

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie



Diplomová práce

Disoluční studie PLGA nanočástic

Dissolution study of PLGA nanoparticles

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Monika Smékalová, Ph.D.

Hradec Králové, 2023

Aneta Budigová

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

V Hradci Králové

.....

Aneta Budigová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat Mgr. Monice Smékalové Ph.D. za její odborné vedení, trpělivost a cenné rady, které mi pomohly při zpracování této diplomové práce. Dále také děkuji Mgr. Barboře Boltnarové za její ochotu a pomoc v laboratoři. Ráda bych poděkovala své rodině a příteli za jejich podporu během mého studia a psaní této diplomové práce.

OBSAH

1	ABSTRAKT	7
2	ABSTRACT	8
3	ZADÁNÍ A CÍL PRÁCE	9
4	ÚVOD.....	10
5	TEORETICKÁ ČÁST	11
5.1	Nanočástice	11
5.2	Nanočásticové nosičové systémy.....	11
5.2.1	Lipidové nanočástice	12
5.2.2	Dendrimery.....	13
5.2.3	Anorganické nanočástice	14
5.2.4	Nanokrystaly.....	14
5.2.5	Proteinové a polysacharidové nanočástice	14
5.2.6	Polymerní nanočástice	14
5.3	Úprava povrchu nanočástic.....	16
5.4	Metody přípravy polymerních nanočástic	17
5.4.1	Odpaření rozpouštědla.....	18
5.4.2	Emulzně difuzní odpařovací metoda	19
5.4.3	Vysolování	20
5.4.4	Nanoprecipitace	21
5.4.5	Polymerizace	21
5.5	Vlastnosti nanočástic	22
5.5.1	Velikost a tvar	22
5.5.2	Zeta potenciál	23
5.5.3	Polydisperzita	23

5.5.4	Enkapsulační efektivita.....	23
5.6	Disoluční testy <i>in vitro</i>	24
5.6.1	Metody membránové difuze	24
5.6.2	Metody separace	25
5.6.3	Metoda kontinuálního toku.....	25
5.6.4	Další metody.....	25
5.7	Cílená distribuce léčiv	26
5.7.1	Cílená distribuce léčiv v terapii nádorových onemocnění	26
5.7.2	Cílená distribuce léčiv do buněk imunitního systému.....	27
5.8	Uvolnění léčiva	28
5.8.1	Difuze přes vodní póry	29
5.8.2	Difuze z polymerní matrice	29
5.8.3	Osmotická pumpa.....	30
5.8.4	Eroze.....	30
6	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
6.1	Použité suroviny	31
6.1.1	Fluorescein	32
6.1.2	Dexamethason-acetát.....	33
6.1.3	Stabilizátor (poloxamer 407).....	33
6.1.4	Rozpouštědla	34
6.1.5	Povrchově aktivní látka (polysorbát 20).....	34
6.2	Použité přístroje	34
6.3	Použité metody	35
6.3.1	Difuze volného fluoresceinu.....	35
6.3.2	Příprava PLGA nanočástic s fluoresceinem	35
6.3.3	Disoluce fluoresceinu z PLGA nanočástic	36

6.3.4	Disoluční média použitá při disoluci fluoresceinu	37
6.3.5	Měření enkapsulace fluoresceinu	38
6.3.6	Příprava nanočástic s dexamethason-acetátem.....	40
6.3.7	Disoluce dexamethason-acetátu z PLGA nanočástic.....	41
6.3.8	Měření enkapsulace dexamethason-acetátu.....	42
6.3.9	Určení velikosti a zeta potenciálu nanočástic na přístroji Zetasizer.....	42
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	43
7.1	Disoluce fluoresceinu z PLGA nanočástic do PBS	43
7.1.1	Difuze volného fluoresceinu do PBS	44
7.2	Disoluce fluoresceinu z PLGA nanočástic do fyziologického roztoku	45
7.3	Disoluce fluoresceinu z PLGA nanočástic do acetátového pufru.....	46
7.4	Disoluce fluoresceinu z PLGA nanočástic do ALF	47
7.5	Srovnání uvolňování fluoresceinu z PLGA nanočástic do jednotlivých disolučních médií.....	48
7.6	Disoluce dexamethason-acetátu z PLGA nanočástic do PBS.....	50
7.7	Velikost nanočástic	51
7.8	PDI nanočástic	53
7.9	Zeta Potenciál	54
7.10	Enkapsulační efektivita	55
8	ZÁVĚR.....	56
9	POUŽITÉ ZKRATKY	57
10	SEZNAM OBRÁZKŮ	58
11	SEZNAM TABULEK	60
12	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	61

1 ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Školitel: Mgr. Monika Smékalová Ph.D.

Posluchač: Aneta Budigová

Název diplomové práce: Disoluční studie PLGA nanočástic

PLGA nanočástice jsou využívány jako nanočásticové nosičové systémy pro cílenou distribuci a řízené uvolňování léčiv.

Cílem této diplomové práce bylo připravit PLGA nanočástice s enkapsulovaným fluoresceinem a dexamethason-acetátem a následně provést jejich disoluce do různých médií. Fluorescein jako modelová látka byl vybrán kvůli své nízké rozpustnosti ve vodě, což je vlastnost, kterou si je blízký s dexamethason-acetátem.

Nanočástice byly připraveny metodou nanoprecipitace. Pro disoluce fluoresceinu byla zvolena následující disoluční média: 0,01M PBS, fyziologický roztok, acetátový pufr a simulovaná lysozomální tekutina (ALF). Disoluce PLGA nanočástic s dexamethason-acetátem byla provedena do 0,01M PBS. Nanočástice byly také hodnoceny z hlediska velikosti, PDI, zeta potenciálu a enkapsulační efektivity.

Ochota fluoresceinu uvolňovat se z PLGA nanočástic klesala v pořadí: acetátový pufr, fyziologický roztok, 0,01M PBS a ALF. Snížení pH disolučního média ze 7,4 (PBS, fyziologický roztok) na 5,5 (acetátový pufr) vedlo k uvolnění přibližně dvojnásobku fluoresceinu za stejnou dobu. Snížením pH na 4,5 (ALF) nedošlo k dalšímu zrychlení ani zvýšení uvolňování.

Při disoluci dexamethason-acetátu do 0,01M PBS se uvolnilo 80 % za 48 hodin. Maximální množství uvolněného fluoresceinu do téhož média bylo 68 % a to v průběhu 4 hodin.

Klíčová slova: PLGA, nanočástice, fluorescein, dexamethason-acetát, disoluce

2 ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Consultant: Mgr. Monika Smékalová Ph.D.

Student: Aneta Budigová

Title of thesis: Dissolution study of PLGA nanoparticles

PLGA nanoparticles are used as nanoparticle carrier systems for targeted distribution and controlled release of drugs.

The aim of this diploma thesis was to prepare PLGA nanoparticles with encapsulated fluorescein and dexamethasone acetate and subsequently dissolve them in various media. Fluorescein as a model substance was chosen because of its low solubility in water, which is close to that of dexamethasone acetate.

Nanoparticles were prepared by the nanoprecipitation method. The following dissolution media were chosen for fluorescein dissolution: 0.01M PBS, saline, acetate buffer, and artificial lysosomal fluid (ALF). Dissolution of PLGA nanoparticles with dexamethasone acetate was performed in 0.01 M PBS. The nanoparticles were also evaluated for size, PDI, zeta potential and encapsulation efficiency.

The willingness of fluorescein to release from PLGA nanoparticles decreased in the order: acetate buffer saline, 0.01M PBS and ALF. Lowering the pH of the dissolution medium from 7.4 (PBS, saline) to 5.5 (acetate buffer) resulted in the release of approximately twice as much fluorescein in the same time. Lowering the pH to 4.5 (ALF) did not further accelerate or enhance release.

When dexamethasone acetate was dissolved to 0.01M PBS, 80% was released in 48 hours. The maximal amount of fluorescein released into the same medium was 68% during 4 hours.

Keywords: PLGA, nanoparticles, fluorescein, dexamethason-acetate, dissolution

3 ZADÁNÍ A CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo enkapsulovat modelovou látku fluorescein do PLGA nanočástic a posoudit jeho uvolňování do disolučních médií o různém pH a složení. Byla použita média 0,1M PBS, fyziologický roztok, acetátový pufr a ALF. Disoluce probíhaly při 37 °C po dobu 48 h. Množství uvolněného fluoresceinu bylo hodnoceno fluorometricky pomocí čtečky destiček. Na závěr byla hodnocena disoluce dexamethason-acetátu (37 °C, 77 h) do 0,1M PBS a hodnocena pomocí HPLC.

Práce byla rozdělena do těchto dílčích kroků:

- 1) Hledání literatury zabývající se zejména cílenou distribucí, metodami přípravy polymerních nanočástic a disolučními testy a sepsání teoretické části práce.
- 2) Příprava PLGA nanočástic s enkapsulovaným fluoresceinem a dexamethason-acetátem.
- 3) Hodnocení velikosti, PDI a zeta potenciálu nanočástic a enkapsulační efektivity.
- 4) Provedení disolučních testů a určení uvolněného množství látek pomocí fluorometrie nebo HPLC.

4 ÚVOD

Nanotechnologie je rychle se rozvíjející a perspektivní oblastí, jejíž poznatky nachází využití v různých oblastech vývoje a výzkumu. Velký význam mají nanočástice v medicíně a farmacii, a to jak v terapii, tak i prevenci a diagnostice mnoha onemocnění.

Nanočásticové nosičové systémy jsou využívány při cílené distribuci a řízeném uvolňování léčiv díky své schopnosti enkapsulovat, adsorbovat nebo ve svém objemu rozpustit či dispergovat léčiva. Mohou zlepšovat vlastnosti léčiv, chránit je před degradací, zvyšovat jejich účinnost, prodloužit účinek, snížit jejich toxicitu, nežádoucí účinky i frekvenci dávkování.

Problematika špatně rozpustných léčiv ve vodě a zvyšování jejich biologické rozpustnosti je aktuálním tématem, neboť velké množství léčiv uváděných na trh mezi léčiva s nízkou rozpustností ve vodě patří.

Dexamethason-acetát je kortikosteroid s protizánětlivými účinky vyznačující se špatnou rozpustností ve vodě. Cílená distribuce dexamethason-acetátu do zánětlivých buněk je slibným přístupem, jak minimalizovat jeho vedlejší účinky. Fluorescein byl v této práci použit jako modelová látka, neboť jeho rozpustnost ve vodě je taktéž nízká. PLGA je biodegradabilní a biokompatibilní polymer s vhodnými vlastnostmi pro využití jako nanočásticový nosič pro cílenou distribuci.

V této práci byly připravovány PLGA nanočástice s enkapsulovaným fluoresceinem a dexamethason-acetátem a následně byly provedeny disoluce do médií o různém pH a složení. Sledovány byly také vlastnosti připravených nanočástic, a to velikost, index polydisperzity, zeta potenciál a enkapsulační efektivita.

5 TEORETICKÁ ČÁST

5.1 Nanočástice

Nanočástice pro farmaceutické účely jsou koloidní částice o rozměrech 10–1000 nm. (1)

Oblast nanočástic a nanotechnologií je rychle se rozvíjející odvětví. Poznatky a objevy z nanotechnologie se uplatňují v širokém spektru oborů, které zahrnují elektroniku, fotoniku, medicínu či biotechnologii. (2)

Nanomedicína je nově vznikající obor implementující poznatky a techniky nanovědy do prevence a terapie nemocí. V medicíně a farmacii jsou nanočástice v současnosti využívány při diagnostice, pro cílenou distribuci léčiv, v tkáňovém inženýrství a jako biosenzory. (3)

5.2 Nanočásticové nosičové systémy

Nanočásticové nosičové systémy mají schopnost enkapsulovat, adsorbovat nebo ve svém objemu rozpustit či dispergovat malé molekuly hydrofilních a hydrofobních léčiv, léčiv na bázi proteinů i nukleové kyseliny. (4)

Biologicky degradovatelné nanočástice se používají ke zlepšení farmakokinetických vlastností léčiv a bioaktivních molekul. Dochází ke zlepšení biologické dostupnosti, terapeutického indexu a rozpustnosti léčiva. Umožňují tedy perorální podání léčiv, u kterých je tento způsob podání obtížný. Mohou vést ke zvýšení jejich účinnosti, snášenlivosti a snížení toxicity. Nanočásticové nosičové systémy mohou snížit frekvenci dávkování léčiva a tím pozitivně ovlivňovat compliance pacienta. Dále jsou využívány při cílené distribuci a řízeném uvolňování léčiv. (5)

Jako nanočásticové nosičové systémy jsou využívány kovové, organické, anorganické a polymerní nanostruktury, včetně dendrimerů, micel a lipozomů. (3)

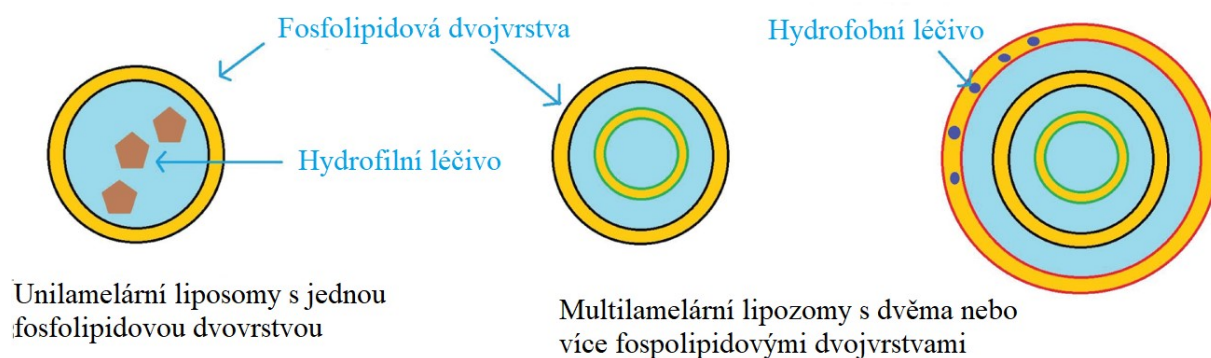
Široce používány jsou vzhledem k jejich výhodné biokompatibilitě a biodegradaci různé syntetické polymery, jako je polyvinylalkohol, kyselina poly-L-mléčná, polyethylenglykol a kyselina poly(mléčná-ko-glykolová) (PLGA) a přírodní polymery, jako je alginát a chitosan. (3)

5.2.1 Lipidové nanočástice

V cílené distribuci léčiv nachází využití i lipidové nanostruktury včetně lipozomů a micel. (3) Do skupiny lipidových nanočástic řadíme různé druhy nanočástic s vodným, olejovým, pevným nebo amorfním jádrem obklopeným a stabilizovaným lipidovými vrstvami. Mezi jejich hlavní výhody patří jednoduchá příprava, biokompatibilita a vysoká biologická dostupnost. Nevýhodou je naopak nízká enkapsulační efektivita. (6, 7) Lipidové nanočástice jsou silně hydrofobní, proto nemohou být samovolně rozpuštěny nebo dispergovány ve vodě. (8)

5.2.1.1 Lipozomy

Lipozomy jsou vezikuly kulovitého tvaru složené z fosfolipidů a steroidů obvykle o velikosti 50–450 nm. Hydrofilní léčiva jsou uzavřena ve vodném jádře lipozomu. Hydrofobní léčiva jsou uložena ve fosfolipidové membráně. (3, 6) Rozdělujeme je na unilamelární a multilamelární dle počtu fosfolipidových dvojvrstev (obrázek 1). Mezi hlavní nevýhody lipozomů patří nedostatek dostupných metod přípravy, nízká stabilita léčiva a rychlý rozklad v lidském těle před dosažením terapeutického účinku. (9)



Obrázek 1: Lipozomy, převzato a upraveno (9)

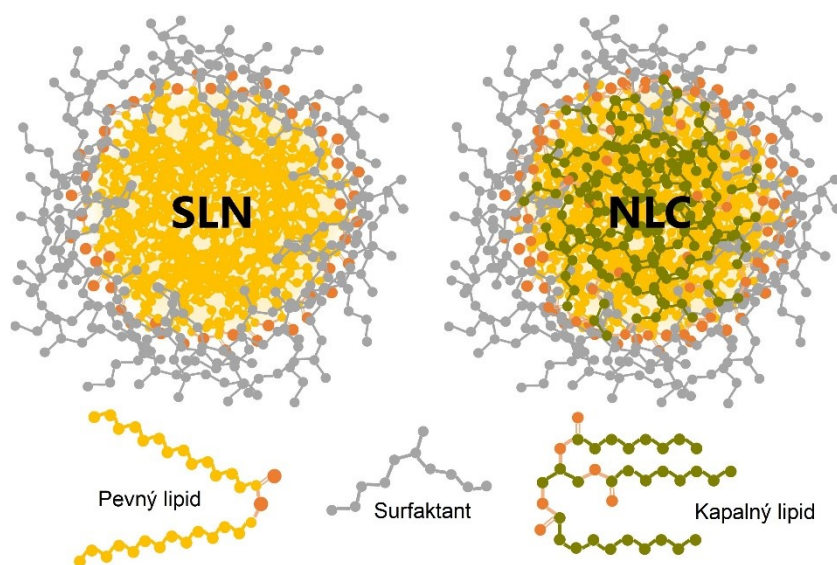
5.2.1.2 Pevné lipidové nanočástice (SLN)

Jedná se o kulovité, diskovité nebo ploché částice připravené z pevných lipidů, které jsou pevné při pokojové i tělesné teplotě. Jsou schopné pojmout léčivo mezi řetězce mastných kyselin, případně může být léčivo připojeno k povrchu nosiče. Při perorálním podání obcházejí firstpass efekt, čímž je zvýšena jejich biologická dostupnost. Dalšími výhodami

je jejich nízká toxicita, účinné zacílení léčiv, řízené uvolňování léčiva a snížení toxicity léčiva. (8, 10, 11, 12)

5.2.1.3 Nanostrukturované lipidické nosiče (NLC)

Nanostrukturované lipidické nosiče vznikají začleněním kapalných lipidů do struktury. Jsou tedy tvořeny směsí pevných a kapalných lipidů v různých poměrech, od 70:30 do 99,9:1 (obrázek 2). Díky tomu prokazují lepší stabilitu, nižší uvolňování léčiva během skladování, vyšší schopnost enkapsulace a lepší biokompatibilitu. (8, 12, 13)



Obrázek 2: Porovnání SLN a NLC, převzato a upraveno (8)

5.2.2 Dendrimery

Dendrimery jsou vysoce rozvětvené 3D struktury kulovitěho tvaru. (3) Aktivní funkční skupiny přítomné na vnějšku dendrimérů umožňují konjugaci biomolekul nebo kontrastních činidel s povrchem, zatímco léčiva mohou být uložena uvnitř. (6) Byly vyvinuty pro transdermální, orální, oční a pulmonální cílené podání léčiv. Klinická aplikace je omezena přítomností aminových skupin v jejich struktuře, které mohou způsobovat toxicitu. (3)

5.2.3 Anorganické nanočástice

Do této skupiny zařazujeme nanočástice stříbrné, zlaté, železné, měděné a z oxidu křemičitého atd. (3) Jejich stabilita a biokompatibilita jsou velmi dobré, ale klinické využití je omezeno nízkou rozpustností a toxicitou způsobenou přítomností těžkých kovů. (6)

5.2.4 Nanokrystaly

Nanokrystaly jsou čisté, pevné částice léčiva bez molekul nosiče. Jejich stabilita je zvýšena pomocí polymerních stabilizátorů nebo povrchově aktivních látek. (3)

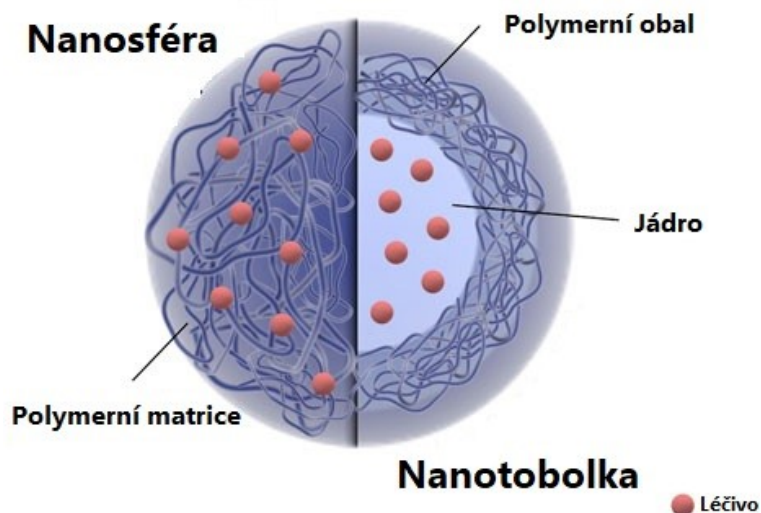
5.2.5 Proteinové a polysacharidové nanočástice

Proteiny a polysacharidy jsou přírodní polymery a nanočástice na jejich bázi jsou snadno biodegradovatelné. Nevýhodou využití polysacharidů v oblasti nanomedicíny je jejich degradace při vysokých teplotách a rozpustnost ve vodě. (3)

5.2.6 Polymerní nanočástice

Polymerní nanočástice jsou pevné, koloidní a kulovité struktury o velikosti pohybující se v rozmezí 10–1000 nm. (14) Jejich syntéza probíhá z přírodních i syntetických látek ve formě monomerů či polymerů, čímž je zajištěna velká variabilita struktur a vlastností. (6) Využívají se jako nosiče pro malá hydrofilní i hydrofobní léčiva při cílené distribuci léčiv do konkrétních orgánů a buněk. (15) Mezi jejich výhody při tomto využití patří schopnost chránit léčivo, zlepšují jeho biologickou dostupnost a terapeutický index. (16)

Rozdělujeme je na nanotobolky a nanosféry, které se navzájem liší svojí stavbou. Nanotobolky jsou vezikulární systémy skládající se z olejového či kapalného jádra, ve kterém je léčivo obvykle rozpuštěno. Jádro je obklopeno pevným polymerním obalem, který ovlivňuje uvolňování léčiva z jádra. Nanosféry jsou matricové částice založené na kontinuální polymerní síti ve které je léčivo uloženo, nebo adsorbováno na jejím povrchu (obrázek 3). (2, 16)



Obrázek 3: Nanosféra a nanotobolka, převzato a upraveno (20)

Nejprve začaly být využívány nebiodegradovatelné polymery, například polyakrylamid a polymethakrylát. Z důvodu rizika chronické toxicity jsou nyní nahrazovány polymery biodegradovatelnými. (17)

Využití polymerních nanočástic má potenciál v terapii rakoviny, AIDS, hepatitidy typu C, diabetu, tuberkulózy i při transplantacích orgánů. Polymerní nanočástice jsou upřednostňovány před použitím anorganických nanočástic z důvodu jejich lepší biokompatibility a degradace. Zároveň mají lepší schopnost enkapsulace léčiva. (17)

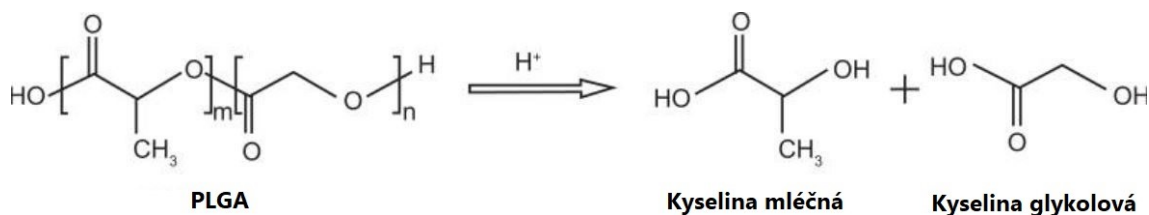
5.2.6.1 Nanočástice z přírodních polymerů

Nanomateriály na bázi chitosanu jsou široce používány pro systémy kontinuálního uvolňování léčiv pro různé typy epitelů, včetně bukalního, střevního, nazálního, očního a plicního, a to díky jeho mukoadhesivním vlastnostem a schopnosti působit v těsných epiteliálních spojích. Dalším biopolymerním mukoadhesivním materiálem používaným k tvorbě nanočástic je alginát. (3)

5.2.6.2 PLGA nanočástice

Jedná se o syntetické, alifatické, biodegradovatelné, polyesterové nanočástice. Jsou to jedny z nejčastěji využívaných polymerních nanočástic v distribuci léčiv. Jejich velikost je obvykle 100–250 nm. (15,17)

Hydrolýzou kyseliny poly(mléčné-ko-glykolové) vznikají monomery kyselina mléčná a glykolová (obrázek 4). Tyto dva monomery jsou endogenní látky, a proto jsou snadno metabolizované prostřednictvím Krebsova cyklu a vylučují se ve formě oxidu uhličitého a vody. Toxicita pro organismus je tedy minimální. Použití PLGA nanočástic pro podávání léčiv je schváleno FDA (úřad pro kontrolu potravin a léčiv) a EMA (evropská léková agentura). (15,17)



Obrázek 4: PLGA, převzato a upraveno (4)

PLGA lze syntetizovat polykondenzační reakcí nebo polymerací s otevíráním kruhu cyklických diesterů. Druhá metoda je v současnosti preferovanější kvůli kratší reakční době. (4)

Polymery jsou komerčně dostupné s různými molekulovými hmotnostmi a různým složením kopolymeru. Například PLGA 50:50 je kopolymer složený z 50 % kyseliny mléčné a 50 % kyseliny glykolové. (15) Poměr PLA (kyselina polymléčná) a PGA (kyselina polyglykolová) spolu s molekulovou hmotností polymeru ovlivňují jejich hydrofobnost, krystalinitu, mechanické vlastnosti, velikost a rychlost biodegradace. Doba degradace se může lišit v řádech dnů, měsíců až let. PGA je krystalický hydrofilní polymer, zatímco PLA je tuhý a hydrofobnější polymer; proto jsou PLGA kopolymery s vyšším obsahem PLA méně hydrofilní, mají tendenci absorbovat méně vody a následně vykazují delší dobu degradace. (18)

5.3 Úprava povrchu nanočástic

PLGA nanočástice pronikají do buněk cílové struktury pinocytózou, fagocytózou či endocytózou. Během 10 minut se dostávají do cytoplazmy. Tělo rozezná cizí hydrofobní částice a pomocí retikuloendoteliárního systému (RES) je odstraňuje z krevního oběhu a odvádí do jater nebo sleziny. Tento proces je největší překážkou cíleného dodávání léčiv. (15)

Vzhledem k tomu vzniklo několik metod úpravy povrchu nanočástic tak, aby RES nanočástici nerozpoznal. Provádí se pokrytím nanočástice molekulami tvořícími na jejím povrchu hydrofilní vrstvu. (15) Nejčastěji je využíván neionický a hydrofilní polymer polyethylenglykol (PEG) a proces PEGylace. Byla u něj prokázána vynikající biokompatibilita. Povrch modifikovaný polyethylenglykolem snižuje interakce nanočástic s trávicími enzymy. (4, 15) Časté je také využití poloxameru. Jedná se neionický, tříslučkový, blokový kopolymer s následující strukturou: polypropylenglykol-polyethylenglykol-polyethylenglykol. (4) Dalšími možnostmi je použití poloxaminu či chitosanu, které mění povrchové vlastnosti nanočástic a mohou tak ovlivnit jejich elektrostatické a hydrofobní interakce. (15)

Důležitou roli má povrchový náboj částice. Kladně nabitě nanočástice mají vyšší schopnost internalizace z důvodu iontové interakce mezi jejich kladným nábojem a záporně nabitými membránami. Negativně a neutrálně nabitě částice upřednostňují umístění v lysosomech. PLGA nanočástice jsou záporně nabitě, proto je jejich povrch upravován PEGylací nebo navázáním chitosanu. (15)

5.4 Metody přípravy polymerních nanočástic

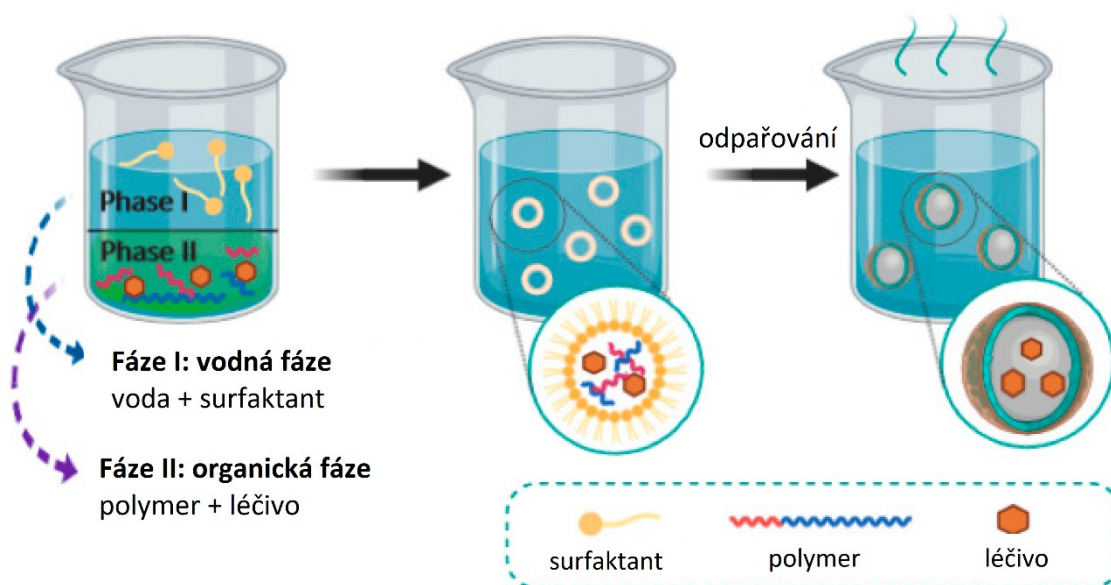
Polymerní nanočástice lze připravit z již předem připravených polymerů, nebo polymerací či polyreakcí monomerů. Pro přípravu nanočástic z předem připravených polymerů se používají metody odpaření rozpouštědla, emulzně difuzní vypařovací metoda, vysolování a nanoprecipitace. (2, 16)

Volba způsobu přípravy se provádí na základě druhu polymerního systému a požadavků na velikost nanočástic. (2) Výběr závisí také na typu ukládaného léčiva a na způsobu podání. (16)

5.4.1 Odpaření rozpouštědla

Nejběžnější metodou přípravy nanočástic je metoda odpaření rozpouštědla. Spočívá v rozpuštění polymeru v organickém rozpouštědle nemísitelném s vodou. V minulosti byl hojně využíván dichlormethan nebo chloroform, ale byly nahrazeny ethylacetátem, a to především s ohledem na jeho nízkou toxicitu. Vodnou fází tvoří voda a povrchově aktivní látka (polysorbát, poloxamer). Následuje přenesení vodné fáze do organické za vzniku emulze o/v, odpaření rozpouštědla a centrifugace (obrázek 5). Odpaření probíhá mícháním na magnetické míchačce při pokojové teplotě, pokud byl použit ethylacetát. V případě použití chlorovaných rozpouštědel je rozpouštědlo odpařováno za sníženého tlaku. Metoda odpaření rozpouštědla je vhodná pro enkapsulaci hydrofobních léčiv. (2, 4, 15, 16)

Modifikovanou verzi této metody, při které se využívá tvorba emulze v/o/v, lze použít pro enkapsulaci hydrofilních léčiv, jako jsou peptidy, proteiny a nukleové kyseliny. (4, 15)

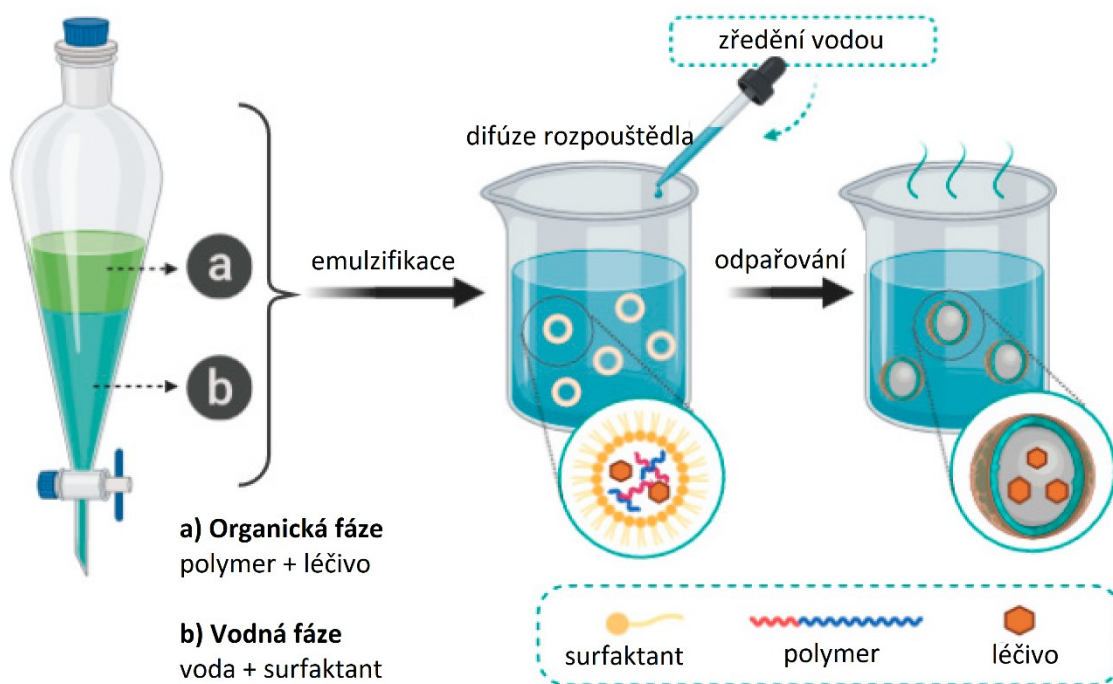


Obrázek 5: Odpaření rozpouštědla, převzato a upraveno (16)

5.4.2 Emulzně difuzní odpařovací metoda

Metoda spočívá v tvorbě emulze v/o. Její fáze tvoří organické rozpouštědlo a v něm rozpuštěný polymer a voda s povrchově aktivní látkou. Používá se organické rozpouštědlo částečně mísitelné s vodou a může se jednat o benzylalkohol či ethylacetát. Rozpouštědlo je předem nasyceno vodou, aby byla na počátku zajištěna termodynamická rovnováha obou fází. Po tvorbě emulze následuje její zředění vodou, které vede k difúzi rozpouštědla z kapiček vnitřní fáze do fáze vnější a k tvorbě koloidních nanočástic (obrázek 6). (16)

Tímto způsobem se často připravují polymerní nanočástice, i přes možné riziko difúze hydrofilního léčiva do vodné fáze. (16)



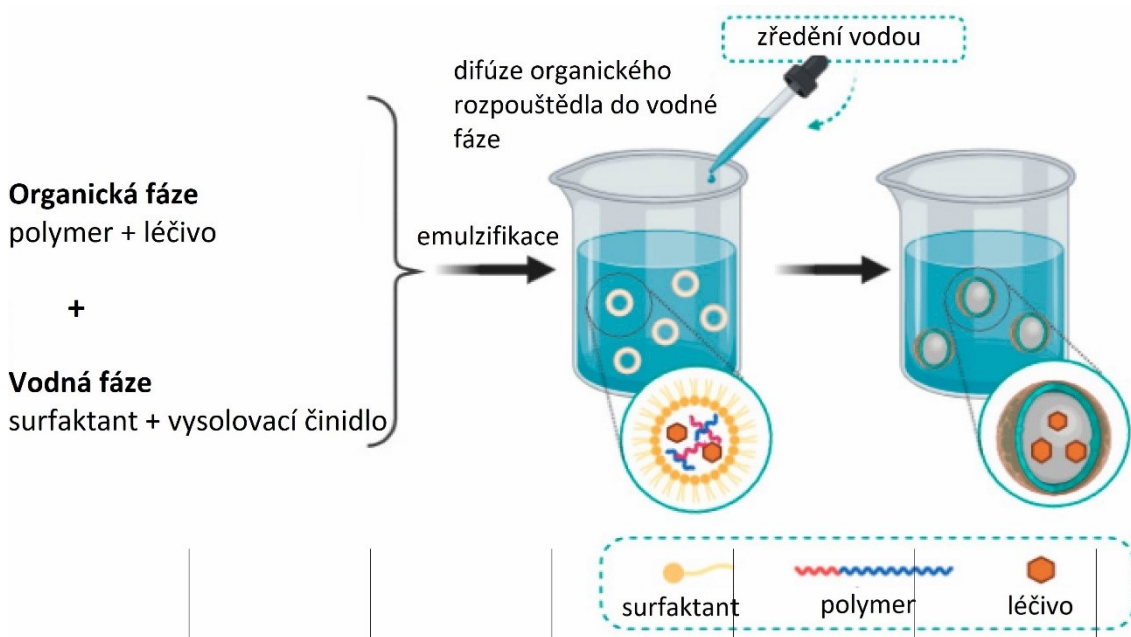
Obrázek 6: Emulzně difuzní odpařovací metoda, převzato a upraveno (16)

5.4.3 Vysolování

Vysolování je založeno na oddělení organického rozpouštědla mísitelného s vodou od vodné fáze díky vysolovacímu efektu, který může vést k tvorbě nanočástic. (16)

Prvním krokem je smísení polymeru s organickým rozpouštědlem, které je mísitelné s vodou. Nejčastější volbou je aceton. Následuje tvorba emulze přidáním vodné fáze, tvořené roztokem vysolovacího činidla, k organické fázi. Vhodným vysolovacím činidlem jsou například elektrolyty, jako chlorid hořečnatý, chlorid vápenatý nebo octan hořečnatý, nebo neelektrolyty, například sacharóza. Emulze se připravuje za intenzivního míchání za pokojové teploty. Poté se emulze zředí přidáním vody a rozpouštědlo difunduje z kapiček vnitřní fáze do vnější vodné fáze. Polymer se vysráží za vzniku nanočástic. Zbytky rozpouštědla se odstraní filtrací s příčným tokem (obrázek 7). (2, 16)

Proces vysolování nezahrnuje použití povrchově aktivních látek a chlorovaných rozpouštědel, která mohou být toxická pro životní prostředí i živé organismy. (2)

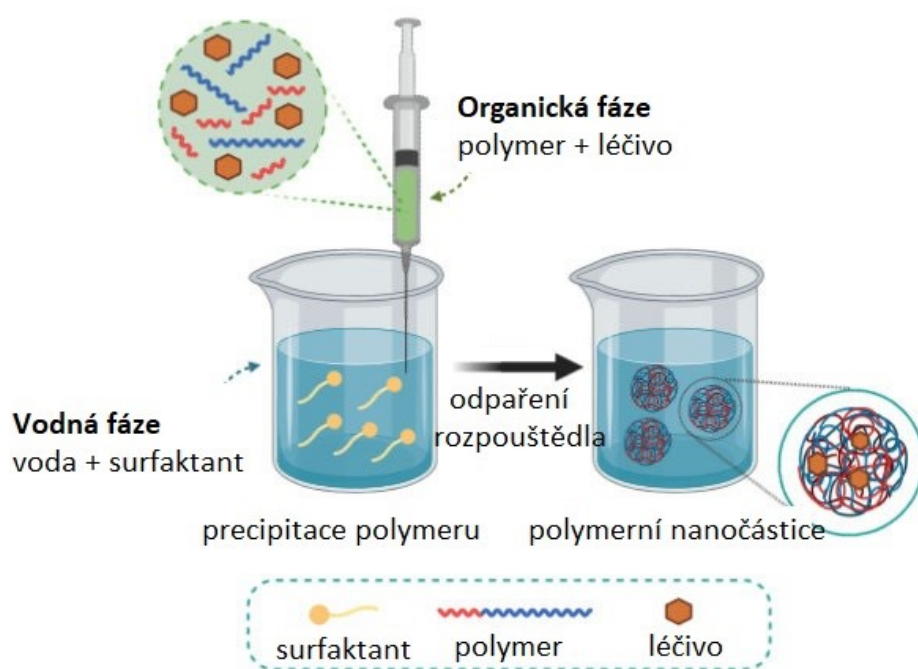


Obrázek 7: Vysolování, převzato a upraveno (16)

5.4.4 Nanoprecipitace

Princip této techniky spočívá v ukládání polymeru na fázovém rozhraní po vytěsnění organického rozpouštědla z organické do vodné fáze. (16)

Polymer se rozpustí v organickém rozpouštědle mísitelném s vodou, například v acetonu, a vstříkne se do vodné fáze za stálého míchání na magnetické míchačce. Součástí vodné fáze bývají povrchově aktivní látky k zaručení stability koloidní suspenze. Díky rychlé difúzi roztoku polymeru do vodné fáze se nanočástice tvoří okamžitě. Organické rozpouštědlo se odpaří a následuje centrifugace (obrázek 8). (4, 15, 16)

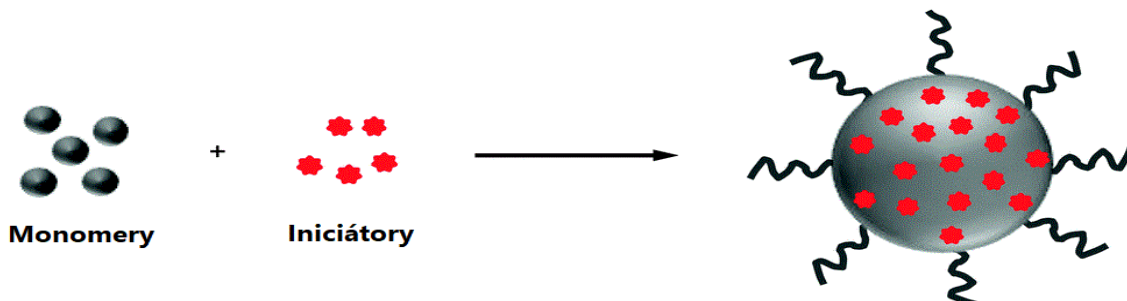


Obrázek 8: Nanoprecipitace, převzato a upraveno (16)

5.4.5 Polymerizace

Všechny již zmíněné metody využívají k přípravě polymerních nanočástic již připravené polymery a nezahrnují polymerační procesy. Pro dosažení požadovaných vlastností pro konkrétní aplikaci je možné připravit polymerní nanočástice výběrem vhodných monomerů. (2)

Organické rozpouštědlo obsahující monomery a organické zářiče je dispergováno do stabilních kapiček oleje za použití ultrazvuku ve vodné fázi s emulgátorem. Přidání iniciátorů do emulze způsobí polymeraci monomerů v olejových kapkách. Odpařením rozpouštědla vznikají dobře dispergované polymerní nanočástice (obrázek 9). (19)



Obrázek 9: Polymerizace, převzato a upraveno (19)

5.5 Vlastnosti nanočástic

Nanočástice se liší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, stavbou, velikostí, tvarem, povrchovými vlastnostmi a krystalinitou. Jejich charakterizace je důležitá pro kontrolu jejich bezpečnosti a jejich přípravy. Iontová síla disperzního média a pH ovlivňují biodistribuci, účinnost a bezpečnost enkapsulovaného léčiva. (16, 20)

5.5.1 Velikost a tvar

Informace o stavbě, velikosti a tvaru nanočástic získáváme díky zobrazovacím technikám skenovací a transmisní elektronové mikroskopie (SEM a TEM). (15) Transmisní elektronová mikroskopie je schopna rozlišit nanotobolky a nanosféry.

Další metodou měření velikosti nanočástic je dynamický (DLS) a statický (SLS) rozptyl světla. (16) Dynamický rozptyl světla neboli fotonová korelační spektroskopie se využívá také při určení indexu polydisperzity. Technika je založena na rozptylu světla částicemi pohybujícími se Brownovým pohybem. (15)

5.5.2 Zeta potenciál

Zeta potenciál (ζ) je elektrický potenciál částice na rovině skluzu (nebo smyku), tj. rozdíl potenciálu mezi stacionární dvojvrstvou tekutiny, která obklopuje koloidní částici v suspenzi, a jakýmkoli bodem v okolním kapalném médiu. Je to míra povrchového náboje částice. (8)

Měření zeta potenciálu poskytuje informace o povrchovém náboji částic a je důležité pro objasnění mechanismu asociace léčiv s nanočásticemi. (16) Měření zeta potenciálu pomocí DLS je založeno na měření elektroforetické pohyblivosti částice pohybující se k opačně nabitě elektrodě způsobující fázový posun dopadajícího laserového záření. V závislosti na typu polymeru a na druhu úpravy povrchu nanočástic mohou být hodnoty zeta potenciálu kladné i záporné. (15) Částice považujeme za stabilní, pokud je jeho hodnota vyšší než +30 mV nebo nižší než -30 mV. Odpuzivé síly mezi sousedními částicemi brání jejich agregaci. (16)

Účinnost povrchové modifikace lze určit měřením povrchového náboje. (15)

5.5.3 Polydisperzita

Polydisperzita popisuje stupeň nestejnomyšnosti distribuce velikosti částic. Vyjadřuje ji index polydisperzity PDI. Tento index je bezrozměrný a jeho hodnota nižší než 0,05 ukazuje na vysoce monodisperzní polymer, ale obecně se považují částice s PDI do 0,2 za monodisperzní systém. Naopak hodnota vyšší než 0,7 znamená, že vzorek je vysoce polydisperzní a nevhodný k měření metodou DLS. (16, 21)

5.5.4 Enkapsulační efektivita

Rozlišujeme dva způsoby, kterými lze inkorporovat léčivo do nanočástice. Jedná se o začlenění léčiva do nanočástice během přípravy, kdy je léčivo přidáno do reakční směsi v průběhu polymerace a adsorpce léčiva na již vyrobené nanočástice. (5, 15)

Enkapsulační efektivita lze určit jako poměr množství inkorporovaného léčiva vzhledem k celkovému použitému množství léčiva. Vyjadřuje se v %. Závisí na typu nanočástice, způsobu jeho přípravy a vlastnostech léčiva i polymeru. Je výhodné, aby nanočástice měly vysokou schopnost enkapsulace. (15, 22)

Přesné stanovení obsahu léčiva uvnitř nanočástic není, vzhledem k tomu, že se jedná o koloidní systémy, snadné. Nejvhodnější metodou separace nanočástic od neenkapsulovaného léčiva je ultracentrifugace. (15) Dále lze využít ultrafiltraci či dialýzu. Množství volného léčiva se pak určí analytickými metodami, například UV spektroskopii nebo HPLC (vysokoučinná kapalinová chromatografie). (22)

5.6 Disoluční testy *in vitro*

Nanočásticové nosičové systémy se úspěšně rozvíjejí v terapii různých onemocnění. Jejich použití s sebou nese i nutnost kontroly účinnosti a bezpečnosti, aby nedocházelo ke vzniku toxicity, ztrátě či změně účinnosti. Disoluční testování *in vitro* je důležitým nástrojem pro kontrolu kvality a předpovídá účinnost nanočásticových systémů. (23)

Rozlišujeme pět druhů metod disolučních testů *in vitro*: metody membránové difuze, metody separace, metodu kontinuálního toku, metodu dynamického rozpouštění a mikrodialýzu. (23)

5.6.1 Metody membránové difuze

Jedná se o nejrozšířenější metody a lze je využít při zkoumání lipozomů, emulzí, polymerních i lipidových nanočástic. Základem je použití dialyzační membrány, která je propustná pro léčivo a nepropustná pro nanočástice. (23)

Metoda dialyzačního vaku zahrnuje umístění nanočástic s enkapsulovaným léčivem do dialyzačních vaků, které se vloží do nádob s disolučním médiem na třepací vodní lázni nebo magnetické míchačce. Léčivo uvolněné z nanočástic prochází přes dialyzační membránu do vnějšího kompartmentu. Z něj jsou v daných intervalech odebírány vzorky. (23, 24)

Při metodě reverzního dialyzačního vaku jsou nanočástice přidávány přímo do disolučního média mimo dialyzační vak. Vzorky se odebírají v časových intervalech z disolučního média uvnitř dialyzačního vaku. Ten typ membránové difuze se používá se k charakterizaci emulzí a koloidních systémů. (23)

Parametry ovlivňující metody membránové difuze jsou podmínky míchání, objem disolučního média a vlastnosti dialyzační membrány. Dialyzační membrána musí mít takovou velikost pórů, aby byla umožněna difúze léčiva, ale aby nedocházelo k průchodu nanočástic. (23)

5.6.2 Metody separace

Nanočástice jsou přidány přímo do disolučního média a pomocí separačních metod, jako je ultrafiltrace a ultracentrifugace, jsou od něj odděleny v daných časových intervalech. Analyzuje se obsah léčiva v supernatantu nebo filtrátu. (23)

Uvolňování léčiva pokračuje i během procesu separace, což může způsobit chybné výsledky. Zároveň separační metody mohou destabilizovat nanočástice. (24)

Parametry ovlivňující uvolňování léčiva do disolučního média jsou podmínky míchání a hlavně technika separace. (23)

5.6.3 Metoda kontinuálního toku

Disoluce se provádí pomocí zařízení USP 4, které je propojeno s dialyzačními celami. Do nich se umístí vzorek. Disoluční médium má danou teplotu, objem a rychlost průtoku. (24) Metoda kontinuálního toku byla původně vyvinuta pro disoluce perorálních lékových forem s řízeným uvolňováním. (23) Nyní má široké využití jak pro konvenční lékové formy, tak i pro nové systémy cíleného dodávání léčiv. Výhodou je, že parametry disolučního média lze v průběhu disoluce měnit. (24)

5.6.4 Další metody

Metoda dynamického rozpouštění využívá ke sledování profilu uvolňování léčiva při disolucích iontově selektivní elektrody a je tedy vhodná pro elektroaktivní léčiva. (23)

Při mikrodialyzační metodě se mikrodialyzační sondy umístí do disolučních nádob a jsou kontinuálně promývány médiem. Množství uvolněného léčiva je určeno běžnými analytickými metodami, například HPLC. (23)

5.7 Cílená distribuce léčiv

Většina současně používaných léčiv nemá schopnost selektivně se akumulovat v patologickém orgánu, tkáni či buňce. Obvykle je rovnoměrně distribuováno do celého těla a může tedy způsobovat na necílových strukturách nežádoucí reakce. Cílenou distribuci léčiv lze chápat jako schopnost léčiva hromadit se v cílovém orgánu nebo tkáni, tak aby jeho koncentrace v ostatních strukturách nezpůsobovala negativní reakce. (25)

Většina nanočástic nedosáhne zamýšleného cíle. Po podání dochází k jejich odbourávání játry, slezinou a ledvinami. Do cílové tkáně se dostává méně než 5 % nanočástic. Játra fungují jako biologický filtrační systém, který izoluje 30–99 % podaných nanočástic z krevního řečiště. (26)

5.7.1 Cílená distribuce léčiv v terapii nádorových onemocnění

Cílené distribuce léčiv neboli targetingu lze dosáhnout využitím patofyziologických rozdílů nádorové a zdravé tkáně v případě pasivního transportu. Důležitou roli zde mají i fyzikálně-chemické vlastnosti nosiče léčiva. Při aktivním transportu dochází k zacílení nosiče léčiva pomocí cílově specifických ligandů na jeho povrchu. (17)

Targeting v terapii nádorových onemocnění je způsobem, jak se vyvarovat poškození zdravé tkáně. Cílení na rakovinné buňky pomocí nanočástic s enkapsulovaným léčivem vede k snížení systémové toxicity a ke snížení nežádoucích účinků. (4)

5.7.1.1 Pasivní transport

Pasivní transport je ovlivňován fyzikálně-chemickými vlastnostmi nosiče, a to jeho velikostí, povrchovým nábojem, a hydrofobními vlastnostmi. (17) Zároveň je založen na anatomických rozdílech mezi nádorovou a zdravou tkání. Množství cév a jejich uspořádání je v obou typech tkání rozdílné. V nádorové tkáni je vyšší cévní hustota i cévní permeabilita. To v kombinaci s chybějícím lymfatickým systémem umožňuje akumulaci vysokomolekulárních léčiv v nádorech. Označujeme to jako efekt zvýšené permeability a retence. (4)

5.7.1.2 Aktivní transport

Aktivního transportu je dosahováno úpravou povrchu nosiče o cílově specifický ligand. Ligandem mohou být proteiny (protilátky a jejich fragmenty), peptidy nebo nukleové kyseliny (aptamery). Cílená distribuce léčiv aktivním transportem probíhá rozpoznáním rakovinných buněk prostřednictvím interakcí ligand-receptor, nebo antigen-protilátka, případně cílením aptamerů. Tento způsob cílené distribuce léčiv našel využití v terapii rakoviny, revmatoidní artritidy, při onemocněních centrálního nervového systému a jater. (4, 17)

5.7.2 Cílená distribuce léčiv do buněk imunitního systému

Buňky imunitního systému hrají roli u autoimunitních a zánětlivých onemocnění, ale také při rakovině, kardiovaskulárních onemocněních a diabetu. Jedná se o makrofágy, monocyty a dendritické buňky tvořící mononukleární fagocytární systém (MPS). Zvláště důležité jsou makrofágy. (27, 28)

Makrofágy při akutní infekci produkují zánětlivé cytokiny a tím regulují zánětlivé onemocnění. Také jsou schopné fagocytózy, tedy mohou endocytovat částice o velikosti nanometrů až mikrometrů a vychytávat je ze systémové cirkulace. Jsou přítomny v každé tkáni a podílejí se na jejím vývoji i na udržování tkáňové homeostázy. Zejména jejich fagocytární vlastnosti z nich činí ideální terapeutické cíle. (27, 28)

Na základně podnětů a signálů (kortikosteroidy, lipopolysacharidy a interleukiny) procházejí makrofágy polarizací na podtypy s rozdílným fenotypem a biologickými funkcemi. Rozlišujeme dva podtypy makrofágů: M1 s prozánětlivou a M2 s protizánětlivou aktivitou. Při akutní infekci makrofágy zpočátku bojují s patogeny a fagocytují mrtvé buňky, ale poté přeměňují svůj fenotyp a následně pomáhají při procesu hojení ran a remodelace tkáně. (27, 28)

Regulace polarizace makrofágů prostřednictvím aktivní látky ve vhodném nanonosiči může být terapeuticky využita při léčbě široké škály onemocnění, včetně chronického zánětu, nádorového bujení nebo poruch imunitního systému. (28)

Pevné polymerní nanočástice (nanosféry) představují slibný způsob dodávání aktivního léčiva do makrofágů, protože hydrofobní částice o velikosti 100–300 nm jsou velmi účinně vychytávány makrofágy ze systémové cirkulace během několika minut po intravenózním podání. Pro dodávání léčiv do makrofágů jsou v současnosti také využívány lipozomy a lipidické částice. (28)

5.7.2.1 Aktivace imunitního systému

Makrofágy, B-lymfocyty a dendrimery jsou antigen prezentující buňky a slouží jako cíle nanočástic ke zlepšení specifity imunitní aktivity. Při pasivním cílení dochází k použití nanočástic vhodné velikosti, tvaru a s kladným nábojem. Kladný náboj je výhodný při interakci se záporně nabitými buněčnými membránami. Jiné imunoterapeutické přístupy cílí přímo na T-lymfocyty. (29)

5.7.2.2 Potlačení imunitního systému

Potlačení imunitního systému je využíváno mimo jiné při terapii autoimunitních onemocnění například při revmatoidní artritidě či systémovém lupusu erythematodes. Obvykle se léčí imunosupresivy se závažnými vedlejšími účinky. U těchto autoimunitních onemocnění jsou T-lymfocyty a B-lymfocyty citlivé na vlastní antigeny. Specifická imunoterapie cílí na antigen prezentující buňky, T-lymfocyty a B-lymfocyty a má za cíl snížit reaktivitu a zvýšit jejich toleranci k určitým antigenům. (29)

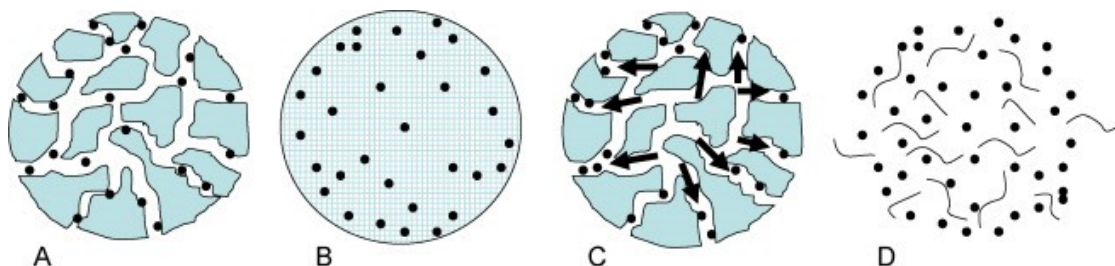
5.8 Uvolnění léčiva

Uvolňování léčiva je děj, při kterém dochází k přechodu molekul léčiva z polymerního nosiče na jeho povrch a následně do okolního prostředí. Doba, po kterou se léčivo uvolňuje z nanočástice je různá a pohybuje se v řádu hodin až měsíců. (30)

Tento proces je ovlivněn fyzikálně-chemickými vlastnostmi rozpuštěného léčiva (rozpuštnost, stabilita, náboj), strukturními vlastnostmi nosiče (složení, struktura, degradace) a prostředím, ve kterém k uvolňování dochází (pH, teplota, iontová síla, přítomnost enzymů). (31) Uvolňování léčiva závisí také na velikosti nanočástic. V případě nanočástic větších rozměrů dochází k nižšímu počátečnímu uvolnění léčiva než u menších nanočástic. (5)

Rozlišujeme čtyři mechanismy uvolňování léčiva (obrázek 10):

- difuze přes vodní póry
- difuze z polymerní matrice
- osmotická pumpa
- eroze (30)



Obrázek 10: Mechanismy uvolnění léčiva, A-difuze přes vodní póry, B-difuze z polymerní matrice, C-osmotické pumpa, D-eroze (32)

Mechanismus uvolňování léčiv závisí na použitém polymeru. (15) Uvolňování léčiva z PLGA nanočástic je komplexní proces, ve kterém převládá difuze a eroze. (30)

5.8.1 Difuze přes vodní póry

Jedná se o náhodný pohyb molekul léčiva řízený koncentračním gradientem. Rychlost uvolňování léčiva difuzí je ovlivněna sítí pórů degradovatelného polymeru. Do nanočástice je absorbována voda, póry se zvětšují, což vede k uvolnění léčiva. (30)

5.8.2 Difuze z polymerní matrice

Molekuly difundují z polymerní matrice bez tvorby pórů. Rychlost uvolňování je konstantní. Není ovlivněna koncentračním gradientem, ale pouze permeabilitou a tloušťkou polymerní membrány. (30)

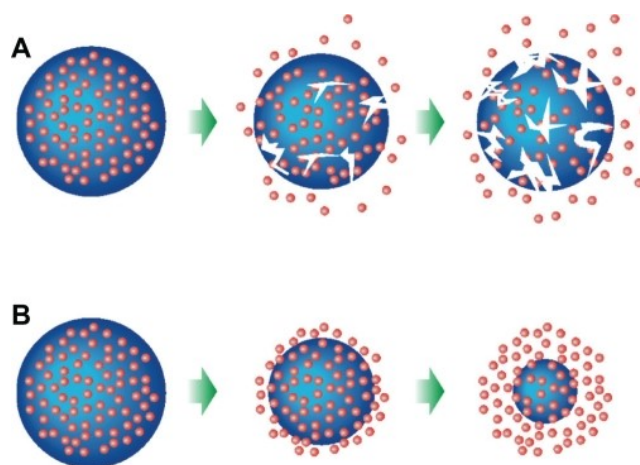
5.8.3 Osmotická pumpa

Osmotická pumpa je založena na principu osmózy, ke které dochází, když membrána propustná pro vodu, ale nikoli pro konkrétní rozpuštěné látky, odděluje dva roztoky s různými koncentracemi rozpuštěné látky. Uvolnění léčiva je způsobeno osmotickým tlakem přitékající vody do neobobtnajícího systému. (30, 33)

5.8.4 Eroze

Hromadná eroze: Voda pronikne do polymeru a způsobí homogenní degradaci celé matrice (obrázek 11). Rychlost, kterou voda proniká do hmoty, je větší než rychlost eroze. Je to méně předvídatelný proces než eroze povrchová, proto je také k uvolňování léčiv méně vhodný. (30)

Povrchová eroze: K povrchové erozi dochází, pokud degradace polymeru začíná od jeho povrchu. Částice se zmenšují z vnějšku směrem dovnitř (obrázek 11). Rychlost pronikání vody je pomalá. Jedná se o vhodný způsob uvolňování léčiva, neboť je kontrolované a předvídatelné. (30)



Obrázek 11: Uvolňování léčiva erozí, A-hromadná, B-povrchová (4)

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 Použité suroviny

Aceton (Lach-Ner s.r.o., Česká republika)

Acetonitril pro HPLC (Honeywell, Riedel-de Haën, USA)

Čištěná voda (Farmaceutická fakulta UK, Česká republika)

Dexamethason-acetát (Sigma – Aldrich s.r.o., USA)

Dihydrát citronanu sodného (Lachema a.s., Česká republika)

Dihydrát vlnanu sodného (Penta s.r.o., Česká republika)

Fluorescein (Sigma – Aldrich s.r.o., USA)

Glycin (Sigma – Aldrich s.r.o., USA)

Heptahydrátfosforečnanu sodného (Lachema a.s., Česká republika)

Hexahydrát chloridu hořečnatého (Lachema a.s., Česká republika)

Hydroxid sodný (Penta s.r.o., Česká republika)

Chlorid sodný (Lachema a.s., Česká republika)

Chlorid vápenatý (Lachema a.s., Česká republika)

Kyselina citronová (Penta s.r.o., Česká republika)

Kyselina octová (Penta s.r.o., Česká republika)

Octan sodný (Lachema a.s., Česká republika)

PBS tablety (Sigma – Aldrich s.r.o., USA)

PLGA 75:25 - Purasorb[®] PDLG 7502A (LA/GA), (Corbion, Nizozemsko)

Poloxamer 407(Pluronic[®] F-127), (Sigma – Aldrich s.r.o., USA)

Polysorbát 20 (Tween[®] 20), (Sigma – Aldrich s.r.o., USA)

Pyruvát sodný (ThermoFisher, Německo)

Síran sodný (Lachema a.s., Česká republika)

6.1.1 Fluorescein

Fluorescein byl využit jako modelové léčivo pro enkapsulaci do nanočástic. Jedná se o žlutou amorfni pevnou látku nebo o oranžovo-červené krystaly. Není rozpustný ve vodě, etheru, benzenu a chloroformu. Je rozpustný v metanolu, etanolu, acetonu, ethylacetátu, N,N' dimethylformamidu a ve zředěných roztocích zásad. Velmi zředěné alkalické roztoky vykazují intenzivní zelenožlutou fluorescenci. (34, 35)

Mr (relativní molekulová hmotnost) = 332,3

log P (rozdělovací koeficient) = 3,4

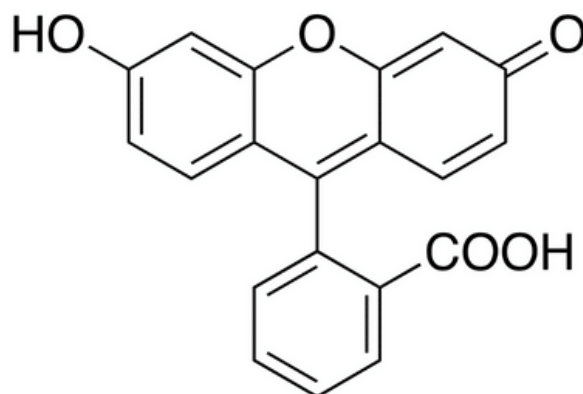
Teplota tání t_f = 315 °C

excitace = 494 nm

emise = 524 nm

pKa (disociační konstanta) = 6,4

Rozpustnost ve vodě = 50 mg/l při 20 °C



Obrázek 12: Struktura fluoresceinu (36)

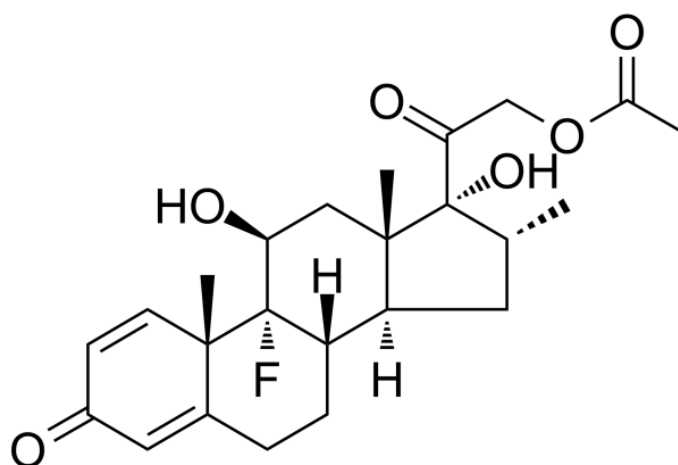
6.1.2 Dexamethason-acetát

Jedná se o sůl dexamethasonu a kyseliny octové. Dexamethason je kortikosteroid využívající se v terapii zánětlivých respiračních, alergických, autoimunitních a jiných onemocnění. (37, 38)

Mr = 434,5

log P = 2,8

Teplota tání t_f = 263 °C



Obrázek 13: Struktura dexamethason-acetátu (39)

6.1.3 Stabilizátor (poloxamer 407)

Poloxamer 407, dostupný pod registrovanou ochrannou známkou jako Pluronic® F-127, byl při přípravě nanočástic metodou nanoprecipitace použit jako stabilizátor ve formě vodného roztoku o koncentraci 0,1 %. Jedná se o kopolymer tvořený z monomerů ethyloxydů a propylenoxydů uspořádaných do trojblokové struktury PEO-PPO-PEO. Jeho syntéza probíhá polymerizací ethyloxydů a propylenoxydů za přítomnosti hydroxidu sodného nebo draselného. (40)

Mr = 12 600

HLB (hydrofilně-lipofilní rovnováha) = 22 (při 22 °C)

6.1.4 Rozpouštědla

Aceton byl použit jako rozpouštědlo fluoresceinu při přípravě organické fáze.

Čištěná voda byla použita při přípravě vodné fáze jako rozpouštědlo pro stabilizátor poloxamer 407. Dále byla také použita jako náhrada supernatantu po centrifugaci nanosuspenze.

6.1.5 Povrchově aktivní látka (polysorbát 20)

Polysorbáty jsou amfifilní neiontové povrchově aktivní látky složené z esterů mastných kyselin a polyoxyethylensorbitanu. V případě polysorbátu 20 se jedná o polyoxyethylensorbitan laurát. (41, 42) Polysorbát 20 byl použit při přípravě disolučních médií v koncentraci 0,2 % (w/v).

6.2 Použité přístroje

Analytické váhy Ohaus Discovery (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko)

Váhy Kern 440-53N (Kern, Balingen, Německo)

Magnetická míchačka IKA-WERKE RT 5 power (IKA, Staufen, Německo)

Centrifuga MPW 260R (MPW MED.Instruments, Varšava, Polsko)

Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlín, Německo)

Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Malvern, UK)

Plate reader Synergy 2 (BioTek Instruments, USA)

Vodní lázeň Julabo SW22 (Seelbach, Německo)

HPLC 1200 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) se softwarem Agilent ChemStation for LC&LC/MS Systems

6.3 Použité metody

6.3.1 Difuze volného fluoresceinu

1. Prvním krokem byla příprava roztoku složeného z 10 ml vody, stabilizátoru Pluronic F-127 o finální koncentraci 0,1 % a 100 µg fluoresceinu.
2. Roztok byl přenesen po 2 ml do tří dialyzačních membrán (MC18 x 100 CLR, šířka 25 mm, tloušťka 27 µm, MWCO 14 kDa). Membrány se pevně zavázaly na obou koncích a po jedné se vložily do tří zatmavených, uzavřených nádob s 20 ml disolučního média. Následně byly umístěny do třepací vodní lázně udržující teplotu na 37 °C. Jako disoluční médium byl použit 0,01M PBS s polysorbátem 20 o koncentraci 0,2 % o pH 7,4.
3. Odběr vzorků disolučního média z každé disoluční nádoby probíhal v průběhu disoluce od 15 minut do 48 hodin od jejího začátku. Odebrané vzorky o objemu 500 µl byly přeneseny do mikrozkušavek typu eppendorf, dále byly obaleny do alobalu a uloženy do lednice. Odebrané disoluční médium bylo nahrazeno médiem čistým.
4. Z odebraného vzorku se 150 µl přeneslo v triplicátu na 96 jamkovou mikrotitrační destičku. Měření bylo provedeno na přístroji Plate reader při těchto podmínkách: excitace 485/20, emise 528/20, Gain 50.

6.3.2 Příprava PLGA nanočástic s fluoresceinem

Nanočástice byly připraveny metodou nanoprecipitace.

1. Příprava vodné fáze

Vodná fáze se skládala z 10 ml vody a stabilizátoru. Použitým stabilizátorem je Pluronic F-127 o finální koncentraci 0,1 %. Vodná fáze byla připravena rozpuštěním poloxameru v čištěné vodě za stálého míchání na magnetické míchače.

2. Příprava organické fáze

Organickou fází tvořil polymer PLGA, fluorescein a aceton. Na analytických vahách bylo naváženo 30 mg polymeru a 100 µg fluoresceinu. Následovalo rozpuštění tohoto množství v 1 ml acetonu za stálého míchání na magnetické míchače.

3. Příprava nanosuspenze

Organická část se pomocí mikropipety převedla za stálého míchání na magnetické míchače do fáze vodné. Došlo k vytvoření nanosuspenze.

6.3.3 Disoluce fluoresceinu z PLGA nanočástic

1. Prvním krokem byla příprava nanočástic podle postupu v kapitole 6.3.2.
2. Nanosuspenze byla přefiltrována přes filtr s velikostí pórů 1,2 μm .
3. Připravená nanosuspenze byla přenesena do pěti mikrozkušavek typu eppendorf po 2 ml. Následně tři z nich byly centrifugovány za těchto podmínek: RCF (relativní centrifugační síla) 10 000, teplota 18 °C, čas 15 minut. Vzorek ve čtvrté mikrozkušavce se využil k měření indexu polydisperzity, velikosti částic a zeta potenciálu na přístroji Zetasizer. Pátý vzorek se použil ke stanovení enkapsulační efektivity. Po skončení centrifugace byly vzorky promyty, ze tří mikrozkušavek byl odebrán supernatant a došlo k jeho náhradě čistou vodou. Sediment byl roztřepán v ultrazvukové lázni. Krok promytí byl ještě jednou opakován.
4. Obsah tří mikrozkušavek byl přenesen do tří dialyzačních membrán (MC18 x 100 CLR, šířka 25 mm, tloušťka 27 μm , MWCO 14 kDa), které se pevně zavázaly na obou koncích.
5. Každá membrána obsahující nanosuspenzi byla umístěna do zatmavené, uzavřené nádoby s 20 ml disolučního média. Nádoby byly vloženy do třepací vodní lázně nastavené na teplotu 37 °C.
6. Vzorky disolučního média o objemu 500 μl byly odebírány průběžně od 15 minut do 48 hodin ze všech tří nádob a byly přeneseny do mikrozkušavek typu eppendorf. Ty se obalily do alobalu, kvůli citlivosti fluoresceinu na světlo, a uložily do lednice. Objem odebraného disolučního média byl nahrazen čistým médiem. V průběhu 48 hodin bylo odebráno 12 vzorků.
7. Z každého vzorku bylo odebráno 150 μl , které se přenesly rovnou na 96 jamkovou mikrotitrační destičku v triplikátu. Bylo provedeno měření na přístroji Plate reader při těchto podmínkách: excitace 485/20, emise 528/20, Gain 50.

6.3.4 Disoluční média použitá při disoluci fluoresceinu

Disoluce fluoresceinu z PLGA nanočástic byla provedena celkem čtyřikrát. Pokaždé bylo zvoleno jiné disoluční médium:

1. 0,01M PBS s polysorbátem 20 o koncentraci 0,2 % o pH 7,4.
2. Fyziologický roztok s polysorbátem 20 o koncentraci 0,2 % o pH 7,4. Jedná se o 0,9% roztok NaCl v čištěné vodě.
3. Acetátový pufr s polysorbátem 20 o koncentraci 0,2 %. Na přípravu acetátového pufru byla použita kyselina octová, octan sodný a čištěná voda (tabulka 1). Výsledný pufr měl pH 5,5.

Tabulka 1: Příprava acetátového pufru

0,2M kyselina octová	28 ml
0,2M octan sodný	172 ml

4. Simulovaná lysozomální tekutina (ALF) s polysorbátem 20 o koncentraci 0,2 %. 1 l ALF (pH 4,5) byla připravena ze složek rozpuštěných v čištěné vodě podle tabulky 2.

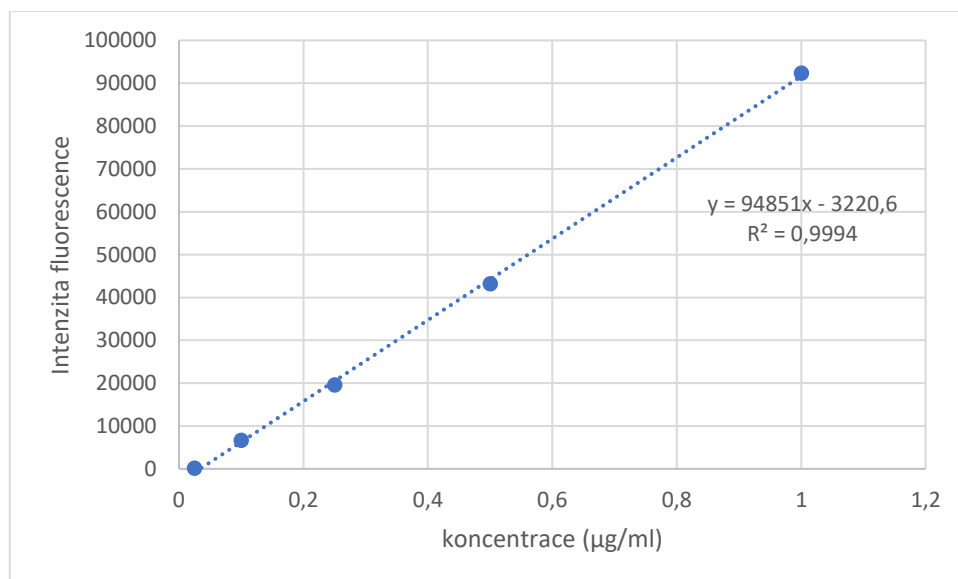
Tabulka 2: Složení ALF

glycin	0,059 g
chlorid sodný	3,210 g
hydroxid sodný	6,000 g
kyselina citronová	20,800 g
chlorid vápenatý	0,097 g
heptahydrát fosforečnanu sodného	0,179 g
síran sodný	0,039 g
hexahydrát chloridu hořečnatého	0,106 g
dihydrát citronanu sodného	0,077 g
dihydrát vínanu sodného	0,090 g
pyruvát sodný	0,086 g

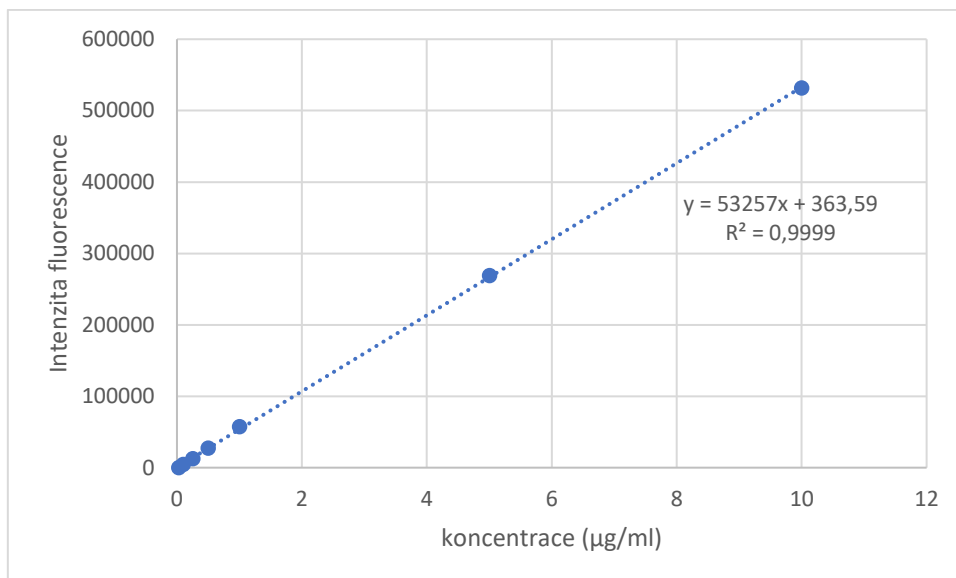
6.3.5 Měření enkapsulace fluoresceinu

Vzorek určený ke stanovení enkapsulace byl v mikrokumavce typu eppendorf centrifugován za následujících podmínek: RCF 21 000, teplota 20 °C, čas 15 minut. Poté byl odebrán supernatant. Následovalo zředění 100 µl odebraného supernatatu 1 900 µl PBS. Poté bylo nanášeno 100 µl v triplikátu na destičku k vyhodnocení na přístroji Plate reader za podmínek: excitace 485/20, emise 528/20, Gain 50.

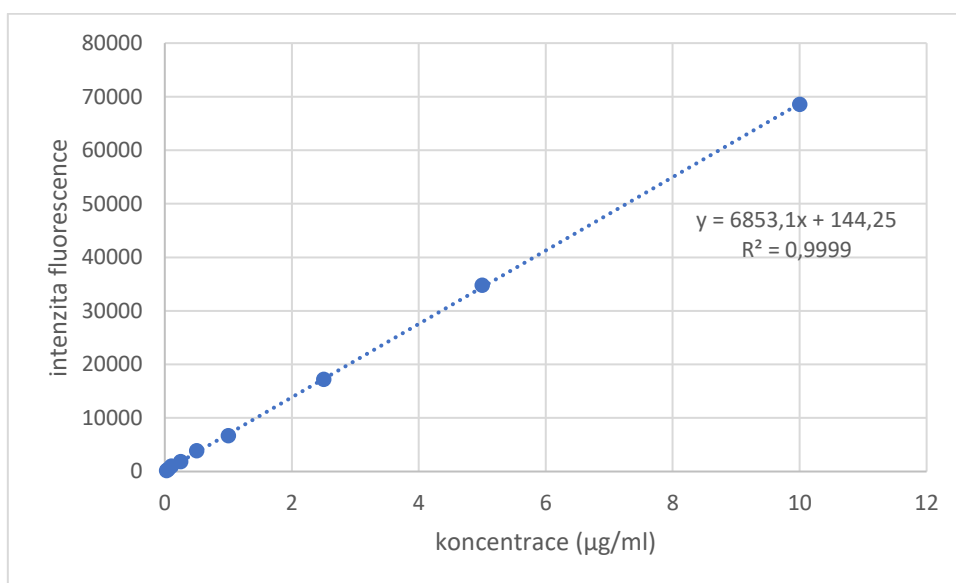
Nejprve byly sestaveny kalibrační křivky fluoresceinu pro všechna disoluční média uvedená v kapitole 6.3.4 (obrázek 14, 15, 16, 17), které byly využity pro stanovení enkapsulační efektivity i množství uvolněného fluoresceinu při disolučních testech.



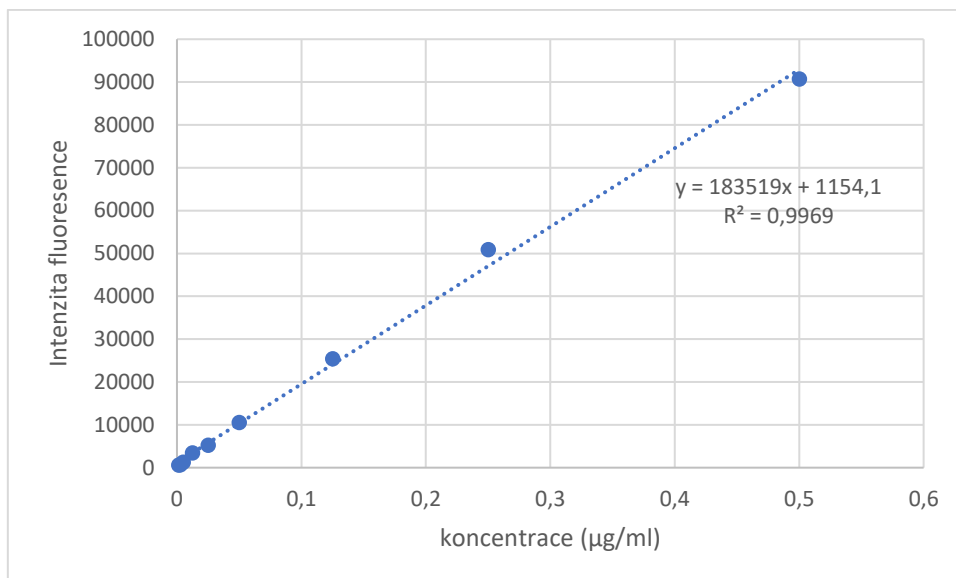
Obrázek 14: Kalibrační křivka fluoresceinu v 0,01M PBS



Obrázek 15: Kalibrační křivka fluoresceinu ve fyziologickém roztoku



Obrázek 16: Kalibrační křivka fluoresceinu v acetátovém pufru



Obrázek 17: Kalibrační křivka fluoresceinu v ALF

Enkapsulační efektivitu lze určit jako poměr množství inkorporovaného léčiva vzhledem k celkovému použitému množství léčiva. Vyjadřuje se v %. Její určení probíhalo nepřímo ze supernatantu.

Výpočet vychází z tohoto vzorce:

$$EE = \frac{\text{navážka fluoresceinu} - \text{volný fluorescein v supernatantu}}{\text{celkové použité množství léčiva}} \cdot 100 \quad [1]$$

6.3.6 Příprava nanočástic s dexamethason-acetátem

Nanočástice byly připraveny metodou nanoprecipitace.

1. Příprava vodné fáze

Na přípravu vodné fáze bylo použito 35 ml vody a stabilizátor Pluronic® F-127, jehož koncentrace v roztoku byla 0,1 %. Příprava proběhla rozpuštěním stabilizátoru v čištěné vodě za stálého míchání na magnetické míchače.

2. Příprava organické fáze

Na přípravu organické fáze byl použit polymer PLGA, dexamethason-acetát a aceton. Na analytických vahách bylo naváženo 105 mg polymeru a 2,1 µg dexamethason-acetátu. Následně se toto množství rozpustilo v 3,5 ml acetonu za stálého míchání na magnetické míchačce.

3. Příprava nanosuspenze

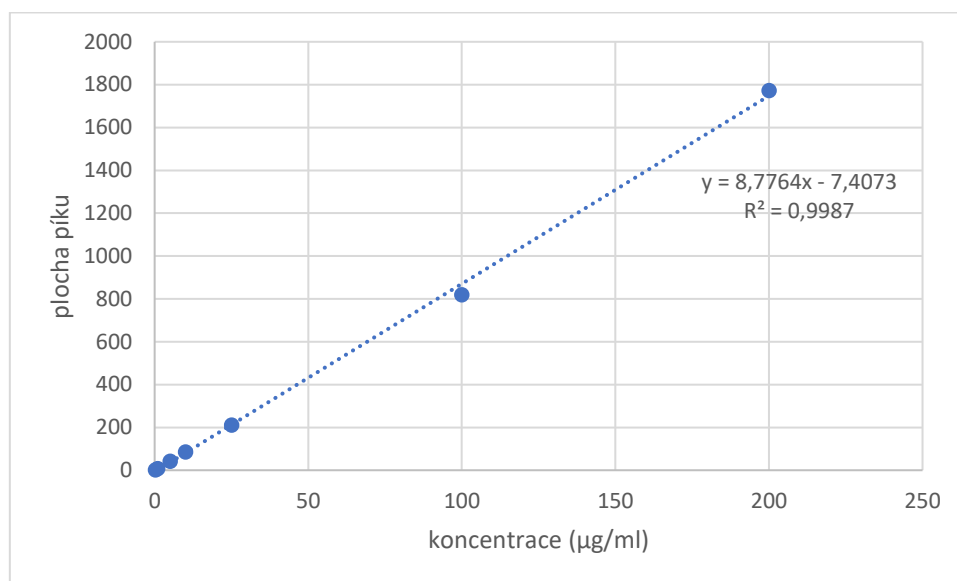
Organická část se pomocí mikropipety převedla za stálého míchání na magnetické míchačce do fáze vodné. Došlo k vytvoření nanosuspenze.

6.3.7 Disoluce dexamethason-acetátu z PLGA nanočástic

1. Prvním krokem byla příprava nanočástic podle postupu v kapitole 6.3.6.
2. Nanosuspenze byla přefiltrována přes filtr s velikostí pórů 1,2 µm.
3. Následně byla nanosuspenze přenesena po 2 ml do 14 mikrozkuvek typu eppendorf, z jejichž víčka byla odstraněna střední část. Před zavřením byla na horní část mikrozkuvky umístěna dialyzační membrána (MC18 x 100 CLR, šířka 25 mm, tloušťka 27 µm, MWCO 14kDa), která uzavřením víčka drží na místě.
4. Všechny mikrozkuvky byly poté vloženy do nádoby s 1 200 ml 0,01M PBS a zatíženy poklopem, aby byly zcela ponořeny pod hladinou. Nádoba byla vložena do třepací vodní lázně nastavené na teplotu 37 °C.
5. Odběr vzorků probíhal v časových intervalech 0, 1, 2, 4, 10, 22, 29, 48, 72,5 a 77 hodin. Byly odebírány dvě mikrozkuvky, které se centrifugovaly za podmínek: RCF 15 000, teplota 14 °C, čas 20 minut. Supernatant byl odebrán a peleta byla redispergována v 1 ml acetonitrilu.
6. Dále proběhla analýza obsahu dexamethason-acetátu v peletě pomocí HPLC za podmínek: mobilní fáze 50% acetonitril, nástřik 10 µl, teplota kolony 25 °C, průtok 1 ml/min, vlnová délka detekce 236 nm, délka jednoho měření 6,5 min. Byla použita kolona Restek Ultra 100Å, typ stacionární fáze C18, velikost částic 5 µm, délka 150 mm, průměr 4,6 mm.

6.3.8 Měření enkapsulace dexamethason-acetátu

Vzorek určený k měření enkapsulační efektivity připravených nanočástic byl upraven a měřen totožně, jako je popsáno v kapitole 6.3.7. Před tímto měřením byla sestavena kalibrační křivka dexamethason-acetátu v 0,01M PBS (obrázek 18), která byla využita také pro stanovení obsahu dexamethason-acetátu ve vzorcích odebraných při disolučních testech (kapitola 6.3.7). Výpočet enkapsulační efektivity vychází ze vztahu [1].



Obrázek 18: Kalibrační křivka dexamethason-acetátu v 0,01M PBS

6.3.9 Určení velikosti a zeta potenciálu nanočástic na přístroji Zetasizer

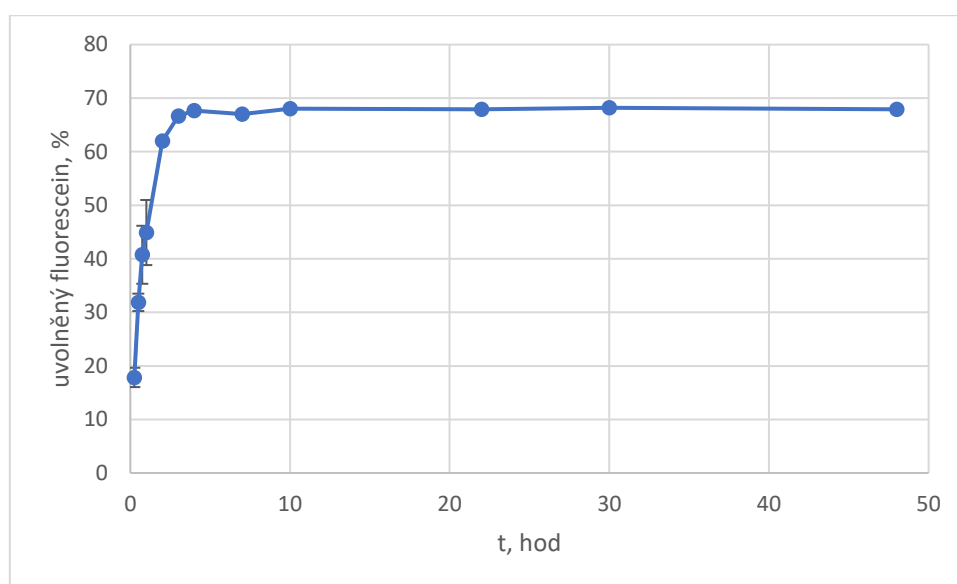
PLGA nanočástice s enkapsulovaným fluoresceinem a dexamethason-acetátem byly po přípravě hodnoceny pomocí přístroje Zetasizer. Před zahájením analýzy byla nanosuspenze přefiltrována přes filtr o velikosti pórů 1,2 µm.

Pomocí tohoto přístroje lze určit index polydisperzity, velikost částic a zeta potenciál připravených nanočástic. K určení indexu polydisperzity a velikosti částic byla použita plastová kyveta. Přístroj pracuje na základě metody dynamického rozptylu světla. Při měření zeta potenciálu je využita metoda elektroforetického rozptylu světla. Měření probíhá v plastové kyvetě s kapilárou (typ DTS1060).

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

Kapitola obsahuje výsledky získané přípravou PLGA nanočástic s enkapsulovaným fluoresceinem metodou nanoprecipitace a jejich následnou disolucí do různých disolučních médií. Dále jsou zde obsaženy výsledky disoluce dexamethason-acetátu z PLGA nanočástic do 0,01M PBS. Byla změřena také velikost, PDI, zeta potenciál a enkapsulační efektivita připravených nanočástic.

7.1 Disoluce fluoresceinu z PLGA nanočástic do PBS



Obrázek 19: Graf uvolňování fluoresceinu z PLGA nanočástic do 0,01M PBS

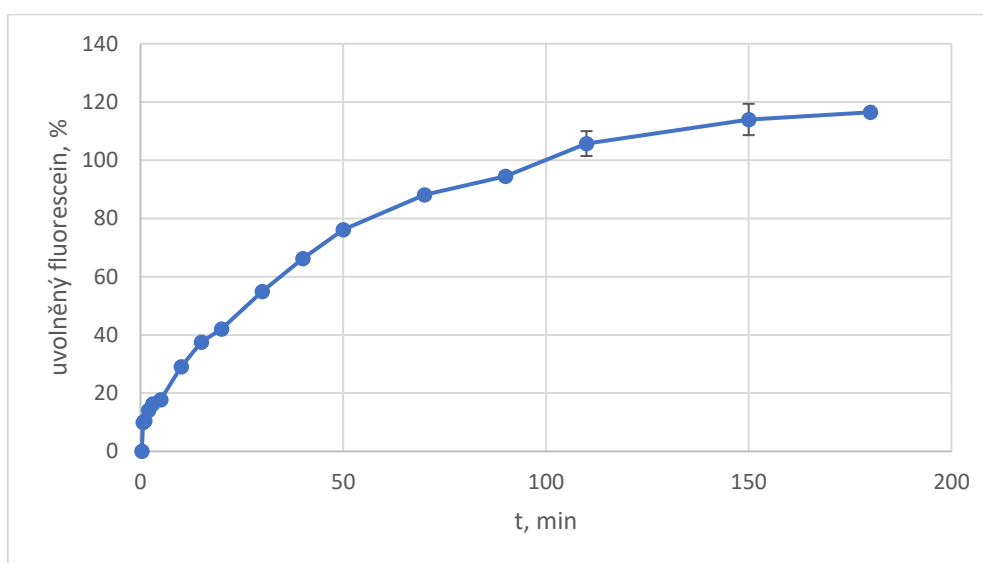
Obrázek 19 znázorňuje, že došlo k uvolnění 68 % enkapsulovaného fluoresceinu z PLGA nanočástic do 0,01M PBS a to v průběhu 4 hodin. Po zbytek doby disolučního testu už se další fluorescein neuvolňoval.

Většina enkapsulovaného fluoresceinu byla rychle uvolněna do média na počátku disolučního testu. U většiny polymerních částic pro cílenou distribuci léčiv dochází k burst efektu, tedy k počátečnímu výraznému uvolnění léčiva. Významná část enkapsulovaného léčiva se uvolní během krátké doby po aplikaci. Tato fáze může trvat od několika hodin do 1–2 dnů. Jedná se o jev nežádoucí, jelikož zkracuje dobu

terapeutického účinku léčiva. (43) Při nadměrném uvolnění může také léčivo působit toxicky. (43, 44)

Předpokládá se, že tento jev souvisí s uvolňováním molekul léčiva zachycených blízko povrchu nanočástic. Dalším důvodem vzniku může být vysoký počáteční koncentrační gradient léčiva mezi nanonosičem a okolním prostředím. (43)

7.1.1 Difuze volného fluoresceinu do PBS

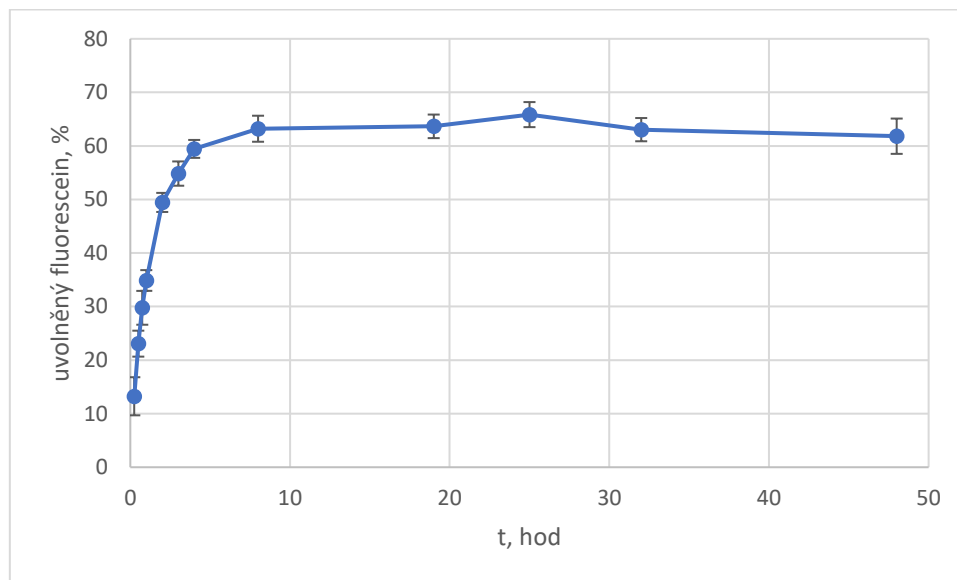


Obrázek 20: Graf uvolňování volného fluoresceinu z dialyzační membrány do 0,01M PBS

Na obrázku 20 je znázorněno uvolňování samotného fluoresceinu umístěného do dialyzační membrány do 0,01M PBS. Test byl proveden za účelem zjištění, jak je difuze uvolněného fluoresceinu do média ovlivněna dialyzační membránou. Difuze probíhala po dobu 3 hodin a maximální množství fluoresceinu se uvolnilo zhruba po 150 minutách.

V případě disoluce z PLGA nanočástic došlo k uvolnění jen 68 % enkapsulovaného fluoresceinu (viz kap. 7.1), což odpovídá hmotnosti 47 μg . K uvolnění obdobného množství volného fluoresceinu z dialyzační membrány došlo již za 25 minut a postupně došlo k difuzi celého množství fluoresceinu, který byl do membrány aplikován. Dialyzační membrána v tomto případě tedy není limitujícím krokem disoluce.

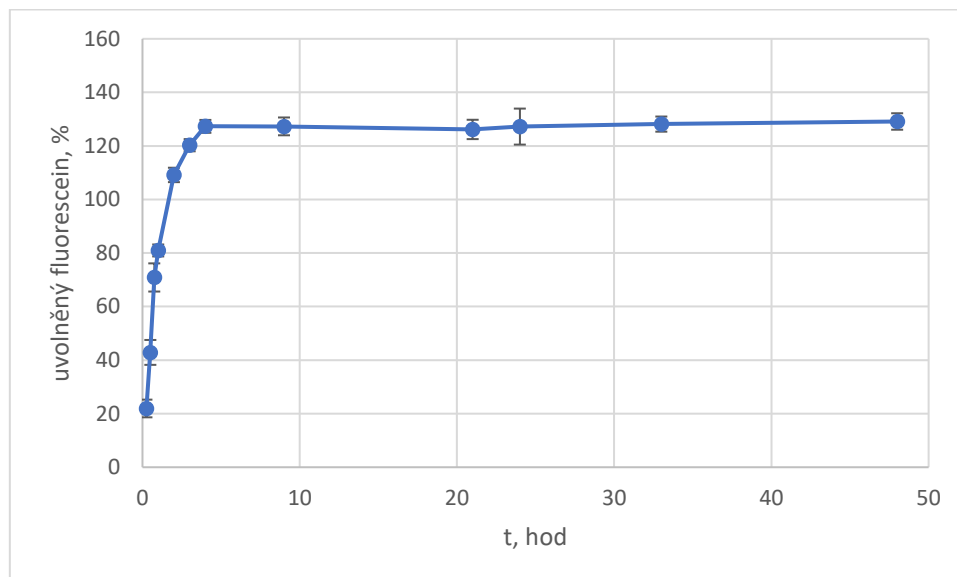
7.2 Disoluce fluoresceinu z PLGA nanočástic do fyziologického roztoku



Obrázek 21: Graf uvolňování fluoresceinu z PLGA nanočástic do fyziologického roztoku

Dle obrázku 21 došlo k uvolnění 63 % enkapsulovaného fluoresceinu z PLGA nanočástic do fyziologického roztoku během 4 hodin. Následně se již množství uvolněného fluoresceinu v testovaném časovém okně nezvyšovalo. Byl pozorován burst efekt a podobný průběh uvolňování jako v případě pufovaného fyziologického roztoku (viz kap. 7.1).

7.3 Disoluce fluoresceinu z PLGA nanočástic do acetátového pufru

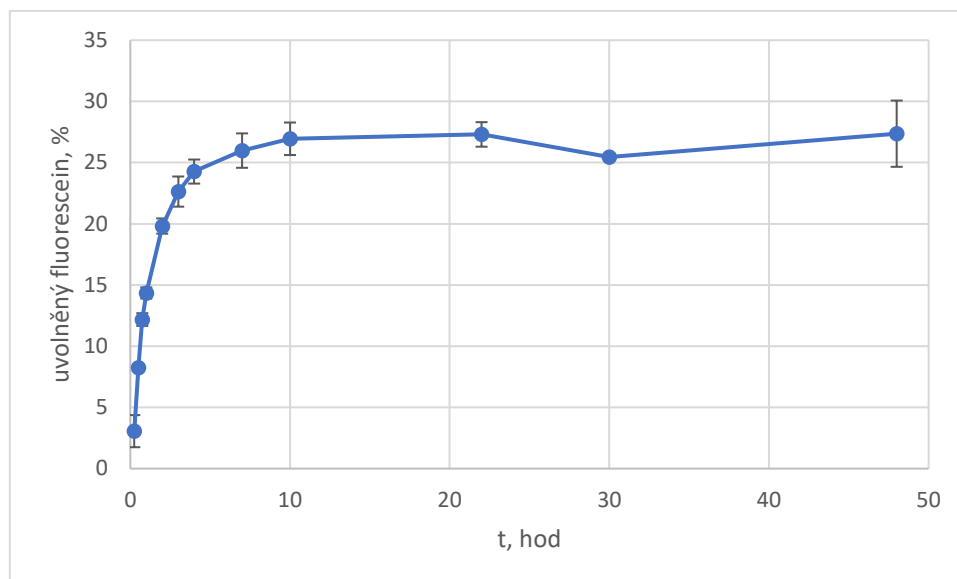


Obrázek 22: Graf uvolňování fluoresceinu z PLGA nanočástic do acetátového pufru

Obrázek 22 ukazuje, že k uvolnění 127 % enkapsulovaného fluoresceinu z PLGA nanočástic do acetátového pufru v průběhu 4 hodin. Dále už bylo množství uvolněného fluoresceinu konstantní. Více než 80 % se uvolnilo za 1 hodinu.

Množství uvolněného fluoresceinu přesahující 100 % by, mimo jiné, mohlo být způsobeno evaporací disolučního média v průběhu disoluce, nedostatečně rozpuštěným fluoresceinem při přípravě roztoků k sestavení kalibrační křivky či chybně určenou enkapsulační efektivitou z důvodu nízké rozpustnosti fluoresceinu. Další možností je tzv. cross talk, při kterém záření fluoresceinu v jedné jamce mikrotitrační destičky září i do jamek okolních a zvyšuje tak signál, čímž dochází k ovlivnění výsledků. (45)

7.4 Disoluce fluoresceinu z PLGA nanočástic do ALF



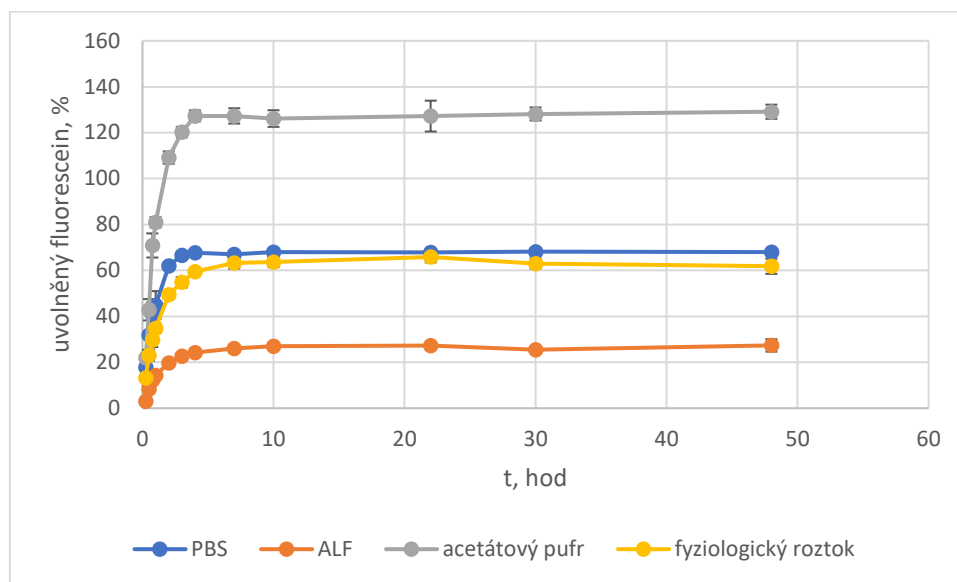
Obrázek 23: Graf uvolňování fluoresceinu z PLGA nanočástic do ALF

PLGA nanočástice se zdají být vhodným nosičem léčiv pro cílenou léčbu zánětlivých onemocnění. Makrofágy jsou fagocytující buňky vrozené imunity, které regulují zánětlivou odpověď produkcí cytokinů. (46) Pro simulaci vnitřního prostředí lysosomů makrofágů z hlediska pH, iontové síly a složení bylo použito médium ALF.

Z obrázku 23 vyplývá, že došlo k uvolnění pouze 26 % enkapsulovaného fluoresceinu z PLGA nanočástic do ALF v průběhu 7 hodin. Dále se již v testovaném časovém okně další fluorescein neuvolňoval.

Jahagirdar a kol. (47) studovali disoluci kurkuminu, špatně rozpustné látky ve vodě (0,6 $\mu\text{g/ml}$, 48), z PLGA nanočástic do ALF s 1 % laurylsulfátu sodného. Podobně jako bylo pozorováno uvolnění 26 % fluoresceinu během 7–10 h, došlo k uvolnění zhruba 26 % kurkuminu za 10 h. Avšak kurkumin se uvolňoval pozvolna dále až na 76,29 % během 72 h. Disoluční profil byl popsán Higuchiho modelem. Nanočástice oxidu železa pokryté PLGA se do ALF uvolňovaly pozvolna kinetikou prvního řádu a během 72 hodin částice degradovaly z 57,5 %. V ALF (pH 4,5) se tyto částice rozpouštěly 4krát rychleji než v AEF (simulovaná endozomální tekutina, pH 5,5). (49)

7.5 Srovnání uvolňování fluoresceinu z PLGA nanočástic do jednotlivých disolučních médií



Obrázek 24: Srovnání uvolňování fluoresceinu z PLGA nanočástic do jednotlivých disolučních médií

V průběhu disolucí došlo k uvolnění 68 % enkapsulovaného fluoresceinu do 0,01M PBS, 63 % enkapsulovaného fluoresceinu do fyziologického roztoku, 127 % enkapsulovaného fluoresceinu do acetátového pufru a 26 % enkapsulovaného fluoresceinu do ALF (obrázek 24).

Disoluce léčiva z polymerních nanočástic závisí na povaze léčiva, polymeru, pH a složení disolučního média. Rozpustnost fluoresceinu je nižší, čím je nižší pH. S rostoucím pH se vyskytuje fluorescein jako kation v silně kyselém prostředí, neutrální molekula (pH 2–4), monoanion (pH 4,3–6,4) a dianion (pH > 6,4). (50)

PLGA kopolymer podléhá degradaci hydrolýzou nebo biodegradací štěpením jeho esterových vazeb na monomery. Degradace probíhá prostřednictvím hromadné eroze matrice, při které dochází k rychlejšímu průniku vody do matrice, než je rychlost degradace polymeru. Dále k degradaci přispívá také difuze přes vodní póry, difuze z polymerní matrice a povrchová eroze. (51)

Uvolnění léčiva na počátku disoluce je ovlivněno jeho koncentrací, rozpustností a hydrofobními vlastnostmi polymeru. Jedná se o léčivo na povrchu uvolňující se při kontaktu s médiem penetrací vody do polymerní matrice. Ve druhé fázi se léčivo uvolňuje přes silnější vrstvu polymeru. Voda uvnitř matrice hydrolyzuje polymer na monomerní produkty a vytváří tak průchod pro léčivo, které se uvolňuje difúzí a erozí až do úplného rozpuštění polymeru. (51)

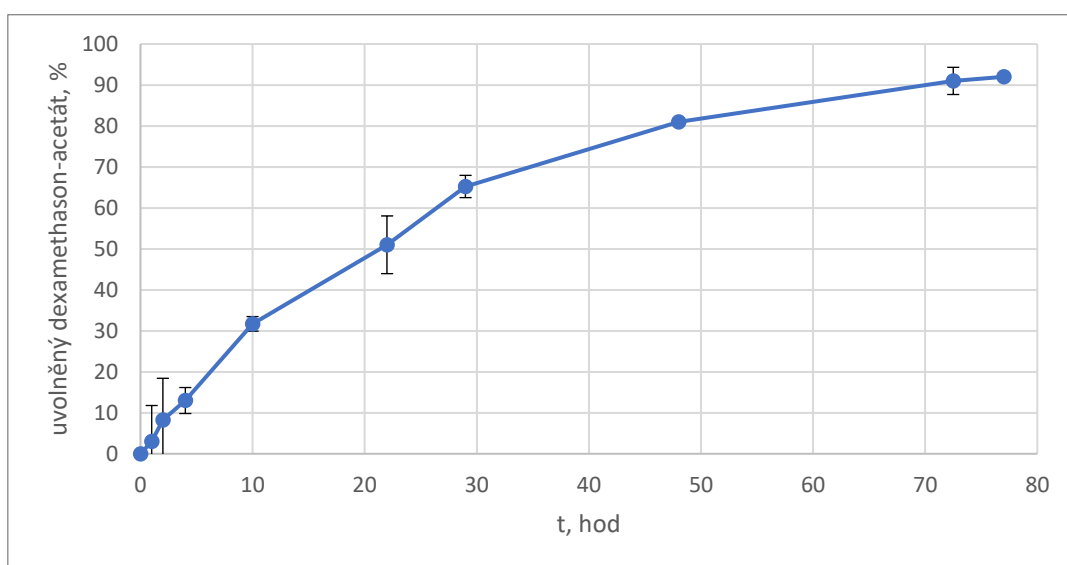
Průběh a rychlost biodegradace PLGA polymeru lze s ohledem na množství ovlivňujících faktorů těžko předvídat. Patří mezi ně například poměr LA:GA v řetězci polymeru. Rychlost degradace roste se zvyšujícím se podílem kyseliny glykolové a klesá tedy v pořadí PLGA 50:50, PLGA 63:35, PLGA 72:25, PLGA 85:15. Dále je rychlost degradace PLGA polymeru ovlivněna krystalinitou, ale o jejím vlivu na rychlost se objevují nekonzistentní fakta. Polymery s vyšší molekulovou hmotností jsou charakteristické nižší rychlostí degradace. Mají delší řetězce a vyžadující tedy delší dobu degradace než polymery nízkomolekulární. (51)

Snížením pH média ze 7,4 (PBS, fyziologický roztok) na 5,5 (acetátový pufr) došlo k uvolnění přibližně dvojnásobku fluoresceinu za stejnou dobu. Alkalická a silně kyselá média degradaci PLGA nanočástic *in vitro* urychlují zvýšením hydrolyzy esterových vazeb. Tím dochází i k ovlivnění uvolňování léčiva. Rozdíl mezi mírně kyselým a neutrálním prostředím je však méně výrazný, a to z důvodu autokatalýzy koncovými karboxylovými skupinami. (51, 52) Při kyselém pH (2,4) dochází k rychlejšímu uvolňování léčiva také z PLGA mikrosfér a jejich morfologie je během degradace v nízkém kyselém pH odlišná než při pH neutrálním. (53)

Dalším snížením pH na 4,5 (ALF) však již nedošlo k rychlejšímu uvolňování fluoresceinu, pravděpodobně z důvodu vyšší iontové síly a osmolality tohoto média. Během disolučního testu se uvolnil pravděpodobně jen fluorescein z povrchu nanočástic, který mohl být přítomen i přes promytí nanočástic. Iontová síla může ovlivňovat rozpustnost léčiva a stabilitu nanočástic, která může být zvýšena povrchovou modifikací např. poloxamery nebo bílkovinami. (54, 55) Nebyla pozorována žádná degradace PLGA nanočástic povrchově modifikovaných hovězím sérovým albuminem během 7denní inkubace v ALF. (55) Tomic a kol. (56) publikovali, že iontová síla neovlivnila disoluci

peptidu z PLGA mikrosfér. Řídící silou mechanismu uvolňování byla osmolalita média. Jev byl vysvětlen rychlejší degradací polymeru při nižší osmolalitě média, kdy mechanismem uvolňování byla difuze. Voda ochotně penetruje do částic, kde dojde k rozpuštění inkorporovaného léčiva, zatímco polymer se rozpouští pomaleji. (56, 57)

7.6 Disoluce dexamethason-acetátu z PLGA nanočástic do PBS



Obrázek 25: Graf uvolňování dexamethason-acetátu do 0,01M PBS

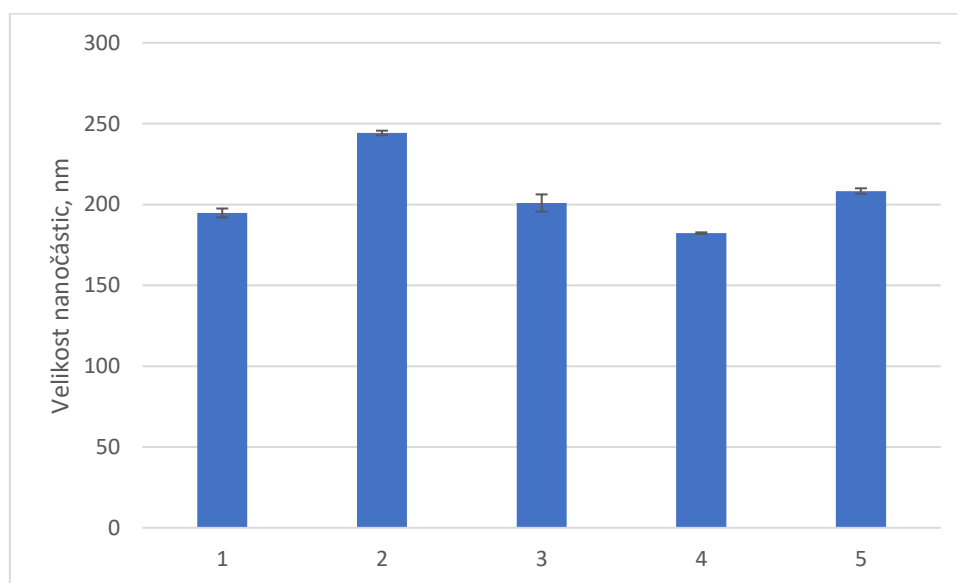
Dle obrázku 25 došlo k uvolnění 92 % dexamethason-acetátu z PLGA nanočástic do 0,01M PBS v průběhu 77 hodin.

K uvolňování dexamethason-acetátu docházelo pozvolněji než v případě fluoresceinu. Nedošlo zde k výraznému počátečnímu uvolnění léčiva. Burst efekt nebyl pozorován na rozdíl od disoluce fluoresceinu, kdy byl burst efekt pozorovatelný ve všech použitých médiích.

Disoluční profil se značně liší od dříve publikovaných prací. Campos a kol. (58) prováděli disoluci dexamethason-acetátu do PBS o pH 7,4 po dobu 48 hodin. Došlo k rychlému uvolnění dexamethason-acetátu během prvních 6 hodin testu a poté bylo uvolňování na několik dalších hodin stabilizováno. Za 48 hodin se uvolnilo pouze 25 % enkapsulovaného fluoresceinu v PLGA nanočásticích, což odpovídá množství, které bylo

v námi provedené disoluci uvolněno za 8 hodin. Za 48 hodin se uvolnilo 81 % enkapsulovaného léčiva, tedy více než třikrát tolik v porovnání s touto dříve provedenou disolucí. Gómez-Gaete a kol. (59) publikovali studii uvolňování dexamethason-acetátu *in vitro* v průběhu 48 hodin. Došlo k rychlému uvolnění 100 % aktivního léčiva během prvních 4 hodin. Dle profilu uvolňování a přítomnosti burst efektu lze předpokládat umístění dexamethason-acetátu v blízkosti povrchu nanočástice.

7.7 Velikost nanočástic



Obrázek 26: Hodnoty velikosti připravených PLGA nanočástic s fluoresceinem (připraveny pro disoluci do: 1–0,01M PBS, 2–fyziologického roztoku, 3–acetátového pufru, 4–ALF) a s dexamethason-acetátem (5)

Obrázek 26 zobrazuje hodnoty velikosti připravených PLGA nanočástic. Jejich velikost se pohybovala v rozmezí 182,3 až 244,2 nm.

Velikost polymerních nanočástic ovlivňuje jejich transport z krve do tkání a do patologických buněk. Velké částice jsou rychle odstraněny z krevního oběhu buňkami mononukleárního fagocytárního systému, nebo dalšími příslušnými orgány. (60)

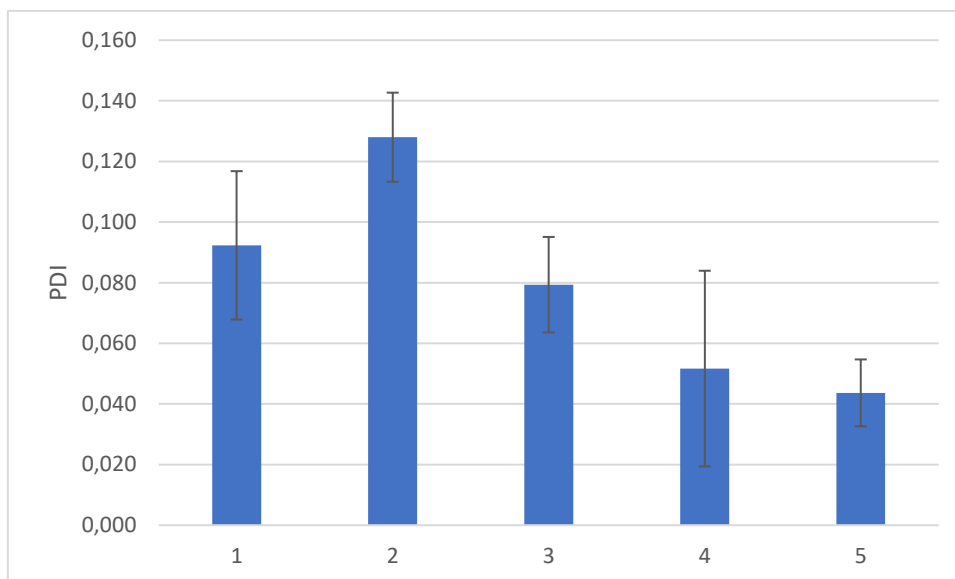
Polymerní nanočástice větší než 200 nm jsou vychytávány sinusoidami sleziny. Částice, jejichž velikost je v rozmezí 100–300 nm (28), jsou zachyceny Kupfferovými buňkami jater. Všechny připravené částice velikostí náleží do uvedeného rozmezí 100–300 nm. Částice menší než 5,5 nm prochází ledvinami. (60)

Dle studií distribuce nanočástic do orgánů v závislosti na jejich velikosti byly intravenózně aplikované nanočástice o velikosti 10 nm nalezeny v krvi, játrech, slezině, ledvinách, varlatech, brzlíku, srdci, plicích a mozku. Zatímco nanočástice větších rozměrů (50, 100 a 250 nm) byly přítomné pouze v krvi, játrech a slezině. (60)

Velikost nanočástic ovlivňuje také způsob a rychlost jejich absorpce buňkou. (60)

Poměr plochy povrchu k objemu je významným faktorem při degradaci větších částic. Vyšší poměr plochy povrchu vede k vyšší degradaci matrice. Hromadná eroze je rychlejší než povrchová, díky tomu je uvolňování léčiva rychlejší z částic s větší plochou povrchu k objemu. (51)

7.8 PDI nanočástic

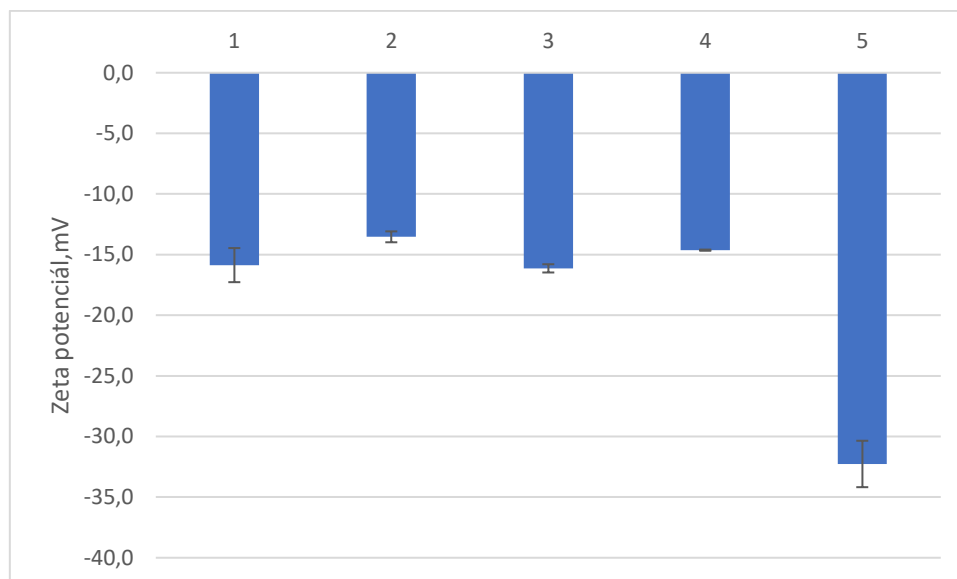


Obrázek 27: Hodnoty PDI připravených nanočástic s fluoresceinem (připraveny pro disoluci do: 1–0,01M PBS, 2–fyziologického roztoku, 3–acetátového pufru, 4–ALF) a s dexamethason-acetátem (5)

Index polydisperzity popisuje stupeň nestejnornosti distribuce velikosti částic. Všechny vzorky lze považovat za monodisperzní systémy, neboť jak ukazuje obrázek 27, naměřená hodnota PDI byla vždy menší než 0,2. (16, 21)

Polydisperzita PLGA nanočástic s enkapsulovaným dexamethason-acetátem byla naměřena nižší než u PLGA nanočástic s enkapsulovaným fluoresceinem.

7.9 Zeta Potenciál

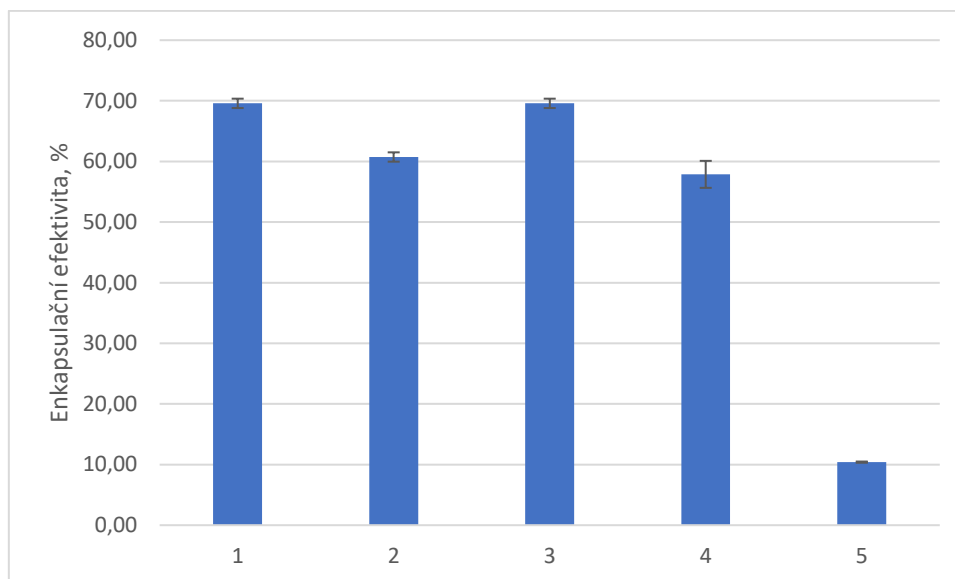


Obrázek 28: Hodnoty zeta potenciálu připravených nanočástic s fluoresceinem (připraveny pro disoluci do: 1–0,01M PBS, 2–fyziologického roztoku, 3–acetátového pufru, 4–ALF) a s dexamethason-acetátem (5)

Obrázek 28 zobrazuje naměřené hodnoty zeta potenciálu připravených nanočástic. Částice považujeme za stabilní, pokud je jeho hodnota vyšší než +30 mV anebo nižší než -30 mV. (16) Zeta potenciál PLGA nanočástic s dexamethason-acetátem měl hodnotu -33,2 mV a tyto nanočástice lze tedy považovat za stabilní. U nanočástic s enkapsulovaným fluoresceinem byla naměřená hodnota nižší, ale při všech měřeních pohybující se v úzkém rozmezí od -13 do -15,8 mV.

PLGA nanočástice připravené s poloxamery jsou stabilní i přes absolutní hodnotu zeta potenciálu nižší než 30 mV. Adsorbované poloxamery vytváří na povrchu částice vrstvu, která stíní povrchový náboj částice, posouvají rovinu skluzu dále od částice a snižují elektroforetickou pohyblivost. Nanočástice jsou částečně stabilizovány stericky. (61, 62)

7.10 Enkapsulační efektivita



Obrázek 29: Hodnoty enkapsulační efektivity připravených nanočástic s fluoresceinem (připraveny pro disoluci do: 1–0,01M PBS, 2–fyziologického roztoku, 3–acetátového pufru, 4–ALF) a s dexamethason-acetátem (5)

Obrázek 29 ukazuje hodnoty enkapsulačních efektivit připravených PLGA nanočástic. Enkapsulační efektivita nanočástic s fluoresceinem se pohybovala v rozmezí 57,9 % až 69,6 %. Hodnota enkapsulační efektivity nanočástic s dexamethason-acetátem byla výrazně nižší. Její hodnota dosáhla 10,4 %.

Obecně probíhá enkapsulace léčiva do polymerních částic snadněji u malých hydrofobních molekul než u větších hydrofilních. (63) Fluorescein se vyznačuje molekulovou hmotností 332,3 (34, 35) a rozdělovacím koeficientem 3,4 (34). Molekulová hmotnost dexamethason-acetátu je 434,5 (37, 38, 39) a jeho rozdělovací koeficient se rovná 2,8 (38). PLGA nanočástice s fluoresceinem, který je menší a hydrofobnější molekula než dexamethason-acetát, měly vyšší enkapsulační efektivitu než PLGA nanočástice s dexamethason-acetátem.

8 ZÁVĚR

V rámci této práce se podařilo připravit PLGA nanočástic s enkapsulovaným fluoresceinem a dexamethason-acetátem a následně provést jejich disoluci do různých médií. Nanočástice byly také porovnávány z hlediska velikosti, PDI, zeta potenciálu a enkapsulační efektivity.

Z výsledků vyplývá:

1. Připravené nanočástice byly monodisperzní a jejich velikost se pohybovala v rozmezí od 182 do 244 nm.
2. Enkapsulační efektivita nanočástic s dexamethason-acetátem byla nižší (10,4 %) než u nanočástic s fluoresceinem (od 57,9 do 69,6 %), a to proto, že dexamethason-acetát je větší a hydrofilnější molekula než fluorescein.
3. Srovnání uvolňování volného fluoresceinu z dialyzační membrány a uvolňování fluoresceinu z PLGA nanočástic do 0,01M PBS dokázalo, že difuze uvolněného fluoresceinu do disolučního média není limitována použitou dialyzační membránou.
4. Fluorescein se lépe uvolňoval z PLGA nanočástic při použití různých médií v tomto pořadí: acetátový pufr, fyziologický roztok, 0,01M PBS a ALF.
5. Snížení pH disolučního média ze 7,4 (PBS, fyziologický roztok) na 5,5 (acetátový pufr) vedlo k uvolnění přibližně dvojnásobku fluoresceinu za stejnou dobu. Snížením pH na 4,5 (ALF) nedošlo k dalšímu zrychlení ani zvýšení uvolňování pravděpodobně z důvodu vyšší iontové síly a osmolality média.
6. K uvolnění významného množství enkapsulovaného fluoresceinu z PLGA nanočástic došlo rychle na počátku disolučního testu, byl pozorován burst efekt, a to při použití všech vybraných médií. Průběh uvolňování byl pokaždé podobný.
7. Průběh uvolňování fluoresceinu a dexamethason-acetátu do 0,01M PBS byl odlišný. Při disoluci fluoresceinu byl pozorovaný burst efekt. Uvolňování dexamethason-acetátu bylo pozvolnější. Při disoluci dexamethason-acetátu se uvolnilo 80 % za 48 hodin. Maximální množství uvolněného fluoresceinu do 0,01M PBS bylo 68 % a to v průběhu 4 hodin.

9 POUŽITÉ ZKRATKY

AEF	simulovaná endozomální tekutina
ALF	simulovaná lysozomální tekutina
DLS	dynamický rozptyl světla
EE	enkapsulační efektivita
EMA	evropská léková agentura
FDA	úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GA	kyselina glykolová
HLB	hydrofilně-lipofilní rovnováha
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LA	kyselina mléčná
log P	rozdělovací koeficient
MPS	mononukleární fagocytární systém
Mr	relativní molekulová hmotnost
MWCO	mezní hodnota molekulové hmotnosti
NLC	nanostrukturované lipidické nosiče
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDI	index polydisperzity
PEG	polyethylenglykol
PGA	kyselina polyglykolová
pKa	disociační konstanta
PLA	kyselina polyléččná
PLGA	kyselina poly(mléčná-ko-glykolová)
RCF	relativní centrifugační síla
RES	retikuloendoteliární systém
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SLN	pevné lipidové nanočástice
SLS	statický rozptyl světla
TEM	transmisní elektronová mikroskopie

10 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Lipozomy, převzato a upraveno (9)	12
Obrázek 2: Porovnání SLN a NLC, převzato a upraveno (8).....	13
Obrázek 3: Nanosféra a nanotobolka, převzato a upraveno (20)	15
Obrázek 4: PLGA, převzato a upraveno (4).....	16
Obrázek 5: Odpaření rozpouštědla, převzato a upraveno (16)	18
Obrázek 6: Emulzně difuzní odpařování metoda, převzato a upraveno (16)	19
Obrázek 7: Vysolování, převzato a upraveno (16)	20
Obrázek 8: Nanoprecipitace, převzato a upraveno (16)	21
Obrázek 9: Polymerizace, převzato a upraveno (19).....	22
Obrázek 10: Mechanismy uvolnění léčiva, A-difuze přes vodní póry, B-difuze z polymerní matrice, C-osmotické pumpa, D-eroze (32)	29
Obrázek 11: Uvolňování léčiva erozí, A-hromadná, B-povrchová (4).....	30
Obrázek 12: Struktura fluoresceinu (36)	32
Obrázek 13: Struktura dexamethason-acetátu (39)	33
Obrázek 14: Kalibrační křivka fluoresceinu v 0,01M PBS	38
Obrázek 15: Kalibrační křivka fluoresceinu ve fyziologickém roztoku.....	39
Obrázek 16: Kalibrační křivka fluoresceinu v acetátovém pufru.....	39
Obrázek 17: Kalibrační křivka fluoresceinu v ALF	40
Obrázek 18: Kalibrační křivka dexamethason-acetátu v 0,01M PBS	42
Obrázek 19: Graf uvolňování fluoresceinu z PLGA nanočástic do 0,01M PBS.....	43
Obrázek 20: Graf uvolňování volného fluoresceinu z dialyzační membrány do 0,01M PBS	44
Obrázek 21: Graf uvolňování fluoresceinu z PLGA nanočástic do fyziologického roztoku	45
Obrázek 22: Graf uvolňování fluoresceinu z PLGA nanočástic do acetátového pufru..	46

Obrázek 23: Graf uvolňování fluoresceinu z PLGA nanočástic do ALF	47
Obrázek 24: Srovnání uvolňování fluoresceinu z PLGA nanočástic do jednotlivých disolučních médií.....	48
Obrázek 25: Graf uvolňování dexamethason-acetátu do 0,01M PBS.....	50
Obrázek 26: Hodnoty velikosti připravených PLGA nanočástic s fluoresceinem (připraveny pro disoluci do: 1–0,01M PBS, 2–fyziologického roztoku, 3–acetátového pufru, 4–ALF) a s dexamethason-acetátem (5)	51
Obrázek 27: Hodnoty PDI připravených nanočástic s fluoresceinem (připraveny pro disoluci do: 1–0,01M PBS, 2–fyziologického roztoku, 3–acetátového pufru, 4–ALF) a s dexamethason-acetátem (5).....	53
Obrázek 28: Hodnoty zeta potenciálu připravených nanočástic s fluoresceinem (připraveny pro disoluci do: 1–0,01M PBS, 2–fyziologického roztoku, 3–acetátového pufru, 4–ALF) a s dexamethason-acetátem (5)	54
Obrázek 29: Hodnoty enkapsulační efektivity připravených nanočástic s fluoresceinem (připraveny pro disoluci do: 1–0,01M PBS, 2–fyziologického roztoku, 3–acetátového pufru, 4–ALF) a s dexamethason-acetátem (5)	55

11 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Příprava acetátového pufru.....	37
Tabulka 2: Složení ALF.....	37

12 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1. Muthu MS, Feng SS.** Pharmaceutical stability aspects of nanomedicines. *Nanomedicine* [online]. 2009, 4(8):857-860 [cit. 2023-03-02]. Dostupné z: doi:10.2217/nmm.09.75
- 2. Rao J, Geckeler KE.** Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science* [online]. 2011, 36(7), 887-913 [cit. 2023-03-02]. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001
- 3. Patra JK, Das G et al.** Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology* [online]. 2018, 16(1) [cit. 2023-03-02]. Dostupné z: doi:10.1186/s12951-018-0392-8
- 4. Dinarvand R, Sepehri N et al.** Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *International Journal of Nanomedicine*. [online] 2011, 877-877 [cit. 2023-03-02]. Dostupné z: doi:10.2147/ijn.s18905
- 5. Kumari A, Yadav S et al.** Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2010, 75(1):1-18 [cit. 2023-03-02]. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.001
- 6. Mitchell ME, Billingsley MM et al.** Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. 2021, 20(2):101-124. [cit. 2023-03-02]. Dostupné z: doi:10.1038/s41573-020-0090-8
- 7. Fan YC, Marioli M et al.** Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2021, 192:113642-113642. [cit. 2023-03-02]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2020.113642
- 8. Scioli-Montoto S, Muraca G et al.** Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: Pharmacological and Biopharmaceutical Aspects. *Frontiers in Molecular Biosciences* [online]. 2020, 7. [cit. 2023-03-02]. Dostupné z: doi:10.3389/fmolb.2020.587997

- 9. Alavi M, Hamidi M.** Passive and active targeting in cancer therapy by liposomes and lipid nanoparticles. *Drug metabolism and personalized therapy* [online]. 2019, 34(1). [cit. 2023-03-02]. Dostupné z: doi:10.1515/dmpt-2018-0032
- 10. Mirchandani Y, Patravale VB et al.** Solid lipid nanoparticles for hydrophilic drugs. *Journal of Controlled Release* [online]. 2021, 335:457-464. [cit. 2023-03-02]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2021.05.032
- 11. Mendoza-Muñoz N, Urbán-Morlán Z et al.** Solid Lipid Nanoparticles: An Approach to Improve Oral Drug Delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* [online]. 2021, 24:509-532. [cit. 2023-03-02]. Dostupné z: doi:10.18433/jpps31788
- 12. Tapeinos C, Battaglini M et al.** Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases. *Journal of Controlled Release* [online]. 2017, 264:306-332. [cit. 2023-03-02]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2017.08.033
- 13. Patil TS, Deshpande A.** Nanostructured lipid carriers-based drug delivery for treating various lung diseases: A State-of-the-Art Review. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2018, 547(1-2):209-225. [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2018.05.070
- 14. Ahlawat J, Henriquez G et al.** Enhancing the Delivery of Chemotherapeutics: Role of Biodegradable Polymeric Nanoparticles. *Molecules* [online]. 2018, 23(9):2157-2157. [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23092157
- 15. Danhier F, Ansorena E et al.** PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release* [online]. 2012, 161(2):505-522. [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.043
- 16. Zielińska A, Carreiró F et al.** Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules* [online]. 2020, 25(16):3731-3731. [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25163731

- 17. Tammam SN, Azzazy HM et al.** Biodegradable Particulate Carrier Formulation and Tuning for Targeted Drug Delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology* [online]. 2015, 11(4):555-577. [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: doi:10.1166/jbn.2015.2017
- 18. Rocha C, Gonçalves VS et al.** PLGA-Based Composites for Various Biomedical Applications. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, 23(4):2034-2034. [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23042034
- 19. Li K, Liu B.** Polymer-encapsulated organic nanoparticles for fluorescence and photoacoustic imaging. *Chemical Society Reviews* [online]. 2014, 43(18):6570-6597. [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: doi:10.1039/c4cs00014e
- 20. Gagliardi A, Giuliano ES et al.** Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2021, 12. [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2021,601626
- 21. M Danaei, M Dehghankhold et al.** Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* [online]. 2018, 10(2):57-57. [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics10020057
- 22. Jain AK, Thareja S.** In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* [online]. 2019, 47:1, 524-539 [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:10.1080/21691401.2018.1561457
- 23. Shen J, Burgess DJ.** In vitro dissolution testing strategies for nanoparticulate drug delivery systems: recent developments and challenges. *Drug Delivery and Translational Research* [online]. 2013, 3(5):409-415. [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:10.1007/s13346-013-0129-z
- 24. Gupta R, Chen Y, Xie H.** In vitro dissolution considerations associated with nano drug delivery systems. *Wiley Interdisciplinary Reviews-nanomedicine and Nanobiotechnology* [online]. 2021, 13(6). [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:10.1002/wnan.1732

- 25. Torchilin VP.** Drug targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2000, 11:S81-S91. [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:10.1016/s0928-0987(00)00166-4
- 26. Zhang YN, Poon W et al.** Nanoparticle–liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination. *Journal of Controlled Release* [online]. 2016, 240:332-348. [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2016.01.020
- 27. Peterson K, Cottam MA et al.** Macrophage-Targeted Therapeutics for Metabolic Disease. *Trends in Pharmacological Sciences* [online]. 2018, 39(6):536-546. [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:10.1016/j.tips.2018.03.001
- 28. Boltnarova B, Kubackova J et al.** PLGA Based Nanospheres as a Potent Macrophage-Specific Drug Delivery System. *Nanomaterials* [online]. 2021, 11(3):749-749. [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:10.3390/nano11030749
- 29. Mitchell ME, Billingsley MM et al.** Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. 2021, 20(2):101-124. [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:10.1038/s41573-020-0090-8
- 30. Kamaly N, Yameen B et al.** Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chemical Reviews* [online]. 2016, 116(4):2602-2663. [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.5b00346
- 31. Fu Y, Kao WJ.** Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2010, 7(4):429-444. [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:10.1517/17425241003602259
- 32. Fredenberg S, Wahlgren M et al.** The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2011, 415(1-2):34-52. [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2011.05.049

- 33. Sanopoulou M, Papadokostaki KG.** Controlled Drug Release Systems: Mechanisms and Kinetics. *WORLD SCIENTIFIC eBooks*. [online] January 1, 2018:1-33. [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:10.1142/9789813223974_0001
- 34.** Fluorescein. *PubChem* [online]. [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fluorescein#section=2D-Structure>
- 35.** Fluorescein. *ChemicalBook* [online]. [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7753558.htm
- 36. Agrawal S.** Fluorescein & its Sodium Salt. Chemistry, Uses and Side effects. *Macsen Labs*. [online]. [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: <https://www.macsenlab.com/blog/what-is-fluorescein-sodium/>
- 37.** Dexamethasone acetate. Uses, Interactions, Mechanism of Action. *DrugBank* [online]. [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB14649>
- 38.** Dexamethasone acetate. *PubChem* [online]. [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dexamethasone-acetate#section=Spectral-Information>
- 39.** Dexamethasone acetate. *MedchemExpress* [online]. [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: <https://www.medchemexpress.com/Dexamethasone-acetate.html>
- 40. Dumortier G, Grossiord JL et al.** A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. *Pharmaceutical Research* [online]. 2006, 23(12):2709-2728. [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: doi:10.1007/s11095-006-9104-4
- 41. Fu Y, Kao WJ.** Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2010, 7(4):429-444. [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:10.1517/17425241003602259

- 42. Kerwin BA.** Polysorbates 20 and 80 Used in the Formulation of Protein Biotherapeutics: Structure and Degradation Pathways. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2008, 97(8):2924-2935 [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: doi:10.1002/jps.21190
- 43. Yoo J, Won YY.** Phenomenology of the Initial Burst Release of Drugs from PLGA Microparticles. *ACS Biomaterials Science & Engineering* [online]. 2020 6 (11), 6053-6062 [cit. 2023-08-7]. Dostupné z: doi: 10.1021/acsbomaterials.0c01228
- 44. Allison SD.** Analysis of initial burst in PLGA microparticles. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2008, 615-628, [cit. 2023-08-7]. Dostupné z: doi: 10.1517/17425247.5.6.615
- 45. Arppe R, Carro-Temboury MR KJ et al.** Investigating dye performance and crosstalk in fluorescence enabled bioimaging using a model system. *PLOS ONE* [online]. 2017, 12(11), [cit. 2023-08-12]. Dostupné z: doi: 10.1371/journal.pone.0188359
- 46. Hu G, Guo M et al.** Nanoparticles Targeting Macrophages as Potential Clinical Therapeutic Agents Against Cancer and Inflammation. *Frontiers in Immunology* [online]. 2019, 10. [cit. 2023-08-10]. Dostupné z: doi: 10.3389/fimmu.2019.01998
- 47. Jahagirdar PS, Gupta PK et al.** Polymeric curcumin nanoparticles by a facile in situ method for macrophage targeted delivery. *Bioengineering & translational medicine*. [online]. 2018, 4(1):141-151. [cit. 2023-08-10]. Dostupné z: doi: 10.1002/btm2.10112
- 48. Kurien BT, Singh A et al.** Improving the Solubility and Pharmacological Efficacy of Curcumin by Heat Treatment. *Assay and Drug Development Technologies* [online]. 2007, 5(4):567-576. [cit. 2023-08-10]. Dostupné z: doi: 10.1089/adt.2007.064
- 49. Turrina C, Klassen A et al.** Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for their application in the human body: Influence of the surface. *Heliyon* [online]. 2023, 9(6). [cit. 2023-08-10]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e16487

- 50. Panchompoo J, Aldous L et al.** One-step synthesis of fluorescein modified nano-carbon for Pd(ii) detection via fluorescence quenching. *Analyst* [online]. 2012, 137(9):2054-2054. [cit. 2023-08-13]. Dostupné z: doi: 10.1039/c2an16261j
- 51. Makadia HK, Siegel SJ.** Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)* [online]. 2011, 3(3):1377-1397. [cit. 2023-06-07]. Dostupné z: doi: 10.3390/polym3031377
- 52. Tomic I, Vidis-Millward A et al.** Setting accelerated dissolution test for PLGA microspheres containing peptide, investigation of critical parameters affecting drug release rate and mechanism. *Int J Pharm* [online]. 2016, 505(1-2):42-51. [cit. 2023-06-07] Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.03.048
- 53. Zolnik BS, Burgess DJ.** Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release. *Journal of Controlled Release* [online]. 2007;122(3):338-344. [cit. 2023-07-12] Dostupné z: doi: 10.1016/j.jconrel.2007.05.034
- 54. Santander-Ortega MJ, Jódar-Reyes AB et al.** Colloidal stability of Pluronic F68-coated PLGA nanoparticles: A variety of stabilisation mechanisms. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2006, 302(2):522-529 [cit. 2023-08-13]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jcis.2006.07.031
- 55. Chen X, Gao C.** Influences of surface coating of PLGA nanoparticles on immune activation of macrophages. *Journal of Materials Chemistry B* [online]. 2018, 6(14):2065-2077. [cit. 2023-08-13]. Dostupné z: doi: 10.1039/c7tb03080k
- 56. Tomic I, Vidis-Millward A et al.** Setting accelerated dissolution test for PLGA microspheres containing peptide, investigation of critical parameters affecting drug release rate and mechanism. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2016, 505(1-2):42-51. [cit. 2023-08-13]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.03.048
- 57. Faisant N, Siepmann J et al.** PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2002, 15(4):355-366. [cit. 2023-08-13]. Dostupné z: doi: 10.1016/s0928-0987(02)00023-4

- 58. Campos I, Santos TM et al.** Preparation and Release Characteristics of Dexamethasone Acetate Loaded Organochlorine-free poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2014, 131. [cit. 2023-08-13]. Dostupné z: doi: 10.1002/app.41199
- 59. Gómez-Gaete C, Tsapis N et al.** Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics Science* [online]. 2007, 331(2):153-159. [cit. 2023-08-13]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.11.028
- 60. Huang W, Zhang C.** Tuning the Size of Poly(lactic-co-glycolic Acid) (PLGA) Nanoparticles Fabricated by Nanoprecipitation. *Biotechnol J.* [online]. 2018, 13(1) [cit. 2023-06-07] Dostupné z: doi: 10.1002/biot.201700203
- 61. Miyazawa T, Itaya M et al.** A Critical Review of the Use of Surfactant-Coated Nanoparticles in Nanomedicine and Food Nanotechnology. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2021, 16:3937-3999. [cit. 2023-08-13]. Dostupné z: doi: 10.2147/ijn.s298606
- 62. Kamel AO, Gehanne AS et al.** Preparation of Intravenous Stealthy Acyclovir Nanoparticles with Increased Mean Residence Time. *Aaps Pharmscitech* [online]. 2009, 10(4). [cit. 2023-08-13]. Dostupné z: doi: 10.1208/s12249-009-9342-y
- 63. Han FY, Thurecht KJ et al.** Bioerodable PLGA-Based Microparticles for Producing Sustained-Release Drug Formulations and Strategies for Improving Drug Loading. *Front Pharmacol* [online]. 2016, 28;7:185, [cit. 2023-08-12] Dostupné z: doi: 10.3389/fphar.2016.00185