

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Příprava a hodnocení nanočástic pro cílenou
léčbu zánětlivých onemocnění**

**Preparation and evaluation of nanoparticles for
targeted treatment of inflammatory diseases**

Hradec Králové 2023

Natalie Wurzel

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

V Hradci Králové

Natalie Wurzel

Ráda bych na tomto místě poděkovala vedoucímu mé diplomové práce PharmDr. Ondřejovi Holasovi, Ph.D. za odborné vedení, přátelský přístup, trpělivost a ochotu při vypracování této práce. Poděkování patří i Mgr. Barboře Boltarové, která mi byla oporou v laboratoři, pomáhala mi se získáváním údajů pro experimentální část práce a poskytovala mi cenné informace ke zpracování dat.

OBSAH

ABSTRAKT	6
ABSTRACT.....	7
SEZNAM ZKRATEK	8
ÚVOD.....	9
TEORETICKÁ ČÁST	10
1 Nanotechnologie	10
1.1 Vznik a vývoj nanotechnologie	10
1.2 Využití nanotechnologie.....	11
1.2.1 Textilní průmysl.....	11
1.2.2 Potravinářský průmysl a zemědělství	11
1.2.3 Kosmetický průmysl	12
1.2.4 Ochrana životního prostředí.....	12
1.2.5 Elektronika.....	12
1.2.6 Zdravotnictví.....	12
2 Nanočástice	13
2.1 Polymerní nanočástice.....	15
2.1.1 PLGA.....	16
3 Cílená distribuce léčiv	17
3.1 Pasivní targeting	18
3.2 Aktivní targeting.....	20
4 Příprava polymerních nanočástic	21
4.1 Nanoprecipitace.....	21
5 Hodnocení nanočástic	24
5.1 Velikost.....	24
5.2 Index polydisperzity	26
5.3 Zeta potenciál	26
CÍL PRÁCE	29
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
6 Použité přístroje	30
7 Použité suroviny	30
8 Použité metody	31
8.1 Příprava nanočástic.....	31
8.2 Měření velikosti, PDI a zeta potenciálu	32

8.3	Stanovení EE a DL pomocí HPLC	32
8.4	Čištění vzorků.....	35
VÝSLEDKY A DISKUZE.....		37
9	Velikost nanočástic	38
10	PDI nanočástic	39
11	EE a DL nanočástic	40
11.1	Optimální koncentrace DA.....	45
11.2	Optimální polymer.....	45
12	Purifikované vzorky nanočástic	46
12.1	Velikost nanočástic po purifikaci	47
12.2	PDI čištěných nanočástic.....	48
12.3	ZP čištěných nanočástic	50
12.4	EE a DL čištěných nanočástic	51
ZÁVĚR.....		53
SEZNAM GRAFŮ		54
SEZNAM OBRÁZKŮ.....		55
SEZNAM TABULEK		56
POUŽITÁ LITERATURA		57

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutická technologie

Školitel: PharmDr. Ondřej Holas, PhD.

Konzultant: Mgr. Barbora Boltnarová

Posluchač: Natalie Wurzel

Název diplomové práce: Příprava a hodnocení nanočástic pro cílenou léčbu zánětlivých onemocnění

Nanočástice jsou ve zdravotnických vědách využívány kromě jiného pro cílené dodání léčiv. Toho se využívá pro terapii nádorových a chronických zánětlivých onemocnění.

Cílem této diplomové práce bylo připravit nanočástice vhodné pro cílenou léčbu zánětlivých onemocnění. Úkolem bylo stanovit ideální koncentraci účinné látky, která zajistí vysokou enkapsulační efektivitu a drug loading. Zkoumal se také rozdíl mezi nanočásticemi připravenými z PLGA 5/5E a PLGA 7/3A.

Nanočástice byly připraveny metodou nanoprecipitace. Matrici nanočástic tvořil PLGA s různým poměrem kyseliny mléčné a glykolové. Jako organické rozpouštědlo byl použitý aceton. Enkapsulovanou léčivou látkou byl protizánětlivě působící dexametazon acetát. Vodnou fází tvořil 0,1% vodný roztok Pluronicu F-127. Mezi hodnocené parametry vzniklých nanočástic patřila velikost, index polydisperzity, zeta potenciál, enkapsulační efektivita a drug loading.

Výsledky ukazují, že nejvýznamnější vliv na vlastnosti nanočástic měla koncentrace léčivé látky použité po přípravu. Typ použitého polymeru na výsledné nanočástice neměl významný vliv.

Klíčová slova: Nanočástice, polymery, biodegradovatelnost, makrofágy, zánět, targeting

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradci Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Supervisor: PharmDr. Ondřej Holas, PhD

Consultant: Mgr. Barbora Boltarová

Student: Natalie Wurzel

Title of Thesis: Preparation and evaluation of nanoparticles for targeted treatment of inflammatory diseases

Nanoparticles are used in the health sciences for, among other things, targeted drug delivery. This is used for the therapy of cancer and chronic inflammatory diseases.

The aim of this diploma thesis was to prepare nanoparticles suitable for targeted treatment of inflammatory diseases. The task was to determine the ideal concentration of the active substance, which would ensure high encapsulation efficiency and drug loading. The difference between nanoparticles prepared from PLGA 5/5E and PLGA 7/3A was also investigated.

Nanoparticles were prepared by the nanoprecipitation method. The matrix of the nanoparticles was composed of PLGA with different ratios of lactic acid and glycolic acid. Acetone was used as the organic solvent. The encapsulated active substance was the anti-inflammatory dexamethasone acetate. The aqueous phase consisted of a 0.1% aqueous solution of Pluronic F-127. The evaluated parameters of the resulting nanoparticles included size, polydispersity index, zeta potential, encapsulation efficiency, and drug loading.

The results indicate that the concentration of active substance used for the preparation had the greatest influence on the properties of the nanoparticles. The type of used polymer had no significant impact on the final nanoparticles.

Key words: Nanoparticles, polymers, biodegradability, macrophages, inflammation, targeting

SEZNAM ZKRATEK

ACN	Acetonitril
AUC	Plocha pod křivkou
DA	Dexametazon acetát
DL	Drug loading
DLS	Dynamický rozptyl světla
EE	Enkapsulační efektivita
F127	Pluronic F-127
GA	Kyselina glykolová
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LA	Kyselina mléčná
MPS	Mononukleárně fagocytický systém
PDI	Index polydisperzity
PEG	Polyethylenglykol
PGA	Kyselina polyglykolová
PLA	Kyselina polymléčná
PLGA	Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové
PLGA 5/5E	Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové v poměru 50:50
PLGA 7/3A	Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové v poměru 75:25
RES	Retikuloendotelový systém
ZP	Zeta potenciál

ÚVOD

Nanotechnologie představuje rozšiřující se výzkumnou oblast. V celé řadě odvětví se jejímu využití poslední roky věnuje velká pozornost. Široké uplatnění nacházejí nanočástice i ve zdravotnictví. Důležitým příkladem, který je předmětem zkoumání mnoha studií, je cílené podání léčiv. Podání léčiva ve formě nanočástic s sebou totiž přináší množství benefitů, které mají vliv na zlepšení výsledků terapie.

Své uplatnění nacházejí nanočásticové systémy především v moderních zobrazovacích metodách, teranostice a terapii různých forem rakoviny. Právě terapie nádorových onemocnění, kde se používají léčiva s širokým spektrem nežádoucích účinků, je typickou ukázkou toho, jak mohou nanoformulace zefektivnit léčbu.

Dalším příkladem cílené léčby je léčba zánětlivých onemocnění, kdy se využívá pasivního zacílení na makrofágy, které mají v regulaci zánětu zásadní úlohu. Klíčovou roli v tomto podání hrají fyzikálně chemické vlastnosti nanočástic.

Pro přípravu nanočástic lze využít různé metody. Vždy je důležité zvážit jejich výhody a nevýhody a vybrat optimální metodu pro přípravu konkrétního typu nanočástic. Materiály používané pro přípravu nanočástic by měly být biokompatibilní a biodegradovatelné.

Příprava nanočástic a její optimalizace je tedy pro případné použití v praxi základním kamenem. Na tuto problematiku byla zaměřena experimentální část této práce, kde bylo cílem nalezení optimálních podmínek pro přípravu polymerních nanočástic, které by mohly být využity pro další experimenty.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Nanotechnologie

Nanotechnologie je vědecký výzkumný obor. Předpona „nano“, která je součástí samotného termínu, zároveň patří mezi předpony soustavy SI. Pochází z řeckého označení pro trpaslíka a znamená jednu miliardtinu (10^{-9}) základní jednotky. Již podle pojmenování je tedy zřejmé, že se tento obor zabývá objekty malých rozměrů. (1)

Můžeme se setkat i s pojmem nanověda, jednotlivá označení bychom ale měli rozlišovat. Zatímco nanověda studuje struktury s velikostí v rozmezí 1 až 100 nm, nanotechnologie se zabývá jejich praktickým využitím. (1, 2, 3)

1.1 Vznik a vývoj nanotechnologie

Termín „nanotechnologie“ poprvé použil japonský fyzik Norio Taniguchi v roce 1974, nicméně zmínky o využití nanočástic v praxi máme již z dob starověku. Nejstarším příkladem jsou Lykurgovy poháry pocházející ze 4. století. Jejich jedinečnost spočívá ve změně barvy v závislosti na světle. Příčinou tohoto efektu jsou obsažené nanokrystaly kovů. Předpokládáme ovšem, že tehdejší skláři si neuvědomovali, že při jejich výrobě budují základ nového technického oboru, který v budoucnu dosáhne takového rozmachu. (1, 4, 5)

Za zakladatele oboru nanotechnologie je považován americký fyzik a nositel Nobelovy ceny Richard Phillips Feynman. V roce 1959 na výročním zasedání neziskové organizace American Physical Society v Kalifornském technologickém institutu představil svou přednášku *There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics* (v překladu Tam dole je spousta místa: Pozvánka ke vstupu do nového světa fyziky). Během ní posluchače seznámil se svou vizí manipulace s látkou na úrovni molekul a atomů. Tato schopnost podle jeho slov umožní vznik nových materiálů s unikátními vlastnostmi a výrobu přístrojů miniaturních rozměrů, které by mohly najít uplatnění v různých oborech. Feynmanovy myšlenky přilákaly pozornost mnoha dalších osobností, postupně vznikaly nové

výzkumné práce zabývající se touto problematikou a došlo ke spoustě důležitých objevů a zjištění. (1, 2, 5)

Zásadní přínos mělo sestrojení skenovacího tunelového mikroskopu a mikroskopu atomárních sil v 80. letech minulého století. Tyto přístroje umožnily nejen přesnou vizualizaci, ale právě i manipulaci s molekulárními a atomárními strukturami. Myšlenky, kvůli kterým byl Feynman dříve označován za snílka, se tedy nakonec vyplnily. (2, 4, 5)

V důsledku prudkého vzestupu zájmu byl pokrok v dalších letech ještě rychlejší. Po celém světě začaly vznikat investiční programy a výzkum se postupně rozšířil do všech průmyslově vyspělých zemí. V posledních letech je velký důraz kladen i na odpovídající vzdělávání v oblasti nanotechnologií, což je důležitým aspektem pro další rozvoj. (2, 4)

1.2 Využití nanotechnologie

Dnes už je nanotechnologie multidisciplinárním oborem a s nanočásticemi se setkáváme i v běžném životě. V následujících podkapitolách jsou uvedeny a stručně popsány alespoň nějaké příklady. Podrobněji je popsáno využití nanotechnologií ve zdravotnictví, což souvisí s tématem této práce.

1.2.1 Textilní průmysl

Díky nanotechnologii se v dnešní době můžeme setkat s textiliemi různých vlastností. Existují například látky odolné proti roztržení či ušpinění, látky nemačkové či látky, které zabraňují prostupu mikroorganismů. (6, 7)

1.2.2 Potravinářský průmysl a zemědělství

Použití nanotechnologií v zemědělství, například ve formě nanohnojiv a nanopesticidů, zvýšilo nejen produktivitu, ale i kvalitu získaných plodin. V potravinářství se nanočástice využívají jako barviva, chuťová korigencia, konzervační nebo protispěkové látky. Došlo také k inovaci obalů, díky kterým si teď potraviny zachovávají kvalitu a čerstvost delší dobu. (7-9)

1.2.3 Kosmetický průmysl

I v kosmetických přípravcích se dnes nanočástice vyskytují poměrně běžně. Příkladem mohou být nanočástice oxidu titaničitého a oxidu zinečnatého. Ty jsou součástí některých opalovacích přípravků. Oproti klasickým minerálním filtrům se lépe nanášejí a nezanechávají na pokožce bílý povlak. Dále lze uvést nanočástice oxidu železitého, jež fungují jako pigmenty v dekorativní kosmetice. (4, 6, 7)

1.2.4 Ochrana životního prostředí

Mnoho nanotechnologických inovací má pozitivní vliv na naši planetu. Používají se například při čištění vod, půd a ovzduší. Ke snižování znečištění životního prostředí přispívají ale i nepřímo. Jejich zásluhou se rozšiřuje využívání obnovitelných zdrojů energie a vznikají také materiály s delší životností. (1, 6)

1.2.5 Elektronika

Značný pokrok přinesla aplikace nanotechnologie do oblasti elektroniky. Dochází k výrobě stále menších součástek, což vede ke vzniku kompaktnějších produktů. Vyvinuly se materiály s lepšími mechanickými, tepelnými či elektrickými vlastnostmi a také materiály umožňující zhotovení flexibilní elektroniky. Další výhodou je také produkce energeticky úspornějších zařízení. (1, 6, 10)

1.2.6 Zdravotnictví

Velká pozornost je poslední roky věnovaná také využití nanotechnologií ve zdravotnictví. Nanočástice a nanomateriály mají v tomto oboru velmi důležitou roli, zejména díky obrovskému potenciálu a široké možnosti jejich uplatnění. (11-14)

Nanočástice se používají v zobrazovacích technikách, jako je například magnetická rezonance, optická koherentní tomografie, pozitronová emisní tomografie či jednofotonová emisní počítačová tomografie. Tyto pokročilé techniky vedou k získávání snímků s vysokým rozlišením a kontrastem, což lékařům umožňuje včasnou, a především přesnou diagnostiku. (6, 12, 13, 15)

K dispozici jsou nyní i inovativní diagnostické metody, které disponují vyšší citlivostí a specifíčností. Jako příklad lze uvést nanočástice v biosenzorech, které lze využít například k detekci iontů těžkých kovů či bakteriální kontaminace nebo ke stanovení hladiny glukózy v krvi. Dalším příkladem mohou být kovové a polovodičové nanočástice. Ty mají díky zlepšenému rozptylu světla a absorpčních vlastností obrovský potenciál nejen pro diagnostiku, ale i terapii rakoviny. (6, 11, 16)

Nanotechnologie vedly také ke vzniku nanomateriálů, které napodobují biologické struktury a jsou kompatibilní s lidským tělem. Toho se využívá při zhotovování kloubních, kostních či zubních náhrad a k podpoře regenerace poškozených orgánů. (6, 13, 16)

Nanotechnologie se uplatňují i při vývoji vakcín. Nanovakcíny mají větší stabilitu, vyvolávají lepší imunogenicitu a mají dlouhodobější účinek. Využívají se v boji proti infekčním onemocněním, v současnosti probíhají ale i preklinické a klinické studie nanovakcín protinádorových. (6, 17, 18)

Ve výzkumné fázi jsou také programovatelné stroje s velikostí v řádu nanometrů. Tyto nanoroboty by mohly nejen usnadnit práci lékařům, ale také by mohly přinést mnohá zlepšení týkající se chirurgických zákroků, cíleného dodávání léčiv nebo diagnostiky. (16, 19)

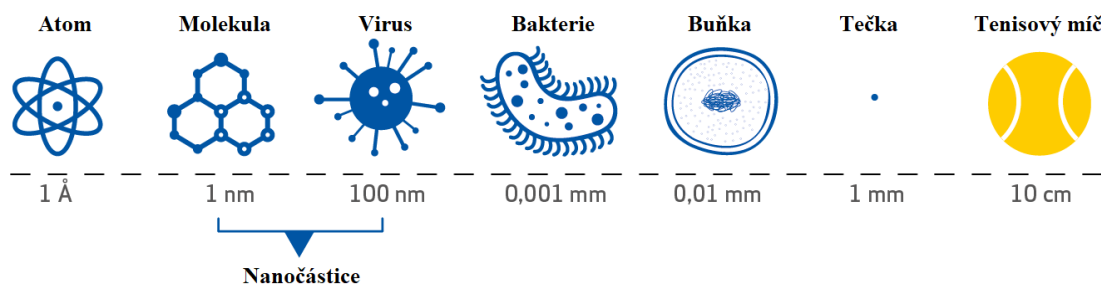
Některé nanočástice disponují baktericidními vlastnostmi. Příkladem mohou být nanočástice stříbra, které se využívají k předcházení bakteriálních infekcí nebo k jejich léčbě. Jsou součástí zdravotnických prostředků k ošetření ran, krytí na rány, roušek nebo mohou tvořit potahovou vrstvu chirurgických nástrojů. (20)

Poslední způsob, který je v tomto výčtu uveden, je využití nanočástic pro cílenou distribuci léčiv. Na tuto problematiku se podrobněji zaměřuje kapitola 3.

2 Nanočástice

Nanočástice tvoří základní stavební jednotku nanomateriálů. Uvést jednoznačnou definici jejich velikosti je poměrně složité. Obvykle se setkáváme s tvrzením, že

nanočástice by měly mít alespoň jeden rozměr ve velikosti 1 až 100 nm. V praxi se ovšem nejčastěji setkáváme s nanočásticemi, které mají velikost v rozmezí 100 až 200 nm. (1, 2, 5, 21-23)



Obrázek 1 Velikost nanočástic (23)

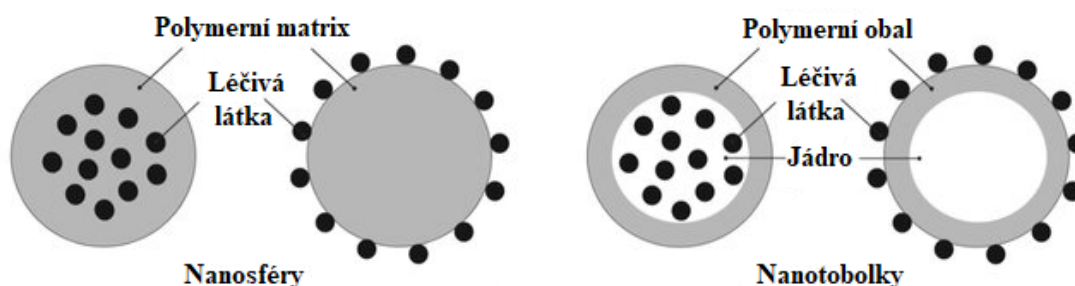
Nanočástice můžeme klasifikovat podle chemické struktury do třech základních tříd, které se následně dále dělí. (3, 14, 21)

- Anorganické
 - Kvantové tečky
 - Uhlíkové nanotrubičky
 - Kovové nanočástice
- Organické
 - Lipozomy
 - Dendrimery
 - Polymerní nanočástice
- Hybridní
 - Nanopěny

Další text bude zaměřen na polymerní nanočástice, jelikož právě ty byly v experimentální části připravovány a hodnoceny.

2.1 Polymerní nanočástice

Polymerní nanočástice mohou mít formu nanosfér či nanotobolek. Nanosféry jsou homogenní matricové částice. Molekuly léčivé látky mohou být adsorbovány na povrchu nebo dispergované uvnitř nanočástice. Nanotobolky jsou vezikulární systémy, jejichž struktura je tvořena jádrem a polymerním obalem. Molekuly léčivé látky se u takových nanočástic nachází obvykle v jádře. (10, 24, 25)



Obrázek 2 Nanosféry a nanotobolky (25)

Pro přípravu polymerních nanočástic lze použít různé polymery, konkrétní typ však ovlivní vlastnosti výsledných nanočástic. Základní dělení polymerů je podle jejich původu, tedy na polymery přírodní a syntetické. Přírodní polymery, mezi které řadíme například albumin, kolagen, želatinu, elastin, alginát, chitosan či dextran, se ovšem tolik nevyužívají. Důvodem je jejich rozdílná čistota a potřeba zesíťování, které by ovšem mohlo způsobit denaturaci léčivé látky. V dnešní době se tedy více pozornosti věnuje polymerům syntetickým. Ty můžeme dále rozdělit na polymery biodegradovatelné a nebiodegradovatelné. (18, 26)

Jako příklad nebiodegradovatelných polymerů lze uvést polyakrylamid a polymethakrylát. Od použití této skupiny polymerů se ovšem také upustilo. Nebiodegradovatelné polymery se totiž ukládají v buňkách a tkáních a dochází tak k chronickému toxickému působení na lidský organismus. (27)

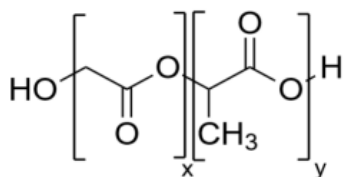
Mezi biodegradovatelné polymery řadíme kyselinu polymléčnou (PLA), kyselinu polyglykolovou (PGA), kopolymer kyseliny mléčné a glykolové (PLGA), poly(ϵ -kapolakton) a polyalkylkyanoakryláty. Ne všechny biologicky odbouratelné materiály jsou ovšem považovány za bezpečné pro aplikaci u lidí. Například

polyalkylkyanoakryláty jsou v lidském těle degradovány za vzniku toxických produktů. Ideální polymer by měl tedy kromě biodegradovatelnosti splňovat také požadavky na biokompatibilitu. (18, 28-30)

2.1.1 PLGA

PLGA je jedním z nejlépe charakterizovaných a nejčastěji používaných polymerů pro přípravu nanočástic. Jeho terapeutické použití u lidí schválil americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv i Evropská léková agentura. (18, 28, 31)

PLGA je lineární alifatický polyester. Konkrétně se jedná o kopolymer mléčné kyseliny (LA) a glykolové kyseliny (GA). Fyzikálně chemické vlastnosti PLGA jsou závislé především na molekulové hmotnosti a poměru LA a GA. Struktura PLGA je uvedena na Obrázku 3, kde x znamená počet molekul GA a y počet molekul LA. (27-29, 31)



Obrázek 3 Struktura PLGA (28)

PLGA lze využít pro dodání léčiv s různou molekulovou hmotností. Jako příklad lze uvést peptidy, proteiny, protizánětlivé látky, cytokiny, protinádorová léčiva, antibiotika, antagonisty narkotik nebo inzulin. (26, 29)

Hlavní výhodou PLGA je odbourávání na produkty, které jsou pro lidské tělo neškodné. Díky obsažené esterové vazbě je PLGA v těle hydrolyzován za vzniku endogenních látek, kterými jsou LA a GA (viz Obrázek 4). Tyto produkty jsou následně metabolizované prostřednictvím Krebsova cyklu na oxid uhličitý a vodu. Rychlost degradace PLGA nanočástic je ovlivněna řadou faktorů, mezi které patří velikost nanočástic, molekulová hmotnost použitého polymeru, obsažená léčivá látka a její množství, pH a teplota prostředí. (27, 28, 31)

3.1 Pasivní targeting

Pasivní targeting využívá k cílené distribuci fyzikálně chemické vlastnosti nanočástic, mezi které patří velikost, povrchový náboj a hydrofobicita. Vliv má ale také cesta podání a zdravotní stav pacienta. (27, 36)

Pro pasivní cílení se mnohdy využívají nanočástice podané intravenózně. Lidské tělo je ovšem vybaveno systémem, který rozpoznává a odstraňuje cizorodé částice, které se v krvi objeví. Tímto ochranným systémem je retikuloendotelový systém (RES). Salma N. Tammam a kol. (27) nebo Fabienne Danhier a kol. (31) ve svých pracích popisují, jakým způsobem k tomuto čištění dochází. Ve chvíli, kdy cirkulující proteiny (opsoniny) přijdou do kontaktu s cizorodou částicí, naváží se na její povrch. Takto označené částice jsou následně snadno rozpoznány a pohlceny fagocytujícími buňkami. Monocyty, makrofágy a dendritické buňky, které řadíme mezi fagocytující buňky, souhrnně označujeme jako mononukleárně fagocytický systém (MPS). MPS se nachází v krvi a různých tkáních, v největší míře jsou ovšem zastoupeny v místech, kde probíhá zánět. Makrofágy totiž hrají v regulaci zánětu hlavní roli. Existují dva základní typy makrofágů, které se zásadně liší svou funkcí. Aktivované M1 makrofágy vykazují prozánětlivou aktivitu. Uplatňují se při eliminaci patogenů, zabraňují rozvoji rakoviny, ale mohou být také původcem chronických zánětů. Aktivované M2 makrofágy jsou protizánětlivé. Jejich funkcí je hojení ran a oprava tkání, vlivem potlačení imunitní odpovědi ale mohou způsobit i růst nádorů. V závislosti na podnětech a signálech dochází ke změně polarizace a tím i ke změně typu makrofágu. Právě RES a MPS představují u některých podaných látek překážku, která je potřeba překonat. V jiných případech, jako je například léčba zánětlivých onemocnění, se ovšem cílení na MPS využívá. Podáním nanočástic s vhodnými vlastnostmi lze totiž jejich vychytávání makrofágy podpořit. Vhodnou volbou léčivé látky lze poté ovlivnit polarizaci makrofágů. Příkladem může být cílené podání nanočástic obsahujících kortikosteroidy, které inhibují diferenciaci makrofágů směrem k typu M1 a naopak působí polarizaci makrofágů směrem k typu M2. (27, 29, 37, 38)

Jak již bylo zmíněno, o osudu podaných nanočástic ovšem rozhodují především její vlastnosti, kterým je věnován následující text.

Velikost

Velikost je velmi důležitým parametrem, jelikož předurčuje, jak budou nanočástice prostupovat do tkání, zda budou vychytávány MPS, nebo v jakých orgánech se budou akumulovat. Částice menší než 30 nm se rychle eliminují ledvinami. Delší dobu cirkulace mají částice s velikostí 30 nm až 100 nm, jelikož nejsou odstraňovány ledvinami, ale zároveň neaktivují RES a nejsou tedy odstraňovány ani MPS. Delší doba setrvání v systémovém oběhu umožňuje, aby léčivo stihlo dosáhnout cílového místa. Částice o velikosti 100 nm až 6 μm jsou aktivně opsonizovány, vychytávány MPS a dochází k jejich hromadění v játrech a slezině. Nejvíce dochází k vychytávání částic s velikostí 100 až 300 nm, a proto se právě tyto nanočástice využívají pro cílený targeting do makrofágů, čehož lze využít v léčbě zánětlivých onemocnění. Částice s velikostí 6 μm až 10 μm se vychytávají v plicích, čehož se využívá v terapii plicních nádorů. Pro cílení na solidní nádory se uplatňují nanočástice s velikostí 30 až 200 nm. Akumulace v nádorové tkáni je umožněna díky tzv. efektu zvýšené permeability a retence. Nádorová tkáň je z důvodu zvýšené potřeby živin nadměrně prokrvená, mezi jednotlivými buňkami cévní stěny jsou ale větší prostory, které jsou příčinou zvýšené permeability. Typické je také menší množství lymfatických cest, které by nanočástice, jakožto cizí látky, mohly odvádět. Díky těmto faktorům se nanočástice v nádorové tkáni akumulují více než v tkáních zdravých. (27, 36)

Povrchový náboj

Nabitě částice jsou opsonizovány přednostně. Přítomnost náboje ovlivňuje také místo, kde budou částice akumulovány. Výsledky studií ukazují například to, že inhalačně podané kladně nabitě částice se akumulují v plicích, jejichž alveoly mají na svém povrchu negativní náboj. (27, 29, 31, 39) Ve studii Xiao Kai a kol. (40) bylo zjištěno, že vysoce kladně či záporně nabitě micelární nanočástice na bázi kyseliny oligocholové, jejichž povrch byl modifikován navázáním polyethylenglykolu (PEG), byly vychytávány makrofágy a docházelo k jejich hromadění v játrech. Naproti tomu nanočástice s mírně negativním nábojem se více akumulovaly v nádorové tkáni. Podobná zjištění přinesla také práce He Chunbai a kol. (41) I výsledky jejich studie

ukázaly, že nanočástice s mírně negativním nábojem se akumulovaly v nádorové tkáni ve větší míře než v játrech.

Náboj lze s využitím vhodných látek změnit. Jako příklad lze uvést negativně nabitě nanočástice obsahující PLGA, u nichž se k úpravě standardně využívá polymer PEG. Výsledné částice jsou poté neutrální. (27, 31, 39)

Hydrofobicita

Studie prokázaly, že čím více je povrch částice hydrofobní, tím rychleji dochází k opsonizaci. Pro prodloužení doby cirkulace lze povrch hydrofobních částic upravit využitím hydrofilní látky. Použit lze PEG, polyethylenoxid, polyvinylpyrrolidon, kyselinu polyakrylovou, poloxamer, poloxamin či hydrofilní polysacharidy. Je třeba myslet ale i na to, že přes membrány prostupují látky hydrofobní. (27, 31, 35, 39)

3.2 Aktivní targeting

V případě aktivního targetingu se pro zacílení využívá navázání signálních molekul na povrch nanočástice. Výběr vhodné signální molekuly je klíčový. Je třeba vybrat takovou molekulu, která bude schopna navázat se na receptor nadměrně exprimovaný v cílovém místě. (27, 42)

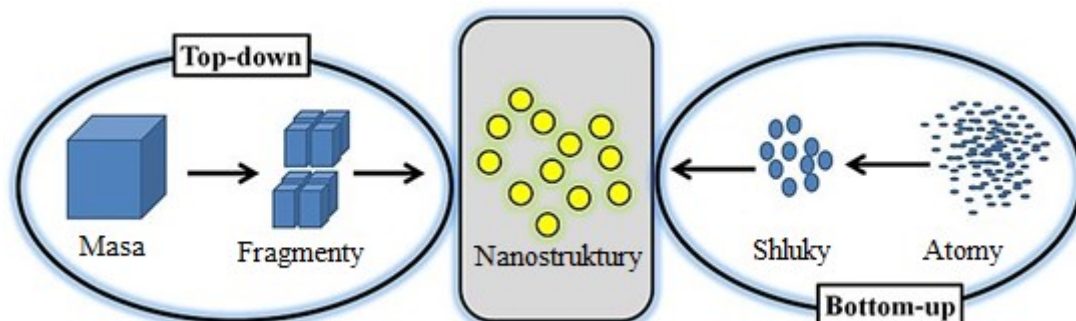
Navázanými molekulami mohou být proteiny (protilátky a jejich fragmenty), peptidy, nukleové kyseliny (aptamery), malé molekuly (kyselina listová), vitamíny nebo sacharidy. Vazba molekul k nanočásticím může být nekovalentní či kovalentní. U nekovalentní vazby se uplatňují elektrostatické nebo hydrofobní interakce. U vazby tohoto typu ovšem hrozí vytlačení navázaného ligandu plazmatickým proteinem s vyšší afinitou k povrchu nanočástice. Z toho důvodu se více využívá vazba kovalentní, která je stabilnější. (27, 39, 42)

4 Příprava polymerních nanočástic

Existují dva základní typy přípravy nanočástic. Prvním typem je metoda bottom-up (zdola nahoru). Při ní dochází k syntéze nanočástic z menších stavebních jednotek, kterými jsou monomery. Mezi bottom-up způsob přípravy řadíme emulzní a mikroemulzní polymerizaci, radikálovou polymerizaci nebo mezifázovou polymeraci. (1, 10, 21, 34)

Druhým základním typem je metoda top-down (shora dolů), kdy nanočástice vznikají z předem připraveného polymeru. Mezi top-down způsob přípravy řadíme metodu odpařování rozpouštědla, vysolování, emulzní difuzi, ionickou gelaci, dialýzu, technologii superkritických tekutin či nanoprecipitaci. (1, 10, 34)

Detailní informace týkající se tohoto tématu lze nalézt v práci Carlose E. Asteta a Cristiny M. Sybliové (43). Pouze příprava nanočástic metodou nanoprecipitace je popsána podrobněji, jelikož byla využita pro přípravu nanočástic v experimentální části této práce.



Obrázek 5 Top-down, Bottom-up (44)

4.1 Nanoprecipitace

Nanoprecipitace je jednoduchá, rychlá a reprodukovatelná metoda, která nevyžaduje složité vybavení ani velké množství energie. Dalším benefitem je získání nanočástic s dobře definovanou velikostí a úzkou distribucí velikosti. Principem je využití dvou vzájemně mísitelných rozpouštědel, kdy polymer a léčivá látka jsou rozpustné pouze v jednom z nich (organické rozpouštědlo). (3, 27)

Vnější (vodná) fáze může obsahovat surfaktant. Jako surfaktant se používá například poloxamer. Vnitřní (organická) fáze se vytvoří rozpuštěním polymeru a léčivé látky v organickém rozpouštědle. Jako organické rozpouštědlo se využívá aceton, ethanol, dimethylsulfoxid nebo izopropylalkohol. Běžně používanými polymery jsou polymery syntetické, jako například PLGA, PLA, PGA nebo Eudragit. K vytvoření nanočástic dochází ve chvíli, kdy je k míchající se vodné fázi přidána fáze organická. Organické rozpouštědlo rychle difunduje do vodné fáze, náhlou změnou okolního prostředí se molekuly polymeru vysráží a zachytí léčivo. Téměř okamžitě tak vznikají nanočástice ve formě koloidní suspenze. Organické rozpouštědlo se poté odstraňuje odpařením, dialýzou nebo centrifugací. (10, 18, 27, 32)

Metoda nanoprecipitace lze využít pro enkapsulaci hydrofilních i lipofilních léčivých látek. V případě hydrofilních látek ale vznikají nanočástice s nízkou EE a drug loading (DL). Důvodem je nízká afinita hydrofilní léčivé látky k hydrofobnímu polymeru. Při přidání organické fáze spolu s hydrofilní léčivou látkou a polymerem do fáze vodné dochází k difuzi hydrofilní léčivé látky do vodného prostředí. Nanočástice, které vzniknou, tak obsahují méně léčivé látky a zároveň jsou náchylnější k degradaci. (10, 27, 32, 43, 45-47)

Mezi faktory, které mají vliv na vlastnosti vzniklých nanočástic, patří typ, koncentrace a molekulová hmotnost polymeru, volba organického rozpouštědla, poměr rozpouštědel, přítomnost, koncentrace a typ surfaktantu, rychlost míchání vodné fáze a rychlost přidávání organické fáze. (10, 18, 32)

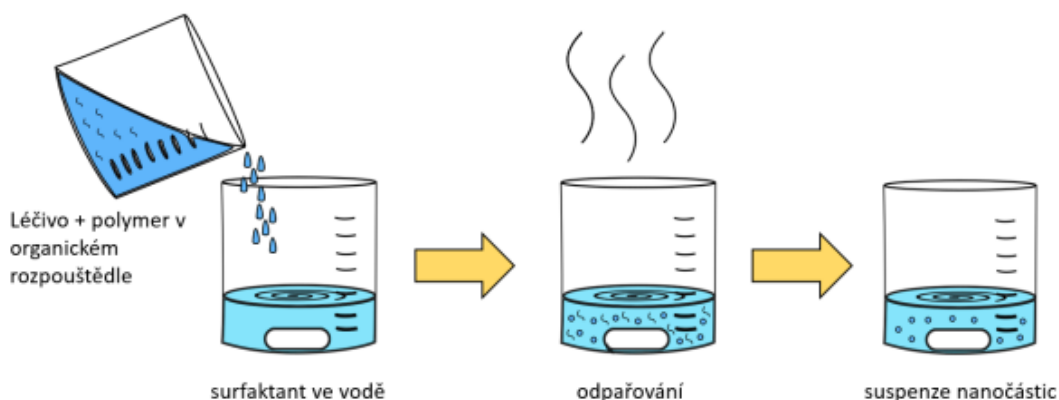
Molekulová hmotnost použitého polymeru ovlivňuje velikost vzniklých nanočástic. Z polymeru s nižší molekulovou hmotností vznikají menší nanočástice, než z polymerů o molekulové hmotnosti vyšší. Velikost nanočástic je ovlivněna také koncentrací použitého polymeru. Se zvýšením koncentrace polymeru se zvyšuje i počet polymerních řetězců na jednotku objemu organického rozpouštědla, což je důvodem vzniku větších nanočástic. S rostoucí koncentrací polymeru zároveň roste i jeho viskozita. Důsledkem toho dochází ke zpomalení difuze organické fáze do fáze vodné, což je další faktor, který je příčinou vzniku nanočástic s většími rozměry. (18, 27, 32, 43)

Čím rozpustnější je organické rozpouštědlo ve vodě, tím rychlejší je jeho difuze do vodného rozpouštědla a tím menší nanočástice vznikají. (32) Poměr vodného a organického rozpouštědla ovlivňuje velikost vzniklých částic. Se zvýšením objemu vodné fáze se velikost vzniklých částic snižuje. Důvodem je zvýšená rychlost difuze organického rozpouštědla do vodné fáze. Poměr rozpouštědel má vliv také na stabilitu. Nevhodně zvolený poměr fází může být příčinou agregace vzniklých částic. (47, 48)

Přítomnost surfaktantu snižuje tendenci shlukování vzniklých nanočástic při jejich skladování. Roli hraje ovšem i konkrétní typ použitého surfaktantu a jeho koncentrace. Například pro Pluronic F-127 platí, že se zvyšující se koncentrací dochází ke snížení velikosti vzniklých nanočástic, ke zvýšení hodnoty indexu polydisperzity (PDI) a ke snížení EE. (10, 18, 32, 50)

Velikost vzniklých nanočástic ovlivňuje také rychlost míchání. Při nízké rychlosti vznikají větší nanočástice, zatímco u vyšších rychlostí vznikají nanočástice menší. (51, 52)

I rychlost přidávání organické fáze má na velikost vzniklých nanočástic vliv. Pomalé přidávání organické fáze může vést k tvorbě částic s větší velikostí a vyšší polydisperzitou. (51)



Obrázek 6 Schéma nanoprecipitace (49)

5 Hodnocení nanočástic

Jak bylo naznačeno v kapitole o pasivním targetingu, fyzikálně chemické vlastnosti nanočástic a jejich znalost je velmi důležitá. Velikost nanočástic, PDI a zeta potenciál (ZP) mají vliv na osud nanočástic v lidském těle, což ovlivní i účinnost takto podaných léčiv. Tyto vlastnosti ovlivňují ale i další faktory, kterými je například stabilita nebo bezpečnost. (22)

5.1 Velikost

Větší částice mohou přenášet větší množství léčivé látky. Velikost má vliv ale i na uvolňování léčiva. Z menších nanočástic se léčivá látka uvolňuje díky většímu povrchu rychleji než z nanočástic větších. Znalost velikosti nanočástic je důležitá také pro jejich bezpečné použití. Pokud by například připravené nanočástice pro intravenózní podání byly větší než 200 nm, jejich praktickým využitím by byl pacient vystaven riziku embolie. (14, 35, 36, 53)

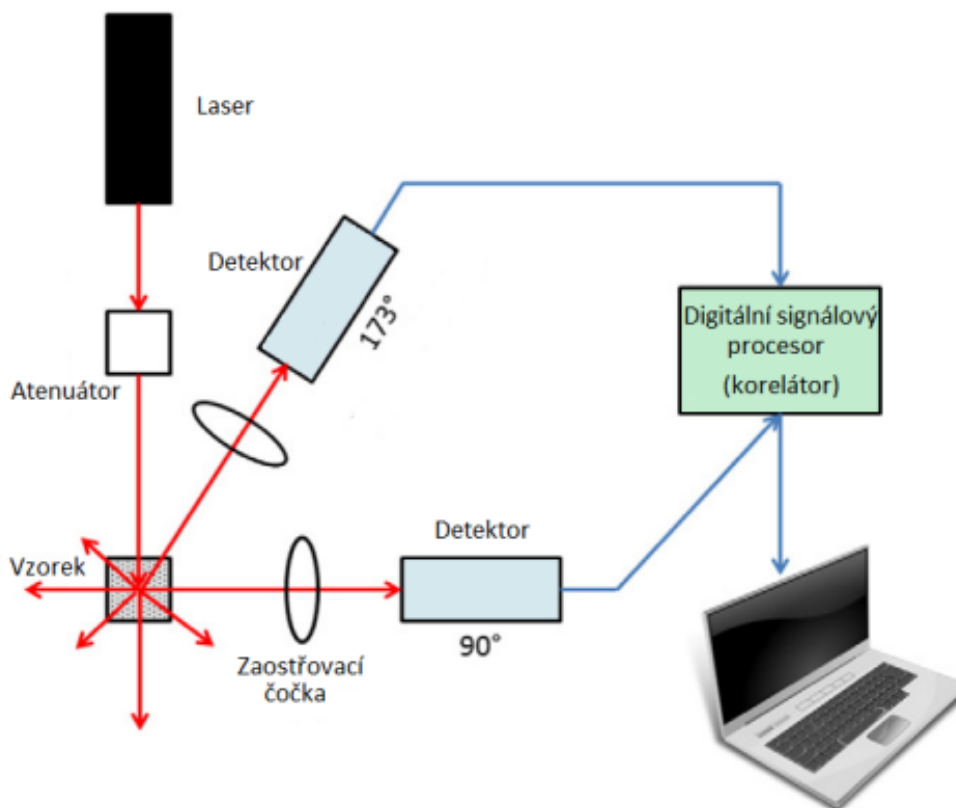
Velikost nanočástic lze stanovit různými technikami. Patří mezi ně například transmisní elektronová mikroskopie, mikroskopie atomových sil, sedimentační metody či laserová difrakce. Pro stanovení velikosti nanočástic v kapalině se ale nejčastěji využívá dynamický rozptyl světla (DLS) neboli fotonová korelační spektroskopie. (22)

Při měření metodou DLS je vzorek umístěn do kyvety, kterou prochází monochromatické světlo. To se odráží od pohybujících se nanočástic. Intenzita takto rozptýleného světla se po určitou dobu pod určitým úhlem detekuje. Vzhledem k náhodnému pohybu nanočástic v disperzním médiu se ale intenzita rozptýleného světla mění. Fluktuaci intenzity rozptylu přístroj ZetaSizer od společnosti Malvern vyhodnocuje za využití tzv. digitálního korelátoru. Tato komponenta měří stupeň podobnosti mezi jednotlivými hodnotami intenzity světla. Velikost nanočástic je následně odvozena využitím Stokes-Einsteinovy rovnice. (22, 53, 54)

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H}$$

Rovnice 1: D – difuzní koeficient, k_B – Boltzmannova konstanta, T – teplota [K^{-1}], η – absolutní viskozita, R_H – hydrodynamický poloměr částic

Sourav Bhattacharjee ve své práci uvádí, že výsledné hodnoty získané pomocí DLS mohou být ovlivněny řadou faktorů, mezi které patří například koncentrace nanočástic ve vzorku. Dle závěrů článku u vzorků s vyšší koncentrací nanočástic měřením získáme hodnoty nižší, než je skutečnost. Důvodem je snížená intenzita rozptýleného světla, která je detekovaná. U vzorků s nižší koncentrací nanočástic zase nemusíme získat dostatek rozptýleného světla, které je pro analýzu potřeba. (22)



Obrázek 7 Schéma měření velikosti a PDI (22)

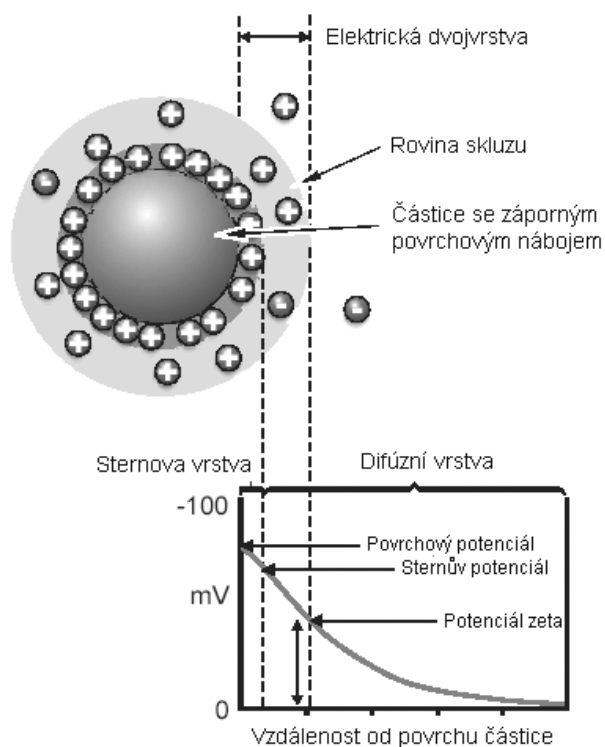
5.2 Index polydisperzity

Index polydisperzity neboli index heterogenity se používá k charakterizaci šířky distribuce velikosti částic v daném systému. (55)

Hodnoty PDI se pohybují v rozmezí od 0,000 do 1,000. Hodnota PDI 0,000 charakterizuje vzorek s dokonale monodisperzní velikostí částic. V praxi jsou ovšem za monodisperzní považovány vzorky s hodnotou PDI menší než 0,200. (55, 56) Hodnoty PDI lze, stejně jako velikost nanočástic, získávat využitím DLS.

5.3 Zeta potenciál

V případě, že je nabitá částice v disperzi, vytváří se kolem ní elektrická dvojvrstva. Tu můžeme rozdělit na dvě části. Vnitřní (tzv. Sternova) vrstva obsahuje silně vázané ionty opačného náboje, než je náboj nanočástice. Vnější (difuzní) vrstva obsahuje ionty, které se volně pohybují. Hypotetická rovina, která působí jako rozhraní mezi těmito dvěma vrstvami, se nazývá rovina skluzu. ZP charakterizuje elektrokinetický potenciál právě této roviny. (22, 57)

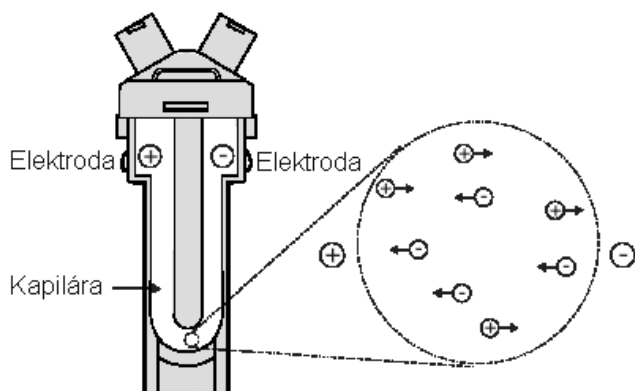


Obrázek 8 Elektrická dvojrstva (57)

Hodnoty ZP mohou být pozitivní či negativní. Čím větší je absolutní hodnota ZP, tím větší je povrchový náboj nanočástic. (18, 31) Povrchový náboj ovlivňuje distribuci nanočástic v organismu a její případné přijetí buňkou. Buněčná membrána nese negativní náboj, a proto ochotněji přijímá nanočástice s nábojem pozitivním. (31)

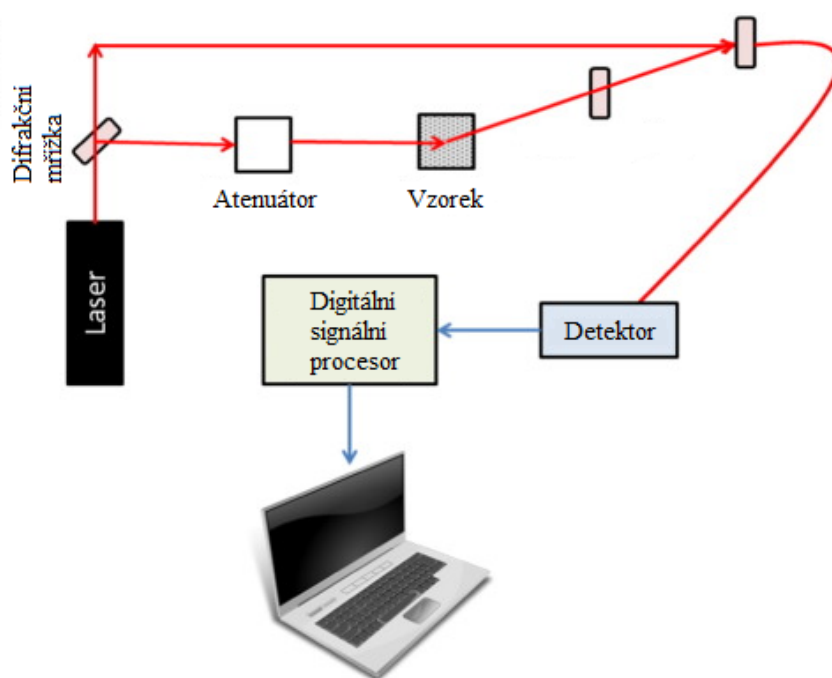
ZP hraje zásadní roli i pro stabilitu koloidních soustav. Pokud mají nanočástice hodnotu ZP vyšší než 30 mV nebo nižší než -30 mV, považujeme disperzní soustavu za dostatečně stabilní. Přítomnost povrchového náboje u nanočástic totiž přispívá k jejich vzájemnému odpuzování, čímž se zabraňuje agregaci. Mezi faktory, které ovlivňují hodnotu ZP, patří pH vnější fáze, iontová síla a koncentrace částic. (3, 22, 35, 57)

Stanovení hodnoty ZP probíhá pomocí elektroforetického rozptylu světla. Vzorek je umístěn do cely, která má z obou stran elektrody. Na elektrody je přiveden elektrický proud. Nabité částice se poté vlivem elektrického pole pohybují k elektrodě s opačným nábojem. Rychlost jejich pohybu je závislá právě na hodnotě ZP. (3, 22)



Obrázek 9 Elektroforetická cela (57)

Laser vysílá paprsek světla, který je před průchodem celou rozdělen na dva. Jeden paprsek slouží jako referenční, druhý prochází celou se vzorkem. Pohybující se nabitě částice dopadající paprsek rozptylují. Takto rozptýlený paprsek má jinou frekvenci než paprsek referenční. Tento frekvenční posun, označující se jako Dopplerův posun, je přímo úměrný rychlosti částic. Využitím Henryho rovnice poté získáme výslednou hodnotu ZP. (3, 22)



Obrázek 10 Schéma měření ZP (22)

CÍL PRÁCE

Cílem experimentální části této diplomové práce bylo připravit nanočástice s optimálními vlastnostmi s ohledem na jejich plánované využití pro cílenou léčbu zánětlivých onemocnění. Úkolem bylo nalezení ideálních podmínek, a to především vhodný poměr mezi nosičem a léčivou látkou. U vzniklých nanočástic se posuzovala velikost, polydisperzita, zeta potenciál, enkapsulační efektivita a drug loading.

Použité polymery se lišily v poměru kyseliny mléčné a kyseliny glykolové a v koncové skupině. Koncentrace účinné látky, tedy DA, jež se použila pro přípravu nanočástic, byla 0,15 mg/ml, 0,30 mg/ml, 0,60 mg/ml, 1,50 mg/ml nebo 3,00 mg/ml.

Na základě poznatků předchozích studií byly stanoveny podmínky, které by připravené nanočástice pro pasivní cílení na makrofágy měly splňovat. Nanočástice by měly být hydrofobní, negativně nabitě a jejich velikost by měla být v rozmezí 100 až 300 nm. Aby byla zaručena bezpečnost, stabilita a účinnost nanočástic pro terapeutické použití, měly by být připravené nanočástice homogenní. Zda mají nanočástice úzkou distribuci velikosti popisuje hodnota PDI, která by měla být nižší než 0,200. Dalšími žádoucími vlastnostmi byly dostatečně vysoké hodnoty EE a DL.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6 Použité přístroje

- Analytické váhy (Ohaus, Greifensee, Švýcarsko), max. 210 g, d= 0,1 mg
- Laboratorní váhy (Kern, Balingen, Německo), max. 400 g, d = 0,01 g
- Magnetická míchačka IKA-WERKE RT 5 Power, (IKA, Staufen, Německo) 100-1000 ot./min
- Centrifuga MPW 260R (Medical Instruments, Varšava, Polsko)
- ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern Panalytical, Malvern, UK)
- HPLC ALS 1329A (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- Spektrofotometr Specord 205 (Analytik Jena, Německo)
- Automatická pipeta Finnpiette F2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Automatická pipeta Research plus (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- DSC 200 F3 NETZSCH Maia (Netzsch-Geratebau GmH, Selb, Německo)
- Laminární box s horizontálním prouděním (Esco, Barnsley, UK)

7 Použité suroviny

- Dexametazon acetát (DA; Merck, Praha, ČR), M_w : 434,50 g/mol, logP 2,8
- Aceton (PENTA s.r.o., Chrudim, ČR)
- Acetonitril (ACN, PENTA s.r.o., Chrudim, ČR)
- Čištěná voda (Katedra farmaceutické technologie FaF UK HK)
- Poloxamer 407, Pluronic F-127 (F127; Merck, Praha, ČR)
- Purasorb PDLG 7502A (PLGA 7/3A) – polymer kyseliny mléčné a kyseliny glykolové v poměru 75:25, zakončený kyselinou, viskozita 0,16 - 0,24 dl/g (Corbion, Nizozemsko)
- Purasorb PDLG 5002 (PLGA 5/5E) – polymer kyseliny mléčné a kyseliny glykolové v poměru 50:50, zakončený esterem, viskozita 0,16 - 0,24 dl/g (Corbion, Nizozemsko)
- Trehalóza (Merck, Praha, ČR)

8 Použité metody

8.1 Příprava nanočástic

Pro přípravu nanočástic byla využita metoda nanoprecipitace, která je popsána v kapitole 4.1. Příprava probíhala za laboratorní teploty.

Příprava vnější (vodné) fáze

Vnější fázi tvořilo vždy 10 ml 0,1% vodného roztoku povrchově aktivní látky, tedy F127. Roztok byl připraven navážením F127 a jeho následným rozpuštěním v čištěné vodě za stálého míchání na magnetické míchačce (300 ot./min). Koncentrace F127 0,1 % byla zvolena záměrně, a to na základě předchozích prací, kde bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací této povrchově aktivní látky klesala hodnota EE. (50)

Příprava vnitřní (organické) fáze

Vnitřní fázi tvořil polymer PLGA 5/5 či PLGA 7/3, aceton a DA v koncentraci 0,15 mg/ml; 0,30 mg/ml; 0,60 mg/ml; 1,50 mg/ml nebo 3,00 mg/ml. Nejprve byly vytvořeny roztoky s účinnou látkou, tedy s DA. Potřebné množství účinné látky se navážilo do lékovek a následně bylo rozpuštěno v acetonu, čímž vznikly roztoky o požadovaných koncentracích. Do čistých lékovek se následně navážilo přesně 30 mg polymeru. Pomocí pipety se poté do každé lékovky s polymerem přidal 1 ml roztoku DA, čímž došlo k rozpuštění polymeru. Byly připraveny i slepé vzorky, které obsahovaly pouze polymer a aceton.

Nanoprecipitace

K 10 ml vodné fáze se za stálého míchání na magnetické míchačce v jednom kroku přidal 1 ml fáze organické. Okamžitě se objevila opalescence, která indikovala vytvoření suspenze nanočástic. Následující 2 hodiny se vzniklá suspenze ponechala v digestoři na magnetické míchačce, aby došlo k odpaření organického rozpouštědla. Po uplynulé době se suspenze přenesla do kalibrované centrifugační zkumavky s kónickým dnem a byla doplněna čištěnou vodou na objem 10 ml.

Úprava vzorků

Vzniklé vzorky byly filtrovány přes stříkačkový filtr s velikostí pórů 1,2 μm . Důvodem filtrace byla přítomnost krystalů DA, o jejichž přítomnosti jsme se mohli přesvědčit využitím polarizačního mikroskopu. Filtrací jsme krystaly ze vzorků odstranili, abychom při stanovení EE nezískali zkreslené výsledky. Každý přefiltrovaný vzorek byl následně rozdělen do pěti kalibrovaných centrifugačních zkumavek.

8.2 Měření velikosti, PDI a zeta potenciálu

Pro hodnocení těchto vlastností se použil přístroj ZetaSizer. Měření probíhala za laboratorní teploty. Měření každého vzorku proběhlo ve třech cyklech, kdy každý cyklus obsahoval 10 až 12 měření. Výsledné hodnoty jsou průměry těchto tří cyklů.

Nejprve byly vzorky naředěny čištěnou vodou v poměru 1:1. Pro měření velikosti a indexu polydisperzity se využily plastové kyvety, které byly naplněny pipetou. Měření těchto dvou parametrů probíhalo zároveň, a to metodou dynamického rozptylu světla (teoreticky popsán v kapitole 5.1 a 5.2). Pro zjištění ZP byla potřeba speciální cely s kapilárou a elektrodami. Jejich naplnění probíhalo velmi opatrně za využití injekční stříkačky, aby se do kyvety nedostaly vzduchové bubliny. Měření probíhalo metodou elektroforetického rozptylu světla (teoreticky popsán v kapitole 5.3).

8.3 Stanovení EE a DL pomocí HPLC

Před vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) se vzorky centrifugovaly. Uzavřené kalibrované centrifugační zkumavky se vložily do rotoru centrifugy a centrifugovaly se při relativní centrifugační síle 15 000x g po dobu 15 min za teploty 14 °C. Vyšší centrifugační síla byla zvolena proto, aby došlo k co nejlepšímu oddělení fází. Po dokončení cyklu se zkumavky opatrně, aby nedošlo k opětovnému smísení, vyjmuly. Pomocí automatické pipety byl šetrně odstraněn čirý supernatant. Vzniklá peleta se uchovávala v uzavřené mikrozkušavce v chladničce do druhého dne, kdy proběhla samotná analýza HPLC.

V den měření se připravené pelety rozpustily v 1 ml ACN a od každého vzorku byl přenesen 1 ml do HPLC vialek.

Před každým měřením byla vytvořena nová kalibrační řada (tabulka č. 1). Tu tvořil roztok DA v ACN v šesti různých koncentracích.

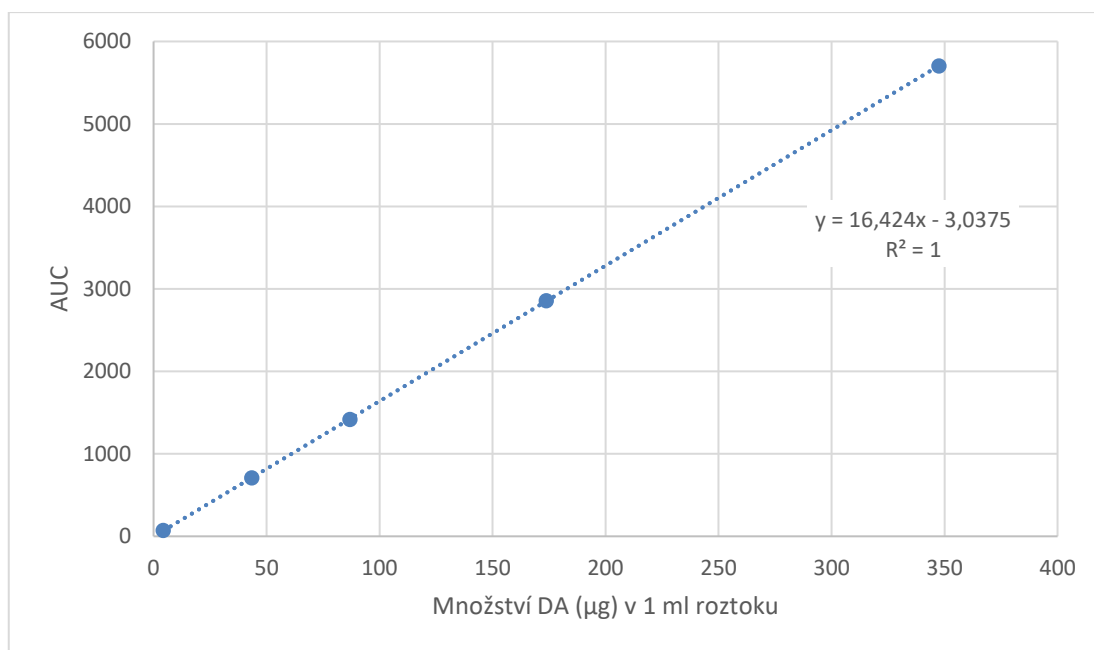
Nejprve byl vytvořen zásobní roztok DA v ACN o koncentraci 800 μM . K tomu bylo zapotřebí spočítat potřebnou navážku DA a následně dopočítat i množství přidávaného ACN. Ostatní roztoky byly poté připraveny postupným ředěním zásobního roztoku. Připravené roztoky kalibrační řady o požadovaných koncentracích byly v objemu 1 ml přeneseny do HPLC vialek.

Tabulka 1 Body kalibrační křivky

Molární koncentrace DA v ACN (μM)	Množství DA (μg) v 1 ml roztoku
800	347,6
400	173,8
200	86,9
100	43,45
10	4,345
0,25	0,108625

Připravené vzorky i roztoky kalibrační řady byly podrobeny HPLC analýze. Mobilní fázi tvořila směs ACN a vody v poměru 50:50. Její průtoková rychlost byla 1 ml/min. Jako stacionární fáze byla použita chromatografická kolona Restek Ultra 100 A o délce 150 mm a průměru 4,6 mm, obsahující 5 μm částice ligandu C18. Objem nástřiku byl 10 μl . DA byl detekován při vlnové délce 238 nm pomocí UV detektoru. Retenční čas DA byl 5,3 min. Získané body kalibrační řady byly proloženy přímkou. V grafu byla zobrazena rovnice této přímky i hodnota spolehlivosti R^2 .

S každým měřením, tedy s každou novou kalibrační řadou, byla sestrojena vždy nová kalibrační křivka. I přes veškerou snahu totiž není možné udržet zcela totožné podmínky, jelikož dochází například k mírnému zanášení kolony. V následujícím grafu je uveden příklad jedné ze získaných kalibračních křivek.



Graf 1 Kalibrační křivka DA v ACN

Enkapsulační efektivita, česky také účinnost zapouzdření, je procentuální vyjádření množství léčivé látky, která se zachytí v nanočástici, z celkového množství léčivé látky použité pro přípravu nanočástic. Hodnota EE byla spočítána pomocí níže uvedené rovnice. (3)

$$EE (\%) = \frac{\text{množství enkapsulovaného DA } (\mu\text{g}) \text{ ve vzorku}}{\text{množství DA použitého pro přípravu nanočástic } (\mu\text{g})} \times 100$$

Rovnice 2

Množství enkapsulovaného DA (μg) ve vzorku zjistíme využitím rovnice lineární funkce.

$$x = \frac{(y + 3,0375)}{16,424}$$

Rovnice 3: x – zjišťované množství DA (μg) ve vzorku, y – plocha pod křivkou (AUC)

Množství DA použitého pro přípravu nanočástic (μg) je různé pro vzorky s různou koncentrací DA. Hodnoty získáme výpočtem množství DA nacházejícího se v jedné kalibrované centrifugační zkumavce.

Tabulka 2 Množství DA použitého pro přípravu nanočástic (μg)

Koncentrace DA v organické fázi (mg/ml)	Množství DA použitého pro přípravu nanočástic (μg)
3,00	600
1,50	300
0,60	120
0,30	60
0,15	30

Drug loading vyjadřuje, jakou část nanočástic zaujímá léčivá látka. Hodnota DL byla spočítána pomocí níže uvedené rovnice. (3)

$$DL (\%) = \frac{\text{množství enkapsulovaného DA } (\mu\text{g}) \text{ ve vzorku}}{\text{hmotnost nanočástic } (\mu\text{g})} \times 100$$

Rovnice 4

8.4 Čištění vzorků

Pro použití připravených nanočástic na buněčných kulturách je potřeba provést čištění, které by odstranilo případné nečistoty, agregáty a bakteriální kontaminaci.

Příprava vzorků nanoprecipitací i následná filtrace probíhala tak, jak je popsáno v kapitole 8.1. Zhotovené vzorky se v laminárním boxu s horizontálním prouděním přefiltrovaly přes sterilní filtr s velikostí pórů $0,45 \mu\text{m}$ do sterilních kalibrovaných centrifugačních zkumavek. Následovala centrifugace při relativní centrifugační síle $8\,000\times g$ po dobu 15 min za teploty $14\text{ }^\circ\text{C}$. Po dokončení cyklu se zkumavky opatrně vyjmuly a s využitím automatické pipety byl odebrán supernatant do další mikrozkušavky. Odebraný supernatant se znovu centrifugoval, tentokrát při relativní

centrifugační síle 10 000x g po dobu 20 min za teploty 14 °C. I nyní následovalo opatrné odebrání supernatantu, ten už ale dále využíváný nebyl.

Výsledkem tohoto procesu byly 2 mikrokumavky s peletami od každého vzorku. Pro následné uchování se do každé z nich přidal 1 ml 5% předem připraveného roztoku trehalózy. Duplikáty mikrokumavek se následně spojily do jedné mikrokumavky a takto zpracované vzorky se následně uchovávaly při teplotě -70 °C. Použitá trehalóza má funkci kryoprotektantu, který zabraňuje agregaci nanočástic při jejich skladování.

(18)

VÝSLEDKY A DISKUZE

V této kapitole jsou prezentovány a diskutovány výsledky experimentální části, která zahrnovala přípravou polymerních nanočástic s dexametazon acetátem v různé koncentraci metodou nanoprecipitace a jejich následné hodnocení. Cílem bylo porovnat vlastnosti vzniklých nanočástic v závislosti na použité koncentraci DA (0,15 mg/ml; 0,30 mg/ml; 0,60 mg/ml; 1,50 mg/ml a 3,00 mg/ml) a typu polymeru (PLGA 5/5E a PLGA 7/3A). Zkoumanými vlastnostmi byla velikost částic, polydisperzita, zeta potenciál, enkapsulační efektivita a drug loading.

Tabulka 3 Naměřené hodnoty nanočástic s PLGA 5/5E

Číslo vzorku	Koncentrace DA (mg/ml)	Velikost (nm)	PDI	EE (%)	DL (%)
1	0,15	146,7	0,075	22,47	0,11
2	0,15	196,5	0,115	11,37	0,06
3	0,15	138,1	0,068	19,36	0,10
4	0,30	162,6	0,082	20,60	0,21
5	0,30	142,1	0,089	22,86	0,23
6	0,30	-	-	-	-
7	0,60	173,4	0,112	20,17	0,40
8	0,60	137,3	0,083	14,56	0,29
9	0,60	-	-	-	-
10	1,50	154,7	0,078	5,60	0,28
11	1,50	139,6	0,096	7,83	0,39
12	1,50	186,1	0,201	6,98	0,35
13	3,00	189,5	0,089	2,42	0,24
14	3,00	140,1	0,081	2,45	0,25
15	3,00	134,3	0,105	2,83	0,28

Vzorky PLGA 5/5E číslo 6 a 9 bohužel nešly přefiltrovat. Tyto vzorky pravděpodobně obsahovaly velké množství krystalů DA, nebo při nanoprecipitaci vznikly příliš velké nanočástice. Důvodem vzniku větších nanočástic by mohlo být pomalejší přidání

organické fáze do fáze vodné při přípravě nanočástic. Z těchto důvodů tyto vzorky nebyly hodnoceny. (51)

Tabulka 4 Naměřené hodnoty nanočástic s PLGA 7/3A

Číslo vzorku	Koncentrace DA (mg/ml)	Velikost (nm)	PDI	EE (%)	DL (%)
16	0,15	160,9	0,074	38,87	0,19
17	0,15	155,8	0,080	11,72	0,06
18	0,15	176	0,209	10,52	0,05
19	0,30	176,3	0,083	26,91	0,27
20	0,30	151,8	0,132	15,43	0,15
21	0,30	146,2	0,083	15,42	0,15
22	0,60	-	-	-	-
23	0,60	146,8	0,081	22,21	0,44
24	0,60	153,7	0,086	18,36	0,37
25	1,50	166,2	0,072	14,60	0,73
26	1,50	139,1	0,100	8,23	0,41
27	1,50	140,6	0,080	5,96	0,30
28	3,00	181,8	0,121	4,87	0,49
29	3,00	145,7	0,094	3,91	0,39
30	3,00	143,7	0,099	3,45	0,34

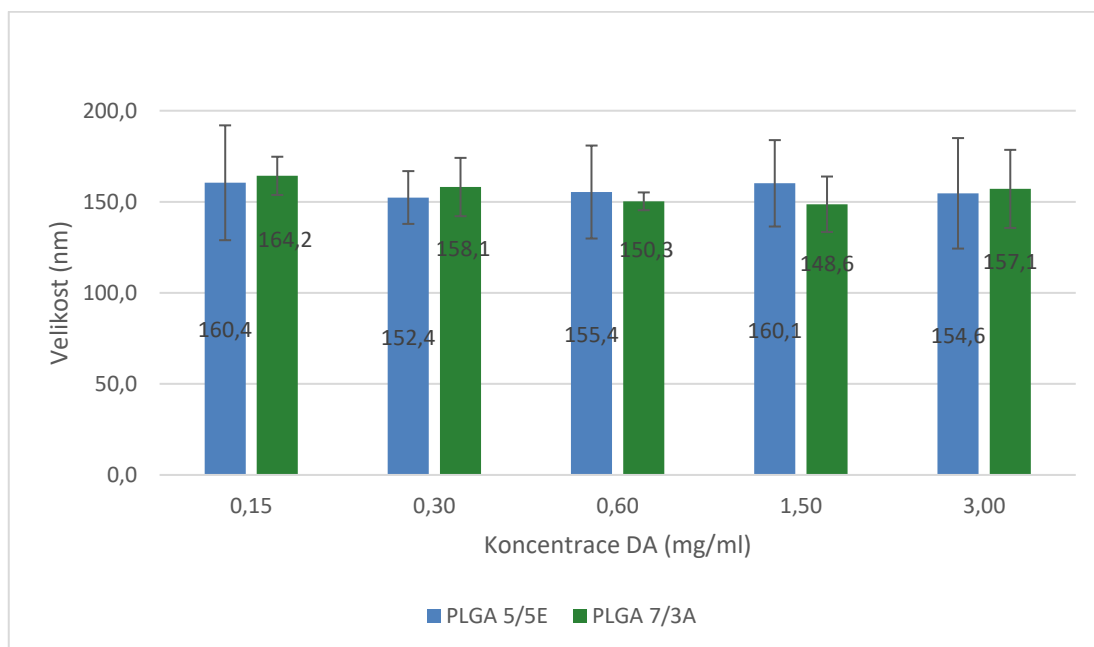
Vzorek PLGA 7/3A číslo 22 se bohužel při filtraci rozlil. Žádné hodnoty u tohoto vzorku tedy nemohly být změřeny.

9 Velikost nanočástic

Naměřené hodnoty velikosti nanočástic jsou uvedeny v tabulkách č. 3 a 4. Velikost nanočástic vzniklých z polymeru PLGA 5/5E se pohybovala v rozmezí 134,3 (vzorek č. 15; 3,00 mg/ml DA) až 196,5 nm (vzorek č. 2; 0,15 mg/ml DA). Velikost nanočástic vzniklých z polymeru PLGA 7/3A se pohybovala v rozmezí 139,1 (vzorek č. 26; 1,50 mg/ml DA) až 181,8 nm (vzorek č. 28; 3,00 mg/ml DA). Z těchto výsledků

vyplývá, že všechny připravené částice splňovaly podmínky pro cílenou distribuci do makrofágových buněk, jelikož se jejich velikost pohybovala v rozmezí 100 až 300 nm. (29)

Naměřené hodnoty velikosti nanočástic pro jednotlivé koncentrace DA a typ použitého polymeru byly zprůměrovány a byla stanovena jejich směrodatná odchylka. Získané hodnoty jsou uvedeny v grafu č. 2. Ze získaných hodnot i grafického znázornění lze usoudit, že koncentrace DA neměla vliv na velikost vzniklých nanočástic. Zároveň nelze říci, že by velikost nanočástic ovlivňoval použitý typ polymeru. Velikost částic bude nejspíše ovlivněna koncentrací polymeru a dalšími proměnnými, to však nebylo v této práci zkoumáno.



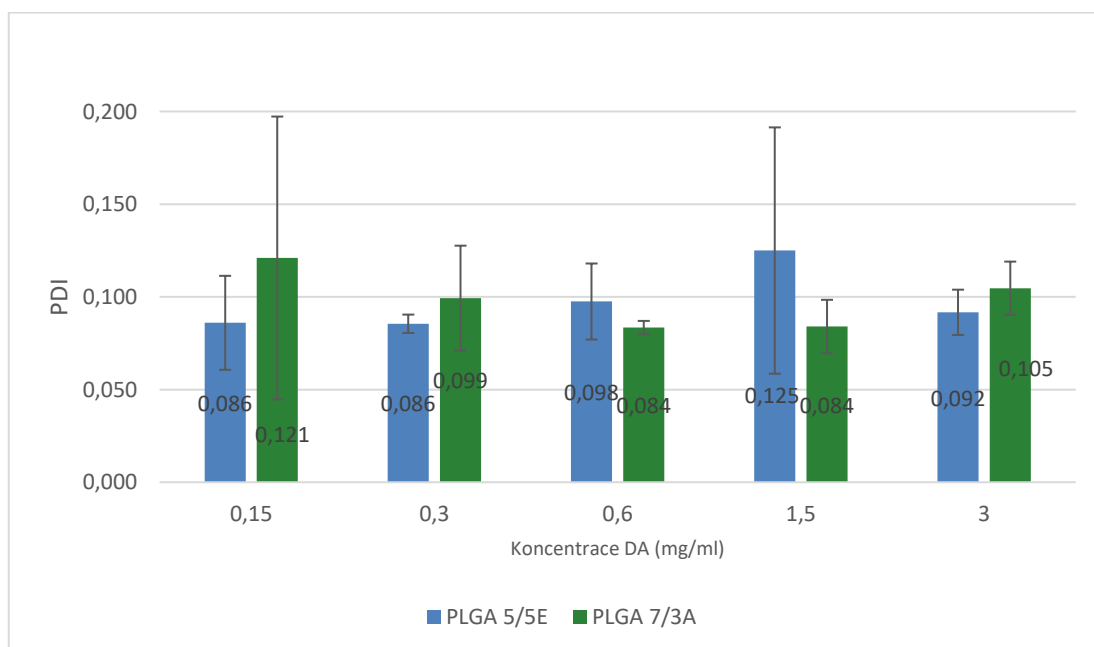
Graf 2 Průměrná velikost nanočástic

10 PDI nanočástic

Naměřené hodnoty PDI jsou uvedeny v tabulkách č. 3 a 4. PDI nanočástic vzniklých z polymeru PLGA 5/5E se pohybovala v rozmezí 0,068 (vzorek č. 3; 0,15 mg/ml DA) až 0,201 (vzorek č. 12; 1,50 mg/ml DA). PDI nanočástic vzniklých z polymeru PLGA 7/3A se pohybovala v rozmezí 0,072 (vzorek č. 25; 1,50 mg/ml DA) až 0,209 (vzorek č. 18; 0,15 mg/ml DA). Z těchto hodnot vyplývá, že téměř všechny můžeme považovat

za vzorky s úzkou distribucí velikosti nanočástic, jelikož mají hodnoty PDI nižší než 0,200. Pouze vzorek č. 12 u PLGA 5/5E (1,50 mg/ml DA) a vzorek číslo 18 u PLGA 7/3A (0,15 mg/ml DA) mají hodnotu PDI vyšší než 0,200, nicméně hodnoty PDI 0,201 a 0,209 nesvědčí o významně zvýšené polydisperzitě.

V grafu č. 3 jsou uvedeny průměrné hodnoty PDI spolu se směrodatnými odchylkami. V tomto grafu můžeme spatřit, že v kontextu průměrných hodnot polydisperzní nanočástice nevznikaly. Podobně jako u hodnocení velikosti ani zde nelze konstatovat, že by koncentrace DA nebo použití jednoho z polymerů mělo vliv na PDI vzniklých nanočástic.



Graf 3 Průměrná hodnota PDI nanočástic

11 EE a DL nanočástic

Získané hodnoty EE jsou uvedeny v tabulkách č. 3 a 4. Hodnota EE pro DA u nanočástic vzniklých z polymeru PLGA 5/5E se pohybovala v rozmezí 2,42 % (vzorek č. 13; 3,00 mg/ml DA) až 22,86 % (vzorek č. 5; 0,30 mg/ml DA). EE pro DA u nanočástic vzniklých z polymeru PLGA 7/3A se pohybovala v rozmezí 3,45 % (vzorek č. 30; 3,00 mg/ml DA) až 38,87 % (vzorek č. 16; 0,15 mg/ml DA).

Zprůměrované hodnoty EE jsou reprezentovány v grafu č. 4. Z tohoto grafu je patrné, že hodnota EE je ovlivněna koncentrací účinné látky, jež byla pro přípravu nanočástic použita.

U nanočástic z PLGA 5/5E dochází ke zvýšení průměrné hodnoty EE se zvýšením vstupní koncentrace DA, až do dosažení maxima, tedy 21,73%, při použité vstupní koncentraci DA 0,30 mg/ml. S dalším zvyšováním koncentrace použitého DA už průměrná hodnota EE ovšem klesala, což může být způsobeno zvýšenou mírou krystalizace DA.

U nanočástic z PLGA 7/3A tak jednoznačný trend vidět nebyl. Nanočástice připravené z tohoto polymeru dosahovaly nejvyšších průměrných hodnot EE, konkrétně 20,37 %, při vstupní koncentraci DA 0,15 mg/ml. Hodnota EE u nanočástic připravených se vstupní koncentrací DA 0,30 mg/ml a 0,60 mg/ml ovšem nebyla významně odlišná. Lze si však povšimnout, že u nanočástic se vstupní koncentrací DA 0,15 mg/ml byla získaná průměrná hodnota EE zatížena vysokou hodnotou směrodatné odchylky. Důvodem je v tomto případě především vzorek č. 16, který dosahoval nejvyšších hodnot EE (viz tabulka č. 4). Oproti vzorkům č. 17 a 18, které byly připraveny použitím stejné vstupní koncentrace DA (0,15 mg/ml), se hodnota EE vzorku č. 16 lišila o více než 20 %. Podobná situace je patrná také u vzorků č. 19, 25 a 28, které vykazovaly oproti ostatním vzorkům o stejné vstupní koncentraci DA vyšší hodnoty EE. Rozdíly v hodnotách EE u těchto vzorků ovšem nebyly již tak významné (viz tabulka č. 4). U vzorků nanočástic připravených z PLGA 7/3A s vyšší vstupní koncentrací DA bylo, podobně jako u polymeru PLGA 5/5E, patrné snížení hodnot EE, pravděpodobně zvýšenou mírou krystalizace DA.

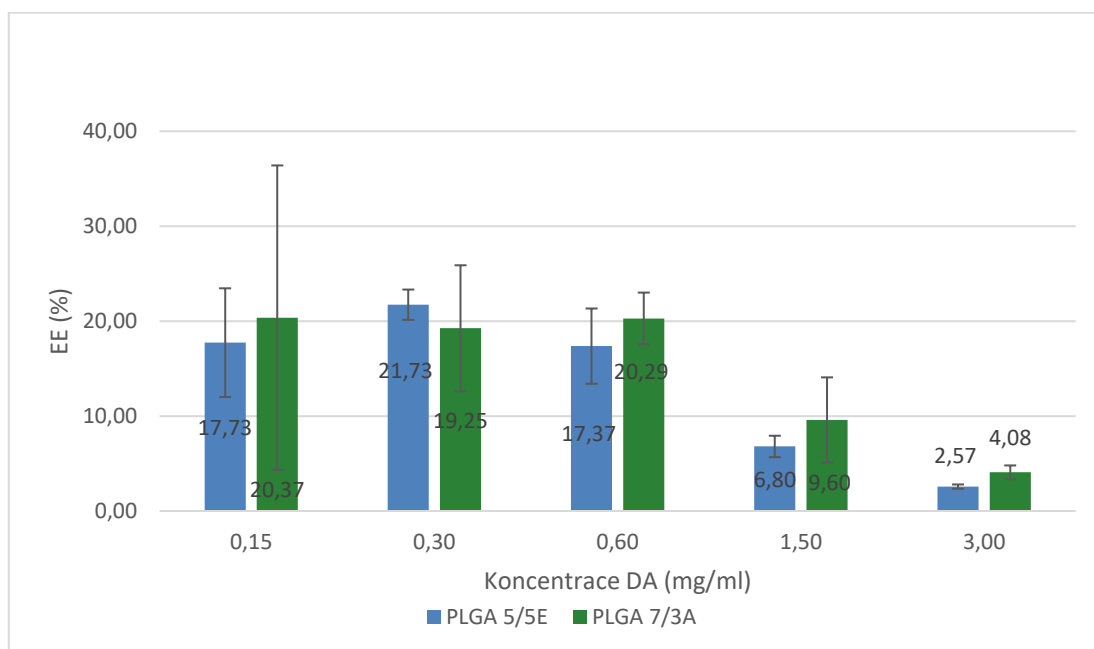
Závislost vstupní koncentrace účinné látky na hodnotě EE popsala i Carolina Gómez-Gaete a kol. (58) V uvedené studii byly připraveny nanočástice s dexametazonem metodou emulzního odpařování rozpouštědla. Nanočástice se připravovaly za využití 100 mg polymeru (PLGA 75:25), 5 ml organického rozpouštědla (aceton a dichlormethan v poměru 1:1), vodný roztok tvořil 0,25% polyvinylalkohol a množství dexametazonu použitého pro přípravu se pohybovalo v rozmezí 220 µg až 21 mg. Použité množství dexametazonu tedy bylo oproti množství DA v této práci o několik

řádů vyšší. Výsledky studie Carolina Gómez-Gaete a kol. ukazují, že hodnota EE se zvyšovala a maximální hodnoty EE, tedy 2,3 %, dosáhly nanočástice, pro jejichž přípravu byla použita koncentrace dexametazonu 2 000 mg/ml. V této práci bylo nejvyšší průměrné hodnoty EE, tedy 21,73 %, dosaženy při vstupní koncentraci DA 0,30 mg/ml. Následné zvýšení množství dexametazonu použitého pro přípravu nanočástic ve výše uvedené studii vedlo k vyšší míře jeho krystalizace ve vodné fázi, zatímco množství enkapsulovaného léčiva se snižoval. Samotný mechanismus vzniku krystalů je popsán v práci Anne-Magali Layre a kol. (59) V této práci byla pro přípravu nanočástic využita metoda nanoprecipitace. Ve chvíli, kdy dochází ke smísení organické a vodné fáze, organické rozpouštědlo difunduje do fáze vodné. To způsobí dočasné zvýšení rozpustnosti léčiva ve spojitě fázi. V okamžik, kdy je organické rozpouštědlo odstraněno, rozpustnost léčiva se sníží a dochází ke vzniku krystalů. Tento fenomén je možné pozorovat i ve výsledcích této práce. Se zvyšujícím se množstvím DA EE postupně roste až do koncentrace 0,60 mg/ml. Při koncentracích vyšších než je tato koncentrace pak dochází při přípravě snáze k supersaturaci ve vodné fázi a následné krystalizaci DA. Krystalizace pak efektivně snižovala množství DA dostupné pro enkapsulaci do PLGA.

Výsledky studie Barichella a kol. (60) ukazují, že vliv na množství vzniklých krystalů, a tedy i hodnotu EE, má interakce mezi použitým léčivem a polymerem. Tuto závislost popsali na základě hodnocení velikosti EE nanočástic připravených z PLGA 75:25 s různými léčivy. Nejvyšších hodnot EE bylo v jejich experimentu dosaženo u hydrofobních léčiv. Hydrofilní léčiva vykazovala slabší interakci s hydrofobním polymerem, což se projevilo jejich zvýšenou tendencí přestupovat do vnější fáze s následnou krystalizací, která se projevila snížením hodnot EE.

V experimentální části této práce byl používaným léčivem DA. DA (logP 2,8) je hydrofobnějším derivátem dexametazonu (logP 1,9), který byl použitý ve studii Caroliny Gomez-Gaete a kol. (58) Z tohoto důvodu bylo očekáváno dosažení vyšších hodnot EE u nanočástic s enkapsulovaným DA, než v právě zmiňované studii, kde se hodnotily nanočástice s dexametazonem. Podle uvedených výsledků je zřejmé, že se predikce potvrdila.

Průměrné hodnoty EE pro jednotlivé koncentrace DA se viditelně lišily i v závislosti na použitém polymeru. Tento rozdíl nebyl nijak markantní, nicméně jako vhodnější se pro přípravu matricových nanosfér s DA jevil PLGA 7/3A. I to lze vysvětlit interakcí mezi léčivou látkou a polymerem. Polymer PLGA 7/3A obsahuje větší poměr hydrofobnější LA (75 %) než méně hydrofobní GA (25 %). I přes to, že koncová skupina (kyselina) u PLGA 7/3A má hydrofilní charakter, výsledný polymer je hydrofobnější než polymer PLGA 5/5E. Stejný trend lze opět pozorovat i ve studii Caroliny Gomez-Gaete a kol. (58) Skupina autorů ve zmíněné studii porovnávala hodnoty EE u nanočástic z PLGA 75:25 a PLGA 50:50. Bylo zjištěno, že vyšších hodnot EE dosahovaly nanočástice z hydrofobnějšího polymeru (PLGA 75:25), nicméně rozdíl nebyl nijak významný.



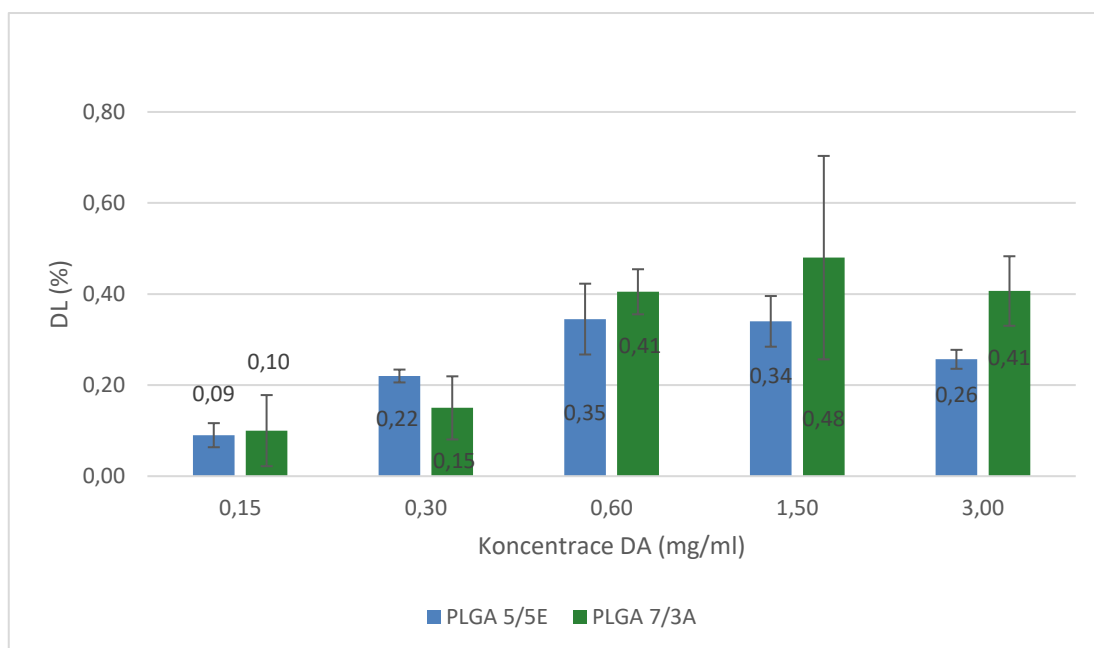
Graf 4 Průměrná hodnota EE nanočástic

Také hodnota DL je velmi důležitou charakteristikou nanočástic. V roce 2017 Shihong Shen a kol. ve své práci uvedly, že většina medikovaných nanočástic dosahuje hodnot DL nižších než 10 %. (61) Snahou je tuto skutečnost změnit, a proto probíhá řada studií, které se snaží formulaci nanočástic optimalizovat. Nízká hodnota DL u nanočástic s sebou přináší několik problémů. Pro terapeutické použití by bylo zapotřebí k zajištění terapeutické dávky podávat velká množství nanočástic. S přípravou velkého množství nanočástic souvisí zvýšení spotřeby pomocných látek,

což by mělo vliv také na vzrůst nákladů. Vyšší množství podávaných nanočástic by také mohlo vést ke zvýšenému výskytu nežádoucích účinků. (61, 62)

Hodnoty DL jsou uvedeny v tabulkách č. 3 a 4 a grafu č. 5. Hodnota DL nanočástic vzniklých z polymeru PLGA 5/5E se pohybovala v rozmezí 0,06 % (vzorek č. 2; 0,15 mg/ml DA) až 0,40 % (vzorek č. 7; 0,60 mg/ml DA). DL nanočástic vzniklých z polymeru PLGA 7/3A se pohyboval v rozmezí 0,05 % (vzorek č. 18; 0,15 mg/ml DA) až 0,73 % (vzorek č. 25; 1,50 mg/ml DA). Podobně jako u hodnot EE lze i zde spatřit ovlivnění hodnoty DL koncentrací účinné látky.

Stejně jako hodnoty EE i hodnoty DL pro jednotlivé vstupní koncentrace DA vykazovaly rozdíl na základě použitého polymeru. Největší rozdíl v průměrné hodnotě DL lze spatřit u nanočástic připravených za použití koncentrace DA 3,00 mg/ml. Vyšší hodnoty DL, a to o 0,15 %, zde dosahoval PLGA 7/3A. Vzhledem k zanedbatelné velikosti tohoto rozdílu lze konstatovat, že ani zde nebyly rozdíly mezi jednotlivými polymery významné.



Graf 5 Průměrná hodnota DL

11.1 Optimální koncentrace DA

Důležitým krokem bylo především získané hodnoty EE a DL porovnat společně. Cílem bylo nalézt optimální koncentraci DA, která by vedla ke vzniku nanočástic s co největší hodnotou EE, aby nedocházelo ke zbytečným ztrátám během formulace nanočástic, ale která by zároveň vykazovala co největší hodnoty DL, aby byla maximalizována potenciální terapeutická efektivita.

Při porovnání grafů číslo 4 a 5 lze vyhodnotit, že nanočástice připravené za využití nízké koncentrace DA, dosahovaly vyšších hodnot EE, zatímco hodnoty jejich DL byly nižší. To může být vysvětleno tím, že použité nízké množství DA se ochotně enkapsuluje, ale na druhou stranu nedokáže zcela naplnit vznikající nanočástice.

U PLGA 5/5E byla jako nejvhodnější zvolena koncentrace DA 0,60 mg/ml. Nanočástice připravené s touto koncentrací účinné látky sice nedosahovaly nejvyšších hodnot EE, ale hodnota DL byla rozhodující.

I u PLGA 7/3A byla jako nejlepší pro přípravu nanočástic zvolena koncentrace DA 0,60 mg/ml. Nanočástice s touto vstupní koncentrací DA sice nedosahovaly maximálních hodnot EE ani DL, ale volba této koncentrace byla vhodným kompromisem, kdy obě porovnávané hodnoty dosahovaly velmi dobrých výsledků.

11.2 Optimální polymer

DA je hydrofobní léčivo a pro jeho inkorporaci je potřeba volit hydrofobní nosič. Esterové zakončení zvyšuje hydrofobicitu, zatímco zakončení kyselinou působí hydrofilně. Hydrofobicitu ale zvyšuje i vyšší poměr LA vůči GA. (33)

Na základě hodnot v grafech č. 4 a 5 již bylo konstatováno, že hodnoty EE a DL se u jednotlivých polymerů lišily. Vhodnějším polymerem se zdá být PLGA 7/3A. Vzorky nanočástic z tohoto polymeru až na výjimky dosahovaly vyšších hodnot, a to jak u EE, tak DL. Zmínit je potřeba ale i to, že rozdíly byly velmi zanedbatelné.

Podobných závěrů bylo dosaženo v diplomové práci Daniely Širajové (63), kde byl hodnocen polymer PLGA 50:50 s koncovou esterovou skupinou a PLGA 50:50

zakončený kyselinou. Nanočástice byly připraveny jako v této práci metodou nanoprecipitace, enkapsulovaným léčivem byl hydrofobní fluorescein. Dle výsledků této práce neměl typ polymeru na hodnoty EE a DL výrazný vliv.

12 Purifikované vzorky nanočástic

Pro případné použití nanočástic na buněčných kulturách je potřeba vzorky purifikovat a zbavit případné mikrobiální kontaminace. Nejprve však proběhla příprava nových vzorků se zvolenou nejvhodnější hodnotou koncentrace DA, tedy 0,60 mg/ml. Vzorky byly připraveny stejným způsobem, který je popsán v kapitole 8.1. U takto připravených nanočástic byla následně hodnocena jejich velikost, PDI, ZP, EE a DL a až následně byly vzorky podrobeny procesu čištění, který je popsán v kapitole 8.4. I u vyčištěných vzorků nanočástic byly následně hodnoceny výše zmíněné parametry.

Tabulka 5 Naměřené hodnoty nanočástic s PLGA 5/5E před a po čištění

Číslo vzorku	Stav vzorku	Velikost (nm)	PDI	ZP (mV)	EE (%)	DL (%)
31	před čištěním	155,4	0,099	-22,9	11,62	0,23
31	po čištění	170,1	0,086	-34,4	2,96	0,06
32	před čištěním	144,2	0,086	-14,8	14,95	0,30
32	po čištění	163,6	0,044	-13,4	5,86	0,12

Tabulka 6 Naměřené hodnoty nanočástic s PLGA 7/3A před a po čištění

Číslo vzorku	Stav vzorku	Velikost (nm)	PDI	ZP (mV)	EE (%)	DL (%)
33	před čištěním	200,4	0,234	-18,8	–	–
33	po čištění	174,3	0,061	-30,4	–	–
34	před čištěním	159,7	0,069	-11,5	16,01	0,32
34	po čištění	194,7	0,183	-21,1	7,27	0,15

Vzorek PLGA 7/3A číslo 33 šel velmi těžce přefiltrovat, a i poté byl viditelně zakalený. Ani čištění zákal neodstranilo, a proto tyto vzorky nemohly podstoupit HPLC analýzu.

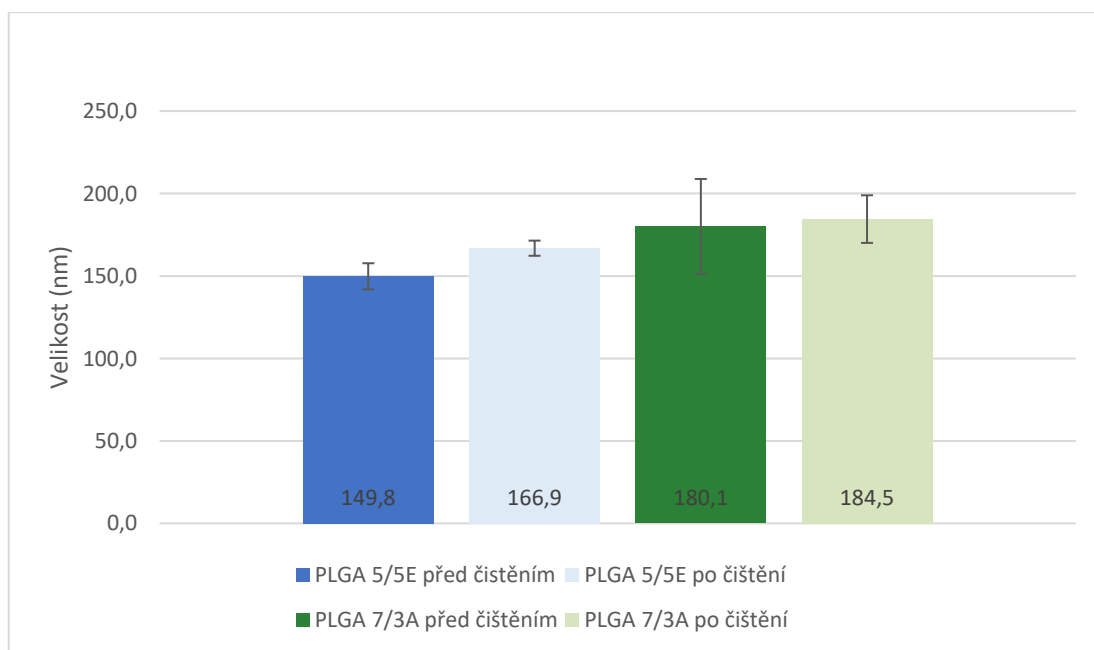
12.1 Velikost nanočástic po purifikaci

Naměřené hodnoty velikosti nanočástic jsou uvedeny v tabulkách č. 5 a 6. Získané hodnoty byly zprůměrovány a spolu se směrodatnými odchylkami pro oba typy polymerů byly přehledně porovnané v grafu č. 6.

Na základě hodnot uvedených v grafu č. 6 je patrné, že vlivem procesu čištění došlo ke zvýšení velikosti nanočástic. Příčinou může být proces centrifugace. Větší nanočástice totiž sedimentují při nižších odstředivých silách, zatímco k sedimentaci menších nanočástic je potřeba odstředivá síla větší. (64) Lze tedy předpokládat, že využitím dostupné centrifugy k sedimentaci malých nanočástic nedošlo, a tak byly odstraněny spolu se supernatantem.

Je třeba poznamenat, že velikost nanočástic se procesem čištění změnila jen nepatrně a výsledné nanočástice stále odpovídaly požadavkům pro cílení na makrofágy, jelikož jejich velikost byla v rozmezí 100 až 300 nm. (10) Lze tedy konstatovat, že vliv čištění na velikost nanočástic neměl významný vliv.

Podobných výsledků, tedy nevýznamného ovlivnění velikosti nanočástic vlivem čistících kroků, bylo dosaženo i v diplomové práci Daniely Kozáčkové. I v práci této autorky byly hodnoceny nanočástice s enkapsulovaným DA připravené metodou nanoprecipitace za využití PLGA 75:25 a PLGA 50:50. (65)



Graf 6 Vliv čistících kroků na velikost nanočástic

12.2 PDI čistěných nanočástic

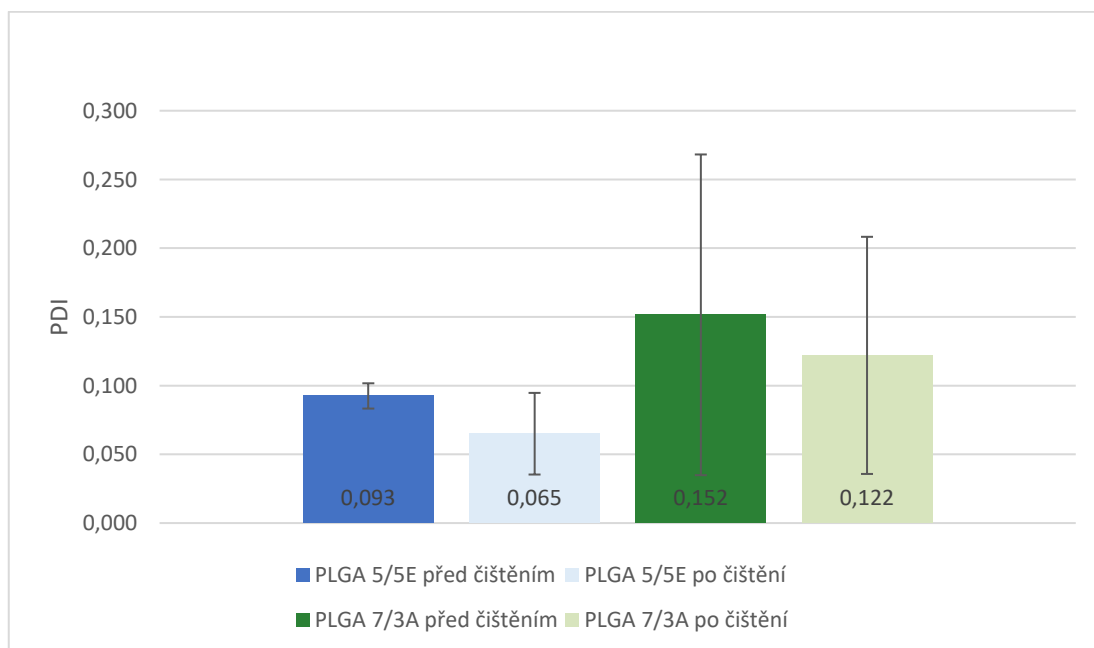
Naměřené hodnoty PDI jsou uvedeny v tabulkách č. 5 a 6. Průměrné hodnoty PDI spolu se směrodatnými odchylkami pro oba typy polymerů jsou přehledně porovnané v grafu č. 7.

Z grafu č. 7 je patrné, že průměrné hodnoty PDI byly u PLGA 7/3A zatíženy vysokou hodnotou směrodatné odchylky. Vzorky před purifikací měly průměrné hodnoty PDI $0,152 \pm 0,117$ a vzorky po purifikaci dosahovaly průměrných hodnot PDI $0,122 \pm 0,086$. Příčinou vysoké odchylky byl vzorek č. 33, jehož hodnota PDI před čistícími kroky dosahovala hodnoty 0,234, tedy nejvyšší hodnoty ze všech vzorků, které byly v rámci této práce připraveny. Vzorek č. 33 byl viditelně mírně zakalený a během jeho purifikace dokonce opakovaně docházelo k ucpávání filtrační membrány. Důvodem byla pravděpodobně přítomnost velkých částic, které mohly vzniknout například ne

zcela plynulým a dostatečně rychlým přidáním organické fáze do míchající se fáze vodné. (51)

Na základě hodnot uvedených v grafu č. 7 je také patrné, že čisticí kroky vedly ke snížení hodnoty PDI. Tento trend je patrný také ve studii Soumyenda Roye a kol., kteří připravovali uhlíkové nanotrubičky. (66) Snížení hodnot PDI odpovídá také informacím uvedeným v práci Cristiny Fornaguery a Conxity Solans. (67) Snížení hodnoty PDI souvisí se změnou velikosti čištěných nanočástic. Po centrifugaci pravděpodobně došlo ke ztrátě malých nanočástic, což mělo za následek zúžení distribuce velikosti nanočástic a tedy snížení hodnoty PDI.

V průměru se hodnota PDI u nanočástic s PLGA 5/5E čištěním snížila o 0,028, zatímco u nanočástic s polymerem PLGA 7/3A to bylo o 0,030. Z těchto výsledků lze soudit, že proces čištění na hodnotu PDI neměl významný vliv, protože se stále jednalo o částice s přijatelnou polydisperzitou.

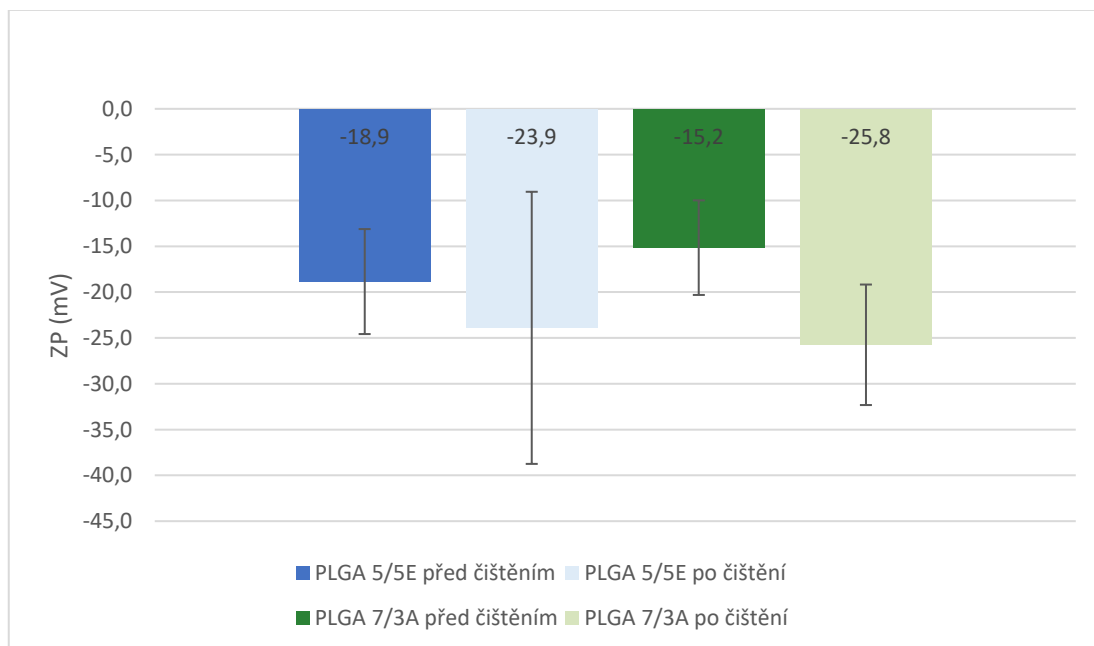


Graf 7 Vliv čisticích kroků na hodnotu PDI

12.3 ZP čištěných nanočástic

Naměřené hodnoty ZP jsou uvedeny v tabulkách č. 5 a 6 a průměrné hodnoty ZP spolu se směrodatnými odchylkami lze spatřit v grafu č. 8. Všechny získané hodnoty ZP jsou záporné, což je vhodné pro cílené podání makrofágům. (29)

Abychom mohli disperzní soustavu považovat za dostatečně stabilní, absolutní hodnota ZP by měla být vyšší než 30 mV. (35) ZP ovšem není jediným faktorem, který ovlivňuje stabilitu vzniklých systémů. Dalším takovým je například přítomnost surfaktantu, který snižuje tendenci shlukování vzniklých nanočástic. (10) Vzhledem k využití F127 jako surfaktantu při přípravě nanočástic v této práci tedy nemůžeme na základě hodnot ZP automaticky systém označit za nestabilní, i když hodnoty ZP naměřené před čištěním byly nižší než 30 mV a vyšší než -30 mV. Graf č. 8 ukazuje, že čisticí kroky způsobily snížení hodnoty ZP, respektive zvýšení absolutní hodnoty ZP. Stejný trend popsala ve své diplomové práci také Daniela Kozáčková. (65) Vysvětlení, které se nabízí, je, že během čištění byl ze soustavy odstraněn F127. F127 je neiontová povrchově aktivní látka, která má schopnost vázat se na povrch nanočástic a tím snižuje absolutní hodnotu ZP. (10, 32, 68, 69) S jeho odstraněním by tak došlo k omezení maskování povrchového náboje nanočástic, což by se projevilo jako zvýšení absolutní hodnoty ZP. Zvýšení hodnoty je přínosné, jelikož makrofágy aktivněji vychytávají částice s vyšším nábojem. (40)

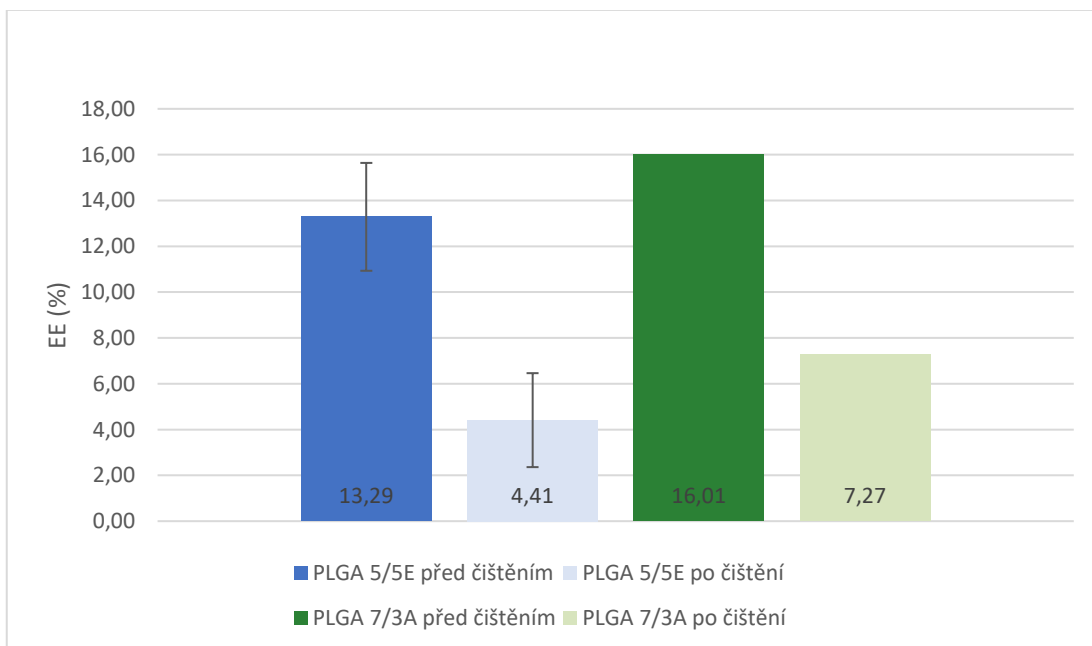


Graf 8 Vliv čistících kroků na hodnotu ZP

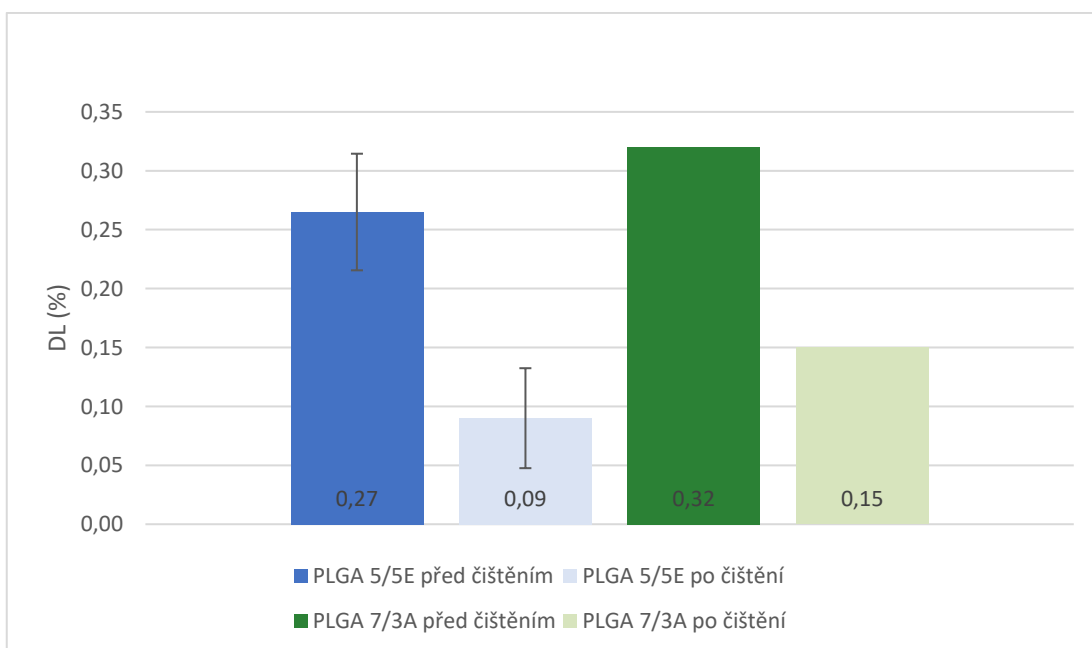
12.4 EE a DL čištěných nanočástic

Získané hodnoty EE a DL jsou uvedeny v tabulkách č. 5 a 6 a průměrné hodnoty EE a DL jsou spolu se směrodatnými odchylkami zaznamenány v grafech č. 9 a 10 v daném pořadí.

Podle výsledků je zřejmé, že na hodnotu EE i DL má proces čištění významný vliv. Hodnoty EE i DL se procesem čištění snížily o více než 50 %. I v tomto případě je příčinou ztráta malých nanočástic během centrifugace, zatímco velké částice a krystaly DA neprojdou filtrační membránou a filtrace tak přispívá ke ztrátovosti celého procesu purifikace.



Graf 9 Vliv čistících kroků na hodnotu EE



Graf 10 Vliv čistících kroků na hodnotu DL

Vzhledem k těmto zjištěním by bylo vhodné během dalších experimentů proces čištění optimalizovat, aby nedocházelo k tak negativnímu ovlivnění důležitých parametrů, kterými EE a DL jsou.

ZÁVĚR

Všechny připravené nanočástice měly velikost v rozmezí 100 až 300 nm, pro cílenou distribuci do makrofágových buněk by tedy byly vhodné. Stejně tak všechny připravené vzorky vykazovaly úzkou distribuci velikosti nanočástic. Koncentrace použitého DA ani typ polymeru na velikost a hodnotu PDI neměly vliv.

U hodnot EE a DL se projevil významný vliv použité koncentrace DA pro přípravu nanočástic. Jako nejvhodnější koncentrace DA se ukázala hodnota 0,60 mg/ml. Nanočástice, pro jejichž přípravu byla použita tato koncentrace léčivé látky, vykazovaly nejlepší poměr hodnot EE a DL.

Na hodnoty EE a DL měl zanedbatelný vliv také typ použitého polymeru. Lepší volbou se zdá být PLGA 7/3A, který je vlivem většího poměru PLA hydrofobnější než PLGA 5/5E.

Procesem čištění došlo k ovlivnění vlastností nanočástic. U všech formulací byla zaznamenána záporná hodnota ZP. Čistící kroky vlivem odstranění F127 způsobily zvýšení absolutní hodnoty ZP. Hodnota velikosti přečištěných nanočástic se zvětšila a v souvislosti s tím došlo ke snížení hodnoty PDI. Významný a nežádoucí vliv však čistící kroky měly na hodnoty EE a DL, které poklesly o více než 50 % a dosáhly tak relativně nízkých hodnot. Nicméně ani toto snížení koncentrace léčiva nemusí vést ke snížení k jejich terapeutické účinnosti.

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Kalibrační křivka DA v ACN.....	34
Graf 2 Průměrná velikost nanočástic	39
Graf 3 Průměrná hodnota PDI nanočástic	40
Graf 4 Průměrná hodnota EE nanočástic	43
Graf 5 Průměrná hodnota DL	44
Graf 6 Vliv čistících kroků na velikost nanočástic	48
Graf 7 Vliv čistících kroků na hodnotu PDI	49
Graf 8 Vliv čistících kroků na hodnotu ZP	51
Graf 9 Vliv čistících kroků na hodnotu EE.....	52
Graf 10 Vliv čistících kroků na hodnotu DL	52

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Velikost nanočástic (23).....	14
Obrázek 2 Nanosféry a nanotobolky (25).....	15
Obrázek 3 Struktura PLGA (28).....	16
Obrázek 4 Hydrolýza PLGA (28).....	17
Obrázek 5 Top-down, Bottom-up (44)	21
Obrázek 6 Schéma nanoprecipitace (49)	23
Obrázek 7 Schéma měření velikosti a PDI (22)	25
Obrázek 8 Elektrická dvojvrstva (57).....	27
Obrázek 9 Elektroforetická cela (57).....	28
Obrázek 10 Schéma měření ZP (22).....	28

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Body kalibrační křivky	33
Tabulka 2 Množství DA použitého pro přípravu nanočástic (μg)	35
Tabulka 3 Naměřené hodnoty nanočástic s PLGA 5/5E	37
Tabulka 4 Naměřené hodnoty nanočástic s PLGA 7/3A	38
Tabulka 5 Naměřené hodnoty nanočástic s PLGA 5/5E před a po čištění	46
Tabulka 6 Naměřené hodnoty nanočástic s PLGA 7/3A před a po čištění	47

POUŽITÁ LITERATURA

1. BAYDA Samer, ADEEL Muhammad, TUCCINARDI Tiziano a kol. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* [online]. 2019, 25(1) [cit. 2023-02-20]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6982820/>
2. KUBÍNEK Roman. Vzdělávání v nanotechnologiích [online]. 2011 [cit. 2023-03-07]. Dostupné z: <https://web.archive.org/web/20160804070653/http://fyzika.upol.cz/cs/system/files/download/vujtek/granty/VzdelavaniNano.pdf>
3. JAIN Akhlesh K., THAREJA Suresh. In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* [online]. 2019, 47(1) [cit. 2023-06-17]. ISSN 2169-141X. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21691401.2018.1561457>
4. PRNKA Tasilo, ŠPERLINK Karel. *Nanotechnologie* [online]. Ostrava: Repronis Ostrava, 2004 [cit. 2023-03-06]. ISBN 80-7329-070-7. Dostupné z: <https://adoc.pub/nanotechnologie-tasilo-prnka-karel-perlink.html>
5. HOŠEK Jan. Úvod do nanotechnologie. Praha: České vysoké učení technické, 2010, str. 6-7. ISBN 978-80-01-04555-8.
6. National Nanotechnology Initiative [online]. [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://www.nano.gov/>
7. SCIENCE POLICY SECTION. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties [online]. London: The Royal Society, 2004 [cit. 2023-05-28]. ISBN 0854036040. Dostupné z: https://royalsociety.org/~media/royal_society_content/policy/publications/2004/9693.pdf
8. HE Xiaojia, DENG Hua, HWANG Huey-min. The current application of nanotechnology in food and agriculture. *Journal of Food and Drug Analysis* [online]. 2018, 27(1) [cit. 2023-05-28]. ISSN 2224-6614. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9298627/>
9. JOUDEH Nadeem, LINKE Dirk. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for

- biologists. *Journal of Nanobiotechnology* [online]. 20(1) [cit. 2023-06-15]. ISSN 1477-3155. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9171489/>
10. RAO J. Prasad, GECKELER Kurt E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science* [online]. 2011, 37(7) [cit. 2023-06-17]. ISSN 0079-6700. Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670011000232>
11. LAN Jiabo. Overview of Application of Nanomaterials in Medical Domain. *Contrast Media & Molecular Imaging* [online]. 2022 [cit. 2023-02-20]. ISSN 1555-4317. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9095353/>
12. SZEFLER Beata. Nanotechnology, from quantum mechanical calculations up to drug delivery. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2018, 13 [cit. 2023-05-28]. ISSN 1178-2013. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6188196/>
13. DIEZ-PASCUAL Ana María, RAHDAR Abbas. Functional Nanomaterials in Biomedicine: Current Uses and Potential Applications. *ChemMedChem* [online]. 2022, 17(16) [cit. 2023-05-29]. ISSN 1860-7187. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9544115/>
14. ANJUM Sumaira, ISHAQUE Sara, FATIMA Hijab a kol. Emerging Applications of Nanotechnology in Healthcare Systems: Grand Challenges and Perspectives. *Pharmaceuticals* [online]. 2021, 14(8) [cit. 2023-07-21]. ISSN 1424-8247. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8401281/>
15. PAL Suchetan, ROTTER Lara, YANG Jiang, KIRCHER Moritz F. Molecular Imaging in Nanotechnology and Theranostics (MINT) Interest Group. *Molecular Imaging and Biology* [online]. 2017, 19(3) [cit. 2023-05-29]. ISSN 1860-2002. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5517372/>
16. KOVÁČ Ján. Budúcnosť nanotechnológie v medicíne a stomatológii. *Praktický lekár* [online]. 2012, 92(6) [cit. 2023-05-30]. ISSN 1805-4544. Dostupné z:
<https://www.prolekare.cz/casopisy/prakticky-lekar/2012-6/buducnost-nanotechnologie-v-medicine-a-stomatologii-38723>

17. YIN Qiliang, WANG Ying, XIANG Yipeng, XU Feng. Nanovaccines: Merits, and diverse roles in boosting antitumor immune responses. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* [online]. 2022, 18(6) [cit. 2023-05-29]. ISSN 2164-5515. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9746515/>
18. HANS Meredith L., LOWMAN Anthony M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* [online]. 2002, 6(4) [cit. 2023-06-25]. ISSN 1359-0286. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359028602001171>
19. ZHANG Yinglei, ZHANG Yuepeng, HAN Yaqian, GONG Xue. Micro/Nanorobots for Medical Diagnosis and Disease Treatment. *Micromachines* [online]. 2022, 13(5) [cit. 2023-05-30]. ISSN 2072666X. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9146405/>
20. BRUNA Tamara, MALDONADO-BRAVO Francisca, JARA Paul, CARO Nelson. Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, 22(13) [cit. 2023-05-30]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8268496/>
21. KARUNAKARAN G., SUDHA K.G., Ali S., CHO E.B. Biosynthesis of Nanoparticles from Various Biological Sources and Its Biomedical Applications. *Molecules* [online]. 2023, 28(11) [cit. 2020-07-07]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10254633/>
22. BHATTACHARJEE Sourav. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* [online]. 2016, 235 [cit. 2023-08-02]. ISSN 1873-4995. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365916303832>
23. Nanomateriály. European Union Observatory for Nanomaterials [online]. [cit. 2023-08-07]. Dostupné z: <https://euon.echa.europa.eu/cs/general-information>
24. XU Hui, LI Shuang, LIU You-Shuo. Nanoparticles in the diagnosis and treatment of vascular aging and related diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [online]. 2022, 7(1) [cit. 2023-07-20]. ISSN 2059-3635 Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9272665/>

25. AMO Laura, CANO Amanda, ETTCHETO ARRIOLA Miren. Surface Functionalization of PLGA Nanoparticles to Increase Transport across the BBB for Alzheimer's Disease. *Applied Sciences* [online]. 2021, 11(9) [cit. 2023-08-10]. ISSN 2076-3417. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/351470142_Surface_Functionalization_of_PLGA_Nanoparticles_to_Increase_Transport_across_the_BBB_for_Alzheimer%27s_Disease
26. HINES Daniel J., KAPLAN David L. Poly (lactic-co-glycolic acid) controlled release systems: experimental and modeling insights. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* [online]. 2013, 30(3) [cit. 2023-07-16]. ISSN 2162-660X. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3719420/>
27. TAMMAM Salma N., AZZAZY Hassan M., LAMPRECHT Alf. Biodegradable Particulate Carrier Formulation and Tuning for Targeted Drug Delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology* [online]. 2015, 11(4) [cit. 2023-06-25]. ISSN 1550-7041. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26310064/>
28. SU Shi, KANG Peter M. Systemic Review of Biodegradable Nanomaterials in Nanomedicine. *Nanomaterials* [online]. 2020, 10(4) [cit. 2023-07-30]. ISSN 20794991. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7221794/>
29. BOLTAROVÁ Barbora., KUBAČKOVÁ Jana, ŠKODA Josef a kol. PLGA Based Nanospheres as a Potent Macrophage-Specific Drug Delivery System. *Nanomaterials* [online]. 2021, 11(3) [cit. 2023-06-18]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8002218/>
30. MAKADIA Hirenkumar K., SIEGEL Steven J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers* [online]. 2011, 3(3) [cit. 2023-07-15]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3347861/>
31. DANHIER Fabienne, ANSORENA Eduardo, SILVA Joana M. a kol. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of controlled release*. [online]. 2012, 161(2) [cit. 2023-06-26]. ISSN 1873-4995.

- Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168365912000752>
32. HERNÁNDEZ-GIOTTONINI Karol Yesenia, RODRÍGUEZ-CÓRDOVA Rosalva Josefina, GUTIÉRREZ-VALENZUELA Cindy Alejandra a kol. PLGA nanoparticle preparations by emulsification and nanoprecipitation techniques: effects of formulation parameters. RSC Advances [online]. 2020, 10(8) [cit. 2023-06-17]. ISSN 2046-2069. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9049000/>
33. JAHAN Sheikh Tasnim, HADDADI Azita. Investigation and optimization of formulation parameters on preparation of targeted anti-CD205 tailored PLGA nanoparticles. International Journal of Nanomedicine [online]. 2015, [cit. 2023-08-11]. ISSN 1178-2013. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4677653/>
34. KHAN Ibrahim, SAEED Khalid, KHAN Idrees. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. Arabian Journal of Chemistry [online]. 2019, 12(7) [cit. 2023-05-29]. ISSN 1878-5352. Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535217300990?via%3Dihub>
35. SINGH Rajesh, LILLARD James W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. Experimental and Molecular Pathology [online]. 2009, 86(3) [cit. 2023-07-07]. ISSN 0014-4800. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3249419/>
36. HICKEY John W., SANTOS Jose Luis, WILLIFORD John-Michael, MAO Hai-Quan. Control of Polymeric Nanoparticle Size to Improve Therapeutic Delivery. Journal of Controlled Release [online]. 2015, 219 [cit. 2023-06-24]. ISSN 1873-4995. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4656075/>
37. XIE Yufei, TOLMEIJER Sofie, OSKAM Jelle M. a kol. Glucocorticoids inhibit macrophage differentiation towards a pro-inflammatory phenotype upon wounding without affecting their migration. Disease Models & Mechanisms [online]. 2019, 12(5) [cit. 2023-08-17]. ISSN 1754-8411. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6550045/>

38. BARTNECK Matthias, WARZECHA Klaudia Theresa, TACKE Frank.
Therapeutic targeting of liver inflammation and fibrosis by nanomedicine.
Hepatobiliary Surgery and Nutrition [online]. 2014, 3(6) [cit. 2023-08-17]. ISSN
2304-389X. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4273112/>
39. BABOCI Lorena, CAPOLLA Sara, DI CINTIO Federica a kol. The Dual Role of
the Liver in Nanomedicine as an Actor in the Elimination of Nanostructures or a
Therapeutic Target. Journal of Oncology. [online]. 2020 [cit. 2023-06-26]. ISSN
1687- 8450. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7060440/>
40. XIAO Kai, LI Yuanpei, LUO Juntao a kol. The effect of surface charge on in
vivo biodistribution of PEG-oligocholeic acid based micellar nanoparticles.
Biomaterials [online]. 2011, 32(13) [cit. 2023-08-18]. ISSN 0142-9612.
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3055170/>
41. HE Chunbai, HU Yiping, YIN Lichen a kol. Effects of particle size and surface
charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles.
Biomaterials [online]. 2010, 31(13) [cit. 2023-08-18]. ISSN 0142-9612.
Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961210000979?via%3Dihub>
42. SALAHPOUR-ANARJAN Fatemeh. Active targeting drug delivery nanocarriers:
Ligands. Nano-Structures and Nano-Objects [online]. 2019, 19 [cit. 2020-07-07].
ISSN 2352-507X. Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2352507X19302926>
43. ASTETE Carlos E., SABLIOV Cristina M. Synthesis and characterization of
PLGA nanoparticles. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition [online].
2012, 17(3) [cit. 2023-08-18]. ISSN 1568-5624. Dostupné z:
<https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1163/156856206775997322?needAccess=true>
44. Nanoparticle Synthesis. Nanoscience [online]. [cit. 2023-08-02]. Dostupné z:
<https://www.nanoscience.com/techniques/nanoparticle-synthesis/>

45. LAMCH Łukasz, WILK Kazimiera A., DÉKÁN Imre a kol. Rational Mitomycin Nanocarriers Based on Hydrophobically Functionalized Polyelectrolytes and Poly(lactide-co-glycolide). *Langmuir* [online]. 2022, **38**(18) [cit. 2023-08-20]. ISSN 1520-5827. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9097536/>
46. PELTONEN Leena, AITTA Johanna, HYVÖNEN Samuli a kol. Improved Entrapment Efficiency of Hydrophilic Drug Substance During Nanoprecipitation of Poly(l)lactide Nanoparticles. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2004, **5**(1) [cit. 2023-08-20]. ISSN 1530-9932. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2784850/>
47. GUHAGARKAR Swati A., MALSHE Vinod C., DEVARAJAN Padma V. Nanoparticles of Polyethylene Sebacate: A New Biodegradable Polymer. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2009, 10(3) [cit. 2023-08-20]. ISSN 1530-9932. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2802147/>
48. DAS Swarnali, SURESH Preeti K., DESMUKH Rohitas. Design of Eudragit RL 100 nanoparticles by nanoprecipitation method for ocular drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. 2010, 6(2) [cit. 2023-08-20]. ISSN 1549-9642. Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963409001853?via%3Dihub>
49. SANTARIUS Karolina. Polymerní částice pro cílenou terapii zánětlivých onemocnění [online]. Hradec Králové, 2022 [cit. 2023-07-09]. Dostupné z:
<https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/173603/120420209.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Diplomová práce. FAF UK HK
50. STRNADOVÁ Kristýna. Optimalizace procesu purifikace nanočásticových systémů [online]. Hradec Králové, 2020 [cit. 2023-07-06]. Dostupné z:
<https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/120927/120374447.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Diplomová práce. FAF UK HK.
51. LINCE Federica, MARCHISIO Daniele L., BARRESI Antonello A.. Strategies to control the particle size distribution of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2008, 322(2) [cit. 2023-08-20]. ISSN 1095-7103. Dostupné z:

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979708003159?via%3Dihub>
52. BADRI Waisudin, MILADI Karim, EDDABRA Rkia, FESSI Hatem, ELAISSARI Abdelhamid. Elaboration of Nanoparticles Containing Indomethacin: Argan Oil for Transdermal Local and Cosmetic Application. *Journal of Nanomaterials* [online]. 2015, 1 [cit. 2023-08-20]. ISSN 1687-4129. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/276934324_Elaboration_of_Nanoparticles_Containing_Indomethacin_Argan_Oil_for_Transdermal_Local_and_Cosmetic_Application/figures?lo=1&utm_source=google&utm_medium=organic
53. FORNAGUERA Cristina, SOLANS Conxita. Characterization of polymeric nanoparticle dispersions for biomedical applications: Size, surface charge and stability. *Pharmaceutical nanotechnology* [online]. 2018, 6(3) [cit. 2023-07-09]. ISSN 2211-7393. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/article/91550>
54. Dynamický rozptyl světla. Krystalografická společnost [online]. [cit. 2023-08-02]. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/dls.htm>
55. DANAEI Mina, DEHGHANKHOLD Mahvash, ATAEI Somayeh a kol. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* [online]. 2018, 10(2) [cit. 2023-07-10]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6027495/>
56. STETEFELD Jörg, MCKENNA Sean A., PATEL Trushar R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews* [online]. 2016, 8(4) [cit. 2023-07-09]. ISSN 1867-2450. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12551-016-0218-6>
57. Zeta potenciál. Krystalografická společnost [online]. [cit. 2023-08-02]. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>
58. ROCCA Joseph, LIU Demin, LIN Wenbin. Are high drug loading nanoparticles the next step forward for chemotherapy? *Nanomedicine* [online]. 2012, 7(3) [cit. 2023-08-21]. ISSN 1748-6963. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3777216/>

59. GOMEZ-GAETE Carolina, TSAPIS Nicolas, BESNARD Madelaine a kol. Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. [online] 2007, 331(2). ISSN 03785173. [cit. 2023-07-07] Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517306009859>
60. HU Qin, GONG Xiaojuan, LIU Lizhen, CHOIL Martin M. F. Characterization and Analytical Separation of Fluorescent Carbon Nanodots. *Journal of Nanomaterials* [online]. 2017, 1(23) [cit. 2023-08-24]. ISSN 1687-4129. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/320636295_Characterization_and_Analytical_Separation_of_Fluorescent_Carbon_Nanodots
61. KOZÁČKOVÁ Daniela. Polymerní částice pro cílenou terapii a zvýšení biodostupnosti [online]. Hradec Králové, 2022 [cit. 2023-08-19]. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/173584/120420987.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Diplomová práce. FAF UK HK.
62. LAYRE Anne-Magali, GREF Ruxandra, JOËL Richard a kol. Nanoencapsulation of a crystalline drug. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2005, 298(2) [cit. 2023-08-20]. ISSN 1873-3476. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517305002425#fig1>
63. BARICHELLO Jose Mario, MORISHITA Mariko, TAKAYAMA Kozo, NAGAI Tsuneji. Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method. *Drug Development and Industrial Pharmacy* [online]. 1999, 25(4) [cit. 2023-08-25]. ISSN 1520-5762. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1081/DDC-100102197?needAccess=true>
64. ROY Soumyendu, JAIN Vishal, BAJPAI Reeti a kol. Formation of Carbon Nanotube Bucky Paper and Feasibility Study for Filtration at the Nano and Molecular Scale. *The Journal of Physical Chemistry C* [online]. 2012, 116(35) [cit. 2023-08-25]. ISSN 1932-7455. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/261529151_Formation_of_Carbon_Nanotube_Bucky_Paper_and_Feasibility_Study_for_Filtration_at_the_Nano_and_Molecular_Scale

65. FORNAGUERA Cristina, SOLANS Conxita. Analytical Methods to Characterize and Purify Polymeric Nanoparticles. *International Journal of Polymer Science* [online]. 2018 [cit. 2023-08-18]. ISSN 1687-9430. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/326864637_Analytical_Methods_to_Characterize_and_Purify_Polymeric_Nanoparticles
66. VAUTHIER Christine, BOUCHEMAL Kawthar. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutical Research* [online]. 2009, 26(5) [cit. 2023-08-20]. ISSN 1573-904X. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11095-008-9800-3>
67. KOZAK Anna, SADOWSKI Zygmunt. Effect of Pluronics and surfactant adsorption onto dolomite suspension zeta potential and stability. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska sectio AA – Chemia* [online]. 2015, 70(1) [cit. 2023-08-19]. ISSN 2083-358X. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/282638224_Effect_of_Pluronics_and_surfactant_adsorption_onto_dolomite_suspension_zeta_potential_and_stability
68. SHEN Shihong, WU Youshen, LIU Yongchun, WUHIGH Daocheng. Drug-loading nanomedicines: progress, current status, and prospects. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2017, 12 [cit. 2023-08-21]. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5459982/>
69. ŠIRAJOVÁ Daniela. Příprava polymerních fluorescenčních nanočástic. [online]. Hradec Králové, 2021 [cit. 2023-08-21]. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/173584/120420987.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Diplomová práce. FAF UK HK.