor. Hlavní funkci HSC u zdravých jedinců je deponace tukových kapének, které obsahují vitamín A. V průběhu onemocnění jater, HSC podstupují diferenciaci na myofibroblasty, které produkují velké množství proteinů jako je kolagen typu I a III. Proteiny vedou k fibróze, která je výsledkem nadměrné produkce pojivové tkáně. [28]

Aktivace HSC může být spouštěná působky buněk imunitního systému, zejména makrofágy. Makrofágy jsou schopné rozpoznat patogenní hrozby na základě rozpoznání molekulárních vzorů asociovaných s patogenem (PAMP) nebo molekulárních vzorů spojených s poškozením (DAMP). Tyto signály spouští zánětlivou kaskádu v makrofázích. Výsledkem je uvolnění velkého množství cytokinů, zejména IL-6 a TNF- β , které aktivují diferenciaci a cytokinů CCL2, CCL3, CCL4, které zodpovídají za migraci HSC. [28]

Makrofágy jsou populací buněk, které se v hojném počtu vyskytují v játrech. Mezi jaterní makrofágy začleňujeme KC a čerstvě diferencované cirkulující monocyty. KC jsou rezidentními nemigrujícími makrofágy jater, které spolu s LSEC tvoří výstelku jaterních sinusoid. Tyto buňky se vyvíjejí z progenitorových buněk pocházejících z fetálního žloutkového vaku. Hlavní funkcí KC je rozpoznat, fagocytovat a degradovat patogeny, buněčné zbytky nebo cizí materiál. Eliminací buněčných zbytků a mrtvých buněk zajišťují homeostázu v játrech. Na rozdíl od KC, monocyty pocházejí z hematopoetické kmenové buňky a jsou schopny migrace. [29]

V důsledku poškození tkáně, Kupfferovy buňky a další jaterní buňky (HS, hepatocyty) sekretnují chemokiny CCL2, které provokují masovou infiltraci prozánětlivých monocytů z kostní dřeně do krevního oběhu. Cirkulující monocyty jsou přitahovány k poškozeným játrům pomocí chemokinového receptoru 2, který vede k infiltraci změněných monocytů přes jaterní tkáň. [29] V jaterní tkáni se monocyty diferencují na makrofágy M1, které vedou k progresi chronického poškození jater prostřednictvím diferenciací a proliferace HSC. [30]

3.4.1.3.1 Polarizace makrofágů

Makrofágy odvozené z cirkulujících monocytů podléhají diferenciaci na dva základní fenotypy v závislosti na cytokinovém prostředí. Reagují také na vnější podněty jako jsou poškozené buňky, aktivované lymfocyty nebo mikrobiální produkty.

Pro makrofágový fenotyp 1 (M1) je charakteristická produkce vysokých hladin prozánětlivých cytokinů a reaktivních kyslíkatých a dusíkatých molekul, mikrobicidní vlastnost a aktivace lymfocytární Th1 odpovědi. Lipopolysacharid, interferon-gama a růstový faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF) jsou zodpovědné za polarizaci makrofágů na fenotyp M1, čímž dochází ke stimulaci uvolňování prozánětlivých cytokinů jako je IL1 β , TNF- α , IL-12, IL-18 a IL23. To je klíčový krok pro spouštění lokální zánětlivé reakce vedoucí k poškození hepatocytů. V důsledku poškození, hepatocyty sekretnují DAMPs, které aktivují KC prostřednictvím signalizační cesty Toll-like receptor. Tímto procesem dochází k vytvoření zánětlivého kruhu. V kontextu onemocnění se tyto makrofágy podílejí na iniciaci a propagaci zánětů, a proto jsou označovány jako prozánětlivé makrofágy. [31]

Naproti tomu, makrofágový fenotyp 2 (M2) se podílí na ochraně organismu před parazity a fungálními infekcemi, zmírňuje zánětlivou reakci a podporuje hojení rán. Nicméně přispívá k růstu nádorů. Aktivace fenotypu 2 je indukována parazity, fungálními buňkami, apoptickými buňkami, imunitními komplexy, faktorem stimulujiícím kolonie makrofágů, signálními molekulami jako je IL-4, IL-13, TGF- β a také léčivy, glukokortikoidy. [32] Aktivované M2 produkují protizánětlivý IL-10 a transformující faktor TGF- β , čímž vedou k inhibici prozánětlivých cytokinů produkovaných makrofágy a DC. Tento fenotyp je označován jako protizánětlivý. [33]

Diferenciace makrofágů je dynamickým procesem. V závislosti na prostředí můžou rychlé přejít z jednoho fenotypu na druhý. Je známo, že právě polarizace makrofágů na fenotyp 1 je klíčovým faktorem pro progresi onemocnění NASH. A proto indukovaná přeměna z prozánětlivého makrofágu na protizánětlivý je jedním z potenciálních terapeutických cílů, který by vedl k léčbě jaterního zánětlivého onemocnění NASH. [34]

3.4.1.4 Potenciální terapie NASH

Glukokortikoidy jsou syntetickými deriváty přirozeného lidského steroidního hormonu kortizolu. Jako léčiva jsou známá hlavně pro svůj protizánětlivý a imunosupresivní účinek. Podílejí se na metabolismu glukózy, proteinů, tuků, vody a minerálů. Ovlivňují kardiovaskulární systém, metabolismus kostí a vykazují antialergické působení a antiproliferační účinek. Vzhledem k široké škále účinků jsou používána prakticky ve všech oborech medicíny. Uplatňují se v léčbě zánětlivých a revmatických onemocnění, systémového lupus erythematoses, alergických stavů (astma), rejekčních reakcí po transplantacích, gastrointestinálních onemocnění (ulcerózní kolitida, Crohnova nemoc) a dalších nemocí. [35]

Glukokortikoidy se vážou na glukokortikoidní receptor v cytosolu a vytváří tzv. komplex glukokortikoid + receptor, který přechází do buněčného jádra a naváže se na specifické místo na určitých genech, čímž podpoří expresi genů a tím syntézu konkrétních proteinů. [36]

Tento komplex vycytává a váže transkripční faktory, kterými jsou aktivační protein 1 a nukleární faktor kappa B (NF- κ B), čímž vede k potlačení exprese zánětlivých proteinů. Zároveň podporuje transkripci protizánětlivých proteinů

(lipokortin-1). **Glukokortikoidy mají rovněž schopnost polarizovat makrofágy na protizánětlivý fenotyp.** Výsledkem je zvýšená exprese protizánětlivých cytokinů a fagocytární aktivita vůči apoptickým buňkám. Což vede k potlačení zánětů a remodelaci tkání. [32]

Kortikoidy vykazují řadu nežádoucích účinků, z nichž některé mohou způsobit závažné zdravotní problémy. Platí pravidlo, čím déle se používají k léčbě, tím více se projevují nežádoucí účinky. Tyto nežádoucí účinky se přirovnávají k symptomům Cushingova syndromu, který se vyznačuje vysokou hladinou kortizolu. Mezi nežádoucí účinky patří snížená rezistence vůči bakteriím, mykotickým infekcím, pomalejší hojení rán, svalová slabost, osteoporóza, hypertriacylglyceridémie, hypertenze, deprese, akné, inzulinová rezistence, přibírání na váze. Dosud neexistují látky, které by zachovaly protizánětlivý účinek a zároveň nevykazovaly závažné nežádoucí účinky. [36] Jednou z možností je právě inkorporace těchto látek do lékové formy, která by omezila systémové nežádoucí účinky a zefektivnila léčbu přímým zacílením do poškozeného místa. V našem případě, nanočástice s obsahem dexametazonu zacílené na makrofágy v játrech.

Z výše uvedeného lze tedy vyvodit, že makrofágy jsou velmi atraktivním cílem pro terapii NASH. Zejména změna polarizace z prozánětlivého na protizánětlivý fenotyp v raných fázích NASH je potenciálně velmi přínosná.

3.5 Targeting a distribuce nanočástic

Jednou z hlavních výhod, kterou nanotechnologie poskytuje je možnost specifického zacílení léčiva ve formě nanočástic. Toho lze dosáhnout pomocí aktivního nebo pasivního mechanismu.

3.5.1 Aktivní targeting

Aktivní targeting dokáže významně zvýšit množství léku v konkrétní tkáni. Tohoto je dosaženo pomocí signálních molekul, kterými jsou protilátky, peptidy a aptamery. Tyto molekuly se využívají na úpravu povrchu nanonosiče. Mechanismus aktivního targetingu spočívá ve specifické interakci mezi cílicí molekulou a cílovým místem/receptorem. Signální molekula neboli ligand může být na povrchu nanočástice

navázána dvěma způsoby: kovalentně a nekovalentně. U nekovalentní vazby se uplatňují elektrostatické a hydrofobní interakce. Z důvodu větší stability se kovalentní způsob uplatňuje daleko častěji. Ligand může být navázán kovalentním způsobem přímo na nanočástici anebo může mít zprostředkovatele v podobě linkerů, kterými mohou být sukcinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyklohexan-1-karboxylát, sukcinimidyl iodoacetát. Klíčovým aspektem použití aktivního targetingu je znalost receptorů exprimovaných v cílovém místě. Právě díky této znalosti jsme schopni navrhnout vhodný ligand, který se spojí s receptorem a zajistí cílenou distribuci léčiva do konkrétního místa. [8] Mezi známé, exprimované na povrchu, makrofágové receptory patří manózový receptor (MR) a fosfatidylserinový receptor (PSR). Manózový receptor je zodpovědný za rozeznání PAMP molekul. Po aktivaci MR dochází ke spuštění endocytózy a fagocytózy antigenu, který obsahuje buď manózu, fukózu, N-acetylglukosamin nebo glukózu. [37] Aktivace PSR rovněž vede ke spuštění fagocytózy apoptických buněk. Tyto buňky na svém povrchu exprimují fosfatidylserin, ligand, který se naváže na PSR a spustí fagocytózu. [38; 39] V případě, že chceme nanočásticemi cílit na MR, je potřeba, aby povrchy byly dekorované manózou. Pro PSR je potřeba vytvořit částice s fosfatidylserinem.

3.5.2 Pasivní targeting a biodistribuce

V pasivním targetingu se využívá fyzikálně-chemických vlastností nanočástic, kterými jsou velikost, náboj, hydrofobicita a tvar. Tyto vlastnosti ovlivňují biodistribuci nanočástic v organismu. Pro pasivní makrofágový targeting je potřeba, aby polymerní nanočástice byly hydrofobní, negativně nabitě a jejich velikost se pohybovala v rozmezí 100-300 nm. [40]

Většina formulací pro cílené podání se podává parenterální cestou. Při intravenózním podání dochází ke vstupu nanočástic do systémové cirkulace. V krevním řečišti jsou nanočástice náchylné k agregaci a proteinové opsonizaci. Opsonizace spočívá v navázání proteinů na povrch nanočástic, čímž naznačí imunitnímu systému, že se jedná o cizí strukturu, kterou je potřeba eliminovat z organismu. Opsonizované nanočástice jsou odstraněny z krevního řečiště pomocí fagocytárních buněk, jejichž největší zastoupení je v játrech a slezině, lymfatických uzlinách a kostní dřeni. Kupfferovy buňky v játrech jsou největší populací makrofágů,

kteřé jsou v kontaktů s krví, a proto po intravenózní aplikaci jsou nanočástice pohlcovány těmito buňkami. Nanočástice mohou být pohlceny i jinými jaterními buňkami, kde ale nezůstávají dlouho. Vylučuji se do žluče. V návaznosti na hepatální clearance, nanočástice můžou být rovněž vylučovány renální cestou. K tomu, aby prošly přes membránu glomerulu, je důležitá jejich velikost. [41]

3.5.2.1 Velikost

Velikost je jedna z hlavních charakteristik, která ovlivňuje cirkulaci a biodistribuci terapeutických nanočástic. Velikost 6-10 μm je charakteristická pro cílenou plicní distribuci. Všechny injekčně aplikované částice větší než 100 nm a menší než 6 μm jsou identifikovány makrofágy jako cizorodé. Částice s velikostí 30-100 nm jsou makrofágy ignorovány, a proto je jejich doba cirkulace podstatně delší. Tudíž pro cílený zásah na makrofágy potřebujeme velikost částic větší než 100 nm. Nicméně některé články uvádí rozmezí 100-300 nm. [40; 8]

3.5.2.2 Náboj

Povrchový náboj nanočástic je důležitým prvkem, který ovlivňuje clearance a terapeutické dodání. Pozitivně nabitě částice generují vyšší imunitní odpověď, což zkracuje jejich pobyt v krevním řečišti. Na rozdíl od záporně nebo neutrálně nabitých částic se akumulují v plicích a nádorové tkáni. [42] Dle článku [43] fagocytující buňky přednostně interagují se záporně nabitými částicemi, což je vysvětlováno na základě fagocytózy bakterií, které mají také negativně nabitý povrch. Neutrální a záporně nabitě povrchy částic významně prodlužují biologicky poločas stráveny v systémovém řečišti, čímž se stávají vhodnými kandidáty pro EPR, což je koncept, ve kterém molekuly o určité velikosti mají tendenci se akumulovat v nádorové tkáni daleko více než v normálních zdravých tkáních. Pro uplatnění toho konceptu je důležitý zmiňovány dlouhý biologický poločas. [44] Povrchový náboj se obvykle charakterizuje pomocí zeta potenciálu.

3.5.2.3 Hydrofobicita a hydrofilita

Dalším klíčovým faktorem pro pasivní makrofágový targeting je hydrofobicita molekuly. Studie ukazují, že čím vyšší hydrofobicita částice, tím je opsonizace větší. Pro makrofágový pasivní targeting je žádoucí omezit hydrofilitu nanočástic.

Nežádoucí je úprava povrchu nanočástic pomocí polyethylenglykolu (PEG) nebo polyethylenoxidu. Vede to ke zvýšení hydrofility nanočástic, což se projeví sníženou opsonizací a menším vychytáváním nanočástic přes makrofágy. Výsledkem PEGylace je prodloužený biologický poločas a únik před fagocytárními buňkami. [45]

3.6 Metody přípravy nanočástic

V závislosti na typu léčiva, které má být inkorporováno do polymerních nanočásticových formulací a jeho požadavcích na způsob podání, bylo vyvinuto několik metod přípravy. Tyto metody můžeme klasifikovat do dvou kategorií dle toho, zda pro přípravu bude použit předem připravený polymer anebo polymer vznikne během polymerizační reakce monomerů. Co se týče biologicky odbouratelných polymerů, pouze PACA nanočástice jsou tvořeny pomocí polymerizační reakce. Nanočástice tvořené polymery PLA, PLGA a PCL jsou připravovány metodou využívající hotový polymer. [8]

3.6.1 Metody využívající předem připravený polymer

3.6.1.1 Emulzní metoda odpaření rozpouštědla

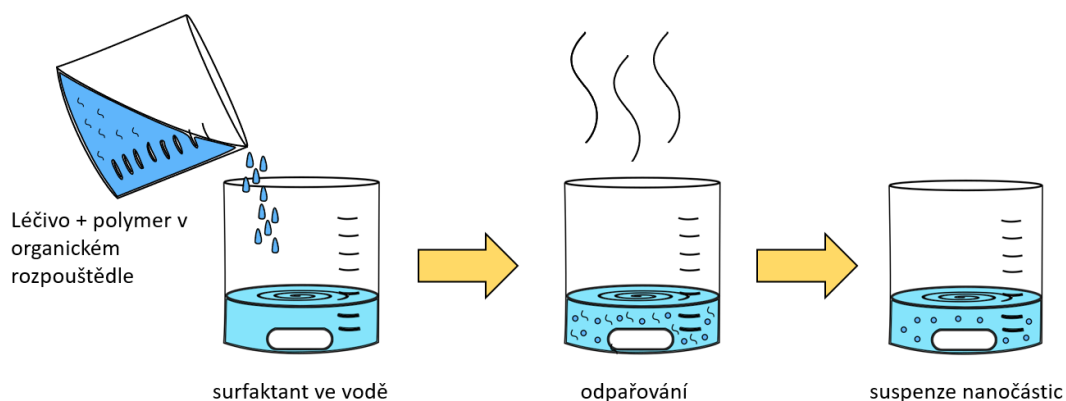
Jedná se o jednu z prvních metod vyvinutou pro přípravu nanočástic z hotového polymeru. Nejprve se připraví organická fáze skládající se z organického polárního rozpouštědla, ve kterém se rozpustí polymer. Mezi známe nepolární rozpouštědla řadíme chloroform a dichlormetan. Nicméně z důvodu své toxicity byly nahrazeny ethylacetátem, který vykazuje lepší toxikologický profil. Organická fáze dále zahrnuje léčivo, které je v organické fázi dispergováno nebo rozpuštěno. Ve vodné fázi je rozpouštěná povrchově aktivní látka (PVA, poloxamer, polysorbát). Během přípravy, dochází k emulgaci organické fáze ve vodném prostředí. Pro vznik menších emulzních kapének využijeme ultrazvuk nebo vysokorychlostní homogenizaci. Odpařením rozpouštědla za stálého míchání nebo sníženého tlaku, získáme disperzi nanočástic, kterou pomocí centrifugace odseparujeme a metodou lyofilizace připravíme pro dlouhodobé uskladnění. [46]

3.6.1.2 Vysolovací metoda

Vysolovací metoda je založena na separaci organického rozpouštědla z vodné anorganické fáze prostřednictvím vysolování. Organická fáze zahrnuje polymer, který je rozpuštěný v organickém rozpouštědle mísitelném s vodou, převážně acetonem. Tato fáze je emulgována do vodné fáze, která obsahuje stabilizátor (polyvinylpyrolidon, hydroxyethylcelulóza) a velké množství soli ($MgCl_2$, $CaCl_2$, $Mg(CH_3COOH)_2$) nebo sacharózu. Emulze o/v je připravená pomocí míchání za pokojové teploty. Přidáním odpovídajícího množství vody dojde k difúzi organického rozpouštědla do vnější vodné fáze, čímž způsobí vysrážení polymeru a tvorbu nanočástic. Následně dochází k eliminaci vysolovacího činidla a polymerního rozpouštědla pomocí filtrace. [46; 47; 8]

3.6.1.3 Nanoprecipitace

Nanoprecipitace je jedna z nejjednodušších metod pro přípravu nanočástic. Nanoprecipitace neboli metoda vytlačení rozpouštědla vyžaduje dva mísitelné roztoky. Vnitřní fáze je složená z polymeru, který je rozpuštěn v polárním organickém mísitelném s vodou rozpouštědle (aceton). Tato fáze se přidá do vodné/vnější fáze, která obsahuje surfaktant/stabilizátor. Pro tvorbu nanočástic je důležité rychlé přidání organické fáze, protože takto získáme menší částice. Smícháním fází dochází, v důsledku difúze organického rozpouštědla do vodné fáze, k precipitaci polymerních nanočástic, které zachycují léčivo. Organické rozpouštědlo je následně jednoduše odstraněno odpařením (Obr. 11). [8]



Obr. 11 Schéma nanoprecipitace

3.7 Metody měření charakteristik nanočástic

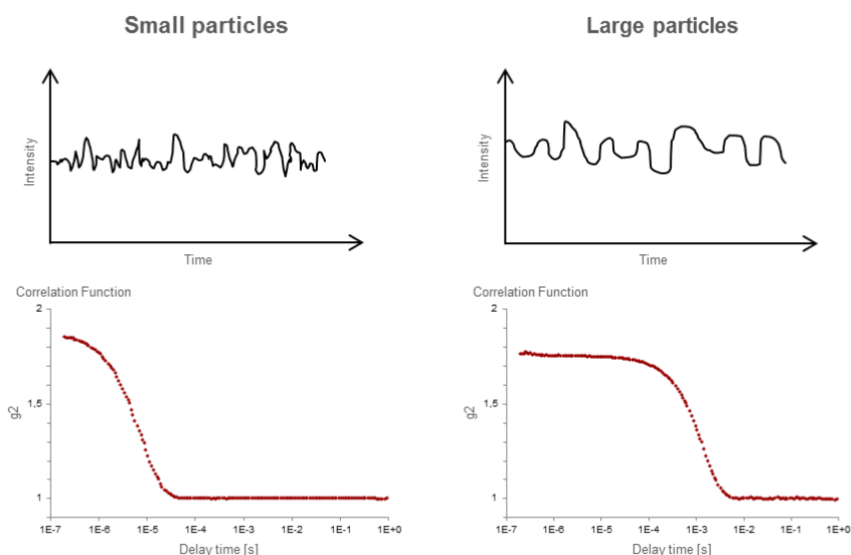
3.7.1 Metoda měření velikosti

Mezi nejpoužívanější metodu pro charakterizaci velikosti částic v tekutém médiu je metoda dynamického rozptylu světla (DLS). Tato metoda je založená na Brownovém pohybu rozptýlených částic. Částice vyskytující se v kapalině nejsou nehybné, pohybují se náhodně ve všech směrech. Neustále srážky částic s molekulami rozpouštědla způsobují přenos určité energie, čímž způsobí zmiňovaný pohyb. Menší částice se pohybují vyšší rychlostí, protože na ně působí menší třecí síla. Rychlost částic je popisována jako translační difúzní koeficient. Vztah mezi velikostí a rychlostí pohybu částic popisuje Stokesova-Einsteinova rovnice (1),

$$d(H) = \frac{K_B T}{3\pi\eta D} \quad (1)$$

kde K_B - Boltzmannova konstanta, T - termodynamická teplota, η - viskozita, $d(H)$ - hydrodynamický průměr částic, D - translační difúzní koeficient. [48; 49]

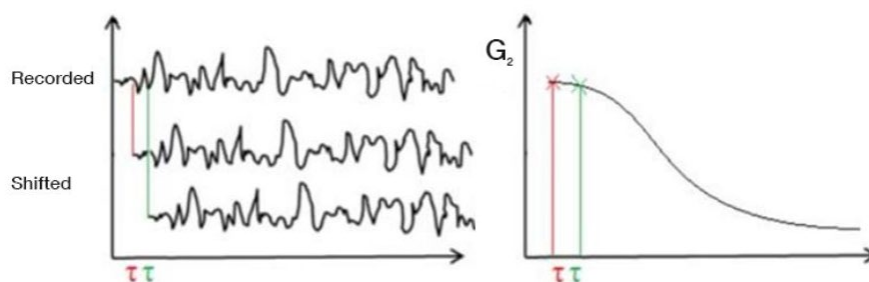
Velikost částic je vyjadřovaná jako hydrodynamický průměr, tedy průměr koule jejichž hydrodynamické chování je za dané teploty ve stejném disperzním médiu stejné jako chování přítomné disperzní částice.



Obr. 12 Rozdíl intenzity signálu (horní část) a korelační funkce (spodní část) malých a velkých částic. Menší částice vykazují rychlejší fluktuace rozptýleného světla a rychlejší spád korelační funkce. [49]

Principem DLS je měření fluktuace intenzity světla laserového paprsku rozptýleného nanočásticemi v závislosti na čase. Monochromatické světlo, které prochází květou obsahující suspenzi nanočástic, je po střetu z nanočásticí rozptýleno do všech stran. Rozptýlené světlo je detekováno pod určitým úhlem a po určitou dobu na detektoru. Výsledkem je kolísající intenzita signálu, která je způsobena Brownovým pohybem částic. Menší částice, které se pohybují rychleji vykazují rychlejší fluktuace než větší částice (Obr. 12). [49]

Zeta sizer od společnosti Malvern, přístroj, který zaznamenává fluktuaci intenzity rozptylu, má uvnitř komponentu zvanou digitální korelátor. Korelátor měří stupeň podobnosti mezi dvěma signály v určité době. Pokud bychom porovnávali intenzitu dvou signálů v krátkém časovém odstupě, zjistili bychom, že intenzita těchto signálů je podobná, tzn. silně koreluje. V případě, že budeme porovnávat intenzitu světla s delším časovým odstupem, korelace se bude snižovat, až dosáhne hodnoty 0. Komponenta sestrojí korelační funkci rozptýlené intenzity (Obr. 13). Obecně,



Obr. 13 Převod stopy intenzity signálu (vlevo) na korelační funkci (vpravo) [49]

korelační funkce popisuje, jak dlouho se částice nachází na stejném místě ve vzorku. Na začátku je korelační funkce lineární, což znamená, že částice je stále ve stejné poloze jako byla předtím. Pohyb částic naznačuje exponenciální rozpad/pokles korelační funkce. Pokud je korelace nulová, tzn. pokud neexistuje podobnost intenzity signálů, korelační funkce je opět lineární. Tato část na grafu je označena jako základní linie neboli baseline. Exponenciální pokles nepřímo představuje čas potřebný ke změně polohy částic. Malé částice se pohybují vyšší rychlostí, takže jejich exponenciální pokles bude rychlejší než exponenciální pokles velkých částic (Obr. 12). Ve skutečnosti je korelační funkce matematickým popisem fluktuací rozptýleného světla a používá se ke stanovení translačního difuzního koeficientu (D),

který je potřebný pro výpočet hydrodynamického průměru z dříve uvedené Stokes-Einsteinovy rovnice. [49]

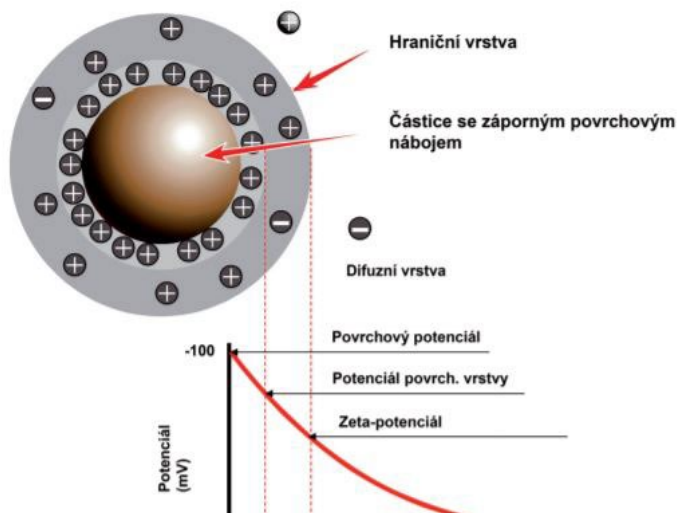
3.7.2 Index polydisperzity

Dalším důležitým parametrem měřeným zároveň s velikostí byl index polydisperzity (PDI). Polydisperzita je termín, který popisuje systém obsahující různé velikosti částic. Index polydisperzity vyjadřuje šířku distribuce velikosti částic v daném systému. Hodnoty PDI se pohybují v rozmezí od 0,00 do 1,00, kde 0,00 charakterizuje dokonale homogenní vzorek s ohledem na velikost částic. Dle obecně přijímaných pravidel [50], vzorky s hodnotou menší než 0,2 jsou v praxi považovány za monodisperzní. Vysoká hodnota PDI u vzorku může, kromě obsahu různých velikostí částic, naznačovat agregaci částic, tudíž nestabilitu systému. Index polydisperzity lze získat z přístrojů, které využívají dynamický rozptyl světla (DLS) (viz. kapitola 3.7.1)

3.7.3 Zeta potenciál

Další důležitou charakteristikou pro nanočástice je zeta potenciál známý také jako elektrokinetický potenciál. Jedná se o jeden z klíčových indikátorů stability koloidní disperze.

Pevná látka po kontaktu s vodným prostředím obvykle získá určitý náboj. K tvorbě tohoto náboje dochází vlivem reakce funkčních skupin s vodným prostředím



Obr. 14 Schéma zeta potenciálu částice v kapalině [59]

anebo absorpcí iontů přítomných v roztoku. Přítomnost funkčních skupin a jejich protonizace nebo disociace není podmínkou pro vznik povrchového náboje. Za neutrálního nebo alkalického pH vzniká na inertních površích přednostně negativní povrchový náboj z důvodu selektivní adsorpce hydroxidových iontů z vody. Pokud pH roztoku klesne pod hodnotu 7, vykazují inertní povrchy kladný náboj, který je dán zvýšeným množstvím hydroniových iontů v roztoku. Z uvedených informací vyplývá, že pH roztoku má silný vliv na povrchový náboj částic, a tudíž na výslednou hodnotu zeta potenciálu. Zmíněný povrchový náboj působí na uspořádání aniontů a kationtů vodného prostředí kolem částice. Vrstva kapaliny, která obklopuje částici, známá pod pojmem elektrická dvojvrstva, se dělí na vnitřní Sternovu vrstvu a vnější difúzní vrstvu. Sternova vrstva neboli stacionární je složená z iontů, které silně interagují s povrchem této částice. Vnější vrstva nazývaná difúzní, obsahuje ionty, které nejsou tak silně přitahovány, a proto se mohou v této vrstvě volně pohybovat. Vnější hranice difúzní vrstvy se označuje jako rovina skluzu. S rostoucí vzdáleností od částice se mění nerovnovážná distribuce iontů, až do dosažení rovnovážného stavu neboli elektroneutrálního místa v roztoku. [51; 52]

Zeta potenciál popisuje rozdíl v potenciálu mezi rovinou skluzu a elektroneutrálním místem v roztoku (Obr. 14). Může nabývat kladných i záporných hodnot. Pokud je zeta potenciál kladný, v difúzní vrstvě převažují kationy. Pro záporný potenciál je nutná převaha aniontů v difúzní vrstvě. Stejná koncentrace kationtů a aniontů vede k nulovým hodnotám zeta potenciálu. [51; 52]

V závislosti na hodnotě zeta potenciálu, se budou jednotlivé částice mezi sebou vzájemně elektrostaticky odpuzovat, čímž zamezí vzniku koloidních nestabilit. Za elektrostaticky stabilní koloidní disperzi se považuje absolutní hodnota zeta potenciálu ± 30 mV. Hodnoty ZP v rozmezí -30 mV až 30 mV mohou poskytnout informaci o větší pravděpodobnosti agregace, flokulace, jinak řečeno, informaci o nestabilitě koloidní soustavy. [51; 52]

Elektrokinetický potenciál lze stanovit pomocí elektroforetické pohyblivosti částic. Elektroforéza je jev, během kterého dochází vlivem působení elektrického pole, k pohybu nabitých částic ve směru elektrody s nábojem opačného znaménka. Rychlost pohybu částic je označována jako elektroforetická pohyblivost. Kombinaci

elektroforetické pohyblivosti a rozptylu světla na částicích získáme metodu pro měření ZP. Tato metoda je známa pod názvem elektroforetický rozptyl světla (Electroforetic Light Scattering). Princip metody spočívá ve snímání intenzity rozptýleného světla, která z důvodu aplikace elektrického pole a pohybu částic bude fluktuovat. Frekvence této fluktuace je přímo úměrná rychlosti částic/elektroforetické pohyblivosti. S touto znalostí můžeme získat ZP aplikováním rovnice (2),

$$v = \frac{2\varepsilon z U}{3\eta l} \quad (2)$$

kde v - elektroforetická pohyblivost, ε - dielektrická konstanta, z - zeta potenciál, U/l - intenzita elektrického pole, η - viskozita. [51; 52]

Pro měření ZP se používá přístroj Zeta Sizer, do kterého se vpraví vzorek nacházející se ve skleněné cele s elektrodami. [51; 52]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité suroviny

PLGA A2, větvený kopolymer PLGA s 2% kyselinou polyakrylovou, Katedra farmaceutické technologie, FaF UK

PLGA 50:50 (poměr kyseliny mléčné a glykolové, 50:50, M_w : 2400 g/mol), Corbion

PLGA 75:25 (poměr kyseliny mléčné a glykolové, 75:25, M_w : 3200 g/mol), Corbion

Čištěná voda, Katedra farmaceutické technologie, FaF UK

Aceton (Penta s.r.o., Chrudim, ČR)

Acetonitril (Penta s.r.o., Chrudim, ČR)

Acetonitril HPLC (Merck, Praha, ČR)

Trehalóza (Merck, Praha, ČR)

Dexametazon (Avantor, ČR)

Poloxamer 407, Pluronic® F-127 (Merck, Praha, ČR)

Polyvinylalkohol, PVA (Merck a.s., Praha)

Cholát sodný (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Německo)

Tween® 20 (Merck, Praha, ČR)

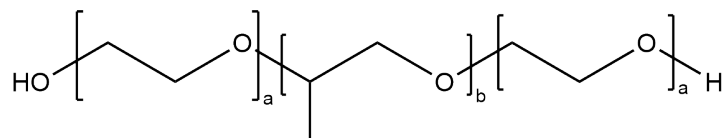
Kolliphor® RH 40 (Merck, Praha, ČR)

Kolliphor® HS 15 (Merck, Praha, ČR)

4.1.1 Surfaktanty

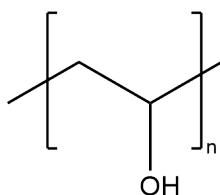
Pluronic® F-127 je neionický tříblokový emulgátor a stabilizátor, který je tvořen hydrofobní jednotkou propylenglykolu a dvěma postranními etylenglykolovými jednotkami (Obr. 15). Množství etylenglykolových jednotek u poloxameru 407

se pohybuje v rozmezí 95-105 a množství propylenglykolových jednotek v rozmezí 54-60. Hodnota HLB poloxameru 407, v závislosti na množství jednotek, se nachází v rozmezí 18-20. [53]



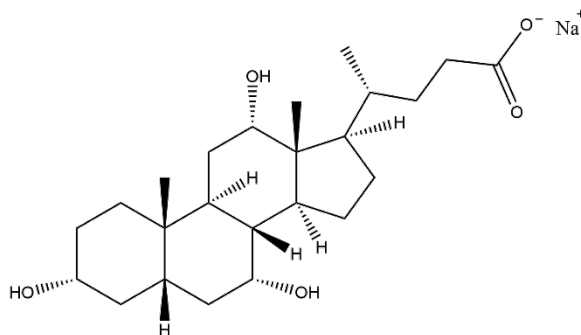
Obr. 15 Obecná struktura poloxameru

Polyvinylalkohol (Obr. 16) je syntetický polymer získávaný hydrolyzou polyvinylacetátu. Je rozpustný ve vodě a nerozpustný v olejích a organických kyselinách. S rostoucí molární hmotností rozpustnost ve vodě klesá. Nejedná se o typický surfaktant, protože ke stabilizaci disperzí dochází především ovlivněním viskozity vnější fáze. [54]



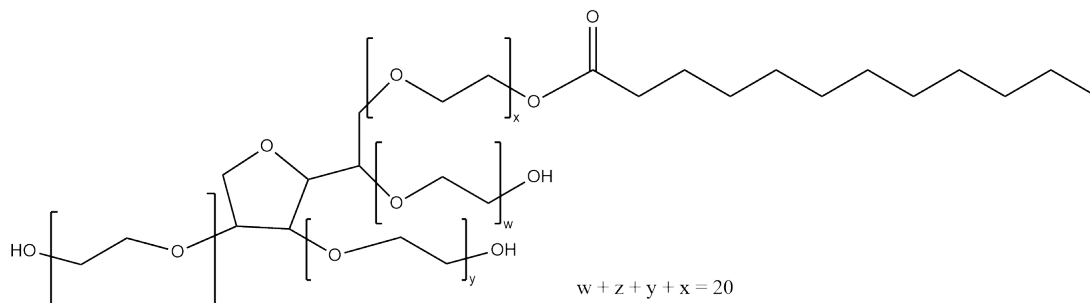
Obr. 16 Struktura polyvinylalkoholu

Cholát sodný je přírodní anionický surfaktant tvořený sodnou solí kyseliny cholové (Obr. 17). V našem organismu je známa jako žlučová kyselina produkovaná játry, která je schopná ve vodě solubilizovat lipidy. [55] Hodnota HLB=18, hodnota kritické micelární koncentrace =12 mM. [56]



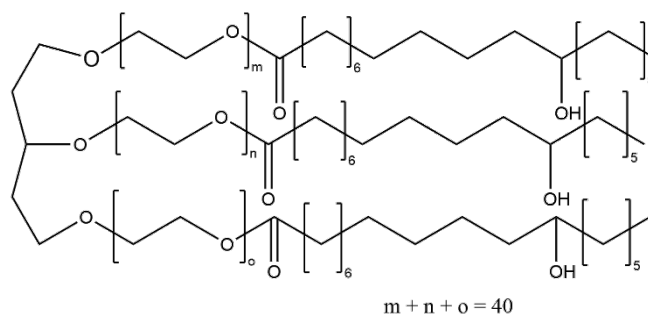
Obr. 17 Struktura cholátu sodného

Tween® 20 je neionická povrchově aktivní látka polysorbatového typu, která vzniká ethoxylací sorbitanu a monoesterifikací etylenglykolové jednotky kyselinou laurovou. Etylenglykolových jednotek je ve struktuře 20 (Obr. 18). Je to nažloutlá kapalina rozpustná ve vodě. HLB=16,7 [53]



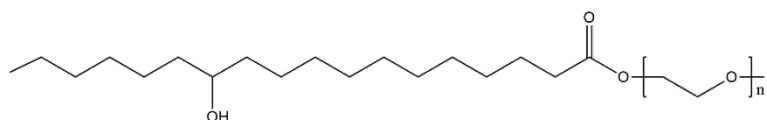
Obr. 18 Struktura Tweenu® 20

Kolliphor® RH 40 je neionický surfaktant, jehož struktura obsahuje esterifikovaný hydrogenovanou kyselinou ricinovou polyethoxylovaný glycerol (Obr. 19). Ve struktuře se nachází 40 etylenglykolových jednotek. Jedná se o bílou až žlutou pastu, která se rozpouští ve vodě, ethanolu, propan-2-olu, ethylacetátu, chloroformu. HLB=14-16. [57]



Obr. 19 Struktura Kolliphor® RH 40

Kolliphor® HS 15 je neionický surfaktant, který je při pokojové teplotě ve formě nažloutlé bílé pasty (Obr. 20). Je rozpustný ve vodě, ethanolu a propan-2-olu za vzniku čirých roztoků. Ze zvyšující se teplotou vody jeho rozpustnost klesá. Nerozpouští se v tekutém parafínu. Skládá se z polyglykolových mono- nebo diesterů kyseliny 12-hydroxystearové a z přibližně 30% volného polyethylenglykolu. Hodnota HLB=15. [58]



Obr. 20 Obecná struktura polyethoxylované 12-hydroxystearové kyseliny

4.2 Použité přístroje

Analytické váhy (Ohaus, Greifensee, Švýcarsko), max. 210 g, d= 0,1 mg

Váhy Kern 440-53N (Kern, Balingen, Německo), max. 400 g, d = 0,01 g

Magnetická míchačka IKA-WERKE RT 5 power, (IKA, Staufen, Německo) 100-1000 ot./min.

Vortex (Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA)

Centrifuga Micro 7 (Fischer Scientific, Hampton, USA)

Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Panalytical, Malvern, Spojené Království)

HPLC ALS 1329A (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

4.3 Použité metody

Pro přípravu nanočástic byla využita metoda nanoprecipitace, která je popsána v kapitole 3.6.1.3.

4.3.1 Postup přípravy:

1) Příprava vodné fáze

V závislosti na požadované koncentraci výsledného roztoku bylo na analytických váhách naváženo určité množství povrchově aktivní látky. Následně bylo naváženo množství, za stálého míchání na magnetické míchačce, rozpuštěno v 10 ml čištěné vody. Byly vytvořeny roztoky surfaktantů o koncentracích 0,1%, 0,5%, 1%, 2%.

2) Příprava organické fáze

Organická fáze obsahovala vždy jeden polymer - poly(lactid-co-glycolid acid) s 2% kyselinou polyakrylovou (PLGA A2) nebo poly(lactid-co-glycolid acid) v poměru 50:50 (PLGA 50:50) anebo poly(lactid-co-glycolid acid) v poměru 75:25 (PLGA 75:25), dále léčivo dexametazon a rozpouštědlo aceton. Pro usnadnění práce byl připraven 1mM zásobní roztok dexametazonu o objemu

100 ml. Jako rozpouštědlo byl použit aceton. Do skleněné vialky se na analytických váhách navážilo ± 30 mg polymeru. Následně se pomocí pipety přidal 1 ml zásobního roztoku dexametazonu, čímž došlo k rozpuštění polymeru.

3) Příprava suspenze

Dalším krokem bylo jednokrokové přidání organické fáze do připraveného vodného roztoku surfaktantu. Tento děj probíhal za stálého míchání vodné fáze na magnetické míchače (300 rpm). Po 2 hodinách odpařování acetonu, byla suspenze nanočástic převedena do kalibrované centrifugační zkumavky a doplněna čistou vodou na objem 10 ml.

4) Centrifugace

Po zvortexování byl obsah flakonky rozdělen do mikrozkuvek (typ eppendorf) o objemu 2 ml. Takto jsme získali pět alikvot. Jedna alikvota byla použita pro charakterizaci nanočástic (velikost, zeta potenciál). Další tři mikrozkuvky byly přeneseny do centrifugy. Centrifugace probíhala za podmínek: 10.000x g, čas 15 min, při teplotě 14 °C. Při každém cyklu byl odstraněn supernatant a peleta byla redispergována v čisté vodě.

5) Úprava vzorků v závislosti na způsobu uskladnění

a) Uskladnění za snížené teploty

Tato metoda byla zvolena v případě, kdy analýza vzorku na přístroji HPLC byla naplánována do druhého dne od přípravy. Po centrifugaci byl z mikrozkuvky odebrán supernatant. Zbylá suspenze nanočástic/peleta byla uskladněna v mikrozkuvce a daná do lednice.

b) Uskladnění ve stavu hlubokého zmrazení

Z centrifugovaných vzorků byl odebrán supernatant. Následně byly nanočástice v peletě rozdispergovány v 1 ml 5% roztoku trehalózy, která působí jako kryoprotektant. Vzorky byly uchovány při -70 °C.

4.3.2 Charakterizace nanočástic

Průměrná velikost částic, index polydisperzity a zeta potenciál byly měřené při laboratorní teplotě na přístroji Zetasizer. Pro charakterizaci částic nebyla nutná další úprava vzorku. Byl použit obsah jedné mikrozkušavky. Měření velikosti a PDI probíhalo v plastových kyvetách metodou dynamického rozptylu světla (viz. kapitola 3.7.1). Zeta potenciál byl měřen pomocí speciální kyvety s kapilárou a s postranními elektrodami typ DTS1060. Princip metody měření zeta potenciálu je popsán v kapitole 3.7.3.

4.3.3 Enkapsulační efektivita

Pro výpočet enkapsulační efektivity byla sestrojena kalibrační křivka, která zahrnovala sedm experimentálních bodů (0,25 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM , 100 μM , 200 μM). Pro sestrojení kalibrační křivky byl vytvořen zásobní roztok dexametazonu s acetonitrilem o koncentraci 2mM. Takto vytvořená kalibrační řada (tabulka č. 1) byla přenesená po 1,5 ml do malých HPLC vialek a podrobená HPLC analýze.

Tabulka č. 1 Body kalibrační křivky

	Koncentrace [μM]	Ředění [μl]	Acetonitril [μl]
7.	200	400	3600
6.	100	2000	2000
5.	25	1000	3000
4.	10	1600	2400
3.	5	2000	2000
2.	1	800	3200
1.	0,25	1000	3000

Obsah enkapsulovaného léčiva byl stanoven pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie – HPLC. Pro separaci a kvantifikaci byla použita kolona Restek Ultra 100 A se stacionární fází C18 o rozměrech 150 x 4,6 μm (velikost částic 5 μm). Mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min, byla tvořená směsí acetonitril:voda

(40:60). Objem nastříkovaného vzorku činil 100 μ l. Dexametazon byl detekován při vlnové délce 238 nm pomocí UV detektoru. Retenční čas dexametazonu činil 4,2 min.

V závislosti na uskladňování nanočástic byly použité dvě metody úpravy vzorku pro HPLC analýzu. V prvním případě, kdy byly nanočástice uskladněny v lednici, byl obsah léčivé látky stanoven rozpuštěním nanočástic/pelety v 1 ml acetonitrilu. Takto upravený vzorek byl centrifugován po dobu 20 min, 15100 otáček/min při teplotě 25°C. V druhém případě, po rozmrazení vzorku následovala centrifugace po dobu 15 min, při rychlosti 10000 otáček/min a teplotě 14 °C. Z purifikovaného vzorku byl odebrán supernatant, který byl nahrazen 1 ml acetonitrilu. Takto připravený vzorek se podrobil HPLC analýze. Enkapsulační efektivita byla stanovená a vypočtená pomocí rovnice (3), kde množství použitého pro přípravu dexametazonu odpovídá hodnotě 80 μ g/ml.

$$EE [\%] = \frac{\text{enkapsulovaný dexametazon } [\mu\text{g}]}{\text{množství dexamethazonu použitého pro přípravu } [\mu\text{g}]} \times 100 \quad (3)$$

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této kapitole jsou prezentovány a diskutovány výsledky získané přípravou nanočástic s dexametazonem. Cílem bylo zjistit, zda použitá metoda přípravy nanočástic za příslušných podmínek vede k enkapsulaci dexametazonu a následně zjistit, jestli použitá koncentrace surfaktantů ovlivňuje enkapsulaci dexametazonu u polymerů, které se liší poměrem kyseliny glykolové, kyseliny mléčné a případně molekulární architekturou. Dalšími zkoumanými parametry byly velikost částic, PDI a zeta potenciál.

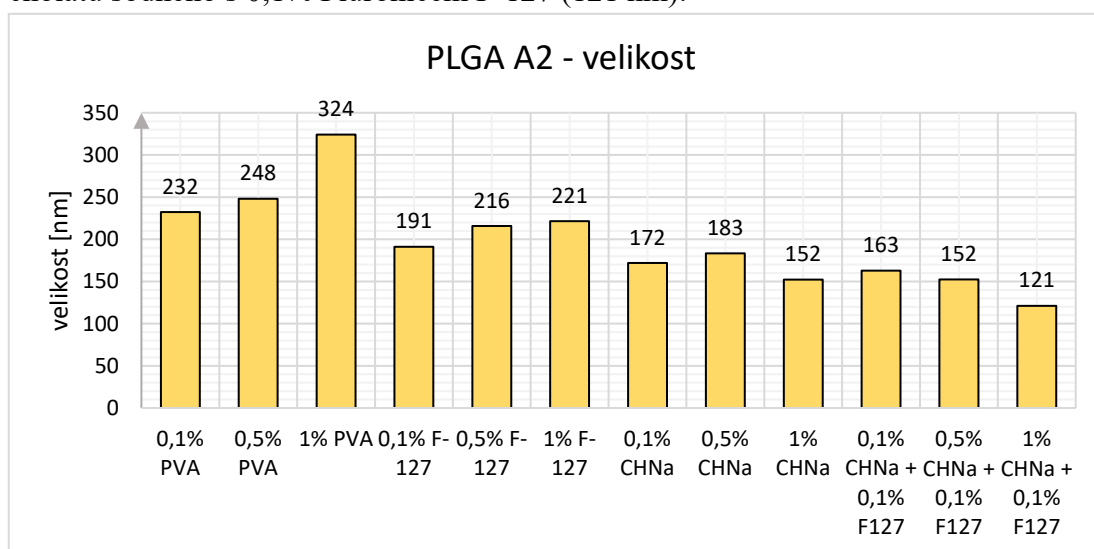
Tabulka č. 2 Naměřené hodnoty připravených vzorků

	surfaktant	koncentrace	velikost [nm]	σ	PDI	σ	ZP [mV]	σ	EE [%]
	PLGA A2	PVA	0,1%	232,23	2,25	0,045	0,010	-3,95	0,15
0,5%			248,13	2,34	0,086	0,018	-1,91	0,12	3,75
1,0%			324,23	4,41	0,038	0,020	-0,85	0,04	4,13
F127		0,1%	191,03	1,92	0,064	0,008	-16,23	0,52	4,45
		0,5%	215,80	1,49	0,106	0,000	-14,30	0,64	4,69
		1,0%	221,40	2,83	0,067	0,022	-9,21	0,30	5,26
CHNa		0,1%	171,87	1,01	0,168	0,007	-57,43	0,90	6,84
		0,5%	183,40	2,54	0,299	0,021	-38,03	4,67	8,51
		1,0%	152,17	1,07	0,089	0,031	-27,43	1,08	9,61
CHNa + 0,1% F127		0,1%	162,77	0,60	0,131	0,003	-16,70	0,51	9,99
		0,5%	152,37	2,05	0,252	0,006	-11,33	0,41	10,45
		1,0%	121,17	0,94	0,143	0,019	-59,10	1,02	6,91
PLGA 50:50	PVA	0,1%	203,73	1,67	0,049	0,005	-7,20	0,34	8,42
		0,5%	267,90	0,86	0,057	0,017	-2,30	0,12	5,01
		1,0%	309,43	1,54	0,067	0,014	-1,10	0,30	7,26
	F127	0,1%	189,00	1,21	0,090	0,011	-15,73	0,53	6,83
		0,5%	195,77	1,76	0,063	0,013	-12,30	0,16	7,13
		1,0%	220,67	1,14	0,065	0,010	-9,82	0,39	7,49
	RH40	0,1%	170,30	1,49	0,073	0,004	-21,50	0,71	8,49
		1,0%	172,60	0,94	0,103	0,018	-27,40	0,28	5,97
		2,0%	185,37	1,69	0,109	0,005	-28,20	0,49	5,45
	HS15	0,1%	179,80	1,19	0,132	0,012	-20,00	0,08	8,86
		1,0%	181,80	1,55	0,131	0,011	-21,60	0,29	7,25
		2,0%	177,83	0,94	0,094	0,015	-25,93	0,34	7,05
	Tween	0,1%	174,27	1,16	0,071	0,010	-22,70	0,50	10,76
		1,0%	165,33	0,63	0,055	0,008	-20,47	0,76	6,44
	CHNa	0,1%	164,90	1,84	0,081	0,012	-61,93	2,07	7,22
		0,5%	140,80	1,45	0,114	0,004	-65,83	3,55	7,28
		1,0%	134,17	1,52	0,123	0,012	-60,27	1,59	6,25
	CHNa + 0,1% F127	0,1%	162,13	1,62	0,105	0,011	-17,60	0,08	8,76
0,5%		146,07	0,54	0,142	0,017	-11,00	0,37	7,89	
1,0%		98,25	0,75	0,196	0,005	-20,87	1,11	7,86	
PLGA 75:25	F127	0,1%	201,80	1,20	0,066	0,020	-14,93	0,05	8,65
		0,5%	210,07	0,25	0,062	0,005	-11,97	0,09	14,48
		1,0%	239,63	0,99	0,137	0,007	-9,31	0,33	10,60
	RH40	0,1%	195,53	0,78	0,095	0,024	-22,63	0,53	9,40
		1,0%	231,43	0,81	0,101	0,006	-10,43	0,29	9,21
		2,0%	209,73	0,91	0,132	0,009	-29,73	1,17	8,11
	HS15	0,1%	192,83	0,88	0,108	0,011	-20,30	0,57	8,77
		1,0%	226,17	1,99	0,216	0,007	-21,37	0,46	7,43
		2,0%	160,27	0,58	0,140	0,009	-20,97	0,45	10,35
	Tween	0,1%	181,00	1,28	0,097	0,014	-23,40	0,45	9,52
		1,0%	183,03	0,59	0,102	0,023	-20,10	0,22	10,10
	CHNa	0,1%	179,40	1,73	0,128	0,006	-64,67	0,90	8,45
		0,5%	154,77	0,87	0,135	0,022	-67,53	1,61	5,87
		1,0%	139,63	1,89	0,126	0,006	-70,83	2,41	7,26
	CHNa + 0,1% F127	0,1%	175,57	1,24	0,116	0,011	-18,17	0,12	9,25
0,5%		161,53	1,19	0,150	0,008	-8,03	0,05	9,37	
1,0%		134,37	1,58	0,115	0,014	-8,89	0,97	7,33	

5.1 Velikost částic a polydisperzita

Výsledky granulometrické analýzy připravených částic jsou uvedeny v tabulce č. 2. Z výsledků experimentů je patrné, že téměř všechny částice připravené v této práci splňovaly podmínky pro cílenou distribuci do makrofágových buněk, tedy pohybovaly se v rozmezí 100-300 nm. Typ použitého polymeru pro přípravu NČ, koncentrace a typ surfaktantu se zdají být rozhodujícími faktory pro výslednou velikost NČ.

Pro větvený polymer PLGA A2 bylo rozmezí vzniklých NČ mezi 121-324 nm. Z grafu č. 1 je patrné, že největší částice byly připravené pomocí surfaktantu PVA. Hodnoty jejich velikostí rostou se vzrůstající koncentrací surfaktantu, kde největší částice tvořené za použití 1% PVA dosahují velikosti 324 nm. Velikost nanočástic je pravděpodobně ovlivněná molární hmotností PVA, který se deponuje na povrchu částic a také viskozitou vnější fáze. Podobný nárůst velikosti nanočástic se zvyšující se koncentrací surfaktantu spatřujeme u Pluronicu F-127, kde největší částice dosahují 221 nm. Opačný fenomén můžeme pozorovat u cholátu sodného i u jeho kombinace s 0,1% Pluronicem F-127, kde velikosti částic se vzrůstající koncentrací klesají. To je dáno menší viskozitou vnější fáze a nižší molární hmotností v porovnání s PVA. Nanočástice připravené se samotným cholátem sodným jsou o něco větší než částice vytvořené za přítomnosti jeho kombinace s 0,1% Pluronicem F-127. Nicméně tento rozdíl není nijak významný. Nejmenší částice u PLGA A2 byly připravené pomocí 1% cholátu sodného s 0,1% Pluronicem F-127 (121 nm).

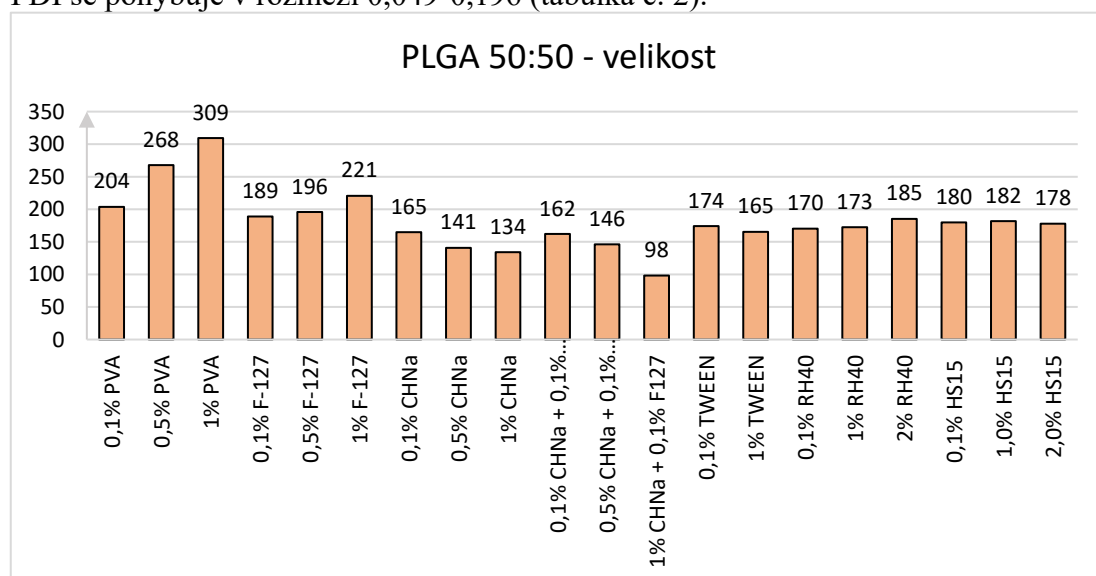


Graf č. 1 Závislost velikosti nanočástic na koncentraci a typu surfaktantu

Index polydisperzity částic u PLGA A2 se pohybuje v rozmezí 0,038 - 0,299 (tabulka č. 2). S výjimkou dvou vzorků tvořených 0,5% cholátem sodným (PDI=0,299) a jeho kombinaci s Pluronicem (0,252), došlo k přípravě monodisperzních systémů. U nevyhovujících vzorků (hodnota vyšší než 0,2) mohlo dojít k agregaci vzniklých částic. V obou případech se jedná o koncentraci cholátu sodného 0,5 %, kde se zdá, že tato koncentrace je z hlediska disperzity částic nevhodná.

U polymeru PLGA 50:50 (graf č. 2) se velikost nanočástic pohybuje v rozmezí 98 - 309 nm. Opět největší částice jsou tvořené v roztoku surfaktantu PVA, kde velikost částic se vzrůstající koncentrací PVA roste, stejně jako tomu bylo v případě částic připravených z PLGA A2. Stejně závislosti můžeme sledovat u Pluronicu F- 127, kde největší částice připravené s koncentrací 1 % dosahují velikosti 221 nm. U vzorků připravených pomocí cholátu sodného (samotného i v kombinaci s 0,1% Pluronicem F-127) došlo se vzrůstající koncentrací použitého cholátu k poklesu velikosti vzniklých nanočástic. Nejmenší částice tvořené kombinací 1% cholátu sodného s Pluronicem F-127 nabývají 98 nm. U surfaktantů Tween®20, RH40 a HS15 změna jejich koncentrace nemá vliv na výslednou velikost částic. Hodnoty velikosti se pro Tween®20 pohybují v rozmezí 165-174 nm, pro RH40 170-185 nm a u HS15 178-182 nm.

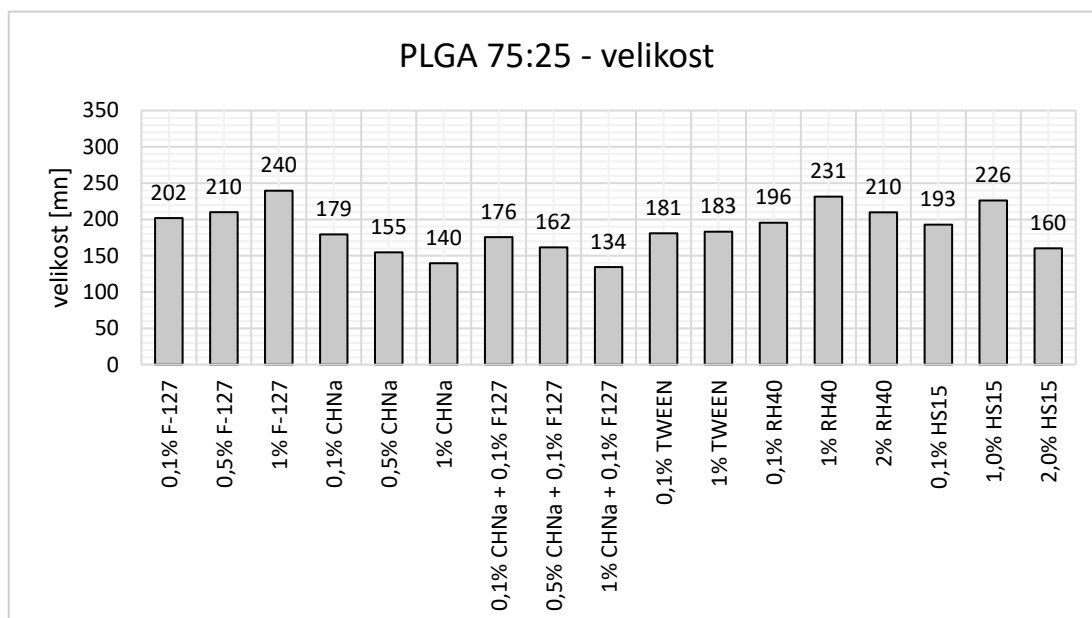
Všechny vzorky připravené u polymeru PLGA 50:50 jsou monodisperzní. Hodnota PDI se pohybuje v rozmezí 0,049-0,196 (tabulka č. 2).



Graf č.2 Závislost velikosti nanočástic na koncentraci a typu surfaktantu u polymeru PLGA 50:50

Velikosti nanočástic připravených z polymeru PLGA 75:25 jsou v rozmezí 134 - 240 nm. Největší částice (240 nm) jsou tvořené 1% Pluronicem F-127. Z grafu č.3 je jasné, že rostoucí koncentrace Pluronicu F-127 vede k tvorbě větších částic. Opačný fenomén můžeme pozorovat u vzorků s cholátem sodným (i v kombinaci s Pluronicem F-127), kde velikost částic klesá s rostoucí koncentrací. Zajímavé je, že velikostí částic připravených při použití samotného cholátu sodného nebo v kombinaci se významně neliší, což ukazuje na fakt, že cholát sodný hraje při kontrole velikosti částic zásadní roli. U částic připravených za přítomnosti Tweenu®20 se jejich velikost, v závislosti na použité koncentraci, rovněž nemění. V případě surfaktantu RH40, velikosti vzniklých nanočástic mírně kolísají. Změnou koncentrace z 0,1% na 1% došlo ke zvětšení nanočástic z hodnoty 196 nm na 231 nm. Nicméně změnou koncentrace z 1% na 2%, došlo k poklesu velikosti na 210 nm. Stejný fenomén spatřujeme u surfaktantu HS15, kde hodnota velikosti částic změnou koncentrace z 0,1% na 1% vzrostla ze 193 nm na 226 nm a při 2% koncentraci hodnota velikosti klesla na 160 nm.

S výjimkou jednoho vzorku tvořeného 1% HS15 (PDI=0,216) se podařilo připravit monodisperzní systémy, jejichž hodnoty se pohybují v rozmezí 0,005-0,024 (tabulka č. 2).



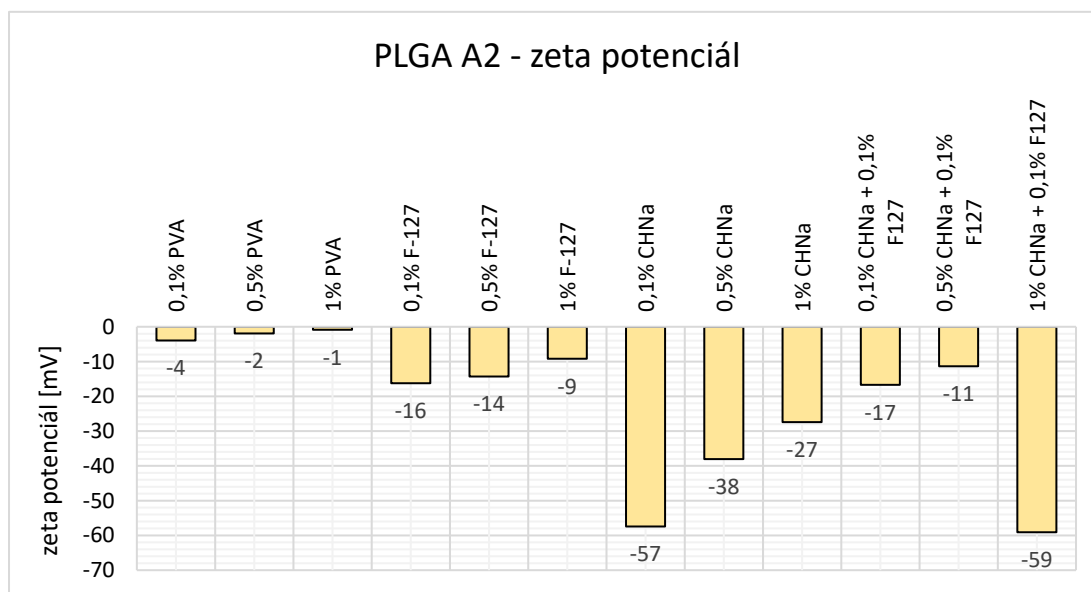
Graf č.3 Závislost velikosti nanočástic na koncentraci a typu surfaktantu u polymeru PLGA 75:25

Na základě výsledků velikosti nanočástic (graf č. 1, graf č.2, graf č.3), které byly připravené pomocí tří různých polymerů, můžeme pozorovat některé trendy. U polymerů PLGA A2 a PLGA 50:50 byly největší částice tvořené 1% PVA. U obou polymerů došlo ke zvýšení velikosti částic se vzrůstající koncentrací této povrchově aktivní látky. Vysvětlením může být vysoká molární hmotnost PVA a viskozita vnější fáze, která vede k pomalejšímu promíchávání vodné a organické fáze, stejně tak k pomalejší difuzi acetonu do vodného roztoku během nanoprecipitace. Stejně závislosti lze sledovat u všech tří polymerů pro surfaktant Pluronic F-127, kde velikosti částic vzrůstaly se zvětšující se koncentrací. Další trend se vyskytuje u částic připravených v přítomnosti cholátu sodného (samotného i v kombinaci s 0,1% Pluronicem), kde téměř u všech vzorků došlo k poklesu velikosti částic se vzrůstem koncentrace. Pokles může být vysvětlen na základě viskozity vnější fáze, která je v porovnání s PVA menší, tudíž během nanoprecipitace dochází k rychlejšímu promíchávání fází. Výjimku tvoří vzorky připravené v kombinaci PLGA A2 s cholátem sodným. Pravděpodobně se jedná o statistický artefakt, pro jehož vyloučení by bylo třeba experiment zopakovat, nicméně výsledky se zbývajícími polymery tento trend potvrzují. U částic připravených v přítomnosti Tweenu®20 pro polymery PLGA 50:50 a PLGA 75:25 se velikost částic v závislosti na koncentraci nezměnila. Nicméně záměnou polymeru PLGA 50:50 za lipofilnější PLGA 75:25, došlo ke zvětšení částic. Další rozdíl nacházíme u částic tvořených pomocí PLGA 50:50 a PLGA 75:25 v přítomnosti surfaktantů RH40 a HS15. Z grafu č.2 je patrné, že pro polymer PLGA 50:50 se velikost částic se zvětšující koncentrací RH40 a HS15 nemění. To ale neplatí pro lipofilnější polymer 75:25, kde velikosti částic změnou koncentrace z 0,1% na 1% vzrostly a následně změnou koncentrace z 1% na 2% poklesly. Vysvětlením této změny může být právě lipofilita samotného polymeru. I přesto, že připravené částice pomocí RH40 a HS15 splňují velikostní požadavek pro makrofágový targeting, tyto surfaktanty jsou nejméně spolehlivé, protože dochází, u dříve zmíněných polymerů, k fluktuaci velikosti částic. Na základě výsledků můžeme konstatovat, že cholát sodný je povrchově silně aktivní látkou, díky které můžeme zmenšovat velikost nanočástic v závislosti na použité koncentraci. Z výše uvedeného plyne, že použitím vhodné koncentrace různých surfaktantů lze kontrolovat velikost připravených částic.

5.2 Zeta potenciál

Výsledky naměřených hodnot zeta potenciálu u připravených nanočástic jsou uvedené v tabulce č. 2. Z grafu č.4, grafu č.5, grafu č.6 je patrné, že hodnoty zeta potenciálu jsou ovlivněné v menší míře typem použitého polymeru, a především typem a koncentrací surfaktantu.

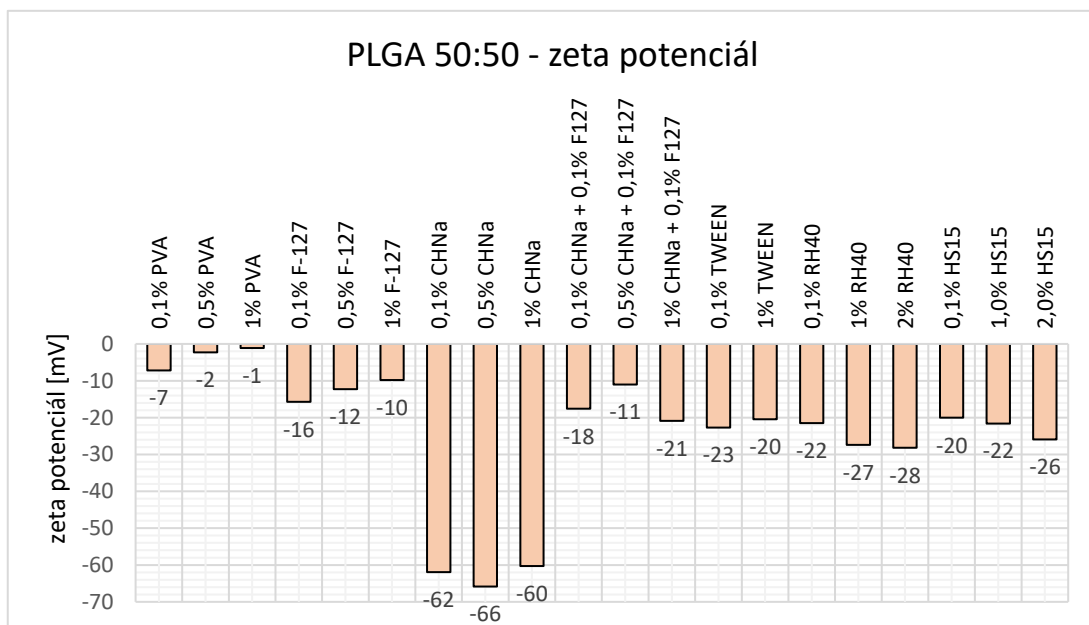
Dle grafu č.4, hodnoty ZP u polymeru PLGA 50:50 se nachází v rozmezí od - 59 mV do - 1 mV. Hodnoty ZP nanočástic připravených za použití surfaktantu PVA se jako jediné přibližují k nulové hodnotě. Čím vyšší koncentrace surfaktantu, tím blíže k nulové hodnotě ZP. Tento fenomén je možné vysvětlit maskovacím efektem PVA, který vytvořil na povrchu částice hydratovanou vrstvou. Podobného jevu se dopátráme u surfaktantu Pluronicu F-127, kde hodnoty ZP rostou z jeho vzrůstající koncentrací z -16 mV na -9 mV. Příčinou může být existence hydrofobních interakcí mezi propylenglykolovou složkou surfaktantu a hydrofobní nanočástici, kde hydrofilní řetězce surfaktantu stínícím efektem maskují náboj částice. Při použití cholátu sodného jako surfaktantu, hodnoty ZP pro koncentrace 0,1% a 0,5% přesahují hodnotu -30 mV. Z grafu č.4 je patrné, že čím větší koncentrace cholátu sodného, tím více se ZP přibližuje k neutrální hodnotě. Může to být dáno nekompatibilitou cholátu sodného s polymerem PLGA A2. Nicméně přidáním 0,1% Pluronicu-F127, hodnoty ZP rostou směrem k neutrální hodnotě, což může být zapříčiněno maskováním karboxylového



Graf č.4 Závislost zeta potenciálu na typu a koncentraci surfaktantu u polymeru PLGA A2

zbytku cholátu sodného Pluronicem F-127. Výjimku tvoří kombinace 1% cholátu sodného s 0,1% Pluronicem F-127, kde hodnota ZP činí -59 mV. Pravděpodobně se jedná o chybu měření.

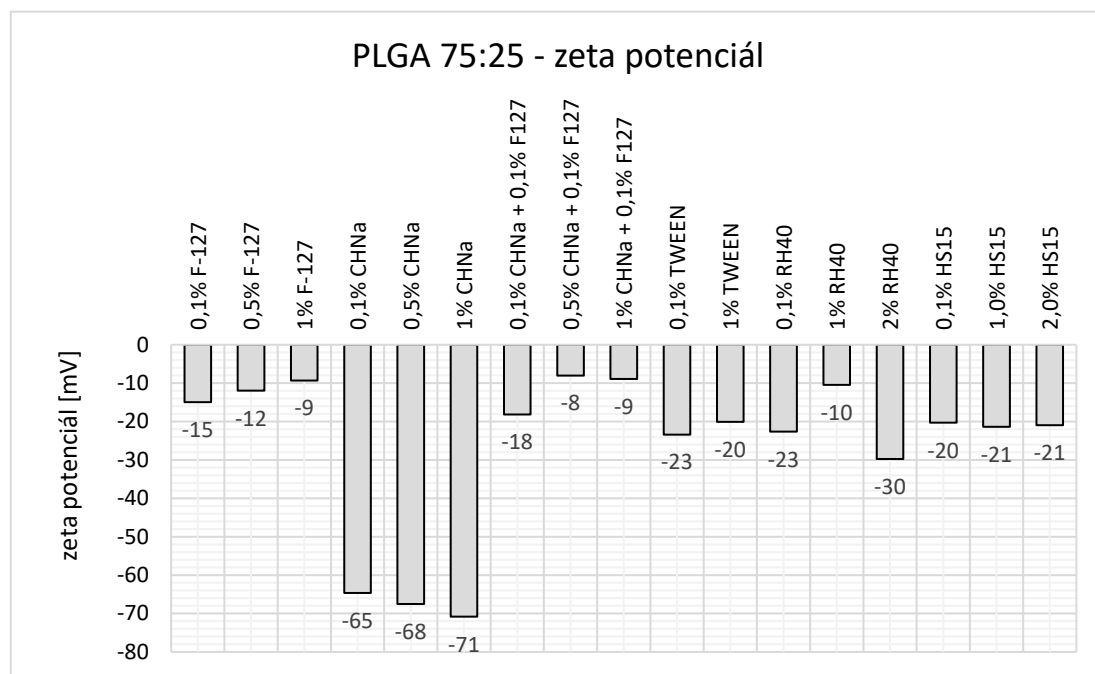
U všech formulací tvořených polymerem PLGA 50:50 byl zaznamenán záporný ZP s hodnotami od -66 mV do -1 mV. Z výsledků (graf č.5) je patrné, že hodnoty ZP u vzorků tvořených v přítomnosti PVA, se opět s jeho vzrůstající koncentrací blíží k neutrálním hodnotám ZP. Stejný fenomén nacházíme pro surfaktant Pluronic F-127, kde hodnoty mírně rostou a dosahují pro 1% Pluronic F-127 -10 mV. Nanočástice připravené v přítomnosti samotného cholátu sodného překračují hodnotu -60 mV, co je dáno přítomností záporně nabitě karboxylové skupiny surfaktantu. Přídavkem 0,1% Pluronicu F-127 došlo k výrazné změně ZP. Pro kombinaci 1% cholátu sodného s 0,1% Pluronicem se hodnota ZP posunula z -60 mV na -21 mV. Stejně změny se dopátráme u zbylých dvou koncentrací. Tyto změny mohou být způsobené maskovacím efektem Pluronicu F-127. Hodnoty ZP u nanočástic tvořených v přítomnosti Tweenu®20 dosahují pro 0,1% -23 mV a pro 1% -20 mV. Změna koncentrace surfaktantu má zanedbatelný vliv na hodnotu ZP. U částic stabilizovaných pomocí surfaktantu RH40, se hodnoty ZP nachází v rozmezí od -28 mV do -22 mV. Vzrůstem koncentrace z 0,1% na 1% došlo ke změně ZP z -22 mV na -27 mV. Další změnou koncentrace z 1% na 2% nedošlo k výraznému ovlivnění ZP. Při použití



Graf č.5 Závislost zeta potenciálu na typu a koncentraci surfaktantu u polymeru PLGA 50:50

neionického surfaktantu HS15, hodnoty ZP v závislosti na zvyšující se koncentraci mírně klesají.

Hodnoty ZP nanočástic připravených polymerem PLGA 75:25 se nachází v rozmezí od -71 mV do -9 mV (graf č.6). U vzorků tvořených Pluronicem F-127, se výsledky ZP mírně liší v závislosti na vzrůstající koncentraci surfaktantu. Pro 1% Pluronic F- 127 je hodnota ZP -9 mV. Nejnižších výsledků bylo dosaženo nezávislé na koncentraci pomocí samotného cholátu sodného, kde ZP přesahoval hodnotu -60 mV. U částic připravených v přítomnosti cholátu sodného s 0,1% Pluronicem F-127 došlo ke změně ZP. Stíněním karboxylové skupiny Pluronicem F- 127 došlo ke vzrůstu hodnot v průměru z -68 mV na -12 mV. Pro Tween®20 se hodnoty ZP v závislosti na koncentraci významně nemění. Stejný fenomén můžeme pozorovat u HS15, kde pro 0,1% koncentraci je ZP -20 mV. Vzrůstem koncentrace se hodnota posunula na -21 mV. Použitím neionického surfaktantu RH40 došlo u připravených vzorků k fluktuaci hodnoty ZP. Se vzrůstající koncentrací RH40, hodnota ZP narostla z -23 mV na -10 mV a následně klesla na -30 mV. Z čehož se nedá usoudit žádná závislost.



Graf č.6 Závislost zeta potenciálu na typu a koncentraci surfaktantu u polymeru PLGA 75:25

Na základě výsledků ZP (graf č.4, graf č.5, graf č.6) nacházíme pár opakujících se jevů. U polymerů PLGA A2 a PLGA 50:50 se hodnota ZP PVA se vzrůstající

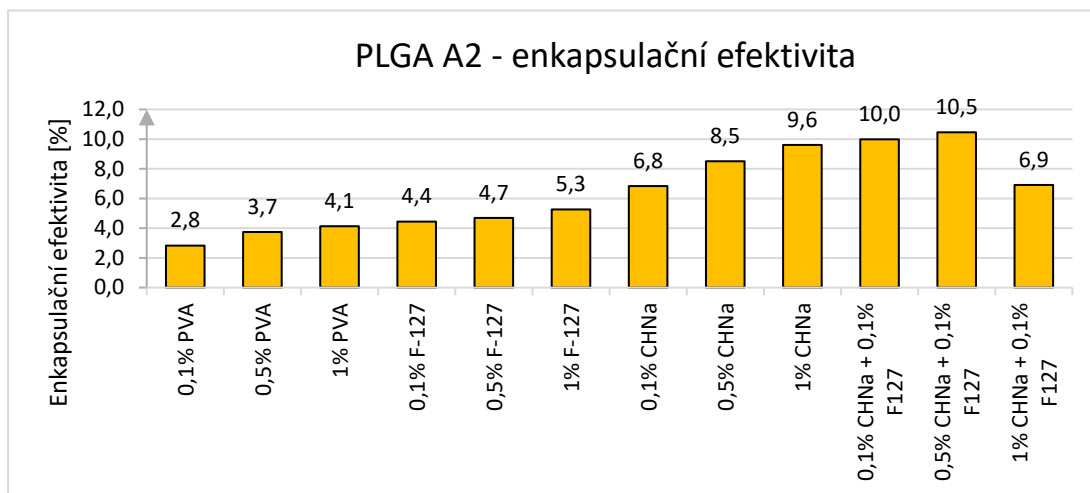
koncentraci přibližovala k neutrální hodnotě. Jak bylo zmíněno dříve, je to dáno molární hmotností PVA, který se naváže na povrch nanočástice a vytvoří vrstvu maskující náboj. Zajímavostí může být fakt, že hodnoty ZP pro Pluronic F-127 jsou u všech polymerů velice podobné. Z toho můžeme vyvodit, že typ použitého polymeru neovlivňuje ZP. Nicméně nárůst ZP se vzrůstající koncentraci může být vysvětlen maskovacím efektem polyethylenglykolu, který je součástí struktury Pluronicu F-127. Rozdíl nacházíme u Tweenu®20, který rovněž ve své struktuře obsahuje polyethylenglykolové řetězce. Pokud ale porovnáme hodnoty ZP pro Pluronic F-127 a Tween®20 u polymerů PLGA 50:50 a PLGA 75:25, z grafu č.5 a grafu č.6 vidíme, že hodnoty pro Tween®20 jsou nižší než pro Pluronic F-127. Důvodem můžou být kratší polyethylenglykolové řetězce u Tweenu®20, které nemají, tak jak v případě Pluronicu, schopnost maskovat povrchový náboj částice. Nanočástice připravené v přítomnosti samotného cholátu sodného vykazují u všech polymerů nejnížší hodnoty ZP, což je způsobeno anionickou karboxylovou skupinou cholátu sodného. U polymerů PLGA 50:50 a PLGA 75:25 hodnoty ZP překračují -60 mV. Výjimku tvoří polymer PLGA A2, kde je nejnížší hodnota dosažená u 0,1% a činí -57 mV, a následně se vzrůstem koncentrace roste k nulové hodnotě. Pravděpodobně to může být zapříčiněno hydrofilitou samotného polymeru a tím sníženou adsorpcí surfaktantu na povrch částice, protože tento jev nenacházíme u zbylých dvou lineárních polymerů. Přídavkem 0,1% Pluronicu F-127 k cholátu sodnému, došlo u všech polymerů ke vzrůstu hodnot ZP. Z výsledků je jasné, že Pluronic F-127 má schopnost maskovat náboj karboxylové skupiny cholátu sodného, což se projeví změnou hodnot ZP. Pokud porovnáme výsledky ZP pro PLGA 50:50 a PLGA 75:25 pro surfaktant RH40, tak se hodnoty ZP, s výjimkou vzorku tvořeného 1% RH40 u PLGA 75:25, neliší. Stejněho jevu se dopátráme u HS15, kde se hodnoty pro polymer PLGA 50:50 vlivem koncentrace mírně (zanedbatelně) mění. Záměnou za lipofilnější polymer se hodnoty včetně vlivu koncentrace nezměnily, tudíž můžeme říci, že typ polymeru ani koncentrace surfaktantu nemají vliv na hodnotu ZP pro surfaktant HS15. Dle naměřených hodnot ZP se zdá, že pouze nanočástice připravené pomocí samotného cholátu sodného se jeví jako stabilní systémy, protože přesahují hodnotu ± 30 mV. Nicméně surfaktanty jako je PVA, Pluronic F-127, Tween®20, HS15 zvyšují stabilitu systému sterickým stíněním, tudíž nemůžeme říci, že vzorky připravené pomocí těchto

surfaktantů jsou automaticky nestabilní. Také je třeba zohlednit to, že povrchový náboj může být ovlivněn dalšími faktory jako např. změna pH roztoku.

5.3 Enkapsulační efektivita

Výsledky enkapsulační efektivit jsou znázorněné v tabulce č. 2. Z výsledků je patrné, že typ polymeru, typ surfaktantu a koncentrace surfaktantu mají vliv na enkapsulaci dexametazonu.

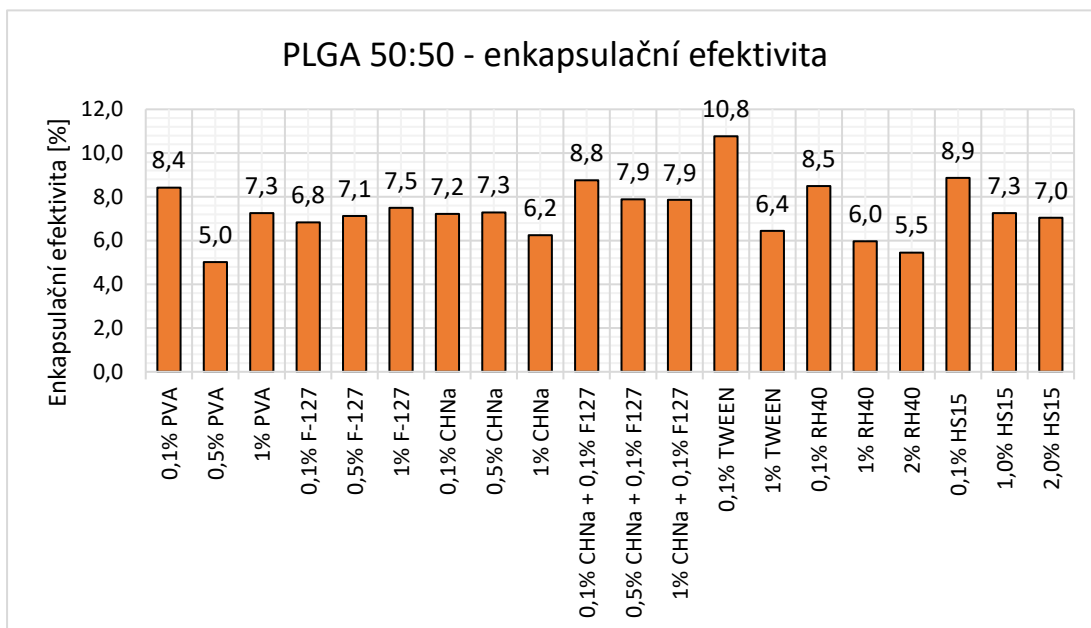
Pro polymer PLGA A2 se hodnoty EE pohybují v rozmezí 2,8-10,5 %. Největší enkapsulace byla dosažena u vzorků tvořených kombinací cholátu sodného s 0,1% Pluronicem F-127, kde hodnoty přesahovaly 10 % s výjimkou jednoho vzorku (1% cholátu sodného v kombinaci). Nanočástice vytvořené v přítomnosti samotného cholátu sodného dosahují v porovnání s kombinovaným cholátem sodným, nižších hodnot. Z grafu č.7 je patrný vliv koncentrace cholátu sodného na velikost enkapsulační efektivit. Čím větší koncentrace surfaktantu, tím vyšší hodnota EE. Velmi nízkých hodnot EE nabyly vzorky připravené v přítomnosti PVA. Rostoucí koncentrace stabilizátoru vede k mírnému nárůstu hodnot EE z 2,8 % na 4,1 %. Vzorky tvořené v přítomnosti Pluronicu F-127 vykazují mírný nárůst EE v závislosti



Graf č.7 Závislost enkapsulační efektivit na typu a koncentraci surfaktantu u polymeru PLGA A2

na vzrůstající koncentraci surfaktantu. Nejvyšší hodnota EE v přítomnosti Pluronicu F-127 byla dosažena u 1% koncentrace (5,3 %).

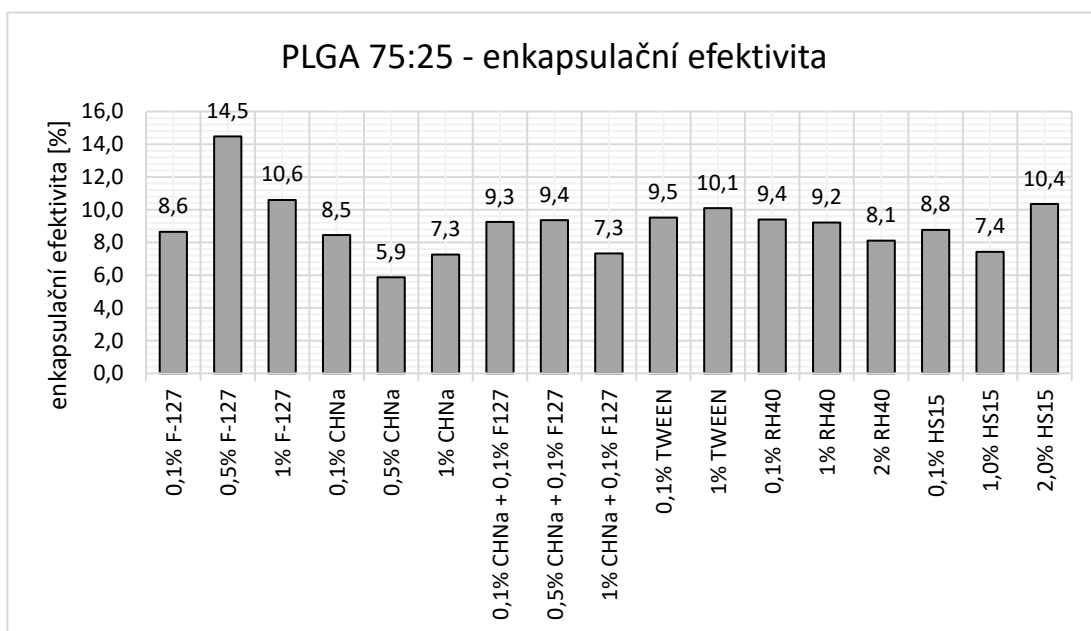
U všech vzorků tvořených polymerem PLGA 50:50 byly zaznamenány hodnoty EE vyšší nebo rovné 5 %. Dle grafu č.8 byla nejvyšší EE 10,8 % dosažena u vzorku 0,1% Tween®20. Změnou koncentrace z 0,1% na 1% došlo k poklesu hodnoty na 6,4 %. Tento pokles je rovněž přítomen u surfaktantů HS15 a RH40, kde nejvyšší hodnoty EE jsou dosaženy pomocí nejnižší koncentrace povrchově aktivní látky. U anionického surfaktantu cholátu sodného se hodnoty EE pohybují v rozmezí 6,2-7,3 %. Přídavkem Pluronicu F-127 došlo ke zvýšení hodnot enkapsulace. Pro vzorky připravené v přítomnosti samotného Pluronicu F-127 došlo k mírnému nárůstu hodnot EE v závislosti na vzrůstající koncentraci. Nejnižší hodnoty EE pro tento polymer bylo dosaženo opět u stabilizátoru PVA, konkrétně u částic připravených v 0,5% PVA. Z grafu č.8 je viditelné, že se hodnoty EE u PVA liší.



Graf č.8 Závislost enkapsulační efektivity na typu a koncentraci surfaktantu u polymeru PLGA 50:50

Pro polymer PLGA 75:25 se hodnoty EE nachází v rozmezí 5,9-14,5 %. Z grafu č.9 je viditelný vliv koncentrace, a především vliv typu povrchově aktivní látky na enkapsulaci dexametazonu. Největší enkapsulace se prokázala u 0,5% Pluronicu F-127, kde hodnota EE činí 14,5 %. Pro anionický surfaktant (samotný i v kombinaci) se hodnoty EE v závislosti na koncentraci liší. Opět přídavkem

Pluronicu došlo ke vzrůstu enkapsulační efektivity. Nicméně tato změna platí pouze pro 0,1% a 0,5% koncentraci. Hodnoty EE se pro 1% cholát sodný (samotný i v kombinaci) nemění. Minimální změnu nacházíme u Tweenu®20, kde se vlivem koncentrace hodnoty EE posunuly z 9,5 % na 10,1 %, což se nedá považovat za signifikantní změnu. Pro surfaktant RH 40 došlo vlivem koncentrace k poklesu EE z 9,4 % na 8,1 %. Podobný pokles nacházíme u vzorků tvořených surfaktantem HS15, konkrétně změna koncentrace z 0,1% na 1%. Nicméně další změnou koncentrace došlo ke vzrůstu EE z 7,4 % na 10,4 %.



Graf č.9 Závislost enkapsulační efektivity na typu a koncentraci surfaktantu u polymeru PLGA 75:25

Pro rozvětvený polymer PLGA A2 se nejlepšího výsledku dosáhlo při použití kombinace surfaktantů 0,5% cholátu sodného s 0,1% Pluronicem F-127, kde hodnota EE dosáhla 10,5 %. Záměnou za lipofilnější polymer PLGA 50:50, došlo k poklesu enkapsulovaného dexametazonu na 7,9 %. Nicméně, pokud porovnáme hodnoty EE pro tuto kombinaci surfaktantu u tří použitých polymerů, zjistíme, že až na jeden vzorek (PLGA A2 1% cholát sodný + 0,1% Pluronic F-127) je hodnota EE vyšší než 7 %. Přítomnost hydrofobního jádra cholátu sodného se jeví jako důležitý faktor pro zlepšení záchytu léčiva do polymeru.

Nejvhodnějším surfaktantem pro lineární polymer PLGA 50:50 se stal 0,1% Tween®20, kde hodnota EE dosáhla 10,8 %. Změnou koncentrace došlo k poklesu na

6,4 %. Tento pokles ale nevidíme u lipofilnějšího polymeru PLGA 75:25, kde se hodnoty EE v závislosti na koncentraci minimálně liší. Co je zajímavé rovněž nevykazují významnou odlišnost od hodnoty, která byla získaná u polymeru PLGA 50:50.

Největší hodnota enkapsulace 14,5 % pro polymer PLGA 75:25 se projevila u vzorku využívající neionický stabilizátor 0,5% Pluronic F-127. U polymerů A2 (graf č.7) a PLGA 50:50 (graf č.8) vidíme zanedbatelný nárůst EE v závislosti na použité koncentraci. To neplatí ale pro PLGA 75:25, kde koncentrace povrchově aktivní látky se zdá být klíčovým faktorem ovlivňujícím efektivitu enkapsulace. Z grafu č.7 a grafu č.8 lze vidět, že záměnou polymeru PLGA A2 za PLGA 50:50 došlo v případě Pluronicu F-127 ke vzrůstu enkapsulace. Další záměnou polymeru se hodnoty EE u všech použitých koncentrací opět zvýšily (graf č.9). Tudíž hodnota EE je rovněž závislá na typu použitého polymeru.

Na základě naměřených dat (graf č.7, graf č.8, graf č.9) je zřejmé, že nejlepších výsledků bylo dosaženo u tří polymerů v kombinaci s jiným surfaktantem. Pokud by se měl vybrat univerzální stabilizátor pro všechny tři polymery, byla by to kombinace cholátu sodného s 0,1% Pluronicem. PLGA A2 jako nejhydrofilnější polymer má nejmenší průměrnou EE (6,45 %). Použitím lipofilnějšího PLGA 50:50 došlo ke zlepšení výsledků, přičemž průměrná hodnota EE byla 7,38 %. Nejlepších výsledků (9,07 %) se dosáhlo pomocí nejlipofilnějšího polymeru PLGA 75:25. **Na základě toho zjištění můžeme konstatovat, že pro enkapsulaci dexametazonu je zásadní typ polymeru.**

6 ZÁVĚR

V experimentální části byly zhotovené vzorky lišící se typem polymeru, koncentrací a typem surfaktantu. Nanočástice byly připravené precipitační metodou za použití tří polymerů: PLGA A2, PLGA 50:50, PLGA 75:25 a surfaktantů Pluronic F-127, Kolliphor®HS15, Kolliphor®RH40, cholát sodný, PVA, Tween®20. Cílem bylo připravit nanočástice s vhodnými vlastnostmi pro makrofágový targeting. U všech připravených vzorků byly získané informace o velikosti nanočástic, monodisperzitě a stabilitě systémů a enkapsulační efektivitě dexametazonu.

Velikost nanočástic se měnila v závislosti na koncentraci a typu použitého surfaktantu u všech polymerů. Na základě výsledků velikosti bylo zjištěno pár opakujících se trendů. Pro PVA a Pluronic F-127, velikost NČ rostla se vzrůstající koncentrací surfaktantu. Opačný trend byl pozorován u cholátu sodného samotného i v kombinaci, kde velikost NČ v závislosti na vzrůstající koncentraci klesala. S výjimkou jednoho vzorku (PLGA 50:50 1% cholát sodný s 0,1% Pluronicem F-127) se podařilo vytvořit nanočástice větší než 100 nm.

U všech formulací byl zaznamenán záporný ZP. Hodnoty ZP se lišily v závislosti na použitém typu surfaktantu. Stínící efekt byl pozorován hlavně u PVA a Pluronic F-127. Tyto surfaktanty na povrchu částice vytvořily vrstvu, která zamaskovala povrchový náboj. Co je zajímavé, tak pro Pluronic F-127, PVA a cholát sodný v kombinaci, se hodnoty ZP v závislosti na typu polymeru prakticky nezměnily. Nejnižších hodnot ZP bylo dosaženo u všech polymerů pomocí anionického surfaktantu cholátu sodného. S výjimkou vzorků tvořených cholátem sodným nebylo dosaženo hodnoty -30 mV. Nicméně surfaktanty jako je PVA, Pluronic F-127, Tween®20, HS15 zvyšují stabilitu systému sterickým stíněním, tudíž nelze konstatovat, že vzorky připravené pomocí těchto surfaktantů jsou automaticky nestabilní.

Nejlepších výsledků EE bylo dosaženo u tří polymerů v kombinaci s jiným surfaktantem. Pro rozvětvený polymer se nejlepšího výsledku dosáhlo při použití kombinace surfaktantů 0,5% cholátu sodného s 1% Pluronicem F-127 (10,5 %), pro lineární polymer PLGA 50:50 byly částice s nejvyšší EE připraveny s 0,1% roztokem

Tween®20 (10,8 %) a pro PLGA 75:25 byl účinný 0,5% Pluronic F-127 (14,8 %). Pokud bychom měli vybrat univerzální surfaktant pro všechny tři polymery byla by to kombinace cholátu sodného s 0,1% Pluronicem F-127. Pro komerční polymery (PLGA 50:50 a 75:25) by byl vhodný také samotný Pluronic F-127. Ze všech použitých polymerů dosahovaly nejvyšších hodnot částice z PLGA 75:25. Tyto částice vykazují přijatelné vlastnosti pro makrofágový targeting, který bude součástí dalších experimentů.

7 SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1 Závislost velikosti nanočástic na koncentraci a typu surfaktantu.....	42
Graf č.2 Závislost velikosti nanočástic na koncentraci a typu surfaktantu u polymeru PLGA 50:50.....	43
Graf č.3 Závislost velikosti nanočástic na koncentraci a typu surfaktantu u polymeru PLGA 75:25.....	44
Graf č.4 Závislost zeta potenciálu na typu a koncentraci surfaktantu u polymeru PLGA A2.....	46
Graf č.5 Závislost zeta potenciálu na typu a koncentraci surfaktantu u polymeru PLGA 50:50.....	47
Graf č.6 Závislost zeta potenciálu na typu a koncentraci surfaktantu u polymeru PLGA 75:25.....	48
Graf č.7 Závislost enkapsulační efektivity na typu a koncentraci surfaktantu u polymeru PLGA A2.....	50
Graf č.8 Závislost enkapsulační efektivity na typu a koncentraci surfaktantu u polymeru PLGA 50:50.....	51
Graf č.9 Závislost enkapsulační efektivity na typu a koncentraci surfaktantu u polymeru PLGA 75:25.....	52

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Schematická struktura optických izomerů kyseliny mléčné (vlevo) a PLA (vpravo).....	11
Obr. 2 Schematická struktura kyseliny glykolové, mléčné a kopolymeru PLGA..	11
Obr. 3 Schéma polykondenzační reakce.....	12
Obr. 4 Schéma polymerizace za otevření kruhu cyklických monomerů	12
Obr. 5 Struktura poly(ϵ -kaprolaktonu).....	13
Obr. 6 Obecná struktura poly(alkylkyanoakrylátu)	13
Obr. 7 Struktura chitosanu	14
Obr. 8 Struktura alginátu.....	15
Obr. 9 Patogeneze progresu NAFLD [22]	17
Obr. 10 Schematický obrázek jaterních buněk	20
Obr. 11 Schéma nanoprecipitace	27
Obr. 12 Rozdíl intenzity signálu (horní část) a korelační funkce (spodní část) malých a velkých částic. Menší částice vykazují rychlejší fluktuace rozptýleného světla a rychlejší spád korelační funkce.....	28
Obr. 13 Převod stopy intenzity signálu (vlevo) na korelační funkci (vpravo).....	29
Obr. 14 Schéma zeta potenciálu částice v kapalině [57]	30
Obr. 15 Obecná struktura poloxameru.....	34
Obr. 16 Struktura polyvinylalkoholu	34
Obr. 17 Struktura cholátu sodného	34
Obr. 18 Struktura Tweenu® 20	35
Obr. 19 Struktura Kolliphor® RH 40	35
Obr. 20 Obecná struktura polyethoxylované 12-hydroxystearové kyseliny.....	35

9 SEZNAM ROVNIC

(1).....	28
(2).....	32
(3).....	39

10 SEZNAM TABULEK

Tabulka č.1 Body kalibrační křivky	38
Tabulka č.2 Naměřené hodnoty připravených vzorků	41

11 SEZNAM ZKRATEK

CCL	chemokinový ligand/cytokin
CCL2	chemokinový ligand/cytokin 2
DAG	diacylglycerol
DAMP	molekulární vzorce spojené s poškozením
DLS	dynamický rozptyl světla
EE	enkapsulační efektivita
EPR	efekt zvýšené permeability a retence
FDA	Food and Drug Administration
FFA	volné mastné kyseliny
HS15	Kolliphor®15
HSC	jaterní hvězdicové buňky
IL	interleukin
IL-1 β	interleukin 1 beta
IL-6	interleukin 6
IR	inzulinová rezistence
KC	Kupfferovy buňky
LSEC	sinusoidální endoteliální buňky
M1	makrofágový fenotyp 1
M2	makrofágový fenotyp 2
MK	mastné kyseliny
MR	manózový receptor
MS	metabolický syndrom

NAFLD	nealkoholické ztučnění jater
NASH	nealkoholická steatohepatitida
NČ	nanočástice
NF- κ B	nukleární faktor kappa B
PAC/PACA	poly(alkyl kyanoakrylát)
PAMP	molekulární vzorce asociované s patogenem
PCL	poly(ϵ -kaprolakton)
PDI	index polydisperzity
PDLA	poly(D-kyselina mléčná)
PEG	polyethylenglykol
PLA	poly(mléčná kyselina)
PLGA 50:50	poly(lactid-co-glycolid acid) v poměru 50:50
PLGA 75:25	poly(lactid-co-glycolid acid) v poměru 75:25
PLGA A2	poly(lactid-co-glycolid acid) s 2% kyselinou polyakrylovou
PLLA	poly(L-kyselina mléčná)
Pluronic F-127	poloxamer 407, Pluronic® F-127
PSR	fosfatidylserinový receptor
PVA	polyvinylalkohol
RH40	Kolliphor® RH40
ROS	reaktivní formy kyslíku
TGF- β	transformující růstový faktor beta
TNF- α	tumor nekrotizující faktor alfa
ZP	zeta potenciál

12 BIBLIOGRAFIE

- [1] WILCZEWSKA, Agnieszka, Katarzyna NIEMIROWICZ, Karolina MARKIEWICZ a Halina CAR. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports*. 2012, **64**(5), 1020-1037. ISSN 17341140. Dostupné z: doi:10.1016/S1734-1140(12)70901-5
- [2] RABIŠKOVÁ, Miloslava. Využití nanočásticových systémů v medicíně. *Remedia*. 2008, **18**(1), 89-97.
- [3] KUBACKOVA, Jana, Jarmila ZBYTOVSKA a Ondrej HOLAS. Nanomaterials for direct and indirect immunomodulation: A review of applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020, **142**. ISSN 09280987. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2019.105139
- [4] HANS, M.L a A.M LOWMAN. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2002, **6**(4), 319-327. ISSN 13590286. Dostupné z: doi:10.1016/S1359-0286(02)00117-1
- [5] SEMRÁDOVÁ, Adélka. *Acidorezistentní polymerní nanočástice: příprava a hodnocení* [online]. Hradec Králové, 2019 [cit. 2022-05-12]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/20.500.11956/106837>. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie. Vedoucí práce Holas, Ondřej.
- [6] ŠNEJDROVÁ, EVA a MILAN DITTRICH. Poly(α -hydroxykyseliny) jako nosiče léčiv. *Chemické listy*. 2011, **105**(1), 27-33.
- [7] LI, Ying, Zhaowei CHU, Xiaoming LI et al. The effect of mechanical loads on the degradation of aliphatic biodegradable polyesters. *Regenerative Biomaterials*. 2017, **4**(3), 179-190. ISSN 2056-3418. Dostupné z: doi:10.1093/rb/rbx009

- [8] TAMMAM, Salma, Hassan AZZAZY a Alf LAMPRECHT. Biodegradable Particulate Carrier Formulation and Tuning for Targeted Drug Delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2015, **11**(4), 555-577. ISSN 15507033. Dostupné z: doi:10.1166/jbn.2015.2017
- [9] PANDEY, Sanjeev, Chandana HALDAR, Dinesh PATEL a Pralay MAITI. Biodegradable Polymers for Potential Delivery Systems for Therapeutics. *Multifaceted Development and Application of Biopolymers for Biology, Biomedicine and Nanotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, s. 169-202. Advances in Polymer Science. ISBN 978-3-642-40122-0. Dostupné z: doi:10.1007/12_2012_198
- [10] DANAFAR, H. Applications of Copolymeric Nanoparticles in Drug Delivery Systems. *Drug Research*. 2016, **66**(10), 506-519. ISSN 2194-9379. Dostupné z: doi:10.1055/s-0042-109865
- [11] BŘÍŽĎALA, Jan. Syntetické makromolekulární látky. In: *E-chembook.eu* [online]. [cit. 2021-11-13]. Dostupné z: <http://e-chembook.eu/synteticke-makromolekularni-latky>
- [12] SMRČKOVÁ, Markéta. *Polymerace a kopolymerace e- ϵ -kapolaktonu pomocí organických a organokovových katalyzátorů* [online]. Brno, 2009 [cit. 2021-11-13]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/9519>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Ústav chemie materiálů. Vedoucí práce Soňa Hermanová.
- [13] BÍLEK, Michal. *Příprava biodegradovatelných polyesterů a polykarbonátů pomocí biologicky akceptovatelných iniciátorů na bázi komplexů hořčíku* [online]. Pardubice, 2015 [cit. 2022-04-23]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10195/61119>. Bakalářská práce. Univerzita Pardubce. Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Růžička, Aleš.

- [14] MILLER, K., J.E. HSU a L.J. SOSLOWSKY. Materials in Tendon and Ligament Repair. *Comprehensive Biomaterials*. Elsevier, 2011, **6**, 257-279. ISBN 9780080552941. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-055294-1.00218-X
- [15] GENTILE, Piergiorgio, Valeria CHIONO, Irene CARMAGNOLA a Paul HATTON. An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014, **15**(3), 3640-3659. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms15033640
- [16] SEVERINO, Patricia, Classius DA SILVA, Luciana ANDRADE, Daniele DE LIMA OLIVEIRA, Joana CAMPOS a Eliana SOUTO. Alginate Nanoparticles for Drug Delivery and Targeting. *Current Pharmaceutical Design*. 2019, **25**(11), 1312-1334. ISSN 13816128. Dostupné z: doi:10.2174/1381612825666190425163424
- [17] SHEKA, Adam, Oyedele ADEYI, Julie THOMPSON, Bilal HAMEED, Peter CRAWFORD a Sayeed IKRAMUDDIN. Nonalcoholic Steatohepatitis. *JAMA*. 2020, **323**(12). ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.2020.2298
- [18] HŮLEK, PETR a ŠTĚPÁN ŠEMBERA. Nealkoholové ztukovatění jater. MAREK, Josef a Michal VRABLÍK. *Markova farmakoterapie vnitřních nemocí 5., zcela přepracované a doplněné vydání*. 5. Praha: Grada Publishing, a.s., 2019, s. 259. ISBN 978-80-247-5078-1.
- [19] MACHADO, Mariana Verdelho. Non-alcoholic fatty liver disease: What the clinician needs to know. *World Journal of Gastroenterology*. 2014, **20**(36). ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v20.i36.12956
- [20] KAREN, Igor, Hana ROSLOVÁ, Miroslav SOUČEK, Štěpán SVAČINA, Michal VRABLÍK a Dana MORAVČÍKOVÁ. *Metabolický syndrom: doporučený diagnostický a terapeutický postup pro všeobecné praktické lékaře 2019*. 2019. Praha: Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře,

Společnost všeobecného lékařství, 2019. Doporučené postupy pro praktické lékaře. ISBN 978-80-88280-13-2.

- [21] FEJFAR, Tomáš, Petr HŮLEK a Irma DRESSLEROVÁ. Therapy of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Interní medicína pro praxi*. 2016, **18**(5), 233-235. ISSN 12127299. Dostupné z: doi:10.36290/int.2016.053
- [22] KITADE, Hironori, Guanliang CHEN, Yinhua NI a Tsuguhito OTA. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance: New Insights and Potential New Treatments. *Nutrients*. 2017, **9**(4). ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu9040387
- [23] Inzulinová rezistence. In: *Lab Tests Online CZ* [online]. 2020 [cit. 2021-11-30]. Dostupné z: <https://www.labtestsonline.cz/inzulinova-rezistence.html>
- [24] LORBEK, Gregor a Damjana ROZM. Cholesterol and Inflammation at the Crossroads of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Atherogenesis. *Atherogenesis*. 1. Slovenia: InTech, 2012, s. 287. ISBN 978-953-307-992-9. Dostupné z: doi:10.5772/27316
- [25] ŠTOFKOVÁ, Andrea. Komplikace obezity. ROKYTA, Richard a KOLEKTIV. *Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi*. 1. Praha: Grada Publishing, 2015, s. 285-286. ISBN 978-80-247-4867-2.
- [26] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. 4. Praha: Grada, 2012, 206, 288. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [27] BALKOVÁ, Patricie. *Úloha lipidů a ROS v kardioprotektivním mechanismu chronické hypoxie* [online]. Praha, 2010 [cit. 2022-05-12]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/20.500.11956/23656>. Dizertační práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra buněčné biologie.
- [28] BARTNECK, Matthias, Klaudia WARZECHA a Frank TACKE. Therapeutic targeting of liver inflammation and fibrosis by nanomedicine. *Hepatobiliary*

- Surg Nutr.* 2014, **2014**(36, 364-376. Dostupné z: doi:10.3978/j.issn.2304-3881.2014.11.02
- [29] TACKE, Frank. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases. *Journal of Hepatology.* 2017, **66**(6), 1300-1312. ISSN 01688278. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhep.2017.02.026
- [30] TACKE, Frank a Henning ZIMMERMANN. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *Journal of Hepatology.* 2014, **60**(5), 1090-1096. ISSN 01688278. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhep.2013.12.025
- [31] ARRESE, Marco, Daniel CABRERA, Alexis KALERGIS a Ariel FELDSTEIN. Innate Immunity and Inflammation in NAFLD/NASH. *Digestive Diseases and Sciences.* 2016, **61**(5), 1294-1303. ISSN 0163-2116. Dostupné z: doi:10.1007/s10620-016-4049-x
- [32] HUANG, Xuan, Yong LI, Mingui FU a Hong-Bo XIN. Polarizing Macrophages In Vitro. *Macrophages.* New York, NY: Springer New York, 2018, **2018**(1784), 120-121. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-7836-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-7837-3_12
- [33] ČÁPOVÁ, Barbora. *Diferenciace lidských M2 monocytů/makrofágů a jejich úloha u transplantací ledvin* [online]. Praha, 2019 [cit. 2022-05-12]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/20.500.11956/104909>. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra buněčné biologie. Vedoucí práce Stříž, Ilja.
- [34] ALISI, Anna, Guido CARPINO, Felipe OLIVEIRA, Nadia PANERA, Valerio NOBILI a Eugenio GAUDIO. The Role of Tissue Macrophage-Mediated Inflammation on NAFLD Pathogenesis and Its Clinical Implications. *Mediators of Inflammation.* 2017, **2017**, 1-15. ISSN 0962-9351. Dostupné z: doi:10.1155/2017/8162421
- [35] MAREK, JOSEF a MICHAL VRABLÍK. Markova farmakoterapie vnitřních nemocí: 5., zcela přepracované a doplněné vydání: Nealkoholové ztukovatění

- jater. MAREK, Josef a Vrablík KOLEKTIV. *Markova farmakoterapie vnitřních nemocí: 5., zcela přepracované a doplněné vydání. 5. vydání.* Praha: Grada Publishing, a.s., 2019. ISBN 978-80-247-5078-1.
- [36] Glukokortikoidy. LÜLLMANN, Heinz a Klaus MOHR. *Farmakologie a toxikologie.* Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004, s. 439-442. ISBN 8024708361.
- [37] CLAEYS, S., T. DE BELDER, G. HOLTAPPELS, P. GEVAERT, B. VERHASSELT, P. VAN CAUWENBERGE a C. BACHERT. Macrophage mannose receptor in chronic sinus disease. *Allergy.* 2004, **59**(6), 606-612. ISSN 0105-4538. Dostupné z: doi:10.1111/j.1398-9995.2004.00471.x
- [38] FADOK, Valerie, Donna BRATTON, S FRASCH, Mary WARNER a Peter HENSON. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death & Differentiation.* 1998, **5**(7), 551-562. ISSN 1350-9047. Dostupné z: doi:10.1038/sj.cdd.4400404
- [39] WONG, Kit, Patricia VALDEZ, Christine TAN, Sherry YEH, Jo-Anne HONGO a Wenjun OUYANG. Phosphatidylserine receptor Tim-4 is essential for the maintenance of the homeostatic state of resident peritoneal macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2010, **107**(19), 8712-8717. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0910929107
- [40] BOLTNAROVA, Barbora, Jana KUBACKOVA, Josef SKODA et al. PLGA Based Nanospheres as a Potent Macrophage-Specific Drug Delivery System. *Nanomaterials.* 2021, **11**(3), 1-15. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano11030749
- [41] ALMEIDA, Joao, Allen CHEN, Aaron FOSTER a Rebekah DREZEK. In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine.* 2011, **6**(5), 815-835. ISSN 1743-5889. Dostupné z: doi:10.2217/nnm.11.79
- [42] Nanoparticles charge through tumors. *Nano Today.* 2016, **11**(3), 273-274. ISSN 17480132. Dostupné z: doi:10.1016/j.nantod.2016.05.001

- [43] FRÖHLICH, Eleonore. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 2012, (7), 55775591. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S36111
- [44] BLANCO, Elvin, Haifa SHEN a Mauro FERRARI. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology*. 2015, **33**(9), 941-951. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt.3330
- [45] BABOCI, Lorena, Sara CAPOLLA, Federica DI CINTIO et al. The Dual Role of the Liver in Nanomedicine as an Actor in the Elimination of Nanostructures or a Therapeutic Target. *Journal of Oncology*. 2020, **2020**, 1-15. ISSN 1687-8450. Dostupné z: doi:10.1155/2020/4638192
- [46] ZIELIŃSKA, Aleksandra, Filipa CARREIRÓ, Ana OLIVEIRA et al. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*. 2020, **25**(16), 3-7. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25163731
- [47] PINTO REIS, Catarina, Ronald NEUFELD, , RIBEIRO a Francisco VEIGA. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2006, **2**(1), 5-7. ISSN 15499634. Dostupné z: doi:10.1016/j.nano.2005.12.003
- [48] ŠEVČÍKOVÁ, PETRA, VĚRA KAŠPÁRKOVÁ, JIŘÍ KREJČÍ a PAVLÍNA VLTAVSKÁ. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické listy*. 2014, **108**(5), 479-482.
- [49] The principles of dynamic light scattering. In: *Anton Paar* [online]. [cit. 2021-12-29]. Dostupné z: <https://wiki.anton-paar.com/en/the-principles-of-dynamic-light-scattering/>
- [50] DANAEI, M., M. DEGHANKHOLD, S. ATAEI, F. HASANZADEH DAVARANI, R. JAVANMARD, A. DOKHANI, S. KHORASANI a M. MOZAFARI. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical

Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*. 2018, **10**(2), 8. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics10020057

- [51] HOLAS, Ondřej. *Fyzikální základy lékových forem: Stabilita disperzních soustav*. Hradec Králové, 2019.
- [52] KRATOCHVÍL, Zdeněk. *Studium stability biopolymerů pomocí technik rozptylu světla* [online]. Brno, 2015 [cit. 2022-01-01]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/39011>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Michal Kalina.
- [53] Tabulky. *Základní praktická cvičení z farmaceutické technologie*. 1. Praha: Karolinum, 2020, s. 132-134. ISBN 978-80-246-4561-2.
- [54] Polyvinylalkohol. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2006, s. 78. ISBN 80-7080-617-6.
- [55] Sodium Cholate. In: *PubChem* [online]. National Center for Biotechnology Information [cit. 2022-04-24]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-cholate>
- [56] Sodium Cholate. In: *Nectagen | Next Gen Antibodies for All* [online]. [cit. 2022-04-24]. Dostupné z: <https://www.nectagen.com/reference-data/ingredients/detergents/sodium-cholate>
- [57] Kolliphor® RH 40 - Technical Information. In: *BASF PHARMA* [online]. Ludwigshafen, Německo: BASF PHARMA, 2020 [cit. 2022-01-02]. Dostupné z: <https://pharma.basf.com/products/kolliphor-rh-40>
- [58] Kolliphor® HS 15 - Technical Information. In: *BASF PHARMA* [online]. Ludwigshafen, Německo: BASF PHARMA, 2020, s. 2 [cit. 2022-01-02]. Dostupné z: <https://pharma.basf.com/products/kolliphor-hs-15>

[59] POLČÍK, M. Sledování nanášení barviva pomocí měření zeta-potenciálu. *Chemagazín* [online]. 2010, **20**(4) [cit. 2022-30-1]. Dostupné z: http://www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin_2010/file/CHXX_4_c19.pdf