

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie



Polymerní nanočástice pro dodání ve vodě špatně rozpustných látek
Polymeric nanoparticles for poorly water soluble drugs delivery

Diplomová práce

Hradec Králové 2023

Martina Nekolová

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

Dne 13. 5. 2023 v Hradci Králové

.....

Martina Nekolová

Tímto děkuji svému školiteli PharmDr. Ondřeji Holasovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, za trpělivost a cenné rady a připomínky během zpracování.

OBSAH

1.	ABSTRAKT	6
2.	ABSTRACT	7
3.	Úvod a cíl práce	8
4.	Teoretická část	9
4.1	Částicové systémy	9
4.2	Polymerní nanočástice	9
4.2.1	Typy polymerů pro přípravu	9
4.2.1.1	Přírodní polymery	10
4.2.1.2	Syntetické polymery	11
4.2.2	Metody přípravy nanočástic	14
4.2.2.1	Nanoprecipitace	15
4.2.2.2	Emulzní odpařovací metoda	18
4.2.2.3	Emulzní difúzní metoda	18
4.2.2.4	Metoda vysolování	19
4.3	Cílená distribuce nanočástic	19
4.3.1	Pasivní targeting	20
4.3.1.1	Cílená distribuce do jater	21
4.3.1.2	Cílená distribuce do nádorové tkáně	22
4.3.2	Aktivní targeting	22
4.4	Kurkumin	24
4.5	NAFLD	25
5.	Experimentální část	26
5.1	Použité suroviny	26
5.2	Použité přístroje	26
5.3	Použité metody	27
5.3.1	Příprava nanočástic	27
5.3.1.1	Příprava vodné fáze	27
5.3.1.2	Příprava organické fáze	27
5.3.1.3	Proces nanoprecipitace	27
5.4	Charakterizace nanočástic	28

5.4.1	Stanovení velikosti částic a indexu polydisperzity	28
5.4.1.1	Příprava a měření vzorku.....	28
5.4.2	Stanovení zeta potenciálu	28
5.4.2.1	Příprava a měření vzorku.....	29
5.4.3	Enkapsulační efektivita a drug-loading	29
5.4.3.1	Příprava vzorku	29
5.4.3.2	Měření vzorku a výpočty	30
5.4.4	Disoluce	31
6.	Výsledky a diskuze	33
6.1	Nanočástice s PLGA 50:50	33
6.1.1	Velikost, PDI a zeta potenciál – různý (w/w).....	34
6.1.2	Hodnocení EE a DLC – různý (w/w).....	35
6.1.3	Velikost a PDI – stejný (w/w).....	36
6.1.4	Hodnocení EE a DLC – stejný (w/w).....	37
6.2	Nanočástice s PLGA A2	38
6.2.1	Velikost, PDI a zeta potenciál – různý (w/w).....	38
6.2.2	Hodnocení EE a DLC – různý (w/w).....	39
6.2.3	Velikost a PDI – stejný (w/w).....	40
6.2.4	Hodnocení EE a DLC – stejný (w/w).....	41
6.3	Porovnání nanočástic s PLGA 50:50 a PLGA A2	42
6.3.1	Velikost a PDI částic.....	42
6.3.2	Hodnocení EE	46
6.3.3	Hodnocení DLC	48
6.3.4	Disoluce	51
7.	Závěr	53
8.	Seznam použitých zkratk	54
9.	Seznam použitých obrázků	55
10.	Seznam použitých rovnic.....	56
11.	Seznam použitých grafů	57
12.	Seznam použitých tabulek	58
13.	Seznam použité literatury	59

1. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Školitel: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Posluchač: Martina Nekolová

Název diplomové práce: Polymerní nanočástice pro dodání ve vodě špatně rozpustných látek

Polymerní nanočástice představují moderní lékovou formu. Jedna z hlavních výhod je ovlivnění farmakokinetických vlastností podávané látky – např. zvýšení rozpustnosti ve vodě. Dále umožňují cílené dodání léčiva do postižené tkáně a tím minimalizovat nežádoucí účinky terapie. To by mohlo znamenat velký přínos pro léčbu nádorových nebo zánětlivých onemocnění. Cílová tkáň i používané nanočástice musí mít některé specifické vlastnosti. U částic je to například velikost a povrchový náboj.

Cílem této práce bylo připravit nanočástice s látkou ve vodě špatně rozpustnou, kterou představuje kurkumin. Částice byly připravovány metodou nanoprecipitace s různými typy kopolymeru kyseliny poly(mléčné-ko-glykolové) (PLGA). Použity byly dva typy polymeru PLGA - lineární a rozvětvený polykarboxylovou kyselinou. Připravené nanočástice byly porovnány na základě několika parametrů – velikost částic a jejich polydisperzita, enkapsulační efektivita (EE), drug-loading capacity (DLC) a disoluční profil. Bylo zjištěno, že PLGA 50:50 poskytuje nanočástice s větší velikostí, ale zároveň s větší polydisperzitou. Následně se hodnotila pomocí spektrofotometru EE a DLC. Vzorky s PLGA A2 obecně vykazovaly vyšší hodnoty EE a DLC. Zvyšováním hmotnosti použitého polymeru došlo sice k zvětšení velikosti částic, ale hodnoty EE a DLC zůstávaly nízké u obou polymerů – nezvětšovala se tedy schopnost částic enkapsulovat danou látku. Během disolučního testu bylo zjištěno, že větší množství kurkuminu se uvolňuje z částic z PLGA A2.

Klíčová slova: nanočástice, polymery, kurkumin, biodegradovatelnost, targeting

2. ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Mentor: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Student: Martina Nekolová

Title of thesis: Polymeric nanoparticles for poorly water-soluble drugs delivery

Polymeric nanoparticles represent a modern drug form. One of the main advantages is influencing the pharmacokinetic properties of the administered substance - e.g. increasing solubility in water. They enable the targeted delivery of the drug to the affected tissue and this way minimize adverse effects. This could be of great benefit to the therapy of cancer or inflammatory diseases. Both the target tissue and the nanoparticles must have some specific properties. For particles, it is, for example, size and surface charge.

The aim of this work was to prepare nanoparticles with a substance poorly soluble in water, represented by curcumin. The particles were prepared by the nanoprecipitation method with different types of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) copolymer. A 50:50 linear PLGA polymer and a branched PLGA A2 polymer were used. The prepared nanoparticles were compared on several parameters – particle size and polydispersity, encapsulation efficiency (EE), drug-loading capacity (DLC) and dissolution profile. PLGA 50:50 was found to provide nanoparticles with a larger size but at the same time with greater polydispersity. EE and DLC were evaluated by spectrophotometer. PLGA A2 samples generally showed higher EE and DLC values. Increasing the weight of the used polymer increased the size of the particles, but the EE and DLC values remained low for both polymers – so the ability of the particles to encapsulate the substance did not increase. During the dissolution test, it was found that a larger amount of curcumin was released from the PLGA A2 particles.

Key words: Nanoparticles, polymers, curcumin, biodegradability, targeting

3. Úvod a cíl práce

Nanotechnologie a tvorba nanočástic je ve farmacii čím dál častěji předmětem zkoumání. Tyto moderní lékové formy mohou pozitivně ovlivnit farmakokinetické vlastnosti léčiv. Velký potenciál je u protinádorových léčiv, u kterých může dojít ke snížení systémové toxicity, což by pro onkologické pacienty byl obrovský přínos.

Zároveň je třeba dodat, že ne všechny účinné látky jsou pro nanočásticové formulace vhodné. Pro targeting léčiva je potřeba, aby cílová tkáň měla nějaké specifické vlastnosti a tím se odlišovala od tkáně zdravé. Další výzvou jsou materiály, ze kterých jsou nanočástice připravené a celkové podmínky přípravy. Obecně je potřeba, aby byly neimunogenní a biokompatibilní. Dnes už je také většinou požadavek, aby byly i biodegradovatelné a tím pádem měly na organismus, co nejmenší zátěž.

Cílem práce je optimalizace podmínek přípravy nanočástic s obsahem ve vodě špatně rozpustné látky tak, aby měly všechny požadované vlastnosti. Materiálem pro přípravu byly různé typy kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové a použitá účinná látka byl kurkumin.

4. Teoretická část

4.1 Částicové systémy

V posledních letech nabývají částicové systémy na velkém významu v mnoha oborech. Především jde o oblast medicíny, farmacie a dalších chemických nebo biologických věd. Velký význam mají v oblasti výpočetní techniky a počítačovém inženýrství, ale můžeme se s nimi setkat i ve vědách zabývajících se životním prostředím, zemědělství nebo například v grafickém umění. [1]

Podle velikosti můžeme rozlišovat nanočástice a mikročástice. Při přípravě nedostáváme většinou jednotnou velikost všech částic. Pro nanočásticové systémy platí, že velikost částic je v rozsahu od 1 nm do 1000 nm. Pro mikročástice je pak určeno rozmezí od 1 μm do 1000 μm . V dalším textu se zaměřím hlavně na nanočástice a jejich farmaceutické využití jako nosiče léčiv. [1]

4.2 Polymerní nanočástice

Polymerní nanočástice představují sofistikovaný typ lékové formy. Umožňují snížit celou řadu nevýhod a nežádoucích účinků, které mohou nastat u klasických lékových forem a jejich způsobu podání. Zejména jde o zvýšení biologické dostupnosti, kdy nanočástice modifikují vlastnosti léčivé látky zvýšením rozpustnosti nebo usnadňují vstup přes biologické membrány. Nanočástice umožňují také cílenou distribuci léčiva a tím minimalizaci nežádoucích účinků. To se například může využívat v diagnostice i terapii nádorových onemocnění, kde se často využívají léčivé látky s velkou systémovou toxicitou. Dále se zkoumá jejich uplatnění v terapii zánětlivých onemocnění nebo například v očním lékařství. [2]

4.2.1 Typy polymerů pro přípravu

Pro přípravu nanočástic může být použita celá řada materiálů. Základním požadavkem je, aby byly biokompatibilní, biologické rozložitelné a neimunogenní. [2]

4.2.1.1 Přírodní polymery

Přírodní polymery se často využívají kvůli jejich velmi nízké toxicitě, biokompatibilitě a také kvůli nízkým nákladům na výrobu. Mohou mít mukoadhezivní vlastnosti, které se můžou využít pro delší setrvání léčiva v místě absorpce a tím zvýšit jeho biodostupnost. [3] Získávají se z živých organismů a můžeme je obecně rozdělit na polysacharidy, proteiny a nukleové kyseliny. [4]

Jeden z nejvíce využívaných polysacharidů je například chitosan a jeho deriváty. [4] Vzniká deacetylací chitinu a je složený z molekul glukosaminu a N-acetylglukosaminu. Přesné složení se může lišit, ale důležitý je požadovaný stupeň deacetylace. [5] Jeho struktura je významná pro elektrostatickou interakci se slizničním epitelem při perorálním podání. Při nižších hodnotách pH než je jeho pKa (6,5), tedy v oblasti žaludku a tenkého střeva, jsou aminové skupiny v jeho struktuře protonizované a můžou tak interagovat se záporně nabitými glykoproteiny v epitelu. Tím dochází k reorganizaci v těsných spojích a k jejich dočasnému otevření a k zvýšení absorpce léčiva, pro které slouží chitosan jako nosič. Chitosan lze využít jako platformu i pro vysoce hydrofilní léčiva, která jsou napojena opět přes elektrostatické interakce nebo vodíkové můstky. Chemické deriváty chitosanu se pak využívají v terapii tlustého střeva, kde už je vyšší pH než 6,5. Modifikovat se může například zavedením kvartérní amoniové, thiolové nebo polyethylenglykolové skupiny nebo navázáním jako ligand kyseliny hyaluronové či listové.

Dalším často využívaným polymerem pro přípravu nanočástic jsou algináty. [3] Získávají se z hnědých mořských řas a jsou odvozeny od kyseliny alginové. Jde o lineární polymerní polysacharid, který se skládá z polyuronových kyselin – hlavně ze zbytků kyseliny D-mannuronové a L-glukuronové. [5] Používají se zejména vápenaté nebo sodné soli kyseliny alginové. Podobně jako u chitosanu jsou tyto nosiče závislé na pH. Alginát sodný má schopnost tvořit gel v přítomnosti dvojmocného kationtu jako je například Ca^{2+} nebo Zn^{2+} , kdy dojde k iontové výměně. K tvorbě gelu a k následnému uvolnění léčiva dochází pouze v prostředí o vyšším pH, což je například ve střevní tekutině. Alginát se často využívá v kombinaci s dalšími polymery kvůli lepší předvídatelnosti a optimalizaci přeměny na gel. Jde třeba o chitosan nebo syntetický polymethakrylát.[3]

Pro přípravu nanočástic se využívají i různé proteiny. Díky jejich sekundární struktuře je možné připravit určité tvary nanočástic. Můžou se použít i polypeptidy o molekulové hmotnosti menší než 10 000, které pak odpovídají přirozeným proteinům a jejich vlastnostem. Zkoumaným nosičem jsou například hedvábné proteiny, a to konkrétně hedvábné fibroiny, které jsou produkovány hmyzem nebo pavouky, z nichž nejznámější je bourec morušový. Vyznačují se hlavně dobrými mechanickými vlastnostmi a dobře kontrolovanou strukturou. Dalšími hojně využívanými proteiny jsou kolagen a z něj získávaná želatina. Nevýhodou je ale slabá mechanická pevnost, a proto nanočástice na bázi želatiny vyžadují ještě další chemické úpravy. Dále se na přípravu používá albumin, rostlinné proteiny Zein a gliadin nebo mléčná bílkovina β -kasein. [4] Hlavní předností proteinů při přípravě nanočástic je jejich primární struktura, která obsahuje celou řadu funkčních skupin dostupných pro různé modifikace nebo pro samotné kovalentní navázání léčiva. [3]

4.2.1.2 Syntetické polymery

Hlavní výhodou syntetických polymerů je lepší kontrola jejich fyzikálně chemických vlastností během přípravy. Velký důraz se klade na biokompatibilitu, degradaci a popřípadě i možnou toxicitu degradačních produktů. Syntetizovaný polymer se pak hodnotí podle chemické struktury, rozpustnosti ve vodě a podle toho, zda je biologicky rozložitelný či nikoli. [3]

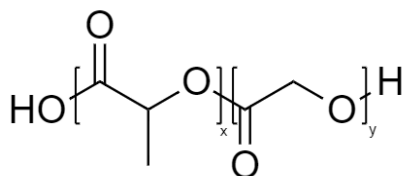
Biologicky nerozložitelné polymery pro přípravu nanočástic jsou v posledních letech na ústupu kvůli jejich možné chronické toxicitě, kdy dochází ke kumulaci v buňkách i v tkáních. Příkladem mohou být polymethakryláty. [6] Jedná se o deriváty kyseliny akrylové a methakrylové, které se připravují jejich kopolymerizací současně s jejich estery. Jsou známé pod obchodním názvem Eudragit[®] a na trhu existuje více druhů. [5] Ve farmaceutické technologii se využívají jako potahový materiál pro různé lékové formy a hrají roli v řízeném uvolňování léčiva. Může jít o zpožděné nebo prodloužené uvolňování podle toho, jaký typ a v jaké vrstvě se Eudragit[®] použije. Využívají se také jako ochrana tablet nebo tobolek před vnějšími vlivy nebo k maskování nepříjemné chuti a zápachu. [7]

Mnohem větší význam mají pak polymery biologicky rozložitelné. Chemicky jde o alifatické polyestery a jejich kopolymery. Jejich hlavní výhodou je úplná

hydrolytická nebo enzymatická degradace na jednoduché molekuly a následná eliminace z organismu především renálně. [3] Jejich přehled pak uvádím níže.

4.2.1.2.1 *Poly(α -hydroxylové kyseliny)*

Řadíme se poly(mléčnou kyselinu) (PLA), kyselinu poly(glykolovou) (PGA) a jejich kopolymer – kyselinu poly(mléčnou-ko-glykolovou) (PLGA) (Obrázek 1). Pro přípravu nanočástic se využívá hlavně PLA a PLGA. Díky esterové vazbě podléhají v organismu ve vodném prostředí snadno hydrolytické degradaci na kyselinu mléčnou a glykolovou. [6] Ty pak vstupují do citrátového cyklu, kde se metabolizují a tím dochází k jejich jednoduché eliminaci z těla ve formě oxidu uhličitého a vody. [8]



Obrázek 1: Struktura PLGA

$x = \text{počet molekul kyseliny mléčné}, y = \text{počet molekul kyseliny glykolové}$

Další výhodou použití PLGA nebo PLA je jejich flexibilita a snadná kontrola fyzikálně chemických vlastností. Může jít o tvar a velikost částic, molekulovou hmotnost a také poměr zastoupení kyseliny mléčné a glykolové v kopolymeru (poměr LA:GA). Tím můžeme optimalizovat farmakokinetické vlastnosti a rychlost degradace částic. [9] Na trhu je dnes dostupná celá řada PLGA s různým poměrem LA:GA, který nám říká, kolik procent kyseliny mléčné a glykolové je v kopolymeru obsaženo. PLGA s větším obsahem kyseliny mléčné ve struktuře jsou více hydrofobní než PLGA s větším obsahem kyseliny glykolové. Je to díky methylové skupině v molekule kyseliny mléčné navíc ve srovnání s glykolovou kyselinou. Tím, že jsou tyto kopolymery méně hydrofilní, tak i méně interagují s vodou a následně je jejich degradace zpomalena. [8]

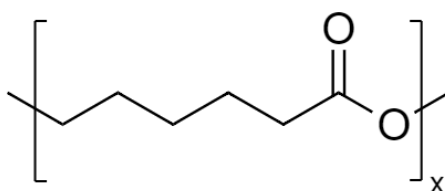
Delší degradační doba může být i u částic s vyšší molární hmotností nebo u polymerů, které nejsou amorfní, např. PLA. Obecně je proces degradace ovlivněn

řadou faktorů – například způsobem přípravy, velikostí a tvarem částic, dalšími vlastnostmi jako je krystalinita a teplota skelného přechodu. Závísí i na parametrech prostředí, kde degradace probíhá, jakou má teplotu, pH nebo iontovou sílu. [8]

Prvním schváleným systémem americkou FDA na základě PLGA byl v roce 1989 přípravek Lupron[®] Depot od farmaceutické společnosti TAP. Skládá se z účinné látky leuprolidacetátu a PLGA je v poměru LA:GA 75:25. Znamená to tedy, že v polymeru je zastoupeno 75% kyseliny mléčné a 25% kyseliny glykolové. Použití bylo schváleno na léčbu karcinomu prostaty a endometriózy. [9]

4.2.1.2.2 *Poly(ε-kaprolakton) (PCL)*

Jde o alifatický hydrofobní polyester, který se v organismu hydrolyzuje na ε-kaprolakton. Tento vedlejší produkt se pak metabolizuje v krvi nebo v žaludku na 6-hydroxyhexanovou kyselinu, která je dobře rozpustná ve vodě a může být snadno eliminována renálně. Protože je PCL (Obrázek 2) více hydrofobní než například PLGA, dochází k absorpci vody pomaleji a tím k pomalejší degradaci. [6]

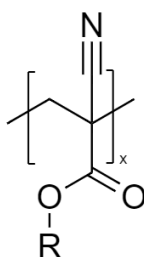


Obrázek 2: Struktura PCL

Delší setrvání polymeru v organismu má za následek také jeho semikrystalická struktura kvůli jeho vyšší teplotě tání a nízké teplotě skelného přechodu. Toho může být využito k pomalejšímu uvolnění léčiva v řádu dnů až měsíců. Naopak pro rychlejší degradaci se připravují blokové kopolymery PCL s dalšími hydrofilními polymery. Může jít například o poly(ethylenglykol) (PEG), který tvoří v kopolymeru vnější hydrofilní plášť okolo hydrofobního jádra PCL. [10]

4.2.1.2.3 Poly(alkylkyanoakryláty) (PACA)

Kyanoakryláty se skládají z akrylových monomerů (Obrázek 3). Americká FDA schválila například poly ethyl, n-butyl nebo oktyl kyanoakrylát. Opět k jejich degradaci dochází přes esterovou vazbu na alkylalkohol a poly(kyanoakrylovou kyselinu), která je rozpustná a může být vyloučena močí. Dalším mechanismem, kterým se potenciálně může PACA degradovat je tzv. inverzní Knoevenagela kondenzační reakce. Při této reakci pak mohou vzniknout toxické produkty jako alkylkyanoacetát a formaldehyd. Tento metabolický proces probíhá ale pomalu a většinou ne při fyziologickém pH. [6]



Obrázek 3: Struktura PACA

4.2.2 Metody přípravy nanočástic

Obecně se rozlišují dva způsoby metod přípravy nanočástic. První možný způsob je tzv. odspodu nahoru neboli „bottom to top“. Principem těchto metod je spojování monomerů až k polymeru. Příkladem jsou polymerizační reakce, konkrétně se nejčastěji provádí emulzní polymerace. Druhý způsob je založený na principu tzv. odshora dolů neboli „top to bottom“. [11] Nanočástice jsou syntetizovány z předem dostupného polymeru a stručně řečeno se jednotlivé částice vhodným způsobem zmenšují. [12]

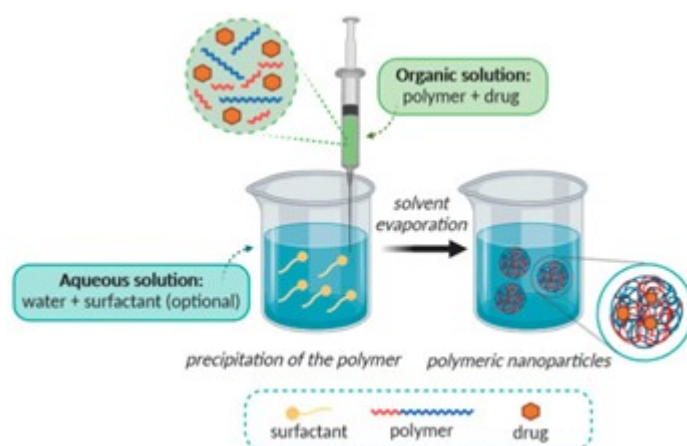
Dále se budu zabývat popisem hlavně těchto metod založených na principu „top to bottom“. Nanoprecipitace je použita v experimentální části práce a její popis bude proto podrobnější.

4.2.2.1 Nanoprecipitace

Nanoprecipitace se v některých zdrojích může označovat i jako metoda vytěšňování rozpouštědla. Jde o poměrně jednoduchý a dobře reprodukovatelný způsob přípravy nanočástic. [9] Většinou se touto metodou připravují částice s hydrofobními léčivými látkami, ale lze ji upravit i pro látky hydrofilní. Základní princip je, že se polymer a daná léčivá látka rozpustí v semipolárním rozpouštědle, které je mísitelné s vodou. Následně se přímo napipetuje nebo přidává po kapkách za stálého míchání do vodné fáze, kde je rozpuštěna povrchově aktivní stabilizující látka. Nanočástice vznikají ihned vytěšněním, neboli také difúzí rozpouštědla. Za sníženého tlaku se pak rozpouštědlo postupně odpařuje. [12] Metoda se dá uskutečnit také napipetováním nebo postupným přidáváním vodné fáze do organické, kde je dispergován polymer a léčivá látka. [9]

Okamžitý vznik nanočástic se na molekulární úrovni vysvětluje složitými mezifázovými hydrodynamickými jevy, kdy mezi dvěma kapalinami vznikají mezifázové turbulence, které se řídí podle Marangoniho efektu. [13] Proces nanoprecipitace závisí na mnoha variabilních faktorech popsaných níže. Hledání vhodné kombinace léčivé látky, rozpouštědla a polymeru, aby došlo k vytvoření nanočástic a zároveň k optimálnímu zachycení léčiva, se ukázalo jako jedna z hlavních nevýhod této metody. [14]

Schématický průběh nanoprecipitace popisuje Obrázek č. 4. [19]



Obrázek 4: Schématické znázornění metody nanoprecipitace [19]

4.2.2.1.1 Volba rozpouštědla

Výběr rozpouštědla má vliv na velikost vzniklých částic a na zachycení dané léčivé látky. Pro tvorbu nanočástic se může využít například aceton, acetonitril, dimethylacetamid, dimethylformamid, dimethylsulfoxid, 2-pyrrolidon, N-methyl-2-pyrrolidon nebo tetrahydrofuran. [9] Používají se i rozpouštědla jako methanol, ethanol nebo dichlormethan a chloroform. Nejčastěji se volí směs rozpouštědel v různém poměru. Optimální poměr a složení směsi rozpouštědel je často předmětem zkoumání a závisí na inkorporované látce. [12] V některých případech došlo k ovlivnění velikosti částic směsí rozpouštědel acetonu s dichlormethanem. Právě dichlormethan zapříčinil větší velikost, a navíc je jako typické chlorované rozpouštědlo toxický. [14] Další zvětšení částic bylo pozorováno například při použití tetrahydrofuranu oproti rozpuštění v acetonu nebo v acetonitrilu. Pravděpodobně díky vyšší viskozitě a nižšímu difúznímu koeficientu tetrahydrofuranu vznikají částice o větším rozměru. [13] Jedno z nejvýhodnějších rozpouštědel, které se často využívá i samostatně, je právě aceton, a to zejména kvůli jeho netoxicitě. [9] Dalšími výhodnými parametry acetonu mohou být nízká viskozita a vyšší difúzní koeficient, který má za následek jeho rychlejší difuzi. [13]

4.2.2.1.2 Volba polymeru

V první řadě je důležitý samotný výběr polymeru, který ovlivní celkové vlastnosti a strukturu vytvořených částic. Záleží i na tom, kde potřebujeme uplatnit nanočásticové systémy a na základě toho vytvořit kombinaci polymeru a léčivé látky. Nejvíce se uplatňuje PLGA, ale bylo zjištěno, že například pro aplikaci nanočástic do mozkové tkáně jsou výhodnější částice na bázi PACA. [12]

Jak již bylo zmíněno, vliv na výsledné nanočástice má i složení daného polymeru. V případě polymeru PLGA je to poměr LA:GA, a tím pádem i různá rychlost uvolňování léčiva. Poměr LA:GA v kopolymeru může mít vliv také na velikost částic. Bylo zjištěno, že mnohem větší vliv na výslednou velikost částic má ale molekulová hmotnost kopolymeru, bez ohledu na jeho LA:GA poměr. [12]

Často se uplatňují i různé modifikace koncových skupin. [15] PLGA může být zakončeno karboxylovou nebo esterovou skupinou. [16] V případě karboxylové skupiny se daná léčivá látka může konjugovat přímo s touto koncovou skupinou - například u doxorubicinu. [15]

Dále se při přípravě uplatňuje vliv molekulové hmotnosti a koncentrace polymeru. Pokud použijeme polymer s nižší molekulovou hmotností, dostaneme menší částice, ale enkapsulace léčiva bude také nižší. U vyšší koncentrace polymeru pak získáme opačný jev. Částice tedy budou mít větší rozměry, a tím se do částic dostane i více léčivé látky. Velikost částic a jejich enkapsulační efektivita, tedy kolik léčiva se zapouzdřilo do částice, jsou dvě nejdůležitější vlastnosti nanočástic, které se hodnotí. [15]

4.2.2.1.3 Volba surfaktantu

Nejčastěji se pro tvorbu nanočástic používají povrchově aktivní poloxamery a poloxaminy. [12] Jsou to kopolymery složené z hydrofilních částí polyoxyethylenu a z hydrofobních částí polyoxypropylenu. Na trhu se vyskytuje celá řada poloxamerů, které jsou podobné chemickým složením. Odlišují se jen zastoupením polyoxyethylenu a polyoxypropylenu v molekule, které je vyjádřeno i v samotném názvu. Objevují se buď označené jako poloxamery nebo pod obchodním názvem např. Pluronic[®]. Písmeno za názvem označuje jeho fyzikální formu. Když první dvě číslice za názvem vynásobíme 100, získáme průměrnou molekulovou hmotnost polyoxypropylenové složky a třetí číslice po vynásobení 10 odpovídá molekulové hmotnosti polyoxyethylenové části. [5] Jako příklad uvádím poloxamer 407 použitý v experimentální části – Pluronic[®] F-127.

Při nanoprecipitaci působí jako stabilizátory vodné fáze, do které se vstříkuje fáze organická. Pokud jsou surfaktanty použity ve vhodné koncentraci, brání agregaci polymeru a tím napomáhají ke tvorbě nanočástic. Při vyšší koncentraci povrchově aktivní látky (PAL) může dojít k její interakci s léčivou látkou. Množství enkapsulovaného léčiva do částic by pak bylo nižší. Naopak pokud použijeme příliš nízkou koncentraci PAL, ke tvorbě nanočástic nemusí dojít vůbec. [15]

Byl pozorován také vliv hydrofilně-lipofilní rovnováhy (HLB) surfaktantu na velikost částic. [12] Hodnota HLB je poměr molární hmotnosti hydrofilní části molekuly a celkové molární hmotnosti. Čím je tedy tato hodnota větší, tím je i celá molekula více hydrofilní. [17] Částice připravené s více hydrofobními PAL, tedy s nižší hodnotou HLB, měly větší velikost. Naopak pokud byly použity PAL s vyšší hodnotou HLB, částice vykazovaly menší velikost. [12]

4.2.2.1.4 Poměr organické a vodné fáze

Význam na velikost a množství enkapsulovaného léčiva má i poměr vodné a organické fáze během přípravy. Větší objem vodné fáze má za následek i větší velikost částic. Je to díky rychlejší difúzi rozpouštědla rozpustného ve vodě. Množství zachyceného léčiva se snižuje s větším objemem vodné fáze. Vysvětluje se to tím, že může dojít ke ztrátám léčivé látky rozpuštěním ve vodné fázi, které je více. Svůj význam má i rychlejší míchání během odpařování rozpouštědla, kdy se usnadní jeho difúze a opět můžeme dostat větší částice. [18]

4.2.2.2 Emulzní odpařovací metoda

Je to nejstarší metoda, která byla použita pro tvorbu polymerních nanočástic. Podobně jako u nanoprecipitace se nejdřív vytvoří dvě fáze – organická a vodná. Organická fáze, která je nemísitelná s vodou, se skládá z rozpuštěného polymeru a dispergované léčivé látky. Často se používala toxická rozpouštědla jako například dichlormethan a chloroform, ale postupně se nahrazují ethylacetátem. Ve vodné fázi je pak opět rozpuštěna PAL, například částečně hydrolyzovaný polyvinylacetát. Organická fáze je poté emulgována ve vodné a ultrazvukem nebo vysokorychlostní homogenizací se získá emulze částic o/v. Pak přichází na řadu odpařování rozpouštědla. Při použití chlorovaných rozpouštědel se odpařuje za sníženého tlaku. Ethylacetát lze odpařit za normálního tlaku při pokojové teplotě na magnetické míchačce. Následně dostaneme suspenzi solidifikovaných nanočástic, která se může dále zpracovávat. [19]

4.2.2.3 Emulzní difúzní metoda

Opět máme u této metody organickou fázi, kde je rozpuštěn polymer ve vhodném rozpouštědle, které je částečně mísitelné s vodou. V tomto případě to může

být benzylalkohol, ethylacetát nebo propylenkarbonát. Vodná fáze představuje opět roztok PAL, do které se emulguje organická fáze. [12] Tvorba nanočástic probíhá při ředění vzniklé emulze vodou. Tím dojde k difúzi rozpouštědla z dispergovaných kapek emulze do vnější fáze a zároveň k opačné difúzi vody směrem do kapek, tedy do fáze vnitřní. Běžně se metodou získávají spíše nanosféry, což je matricový typ částic, kdy léčivá látka je na povrchu adsorbována nebo zadržena uvnitř v polymerní síti. Pokud se do organické fáze přidá malé množství triglyceridů, může vzniknout jiný strukturní typ částic a to jsou tzv. nanokapsle. Tento typ je rezervoárový – účinná látka je rozpuštěna v olejovém jádře a okolo je obal z polymeru, který řídí uvolňování látky z jádra. [19]

4.2.2.4 Metoda vysolování

Složení organické fáze je stejné jako u předchozích metod. Rozpouštědlem může být například aceton. Rozdíl je ve vodné fázi, kde je kromě PAL také sůl, která není rozpustná v organické fázi. Ve vyšších koncentracích se používá hexahydrát chloridu hořečnatého nebo tetrahydrát octanu hořečnatého. Kvůli obsažené soli nedojde k difúzi rozpouštědla a k vytvoření emulze. Přidáním vody se pak rozpouštědlo, které je při vysoké koncentraci elektrolytu s vodou nemísitelné, dostane do vodné fáze a tím vzniknou nanočástice. [12]

4.3 Cílená distribuce nanočástic

Cílená distribuce částic, neboli také targeting, umožňuje například zpožděné uvolnění léčiva tak, aby se prodloužila doba jeho působení a tím jeho terapeutický efekt. [20] Hlavní výhodou je ale uvolnění léčiva přímo v cílové tkáni. Toho se využívá hlavně v terapii nádorových onemocnění. Konvenční chemoterapeutika nejsou často specifická a tím poškozují zdravou tkáň, což vede k celé řadě závažných nežádoucích účinků. Například k nevolnosti, neplodnosti, imunosupresi nebo k tvorbě metastáz. Toxicita těchto léčivých látek může omezit i jejich délku použití. Konkrétně derivát antracyklinu epirubicin, který se používá pro léčbu hepatocelulárního karcinomu, vykazuje velkou srdeční toxicitu, proto je jeho použití omezeno. Je tedy snaha vyvinout efektivnější a bezpečnou léčbu tohoto karcinomu

jater, která může spočívat právě v targetingu pomocí nanočástic. Cílená distribuce a využití nanočástic má význam i pro zlepšení biofarmaceutických vlastností léčiv. Jedná se například o ve vodě špatně rozpustná léčiva, pro která nanočástice slouží jako platforma a zabraňuje jejich agregaci ve vodném prostředí. Při intravenózním podání těchto ve vodě téměř nerozpustných látek by mohlo shlukování vést až k embolizaci. [21]

Rozlišují se dva mechanismy cíleného dodání – pasivní a aktivní targeting. [20]

4.3.1 Pasivní targeting

Pasivní cílení nanočástic je založené na jejich fyzikálně – chemických vlastnostech. Jedná se hlavně o velikost částic, povrchový náboj, hydrofobní vlastnosti nebo o celkové složení. Vliv na dosažení cílové tkáně má i způsob podání a celkový zdravotní stav pacienta. [6]

Podle způsobu podání musí nanočástice projít přes různé biologické bariéry. Obecně nejrychlejší a nejsnadnější způsob je intravenózní podání. Když se částice dostanou do krevního řečiště podléhají procesu opsonizace. Tedy k adsorpci proteinů na povrch nanočástic, které se nacházejí v plazmě. Tento proces je následně důležitý pro rozpoznání a vychytávání mononukleárně fagocytickým systémem (MFS) a jejich eliminaci. [22] Zahrnuje jak makrofágy na periférii, tak makrofágy jater, tzv. Kupfferovy buňky nebo sleziny. Na opsonizaci mají vliv fyzikálně chemické vlastnosti částic. Jejich modifikací můžeme prodloužit dobu oběhu v krvi a tím se může dostat větší množství léčiva na cílové místo. Například hydrofobní povrchy jsou opsonizovány rychleji a dřív se tak dostanou do procesu eliminace pomocí MFS. Na jejich povrch se proto zavádí hydrofilní PEG a tím se zvýší doba cirkulace z minut až na hodiny v závislosti na délce a rozvětvení řetězce. PEG stericky brání vazbě proteinu na nanočástice. [22]

Dalším důležitým parametrem je velikost částic. Větší částice, neboli mikročástice, o průměrné velikosti 6-10 μm nemají schopnost aktivovat MFS a z oběhu se dostávají až filtrací v plicním řečišti. Toho se s výhodou využívá při terapii rakoviny plic, kdy je omezená jejich kapacita a nemá význam inhalační podání. Částice menší než 6 μm jsou MFS vychytávány. [6] V játrech se pak můžou

kumulovat částice, které jsou větší více než 50 nm. Ledvinami se vylučují částice menší než 10 nm. Udává se, že optimální velikost nanočástice, aby nebyla rychle eliminována, by měla být mezi 10 a 50 nm. [21]

Nabité částice jsou pro makrofágy také snadnější cíl, ať už záporně nebo kladně nabitě. [23] Obecně se tedy dá říct, že nanočástice, které jsou hydrofobní s povrchovým nábojem a s velikostí alespoň 100 nm jsou rychle opsonizovány a následně nahromaděny v makrofázích MFS v játrech nebo slezině a jejich pomocí degradovány. Tato vlastnost může být výhodná, pokud potřebujeme zacílit jeden z těchto orgánů, jak je popsáno níže. [22]

4.3.1.1 Cílená distribuce do jater

Chronické onemocnění jater může být následkem různých metabolických a autoimunitních poruch, virové chronické hepatitidy nebo abúzu alkoholu. Takové poškození může vést až k cirhóze jater nebo hepatocelulárnímu karcinomu. Játra jsou složena z parenchymatických buněk, což jsou základní stavební buňky jater a jedná se hlavně o hepatocyty. V menší míře jsou pak zastoupené neparenchymatické buňky, které zastupují okolo 6,5 % celkového objemu jater. Jsou to hlavně makrofágy (v játrech Kupfferovy buňky), jaterní stelátové buňky a jaterní endoteliální buňky. Všechny tyto buňky se podílí na onemocnění jater a můžou být tak potenciálním cílem pro nanočástice. [24]

Jaterní stelátové buňky, označované jako Itovy buňky, se nachází v tzv. perisinusovém prostoru mezi fenestrovaným jaterním endotelem a epiteliálními hepatocyty. Fyziologicky je jejich hlavní funkcí skladování vitamínu A ve formě lipidových kapek. Při poškození jater se tyto buňky aktivují a začnou syntetizovat složky extracelulární matrix – jako je kolagen, proteoglykan, glykosaminoglykan a glykoprotein. Tím je narušena architektura jater a dochází k rozvoji fibrózy. [25]

Současně dochází i k produkci prozánětlivých cytokinů. Mezi hlavní patří růstový faktor odvozený od krevních destiček (PDGF) a transformační růstový faktor β (TGF- β). [26] Vylučování cytokinů také nastává po aktivaci zánětlivého komplexu v makrofázích. Makrofágy se aktivují, tzv. polarizují, a tím je ovlivněno, jaký druh cytokinů uvolňují. Obecně můžeme aktivované makrofágy rozdělit na prozánětlivé, tzv. M1 buňky a protizánětlivé M2 buňky. U zánětlivých onemocnění převládají

M1 buňky a uvolňují se dva základní prozánětlivé cytokiny – interleukin 1 β (IL1 β) a tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α). M2 buňky se uplatňují u alergie, nádorového onemocnění nebo při pozdějším stupni zánětu. Uvolňované protizánětlivé cytokiny potlačují produkci těch prozánětlivých. Nejvýznamnější je interleukin 10 (IL10). Právě nanočástice umožňují ovlivnit polarizaci makrofágů směrem k M2 buňkám během zánětu a tím zabránit dalšímu rozvoji onemocnění, proto probíhá jejich targeting přímo na makrofágy. [24] Zacílit lze i na jaterní stelátové buňky. Časné zabránění rozvoji zánětlivé reakce a fibróze vede pak i k zabránění dalším komplikacím. Jako jsou cirhóza, portální hypertenze, selhání jater nebo až hepatocelulární karcinom. [26]

4.3.1.2 Cílená distribuce do nádorové tkáně

Pasivní targeting do nádorové tkáně využívá některé její charakteristické vlastnosti. Například je to nadměrná vaskularizace nádoru a vaskulární permeabilita. Endotel cév v tumoru je tvořen velkými fenestracemi a chybí hladké svalstvo a inervace. Receptory pro různé vazoaktivní látky často nefungují správně a navíc je uvolňována řada dalších látek, které permeabilitu podporují – např. oxid dusnatý, bradykinin nebo prostaglandiny. [27] Nadměrná permeabilita je potřebná pro dostatečný příjem kyslíku a dalších živin, které jsou využívány pro rychlou proliferaci nádorových buněk. Důležitá je taky absence lymfatické drenáže nebo popřípadě utlačování lymfatických cest proliferující rakovinovou tkání. Díky tomu se nanočástice mohou hromadit přímo v nádorové tkáni. Tento jev se označuje jako efekt zvýšené permeability a retence (enhanced permeability and retention, EPR). [21]

Zde se také může uplatnit i náboj částic. Kationtové nanočástice, konkrétně liposomy, se vážou pomocí elektrostatických sil na fosfolipidy nesoucí záporný náboj, které jsou umístěny na endoteliálních buňkách nádorové tkáně. [28]

4.3.2 Aktivní targeting

U aktivního targetingu se využívá přímá interakce receptoru na cílových buňkách s biologickým ligandem, který je navázán na nanočásticovém nosiči, kde je zabudována i daná účinná látka. Ligand může být napojen přes chemickou vazbu

nebo fyzikálně adsorbován na povrchu částic po jejich přípravě. Existuje i možnost, že ligand je navázaný na některou složku částice ještě před její samotnou tvorbou. Nejčastěji je to na polymer a jako ligand je možné použít například proteiny, peptidy, nukleové kyseliny, polysacharidy nebo různé malé molekuly. [20]

Použití proteinů představuje hlavně protilátky. V současné době se zkoumá spíš použití jejich fragmentů. Prvním důvodem je jejich menší velikost. Dalším pak to, že jsou více specifické pro daný cíl a neobsahují oblast, která by mohla aktivovat komplement a spustit tak imunitní reakci. Zároveň imunitní reakci může odstartovat i původ protilátek, proto se osvědčilo použití jen lidských protilátek. Dalším problémem může být i samotná konjugace protilátky s nanočásticí, která se nejčastěji používá za pomoci linkeru PEG. Pokud jsou konjugovány náhodně, může dojít ke sterickému bránění a nemožnosti navázání protilátky na cílový receptor. Protilátky se často využívají samy o sobě jako účinné látky pro terapii nádorových onemocnění. [28]

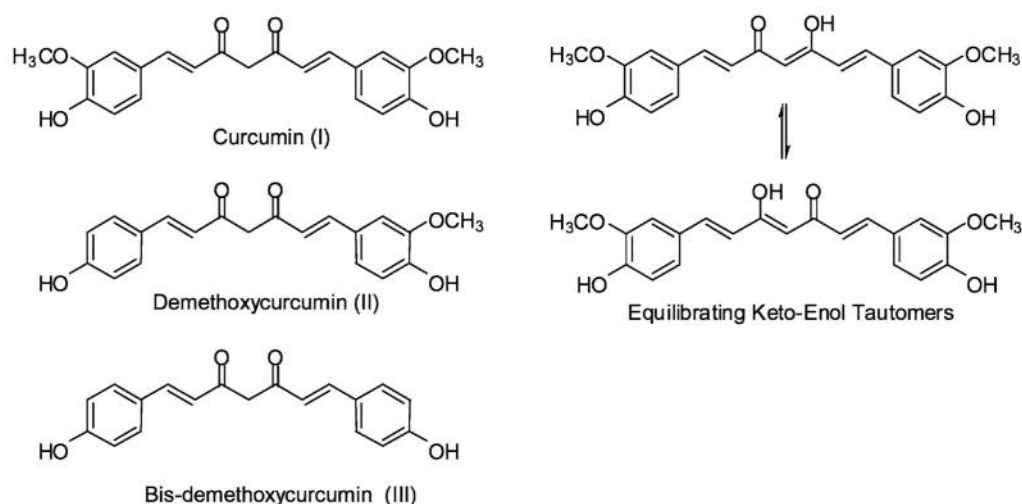
Dále se k cílení může použít například glykoprotein transferin (TF), který je nezbytný pro transport železa. [20] Po navázání TF na jeho receptory dojde k endocytóze a následně je železo disociováno. TF receptory jsou exprimovány v nádorové tkáni, protože mají zvýšenou potřebu železa. [28] Nanočástice modifikované TF se můžou použít například k terapii nádorových onemocnění mozku, kdy mají schopnost, po navázání na TF receptory, proniknout přes hematoencefalickou bariéru.

Mezi nukleové kyseliny (NK) můžeme řadit tzv. aptamery, což jsou krátké NK o několika nukleotidech. Zkoumalo se využití aptameru AS-1411, který se váže na protein nukleolin. Ten je obsažen na povrchu buňky, v cytoplazmě nebo v jádru a usnadňuje tak vstup nanočástic do jádra rakovinných buněk. [20]

Jako poslední uvádím zástupce malých molekul, a to kyselinu listovou. Váže se na folátové receptory a je důležitá pro syntézu purinových a pyrimidinových bází. Nanočástice, která je připojena k ligandu kyseliny listové projde endocytózou do cytoplazmy buňky. Folátové receptory jsou opět nadměrně exprimovány na nádorových rychle proliferujících buňkách. Na rozdíl od zdravých buněk můžou do nádorových přejít i konjugáty kyseliny listové. Tento typ ligandu se často používá kvůli své nízké ceně, stabilitě a vysoké afinitě. [28]

4.4 Kurkumin

Účinnou látkou použitou v experimentální části je kurkumin. Je to polyfenolová sloučenina získaná z rostliny *Curcuma longa* a může se označovat i jako diferuloylmethan. [29] Jeho struktura byla potvrzena a následně syntetizována v roce 1913. V extraktu kurkumy můžeme najít zastoupení těchto tří struktur, z nichž číslo I, kurkumin, je zastoupen nejhojněji (Obrázek 5). Kurkumin vykazuje enol-tautomerii, jak je ukázáno na vedlejší struktuře. [30]



Obrázek 5: Struktury v kurkumě [30]

Je špatně rozpustný ve vodě, v methanolu jen omezeně rozpustný a v chloroformu a dimethylsulfoxidu (DMSO) je dobře rozpustný. Právě jeho špatná rozpustnost je důvodem jeho malé biologické dostupnosti, a proto se hledají řešení, jak ji zvýšit. [30] U nanoformulací kurkuminu bylo zjištěno, že zvyšují jeho rozpustnost a také ho chrání před hydrolyzou a inaktivací. Jako nosiče byly studovány liposomy, pevné lipidické nanočástice, cyklodextriny, nanogely, nanoemulze nebo polymerní nanočástice. [29]

U kurkuminu byly prokázány protizánětlivé, antimikrobiální, antioxidační a neuroprotektivní účinky. [29] Tyto účinky se proto zkoušely u mnoha různých chorob. Šlo například o různé neurologické poruchy – migréna, roztroušená skleróza,

schizofrenie, deprese. Vliv byl prokázán u kardiovaskulárních a metabolických onemocnění. Například jde o ischemickou chorobu srdeční, diabetes mellitus II. typu a jeho komplikace nebo celkově metabolický syndrom. Pozitivní efekt může mít i u některých nádorových nemocích, osteoartrózy nebo na nemoc COVID-19. [31] Další studium vytvořených polymerních nanočástic s kurkuminem v experimentální části práce by bylo zaměřeno na terapii nealkoholového ztukovatění jater (non alcoholic fatty liver disease, NAFLD).

4.5 NAFLD

Dnes už se také toto onemocnění nazývá jako metabolické tukové onemocnění jater a nevyklučuje nadměrné užívání alkoholu ve své definici. Patří mezi nejčastější onemocnění jater a jeho neléčení může vést až k hepatocelulárnímu karcinomu, jak bylo zmíněné výše. NAFLD je spojováno s obezitou, diabetem mellitem II. typu a z nich plynoucí kardiovaskulárních chorob. Prevalence onemocnění se stále zvyšuje a s tím i náklady na léčbu. Jde o multifaktoriální onemocnění a mezi hlavní faktory patří nadměrně kalorická strava, nedostatek fyzické aktivity a celkově nesprávný životní styl. [32]

Mechanismus steatózy jaterní tkáně a následně rozvoj zánětlivé reakce byl již popsán. Na vzniku NAFLD se podílí také lipotoxicita, která právě spouští aktivaci makrofágů. V játrech se vyskytuje velké množství volných mastných kyselin (MK), které jsou získávány ze stravy, nadměrné lipolýzy tukové tkáně nebo syntézy ze sacharidů nebo jiných prekurzorů. Volné MK jsou přeměněny na triglyceridy a zabudovány do lipoproteinů s velmi nízkou hustotou (VLDL) a následně transportovány z jater. Při rozvoji NAFLD dochází k nerovnováze mezi příjmem MK a jejich exportem. Lipidy se tak akumulují v játrech. Rozvíjí se stres endoplazmatické retikula, oxidační stres a mimo jiné dochází i k aktivaci Kupfferových buněk a k produkci prozánětlivých cytokinů. Lipotoxicita vede dále k dysfunkci mitochondrií a ke zvýšenému množství reaktivních forem kyslíku, které se také podílí na rozvoji steatohepatitidy. Toto všechno vede k aktivaci jaterních stelátových buněk a k produkci extracelulární matrix. [32]

5. Experimentální část

5.1 Použité suroviny

- Aceton (Penta, ČR)
- Čištěná voda (připravená reverzní osmózou, FaF UK Hradec Králové)
- DMSO (Penta, ČR)
- Kurkumin (Sigma-Aldrich, Čína)
- **PLGA A2** - kopolymer PLGA větvený na 2% polyakrylové (Faf UK Hradec Králové, doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.)
- **PLGA 50:50** – kopolymer PLGA s LA:GA poměrem 50:50, Purasorb[®] PDLG 5002A (Corbion, Holandsko)
- Poloxamer 407 – Pluronic[®] F-127 (Sigma Aldrich, Německo)
- Polysorbát 20 - Tween[®] 20 (Sigma-Aldrich, USA)

5.2 Použité přístroje

- Analytické váhy (Ohaus, Švýcarsko), max. 210 g, d=0,1 mg
- Magnetická míchačka IKA-WERKE RT5 Power (IKA, Německo), 100-1000 otáček/min
- Mini Vortexer (Heathrow Scientific, USA)
- Centrifuga MPW 260R (MPW Medical Instrument, Polsko)
- Spektrofotometr Specord 205 (Jena Analytik, Německo)
- Třepací vodní lázeň GFL 1083, GFL (Burgwedel, Německo)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin electronic, Německo)
- Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Panalytical, UK)

5.3 Použité metody

5.3.1 Příprava nanočástic

Nanočástice byly připravovány metodou nanoprecipitace, která byla popsána v kapitole 2.2.2.1.

5.3.1.1 Příprava vodné fáze

Vodná fáze byla připravena rozpuštěním povrchově aktivní látky v čištěné vodě. Jedná se o 0,1% roztok poloxameru 407 (Pluronic® F-127). Na analytických vahách bylo naváženo požadované množství poloxameru a následně rozpuštěno v odpovídajícím množství čištěné vody při laboratorní teplotě za stálého míchání na magnetické míchačce.

5.3.1.2 Příprava organické fáze

Pro přípravu organické fáze byly použity roztoky PLGA a kurkuminu v acetonu. Používaly se dva typy kopolymeru – PLGA 50:50 a PLGA A2. Navážené požadované množství PLGA ve vialkách bylo rozpuštěno v 1 ml acetonu za použití Mini Vortexeru nebo ultrazvukové lázně. Po rozpuštění byl celý objem napipetován k naváženému množství kurkuminu a opět rozpuštěn. Všechny vzorky byly připraveny v duplikátech.

5.3.1.3 Proces nanoprecipitace

Samotný proces nanoprecipitace probíhal tak, že se do kádinek rozpipetovalo 10 ml vodné fáze. 1 ml organické fáze byl napipetován od každého vzorku v jednom kontinuálním kroku do vodné fáze. Ke vzniku částic došlo bezprostředně po smísení vodné a organické fáze. Směs organické a vodné fáze se pak opět za stálého míchání nechala odpařovat alespoň 1,5 hodiny. Během této doby došlo k odpaření acetonu. Poté se odpařené vzorky přefiltrovaly přes filtr o velikosti pórů 1,2 μm s cílem odstranit případné vzniklé krystaly kurkuminu. Vzorky se následně rozdělily za pomoci pipety stejným dílem do mikrozkušavek typu Eppendorf. Všechny vzorky byly připraveny v duplikátech.

5.4 Charakterizace nanočástic

Připravené nanočástice byly hodnoceny na základě několika charakteristik:

5.4.1 Stanovení velikosti částic a indexu polydisperzity

Velikost částic byla měřena pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS90. Přístroj funguje na základě dynamického rozptylu světla (dynamic laser scattering = DLS).

Index polydisperzity (PDI) představuje rozložení velikostí jednotlivých částic ve vzorku. Byl měřen stejně jako velikost částic na přístroji Zetasizer Nano ZS90. Pokud se hodnota PDI nachází kolem 0,1 můžeme soustavu považovat za monodisperzní, tzn. že částice jsou stejně velké. Teoreticky monodisperzní systém představuje nulová hodnota PDI. [33]

5.4.1.1 Příprava a měření vzorku

Po odpaření acetonu se všechny vzorky filtrovaly pomocí filtrů o velikosti 1,2 μm . Vzorky s připravenými částicemi se před měřením zhomogenizovaly na Mini Vortexeru. Z každého vzorku pak bylo odebráno 100 μl do kyvety a doplněno 1 ml čištěné vody. Kyveta se vzorkem byla umístěna do Zetasizeru. Měření probíhalo při teplotě 25°C.

5.4.2 Stanovení zeta potenciálu

Hodnota zeta potenciálu je důležitá pro stabilitu disperzních soustav. Pokud je absolutní hodnota zeta potenciálu větší než 30 mV, můžeme pokládat soustavu za dostatečně stabilní. [34]

Měření probíhalo opět na přístroji Zetasizer Nano ZS90. Stanovení probíhá pomocí elektroforetického rozptylu světla a umožňuje změření potenciálu i u částic, které mají nízký elektroforetický pohyb. Měření probíhá na základě pohybu nabitých částic směrem k opačně nabitě elektrodě, kam je přiváděno elektrické pole. [34]

5.4.2.1 Příprava a měření vzorku

Vzorek byl obdobně přefiltrován a naředěn jako u měření velikosti a PDI. Byl umístěn do speciální kyvety typu DTS1060 s elektrodami po stranách a ta pak do Zetasizeru. Měření probíhalo opět při laboratorní teplotě 25°C.

5.4.3 Enkapsulační efektivita a drug-loading

Enkapsulační efektivita (EE), neboli také účinnost zapouzdření, nám udává, kolik procent použitého množství kurkuminu se zapouzdřilo do vytvořených nanočástic. [35] Výpočet proběhl podle následující rovnice (1):

$$EE [\%] = \frac{\text{enkapsulované množství kurkuminu [mg]}}{\text{celkové množství kurkuminu [mg]}} \times 100$$

Rovnice 1

Kapacita naplnění léčivem je v literatuře známá jako drug-loading capacity (DLC). Vyjadřuje schopnost nosiče akumulovat v sobě danou léčivou látku, tzn. je to poměr hmotnosti enkapsulované látky ku celkové hmotnosti nosiče. [35]

V této práci byly použity jako nanomateriálové nosiče různé typy polymeru PLGA. Pro výpočet byla použita rovnice (2):

$$DLC [\%] = \frac{\text{enkapsulované množství kurkuminu [mg]}}{\text{celková hmotnost nanočástic [mg]}} \times 100$$

Rovnice 2

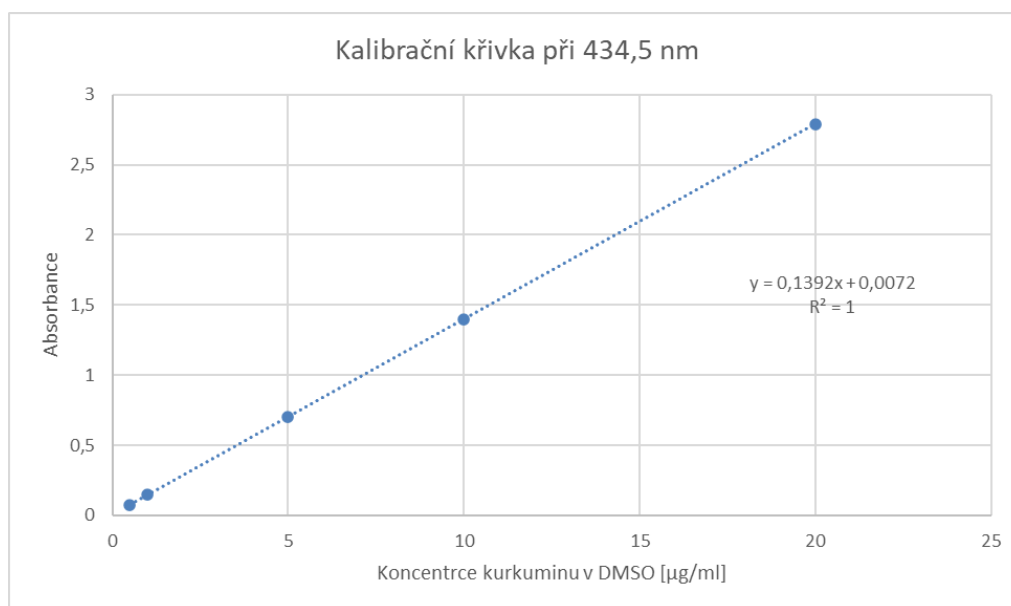
5.4.3.1 Příprava vzorku

Přefiltrované vzorky v mikrozkuvkách typu Eppendorf o objemu 2 ml byly centrifugovány při pokojové teplotě 21°C po dobu 15 minut na 21 000 otáček. Poté se pomocí automatické pipety odsál supernatant. Vzniklá peleta částic se rozpustila v 1,5 ml DMSO. Pro lepší rozpuštění pelety v DMSO se použila ultrazvuková lázeň a Mini Vortexer. Před samotným měřením se příslušný vzorek zředil ještě 10x DMSO.

5.4.3.2 Měření vzorku a výpočty

Stanovení enkapsulovaného množství kurkuminu probíhalo pomocí spektrofotometrie. Před měřením byla sestavena kalibrační řada roztoků o známé koncentraci kurkuminu v DMSO – 0,5 μ/ml; 1 μ/ml; 5 μ/ml; 10 μ/ml; 20 μ/ml. Následně byla sestavena kalibrační přímka a její rovnice - Graf 1.

Absorpční maximum kurkuminu v DMSO bylo stanoveno při vlnové délce 434,5 nm. Další měření tedy probíhalo již při této vlnové délce.



Graf 1: Kalibrační křivka kurkuminu v DMSO při 434,5 nm

Výpočet koncentrace vzorků probíhal dosazením do rovnice kalibrační přímky (3):

$$y = 0,1392x + 0,0072$$

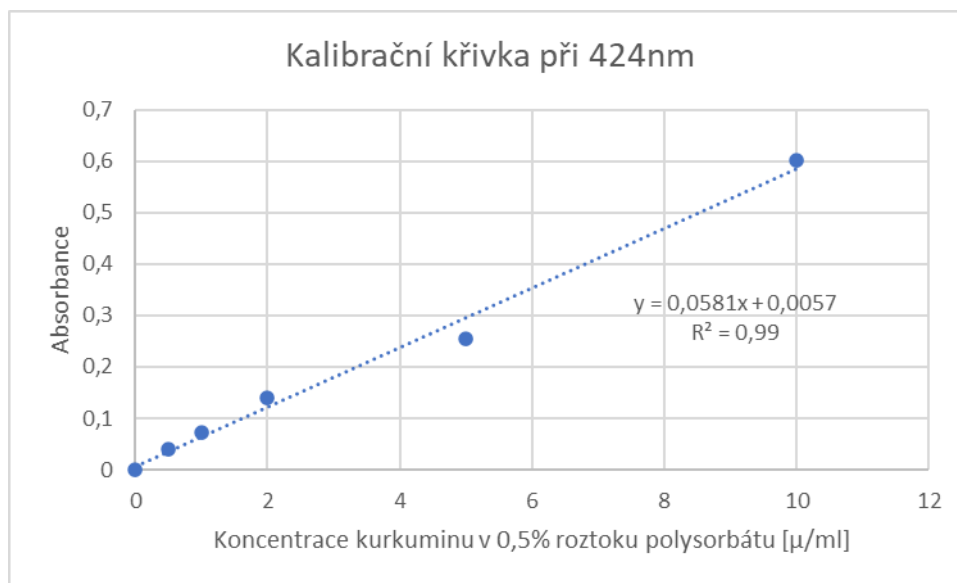
Rovnice 3

kde x je koncentrace kurkuminu v μg/ml a y je absorbance.

Další výpočty proběhly dosazením do rovnice pro EE (Rovnice 1) a DLC (Rovnice 2).

5.4.4 Disoluce

Připravené a přefiltrované vzorky v Eppendorf zkumavkách se nejdříve centrifugovaly při otáčkách 8000 a při teplotě 21 °C po dobu 15 minut. Poté se odsál supernatant, který se opět rozdělil do mikrozkuvek a centrifugoval se při 10 000 otáčkách, opět při teplotě 21 °C a po dobu 15 minut. Vzniklé pelety částic se dispergovaly v 0,5% vodném roztoku polysorbátu 20 (komerčním názvem Tween® 20), který se poté použil i jako disoluční médium. Přídavek polysorbátu byl použit kvůli špatné rozpustnosti kurkuminu ve vodě. Test disoluce probíhal přes dialyzační celulósovou membránu (MWCO 14 000 Da). Rozdispergované částice ve 3 ml 0,5% roztoku polysorbátu byly napipetovány do membrány. Oba konce membrány byly poté zalepeny pomocí akrylátového lepidla. Takto připravené vzorky pro disoluci byly vloženy do vialek a následně se k nim napipetovalo 10 ml disolučního média. Vialky byly umístěny do třepací vodní lázně předem vytemperované na teplotu 37 °C. Vzorky se odebíraly v následujících časech od začátku disoluce – ½ hodiny, 1 hodina, 2 hodiny, 4 hodiny, 8 hodin, 18 hodin, 24 hodin, 48 hodin a 72 hodin. Z vialky se pipetou odebralo vždy celé množství disolučního média (10 ml) a bylo opět doplněno médiem novým o stejném objemu. Koncentrace uvolněného kurkuminu se stanovovala opět pomocí spektrofotometru. Pro výpočet byla vytvořena příslušná kalibrační křivka (Graf 2) z roztoků o známé koncentraci kurkuminu v 0,5% roztoku polysorbátu 20. Šlo o koncentrace 0,5 µ/ml; 1 µ/ml; 2 µ/ml; 5 µ/ml; 10 µ/ml. Absorpční maximum bylo zjištěno při vlnové délce 424 nm. Další měření vzorků probíhalo také při této vlnové délce.



Graf 2: Kalibrační křivka kurkuminu v 0,5% roztoku polysorbátu 20 při 424 nm

Pro výpočet byla použita následující rovnice (4):

$$y = 0,0581x + 0,0057$$

Rovnice 4

kde x je hodnota koncentrace kurkuminu v μ/ml a y představuje hodnotu absorbance.

Na základě vypočtených hmotností se sestrojila kumulativní disoluční křivka – závislost uvolněného množství kurkuminu z připravených nanočástic na čase v hodinách. Všechny vzorky byly připravené v duplikátech a hodnoty z měření zprůměrovány.

6. Výsledky a diskuze

Zde jsou prezentovány výsledky získané z experimentální části. Zabývala se přípravou nanočástic s kurkuminem, který je ve vodě prakticky nerozpustný, metodou nanoprecipitace s dvěma různými kopolymery – PLGA 50:50 a větvený PLGA A2. Zejména šlo o porovnání vlastností nanočástic s různým typem polymeru a jeho použitého množství.

Hlavní srovnávané parametry byla EE a DLC. Dále velikost a zeta potenciál částic a disoluční profil.

6.1 Nanočástice s PLGA 50:50

Nejprve byly připraveny vzorky o různém hmotnostním zlomku (w/w) – 0,5 %; 1 %; 2 %; 5 %; 10 % a 20 %. Jde o poměr mezi hmotností kurkuminu a hmotností PLGA 50:50. Pro tyto vzorky o různém (w/w) bylo použito konstantní množství PLGA – konkrétně 30 mg PLGA 50:50. Následně bylo vypočítáno odpovídající množství kurkuminu v mg pro přípravu - viz Tabulka 1 a 2. U každého vzorku byly hodnoceny tyto vlastnosti – velikost, PDI, zeta potenciál, EE a DLC. Cílem bylo najít optimální poměr kurkuminu a PLGA 50:50 (w/w), který by vykazoval maximální EE [%], aby nedocházelo ke ztrátám kurkuminu během přípravy, ale zároveň s maximální možnou procentuální hodnotou DLC, aby byla maximalizována potenciální terapeutická efektivita.

Právě hodnoty DLC jsou často nízké. Pro dosažení optimálního terapeutického účinku se pak musí podat větší množství částic. To by pak mohlo vést k problémům s aplikací – například u intravenózního podání, protože by se podávala vysoce koncentrovaná a viskózní nanosuspenze. Navíc by mohlo dojít například k embolizaci díky podání většího počtu částic. Kvůli minimalizaci těchto nežádoucích účinků je snaha o zvýšení DLC a tím zajistit, co největší náplň nanočástic léčivem. Tím může dojít i ke snížení výrobních nákladů na nanočásticové léčivé přípravky, které jsou často také překážkou. [36]

Následně podle toho, který poměr o různém (w/w) kurkuminu a PLGA 50:50 vykazoval nejvyšší hodnoty EE a zároveň DLC, byla připravena další sada vzorků o konkrétním stejném (w/w), dále označován jako stejný (w/w), tentokrát s různým množstvím PLGA. Vzorky byly tedy připraveny postupně s PLGA 50:50 o hmotnosti 10 mg, 20 mg, 40 mg a 50 mg. Množství kurkuminu bylo dopočítáno tak, aby se zachoval stejný (w/w) – viz Tabulka 3 a 4.

6.1.1 Velikost, PDI a zeta potenciál – různý (w/w)

Vzorky byly připraveny vždy v duplikátech a výsledné hodnoty byly zprůměrovány. U každé hodnoty je vypočítána směrodatná odchylka (σ).

Tabulka 1: Vzorky s PLGA 50:50 o různém (w/w) – velikost, PDI, zeta potenciál

Vzorek Č.	w/w [%]	m kurkumin [mg]	m PLGA 50:50 [mg]	Velikost částic [nm]	σ	PDI	σ	Zeta potenciál [mV]	σ
1	0,5	0,15	30	141,57	5,79	0,097	0,007	-3,95	0,12
2	1	0,3	30	140,20	1,54	0,092	0,013	-24,33	1,25
3	2	0,6	30	178,70	23,44	0,177	0,069	-19,40	0,24
4	5	1,5	30	180,83	8,73	0,249	0,064	-25,33	1,34
5	10	3	30	158,98	7,33	0,146	0,059	-28,83	1,38
6	20	6	30	164,93	1,53	0,218	0,026	-25,20	0,37

Z Tabulky 1 vyplývá, že velikost všech připravených částic je větší než 100 nm. Jak bylo uvedeno v kapitole 2.3.1, tato velikost má dobrý předpoklad pro to, aby byly částice rychleji opsonizovány a kumulovány v makrofázích MFS v játrech, což je žádoucí pro potenciální terapii NAFLD kurkuminem.

Podle kapitoly 3.4.1 můžeme považovat nanočástice z Tabulky 1 za téměř monodisperzní. Hodnoty PDI se pohybují mezi 0,1 a 0,2.

Zeta potenciál nám udává, že nanočástice na svém povrchu záporný náboj. To je též žádoucí pro targeting do makrofágů – viz kapitola 2.3.1.

6.1.2 Hodnocení EE a DLC – různý (w/w)

Dále se u všech vzorků hodnotila EE a DLC. Výsledky jsou zpracované v Tabulce 2.

Tabulka 2: Vzorky s PLGA 50:50 o různém (w/w) – EE a DLC

Vzorek č.	w/w [%]	m kurkumin [mg]	m PLGA 50:50 [mg]	EE [%]	σ	DLC [%]	σ
1	0,5	0,15	30	58,99	5,26	0,29	0,03
2	1	0,3	30	66,45	6,78	0,66	0,07
3	2	0,6	30	56,73	8,80	1,13	0,18
4	5	1,5	30	39,69	2,75	1,98	0,14
5	10	3	30	13,59	1,67	1,36	0,17
6	20	6	30	6,64	0,59	1,33	0,12

Nejvyšší EE vykazoval vzorek č. 2, ale hodnota DLC je poměrně nízká – 0,66 %. Hlavní zájem byl hlavně o to, co nejvíce využít kapacitu nanočástic. Proto nejlépe vychází vzorek č. 4, kde je DLC nejvyšší - 1,98 %. Může to být způsobené tím, že nanočástice v tomto vzorku č. 4 měly i největší velikost – viz Tabulka 1. Vyšší hodnoty EE můžou být vysvětleny i tím, že u vzorků č. 1, 2 a 3 bylo použito menší množství kurkuminu, ale DLC hodnoty jsou naopak nižší, protože toto malé množství kurkuminu není schopné naplnit celou kapacitu částic o hmotnosti 30 mg. U vzorků č. 5 a 6 už hodnoty EE klesají kvůli většímu množství použitého kurkuminu, kde pravděpodobně dochází k jeho krystalizaci mimo matrici PLGA 50:50.

Další vzorky byly připravené o stejném hmotnostním zlomku podle toho, u kterého vyšla EE a DLC nejlépe – tedy vzorek č. 4 s (w/w) 5 %. Tento poměr (w/w) se ukázal být jako hraniční. Dále bylo ověřeno, jaký vliv bude mít na výsledky různé množství PLGA 50:50 - 10 mg, 20 mg, 40 mg a 50mg. Opět se hodnotily stejné parametry – Tabulka 3 a 4.

6.1.3 Velikost a PDI – stejný (w/w)

Nebyl hodnocen zeta potenciál, protože se nepředpokládá, že by došlo ke změně náboje, a to kvůli tomu, že vzorky byly připraveny za stejných podmínek jako předchozí vzorky č. 1 až 6.

Tabulka 3: Vzorky s PLGA 50:50 o stejném (w/w) – velikost a PDI

Vzorek č.	w/w [%]	m kurkumin [mg]	m PLGA 50:50 [mg]	Velikost [nm]	σ	PDI	σ
7	5	0,5	10	137,14	29,07	0,343	0,019
8	5	1	20	136,28	6,56	0,202	0,042
9	5	2	40	179,97	7,37	0,228	0,023
10	5	2,5	50	210,27	0,25	0,194	0,036

Velikost nanočástic je opět nad 100 nm – vhodné pro vychytávání makrofágy. Zároveň můžeme sledovat, že se zvyšujícím se množstvím PLGA 50:50 dochází i ke vzrůstu velikosti částic – vzorek č. 9 a 10. Hodnoty PDI se opět pohybují mezi 0,2 až 0,3 – vzorky již nejsou monodisperzní s výjimkou vzorku 10. Optimální množství PLGA 50:50 pro přípravu metodou nanoprecipitace bylo tedy 30 mg.

6.1.4 Hodnocení EE a DLC – stejný (w/w)

Dále byla u vzorků stanovena opět EE a DLC. Výsledky jsou shrnuté v Tabulce 4.

Tabulka 4: Vzorky s PLGA 50:50 o stejném (w/w) – EE a DLC

vzorek č.	w/w [%]	m kurkumin [mg]	m PLGA 50:50 [mg]	EE [%]	σ	DLC [%]	σ
7	5	0,5	10	21,72	3,43	1,09	0,17
8	5	1	20	14,75	3,28	0,74	0,16
9	5	2	40	27,84	4,30	1,39	0,21
10	5	2,5	50	15,04	0,03	0,75	0,00

Zde můžeme pozorovat, že se vzrůstající velikostí nanočástic a množstvím použitého PLGA nedochází i ke zvýšení DLC, jak by se mohlo předpokládat z Tabulky 1 a 2 u vzorku č. 4. Není zvýšená ani hodnota EE. Změna množství PLGA při zachování stejného (w/w) nevedla ke zlepšení parametrů enkapsulace. Jako optimální množství pro přípravu nanočástic se tedy ukázalo 30 mg PLGA 50:50 o (w/w) 5 % - vzorek č. 4.

6.2 Nanočástice s PLGA A2

Příprava vzorků s kopolymerem PLGA A2 probíhala analogicky jako u PLGA 50:50. Opět byly nejprve připraveny vzorky o různém poměru (w/w) kurkuminu a PLGA – 0,5 %; 1 %; 2 %; 5 %; 10 % a 20 % se stejným množstvím PLGA A2 – 30 mg. Na základě toho bylo vypočítáno potřebné množství kurkuminu, aby byly zachované různé poměry (w/w) – viz Tabulka 5 a 6. U každého vzorku bylo hlavním cílem nejvyšší možné hodnoty EE a DLC. Podle toho, u kterého vzorku s (w/w) byly naměřeny maximální hodnoty EE a DLC, byl pak tento poměr připraven i s různým množstvím PLGA A2. Použito bylo množství PLGA A2 10 mg, 20 mg, 40 mg a 50 mg a odpovídající množství kurkuminu tak, aby byl tento poměr (w/w) zachován stejný – viz Tabulka 7 a 8.

6.2.1 Velikost, PDI a zeta potenciál – různý (w/w)

Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 5. U vzorků s PLGA A2 byly hodnoceny stejné parametry jako u vzorků výše.

Tabulka 5: Vzorky s PLGA A2 o různém (w/w) – velikost, PDI, zeta potenciál

Vzorek Č.	w/w [%]	m kurkumin [mg]	m PLGA A2 [mg]	Velikost částic [nm]	σ	PDI	σ	Zeta potenciál [mV]	σ
1	0,5	0,15	30	140,58	14,05	0,149	0,063	-32,83	0,33
2	1	0,3	30	117,63	3,55	0,090	0,014	-34,67	0,33
3	2	0,6	30	137,57	12,96	0,086	0,010	-26,35	0,35
4	5	1,5	30	137,05	2,27	0,080	0,021	-25,77	0,83
5	10	3	30	137,55	1,84	0,095	0,012	-29,37	1,75
6	20	6	30	128,62	4,53	0,114	0,039	-28,00	1,64

Jednotlivé hodnoty velikostí se od sebe velmi neliší. Všechny jsou nad 100 nm, tudíž vhodné pro targeting do makrofágů MFS v játrech. Hodnoty PDI také vyhovují požadavkům pro monodisperzní soustavu – pohybují se \pm v rozmezí okolo 0,1.

Podle zeta potenciálu jsou částice záporně nabité. Navíc při hodnotách okolo \pm 30mV můžeme mluvit o dostatečné koloidní stabilitě disperzních soustav [34].

6.2.2 Hodnocení EE a DLC – různý (w/w)

Pro výsledky EE a DLC byla vytvořena Tabulka 6. V Tabulce 6 můžeme pozorovat vysokou EE například u vzorků č. 1 a 2., ale s velmi nízkou DLC. Opět to může být dáno tím, že bylo použité malé množství kurkuminu, které se ochotně enkapsulovalo, ale celková kapacita částic nebyla využita. U vzorků 5 a 6 pozorujeme stejný jev jako v Tabulce 2 u vzorku č. 5 a 6 – pravděpodobně převládla krystalizace kurkuminu mimo částici, proto jsou hodnoty EE nízké. Nejvyšší hodnotu DLC vykazuje opět vzorek č. 4 s (w/w) = 5 %. V další přípravě nanočástic s kurkuminem bude tedy rozpracován tento (w/w) s různým množstvím PLGA A2.

Tabulka 6: Vzorky s PLGA A2 o různém (w/w) – EE a DLC

Vzorek č.	w/w [%]	m kurkumin [mg]	m PLGA A2 [mg]	EE [%]	σ	DLC [%]	σ
1	0,5	0,15	30	72,04	8,13	0,36	0,04
2	1	0,3	30	77,57	1,78	0,78	0,02
3	2	0,6	30	60,67	9,37	1,21	0,19
4	5	1,5	30	55,74	3,20	2,79	0,16
5	10	3	30	7,75	0,48	0,78	0,05
6	20	6	30	2,38	0,80	0,48	0,16

6.2.3 Velikost a PDI – stejný (w/w)

Vzorky byly připravené s různým množstvím PLGA A2 (10 mg, 20 mg, 40 mg, 50 mg) tak, aby byl stále zachován poměr kurkuminu a PLGA (w/w) = 5 %, viz Tabulka 7. U částic nebyl hodnocen zeta potenciál.

Tabulka 7: Vzorky s PLGA A2 o stejném (w/w) – velikost a PDI

Vzorek č.	w/w [%]	m kurkumin [mg]	m PLGA A2 [mg]	Velikost [nm]	σ	PDI	σ
7	5	0,5	10	79,77	0,83	0,214	0,077
8	5	1	20	109,32	1,48	0,122	0,025
9	5	2	40	154,57	2,70	0,169	0,050
10	5	2,5	50	176,83	14,10	0,169	0,059

V Tabulce 7 můžeme vidět, že množství použitého PLGA A2 má vliv na velikost částic. Podobně k tomuto jevu docházelo i u částic připravených s PLGA 50:50, viz Tabulka 3. Čím méně PLGA použijeme, tím jsou částice menší. Nanočástice u vzorku č. 1 mají velikost pod 100 nm a pravděpodobně by se hůře dostávaly do makrofágů. Nejsou proto vhodné pro náš zamýšlený účel terapie NAFLD. U ostatních vzorků je velikost dostačující pro targeting makrofágů. Hodnoty PDI také vyhovují.

6.2.4 Hodnocení EE a DLC – stejný (w/w)

Vypočítané hodnoty pro EE a DLC jsou shrnuty v Tabulce 8.

Tabulka 8: Vzorky PLGA A2 o stejném (w/w) – EE a DLC

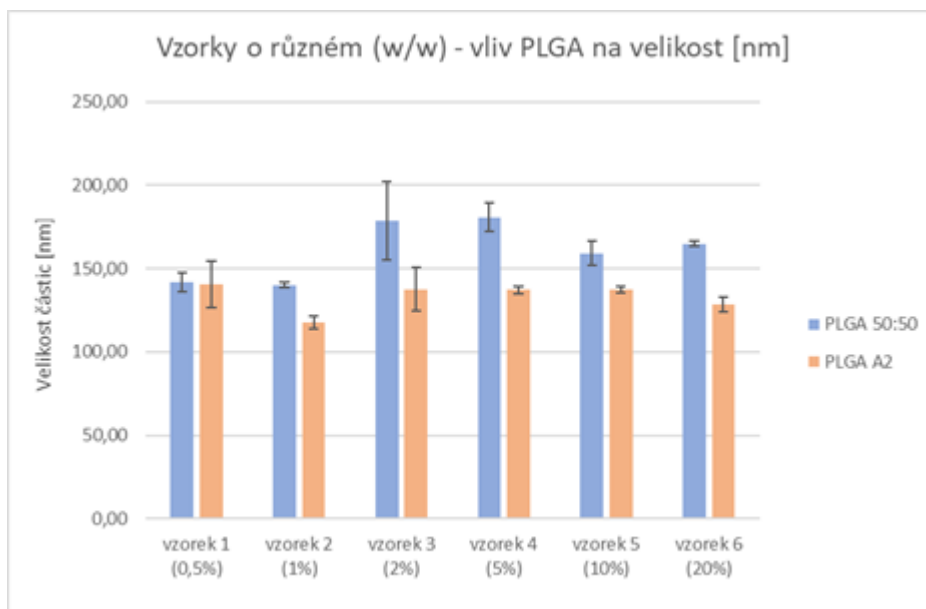
vzorek č.	w/w [%]	m kurkumin [mg]	m PLGA A2 [mg]	EE [%]	σ	DLC [%]	σ
7	5	0,5	10	26,57	1,39	1,33	0,07
8	5	1	20	39,54	7,40	1,98	0,37
9	5	2	40	43,73	2,67	2,19	0,13
10	5	2,5	50	12,54	0,40	0,63	0,02

Ani u PLGA A2 nedochází se zvyšováním jeho použitého množství ke zvýšení EE a DLC. Naopak od vzorků č. 9 a 10 hodnoty klesají. Podobně jako u PLGA 50:50 nemá zvyšování hmotnosti použitého PLGA A2 příznivý vliv na proces enkapsulace.

Z výsledků měření vyplývá, že optimální poměr kurkuminu a PLGA A2 je (w/w) = 5 %, kde hmotnost PLGA A2 je 30 mg (vzorek č. 4).

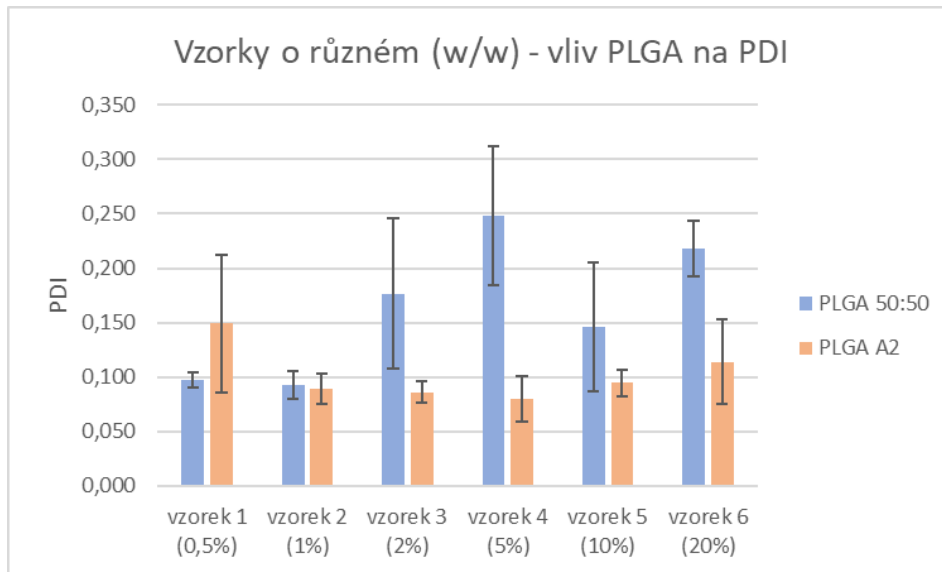
6.3 Porovnání nanočástic s PLGA 50:50 a PLGA A2

6.3.1 Velikost a PDI částic



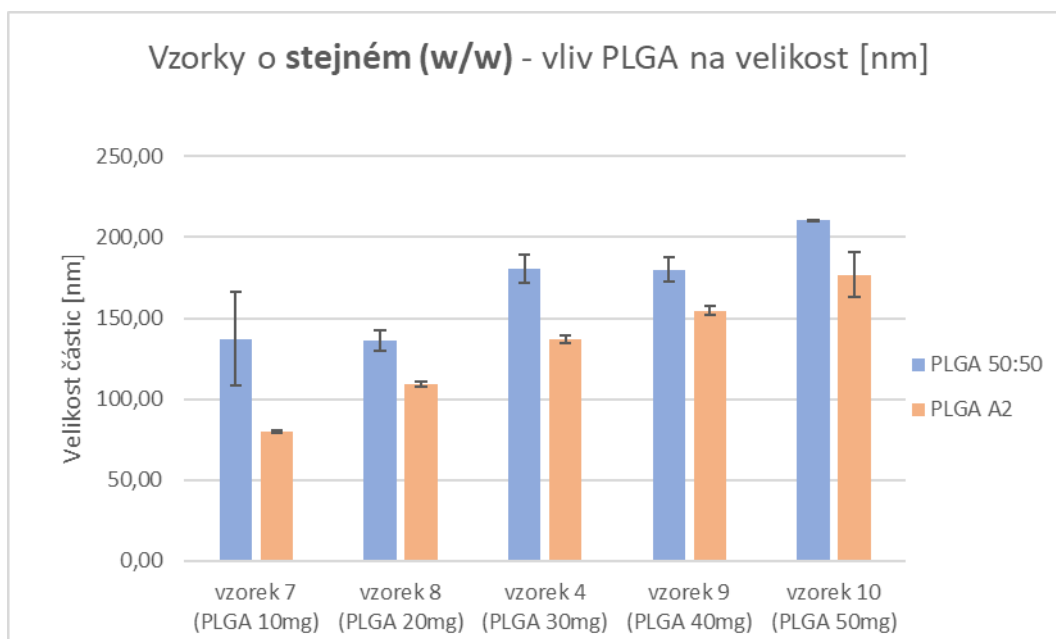
Graf 3: Vzorky o různém (w/w) – vliv použitého PLGA na výslednou velikost částic [nm]

Vzorky mají různý (w/w), kde je zastoupeno různé množství kurkuminu a stejné množství PLGA – 30 mg. Všechny připravené vzorky nanočástic v Grafu 3 mají velikost nad 100 nm, což je důležité pro to, aby byly vychytávány makrofágy. U PLGA 50:50 můžeme obecně pozorovat, že částice mají velikost větší než u PLGA A2.

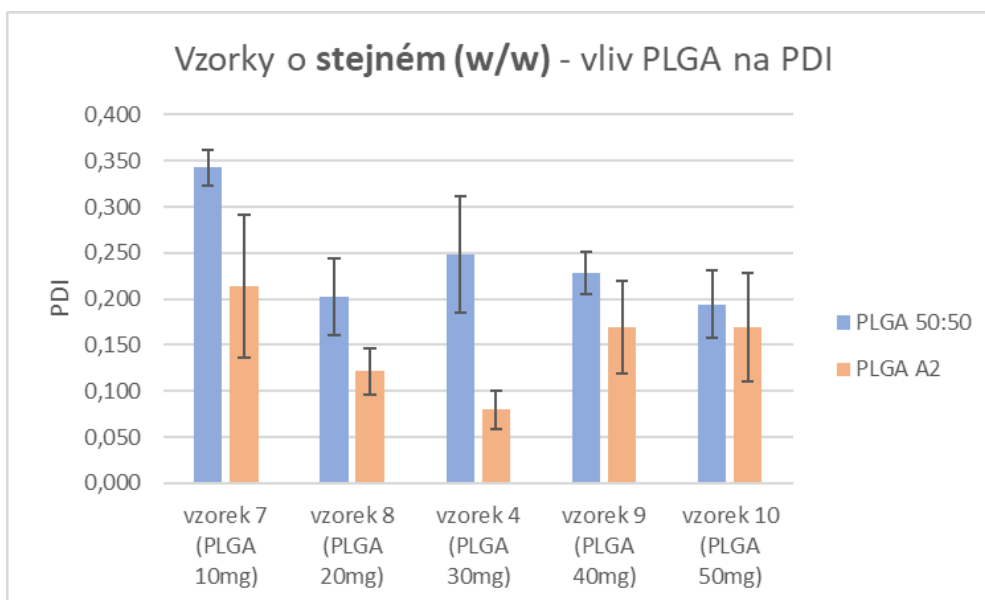


Graf 4: Vzorky o různém (w/w) – vliv použitého PLGA na PDI

V Grafu 4 jsou zaneseny hodnoty PDI pro částice s PLGA 50:50 – zde můžeme vidět, že stejně tak jako se zvětšuje velikost částic, zvyšují se i hodnoty PDI. Vysvětlením by mohlo být to, že dochází ke shlukování částic. Tento jev naopak nepozorujeme u částic vytvořených z PLGA A2. Můžeme tedy říct, že PLGA A2 poskytuje částice s užší distribucí velikostí částic, a tedy vhodnější pro zamýšlené použití.



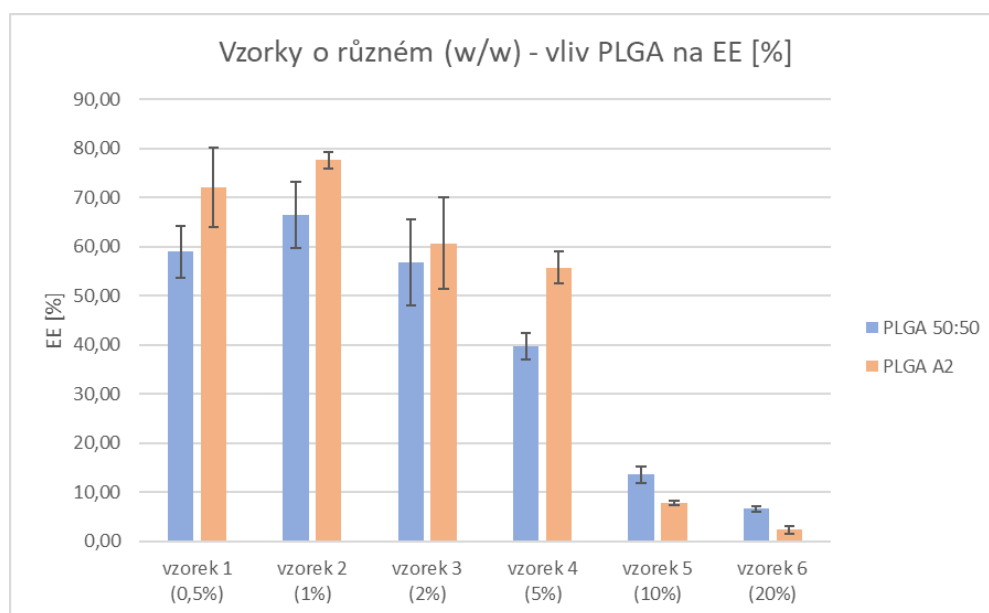
Graf 5: Vzorky o stejném (w/w) = 5 % – vliv použitého PLGA na výslednou velikost částic [nm]



Graf 6: Vzorky o stejném (w/w) = 5 % - vliv použitého PLGA na PDI

V Grafu 5 a 6 jsou zobrazeny vzorky, které mají stejné $(w/w) = 5 \%$, ale různé množství PLGA a různé množství kurkuminu tak, aby byl zachován konstantní poměr (w/w) . Z Grafu 5 vyplývá, že velikost částic je přímo úměrná množství pro přípravu použitého PLGA. U PLGA 50:50 můžeme opět pozorovat, že poskytuje větší nanočástice ve srovnání s polymerem A2, ale podle Grafu 6 nedochází ke zvýšení hodnot PDI – částice s $(w/w) = 5 \%$ mají tedy tendenci se méně shlukovat. U vzorku 7 tj. s PLGA 50:50 došlo pravděpodobně opět k agregaci částic – velikost je ještě větší než u vzorku č. 8 s PLGA 50:50, ale množství použitého PLGA bylo o polovinu nižší – 10 mg. Tento fakt koreluje i s hodnotou PDI u vzorku č. 7 s PLGA 50:50 zanesenou v Grafu 6 (PDI = 0,343). Příslušný vzorek 7 PLGA 50:50 je zatížen i poměrně velkou směrodatnou odchylkou (29,07) – je tedy možné, že výsledek je tímto zkreslen. Naopak u vzorku č. 7 s PLGA A2 došlo k formulaci částic o velikosti až pod 100 nm. To by mohlo vést k nižší kumulaci v makrofázích v játrech – podle kapitoly 2.3.1.

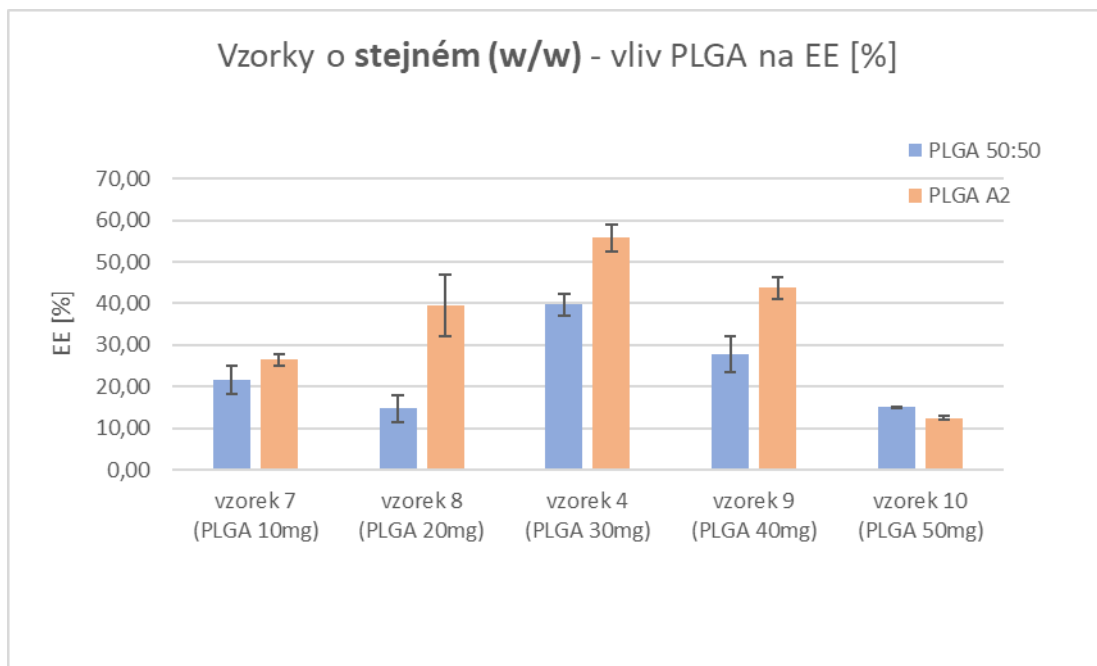
6.3.2 Hodnocení EE



Graf 7: Vzorky o různém (w/w) – vliv použitého PLGA na EE [%]

Jedním z nejdůležitějších parametrů pro nanočástice je hodnota EE. Výsledky jsou shrnuté v Grafu 7. Vzorky byly připravené s různým (w/w), ale hodnota PLGA zůstávala konstantní – 30 mg. Měnilo se množství použitého kurkuminu, viz Tabulka 2 a Tabulka 6. EE nám udává, kolik % z původního množství kurkuminu se enkapsulovalo do částic. U PLGA A2 byla EE větší než PLGA 50:50 až do vzorku č. 4. To může být dáno strukturou PLGA A2, která je rozvětvená a tím může zadržet více kurkuminu. Nižší EE pak můžeme vidět u vyšších (w/w), kde bylo použito větší množství kurkuminu a použité množství PLGA již pravděpodobně nestačilo enkapsulovat takové množství a převládla krystalizace nad enkapsulací. Velikost částic nemá na zvýšení EE velký vliv, jak by se mohlo předpokládat. [15]

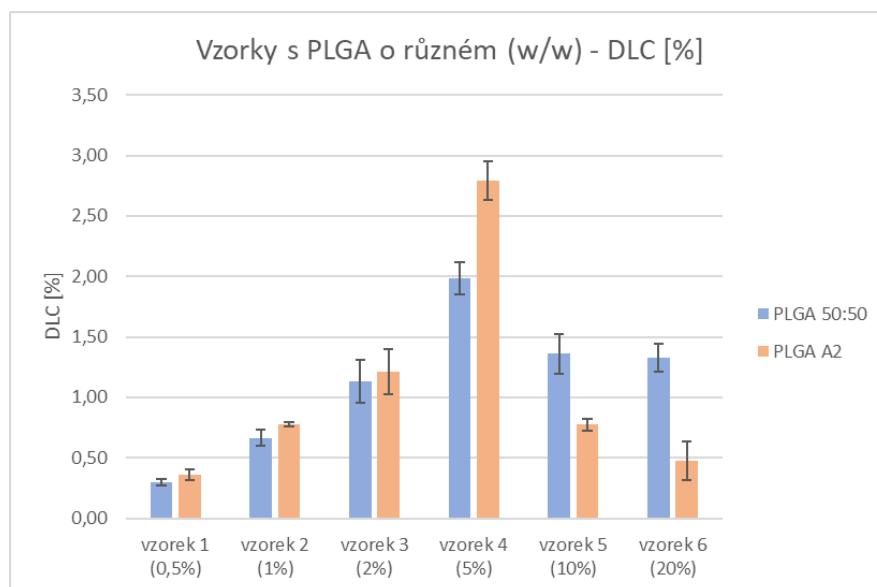
V Grafu 3 můžeme vidět, že velikost částic připravených z PLGA 50:50 je vyšší než částice připravených z PLGA A2. I přesto jsou hodnoty EE ve většině vzorků vyšší u PLGA A2. Z uvedeného vyplývá, že pravděpodobně neexistuje vztah mezi velikostí připravených částic a jejich schopností enkapsulovat léčiv typu kurkumin.



Graf 8: Vzorky o stejném (w/w = 5 %) – vliv použitého PLGA na EE [%]

V Grafu 8 vidíme výsledky (w/w) = 5 % s různým množstvím PLGA a s odpovídajícími množstvími kurkuminu, aby poměr zůstal zachován. Zde se nám potvrzuje, že PLGA A2 je efektivnější pro enkapsulaci kurkuminu – hodnoty jsou vyšší oproti PLGA 50:50. Jak bylo uvedeno výše, je to pravděpodobně díky větvené struktuře PLGA A2. Kopolymer PLGA 50:50 má lineární molekulární architekturu. Potvrzuje se také to, že mezi EE a velikostí částic neexistuje přímá souvislost – viz Graf 5. EE roste do hmotnosti PLGA 30 mg, která se zdá optimální pro oba použité polymery. Se zvyšujícím množstvím polymeru nad tuto hodnotu klesá EE. Výjimkou je jen vzorek č. 8 u PLGA 50:50, kde se pravděpodobně jedná o statistický artefakt.

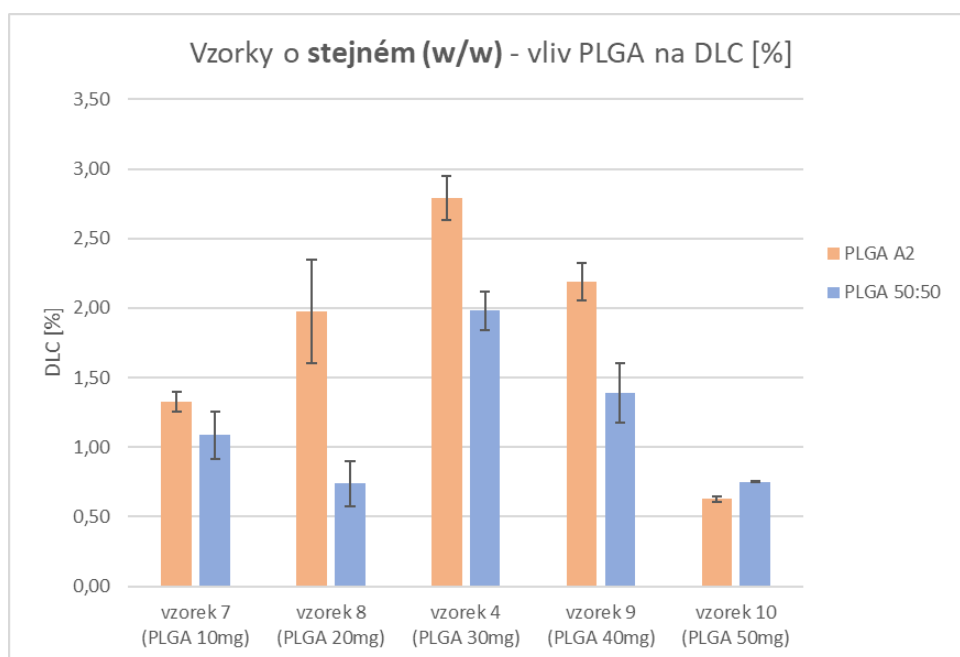
6.3.3 Hodnocení DLC



Graf 9: Vzorky o různém (w/w) – vliv použitého PLGA na DLC [%]

Hodnota DLC byla pro nás během experimentální části zásadní a od ní se odvíjela další příprava. Udává nám, na kolik je využita kapacita připravených částic. Z Grafu 9 je patrné, že nejvyšší hodnotu DLC má vzorek č. 4 a to u vzorků s použitým PLGA 50:50 i PLGA A2. Právě od poměru (w/w) = 5 % se odvíjela i příprava dalších vzorků, a to právě kvůli vysokým hodnotám DLC.

Pokud porovnáme hodnotu DLC mezi dvěma použitými kopolymery, zjistíme, že hodnoty jsou opět vyšší u PLGA A2. Pouze ale pro vzorky č. 1 až 4., pak DLC u PLGA A2 klesá. Naopak je vyšší u PLGA 50:50 – vzorek č. 5 a 6. Stejný fenomén můžeme sledovat i v Grafu 7 pro hodnocení EE – hodnoty jsou vyšší pouze do vzorku č. 4 s (w/w) = 5 %, pak klesají. Jako optimální pro vysokou DLC se tedy ukázal poměr kurkuminu k PLGA (w/w), který odpovídal 5 % kurkuminu vztáženému k navážce PLGA.



Graf 10: Vzorky o stejném (w/w = 5 %) – vliv použitého PLGA na DLC [%]

Graf 10 nám ukazuje, že větší množství použitého PLGA nemá na zvyšování DLC vliv. Po hodnotě PLGA 30 mg nám hodnoty opět klesají, a to jak u PLGA A2, tak i PLGA 50:50.

Při porovnání PLGA můžeme vidět, že vzorky připravené z PLGA A2 mají hodnoty DLC vyšší. Částice z PLGA A2 mohou pojmout větší množství léčiva právě kvůli svojí větvené struktuře.

Z publikovaných prací na optimalizaci přípravy nanočástic pomocí nanoprecipitace s kurkuminem můžeme zjistit, že PLGA A2 vykazoval i zde vyšší hodnoty EE (cca 60 %) než PLGA 50:50. Zároveň také PLGA 50:50 poskytoval větší velikost částic. [37] Nebyla zde ale hodnocena hodnota DLC. Může tedy jít o podobný jev, který byl zjištěn v této části práce, že hodnota EE roste, ale není plně využita kapacita nosiče.

V další práci už DLC u kurkuminu hodnocena byla. Nanočástice byly připraveny opět s PLGA A2 nebo PLGA 50:50. Zde byla použita jiná povrchově aktivní látka, konkrétně polyvinylalkohol. Také tady vykazoval PLGA A2 vyšší hodnoty EE (cca 60 %) a vyšší hodnoty DLC (cca 0,22 %). Obecně hodnoty DLC byly velmi nízké. Zároveň bylo použito i menší množství kurkuminu. [38]

Z výsledků z experimentální části této práce je patrné, že optimální poměr (w/w) kurkuminu a PLGA A2 je 5 %, kde PLGA A2 je v množství 30 mg, aby částice vykazovaly vysoké hodnoty DLC.

V článku z roku 2010 publikovali Anand a kol. PLGA-PEG nanočástice medikované kurkuminem, kdy použily stejný poměr polymeru a kurkuminu jako ten, který byl v této práci vyhodnocen jako optimální (5 %). Autoři uvádějí, že procentuální EE dosahovala hodnoty 97,5 %. Takto vysoká hodnota EE je pravděpodobně zkreslená faktem, že autoři hodnotili EE nepřímo (tj. měřením koncentrace ze supernatantu). Taková metodika nebere v úvahu neenkapsulovanou a nerozpustnou část kurkuminu a nutně tedy vede k falešně pozitivním výsledkům. [39]

6.3.4 Disoluce

Posledním hodnoceným parametrem byl disoluční test – tedy kolik kurkuminu z částic se uvolní za jednotku času. Pro disoluci byly připraveny vzorky s (w/w) = 5 % od každého polymeru, které poskytovaly nejlepší výsledky. Konkrétně šlo o vzorky č. 4 od PLGA 50:50 i PLGA A2 – připravené z 1,5 mg kurkuminu a 30 mg PLGA – viz Tabulka 9. Vzorky byly připraveny v duplikátech a zprůměrovány. Výsledky měření disoluce shrnuje Tabulka 10.

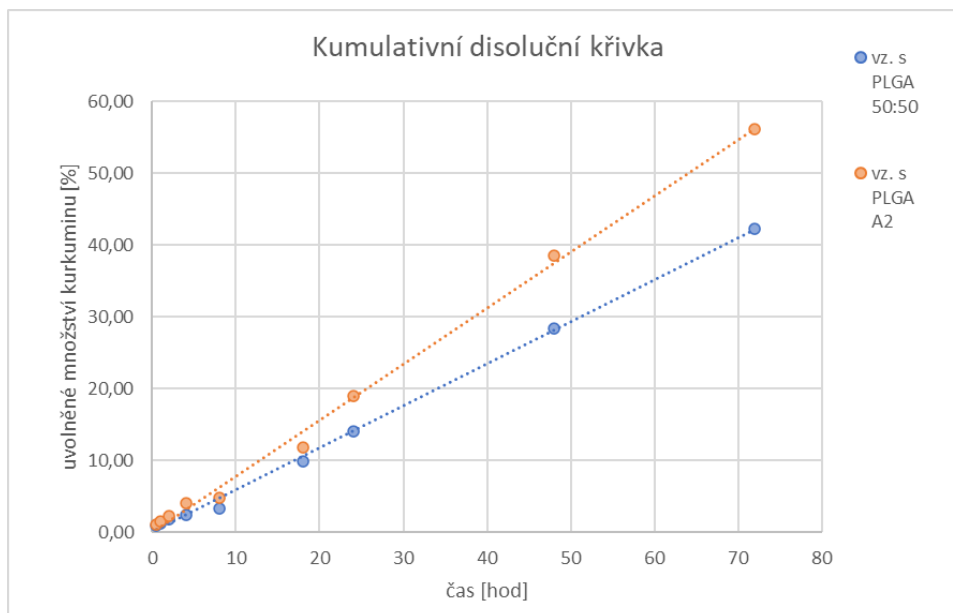
Tabulka 9: Vzorky připravené pro disoluci

Typ PLGA	w/w [%]	m kurkumin [mg]	m PLGA [mg]
PLGA 50:50	5	1,5	30
PLGA A2	5	1,5	30

Tabulka 10: Průběh disoluce u vzorků

čas [hod]	VZ. S PLGA 50:50		VZ. S PLGA A2	
	m uvolněného kurkuminu [mg]	uvolněné množství kurkuminu [%]	m uvolněného kurkuminu [mg]	uvolněné množství kurkuminu [%]
	0,5	0,0043	0,91	0,0032
1	0,0063	1,30	0,0052	1,51
2	0,0092	1,85	0,0077	2,34
4	0,0126	2,48	0,0128	4,03
8	0,0192	3,41	0,0157	4,78
18	0,0599	9,93	0,0410	11,83
24	0,0858	14,10	0,0651	18,98
48	0,1730	28,46	0,1312	38,52
72	0,2565	42,25	0,1918	56,24

Z hodnot v Tabulce 10 byla sestrojena kumulativní disoluční křivka – Graf 11.



Graf 11: Kumulativní disoluční křivka – porovnání PLGA 50:50 a PLGA A2 v 0,5% polysorbátu 20

Výsledné hodnoty uvolněného kurkuminu byly zvýšené u PLGA A2 – po 72 hod se uvolnilo 56,24 % enkapsulovaného kurkuminu. PLGA A2 má ve své struktuře více volných karboxylových funkčních skupin. Díky tomu je více hydrofilní než PLGA 50:50. Nanočástice z PLGA A2 se tedy pravděpodobně degradovaly rychleji ve vodném médiu a tím se mohlo uvolnit větší množství kurkuminu.

Obecně u obou typů polymerů bylo uvolněné množství kurkuminu lineární, což je pro zamýšlenou aplikaci velmi žádoucí. Disoluce probíhala kinetikou 0. řádu. Typ polymeru tedy nemá výrazný vliv na průběh disoluční křivky, pouze na rychlost uvolňování a uvolněné množství.

7. Závěr

Diplomová práce se zabývala přípravou nanočástic s látkou ve vodě špatně rozpustnou, za kterou byl zvolen kurkumin. Potenciální využití nanočástic s kurkuminem by mohla být terapie NAFLD. V postižených játrech by tyto nanočástice mohly mít pozitivní efekt na makrofágy MFS a tím by zabránily další progresi onemocnění.

V teoretické části byla stručně popsána problematika nanočástic. Zejména vhodné polymery, jednotlivé postupy přípravy a jejich podmínky. Další důležitou částí je popis cílené distribuce částic – aktivní a pasivní targeting. Stručně je shrnuto i téma NAFLD onemocnění a vlastnosti kurkuminu.

V experimentální části byla pro přípravu zvolená metoda nanoprecipitace. Byly připraveny vzorky o různém w/w a následně stejném w/w s dvěma typy kopolymeru – PLGA 50:50 a PLGA A2. Vytvořené nanočástice se pak hodnotily a porovnávaly na základě několika parametrů – velikost, PDI, zeta potenciál, EE, DLC a disoluční profil.

Bylo zjištěno, že použitý polymer má vliv na velikost částic – PLGA 50:50 poskytovalo větší částice s větší PDI. S rostoucím množstvím PLGA roste i velikost částic. S velikostí částic se ale nezvyšuje schopnost částic enkapsulovat kurkumin – tedy hodnoty EE a DLC. PLGA A2 vykazovalo větší EE a DLC, což je pravděpodobně dáno jeho molekulární architekturou.

Jako optimální poměr kurkuminu a PLGA se ukázalo 5 %. Ideální množství PLGA se ukázalo být 30 mg, a to jak z hlediska granulometrického, tak i z hlediska efektivity enkapsulace kurkuminu.

Během disolučního testu bylo zjištěno, že kurkumin se rychleji uvolňuje z částic připravených z větveného kopolymeru PLGA A2. Kopolymer PLGA A2 se tedy jeví jako více optimální polymer pro další přípravu nanočástic s kurkuminem.

8. Seznam použitých zkratk

DLC	drug-loading capacity (kapacita naplnění léčivem)
DLS	dynamic laser scattering (dynamický rozptyl světla)
DMSO	dimethylsulfoxid
EE	enkapsulační efektivita
FDA	Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
HLB	hydrofilně-lipofilní rovnováha
MFS	mononukleárně fagocytický systém
MK	mastné kyseliny
NAFLD	nealkoholické ztukovatění jater (non-alcoholic fatty liver disease)
NK	nukleová kyselina
PACA	poly(alkylkyanoakrylát)
PAL	povrchově aktivní látka
PCL	poly(ϵ -kaprolakton)
PEG	poly(ethylenglykol)
PGA	poly(glykolová kyselina)
PLA	poly(mléčná kyselina)
PLGA	poly(mléčná glykolová kyselina)
Poměr LA:GA	poměr kyseliny mléčné a glykolové v polymeru
TF	transferin
VLDL	lipoproteiny s velmi nízkou hustotou

9. Seznam použitých obrázků

Obrázek 1: Struktura PLGA	12
Obrázek 2: Struktura PCL.....	13
Obrázek 3: Struktura PACA	14
Obrázek 4: Schématické znázornění metody nanoprecipitace [19].....	15
Obrázek 5: Struktury v kurkumě [30].....	24

10. Seznam použitých rovnic

Rovnice 1	29
Rovnice 2	29
Rovnice 3	30
Rovnice 4	32

11. Seznam použitých grafů

Graf 1: Kalibrační křivka kurkuminu v DMSO při 434, 5nm	30
Graf 2: Kalibrační křivka kurkuminu v 0,5% roztoku polysorbátu 20 při 424 nm ...	32
Graf 3: Vzorky o různém (w/w) – vliv použitého PLGA na výslednou velikost částic [nm].....	42
Graf 4: Vzorky o různém (w/w) – vliv použitého PLGA na PDI.....	43
Graf 5: Vzorky o stejném (w/w) = 5 % – vliv použitého PLGA na výslednou velikost částic [nm].....	44
Graf 6: Vzorky o stejném (w/w) = 5 % - vliv použitého PLGA na PDI	44
Graf 7: Vzorky o různém (w/w) – vliv použitého PLGA na EE [%]	46
Graf 8: Vzorky o stejném (w/w = 5 %) – vliv použitého PLGA na EE [%]	47
Graf 9: Vzorky o různém (w/w) – vliv použitého PLGA na DLC [%]	48
Graf 10: Vzorky o stejném (w/w = 5 %) – vliv použitého PLGA na DLC [%]	49
Graf 11: Kumulativní disoluční křivka – porovnání PLGA 50:50 a PLGA A2	52

12. Seznam použitých tabulek

Tabulka 1: Vzorky s PLGA 50:50 o různém (w/w) – velikost, PDI, zeta potenciál .	34
Tabulka 2: Vzorky s PLGA 50:50 o různém (w/w) – EE a DLC	35
Tabulka 3: Vzorky s PLGA 50:50 o stejném (w/w) – velikost a PDI	36
Tabulka 4: Vzorky s PLGA 50:50 o stejném (w/w) – EE a DLC	37
Tabulka 5: Vzorky s PLGA A2 o různém (w/w) – velikost, PDI, zeta potenciál.....	38
Tabulka 6: Vzorky s PLGA A2 o různém (w/w) – EE a DLC	39
Tabulka 7: Vzorky s PLGA A2 o stejném (w/w) – velikost a PDI	40
Tabulka 8: Vzorky PLGA A2 o stejném (w/w) – EE a DLC	41
Tabulka 9: Vzorky připravené pro disoluci	51
Tabulka 10: Průběh disoluce u vzorků	51

13. Seznam použité literatury

- [1] RABIŠKOVÁ, Miloslava. Nanočástice pro lékové formy. *Remedia*. 2007, 17: 495-501.
- [2] BEGINES, Belén, Tamara ORTIZ, María PÉREZ-ARANDA, Guillermo MARTÍNEZ, Manuel MERINERO, Federico ARGÜELLES-ARIAS a Ana ALCUDIA. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery: Recent Developments and Future Prospects. *Nanomaterials* [online]. 2020, 10(7) [cit. 2022-11-05]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano10071403
- [3] DIAB, Roudayna, Chiraz JAAFAR-MAALEJ, Hatem FESSI a Philippe MAINCENT. Engineered Nanoparticulate Drug Delivery Systems: The Next Frontier for Oral Administration?. *The AAPS Journal* [online]. 2012, 14(4), 688-702 [cit. 2022-11-17]. ISSN 1550-7416. Dostupné z: doi:10.1208/s12248-012-9377-y
- [4] NITTA, Sachiko a Keiji NUMATA. Biopolymer-Based Nanoparticles for Drug/Gene Delivery and Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2013, 14(1), 1629-1654 [cit. 2022-12-01]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms14011629
- [5] ROWE, Raymond C. SHESKEY, Paul J. QUINN, Marian E. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. London: Pharm Press 2009. ISBN 978 0 85369 792 3
- [6] TAMMAM, Salma N., Hassan M. E. AZZAZY a Alf LAMPRECHT. Biodegradable Particulate Carrier Formulation and Tuning for Targeted Drug Delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology* [online]. 2015, 11(4), 555-577 [cit. 2022-12-13]. ISSN 15507033. Dostupné z: doi:10.1166/jbn.2015.2017]

- [7] KUBOVÁ, Kateřina a David VETCHÝ. Využití (meth)akrylátových kopolymerů v technologii matricových tablet s řízeným uvolňováním léčiva. *Chemické listy*. 2015.
- [8] TABATABAEI MIRAKABAD, Fatemeh Sadat, Kazem NEJATI-KOSHKI, Abolfazl AKBARZADEH, et al. PLGA-Based Nanoparticles as Cancer Drug Delivery Systems. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* [online]. 2014, 15(2), 517-535 [cit. 2022-12-19]. ISSN 1513-7368. Dostupné z: doi:10.7314/APJCP.2014.15.2.517
- [9] LEE, Byung Kook, Yeonhee YUN a Kinam PARK. PLA micro- and nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2016, 107, 176-191 [cit. 2022-12-19]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2016.05.020
- [10] BEHL, Akanksha, Virinder S. PARMAR, Shashwat MALHOTRA a Anil K. CHHILLAR. Biodegradable diblock copolymeric PEG-PCL nanoparticles: Synthesis, characterization and applications as anticancer drug delivery agents. *Polymer* [online]. 2020, 207 [cit. 2022-12-21]. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2020.122901
- [11] MUŽÍKOVÁ, Jitka. *Speciální praktická cvičení z farmaceutické technologie*. Praha: Karolinum, 2019. ISBN 978-80-246-4274-1.
- [12] ASTETE, Carlos E. a Cristina M. SABLIOV. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 2012, 17(3), 247-289 [cit. 2022-12-22]. ISSN 0920-5063. Dostupné z: doi:10.1163/156856206775997322
- [13] BECK-BROICHSITTER, Moritz, Erik RYTTING, Tobias LEBHARDT, Xiaoying WANG a Thomas KISSEL. Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: A shift in the “ouzo region” upon drug loading. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2010, 41(2),

244-253 [cit. 2022-12-22]. ISSN 09280987. Dostupné z:
doi:10.1016/j.ejps.2010.06.007

- [14] QUINTANAR-GUERRERO, David, Eric ALLÉMANN, Hatem FESSI a Eric DOELKER. Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy* [online]. 2008, 24(12), 1113-1128 [cit. 2022-12-29]. ISSN 0363-9045. Dostupné z: doi:10.3109/03639049809108571
- [15] HANS, M.L a A.M LOWMAN. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* [online]. 2002, 6(4), 319-327 [cit. 2022-12-29]. ISSN 13590286. Dostupné z: doi:10.1016/S1359-0286(02)00117-1
- [16] KAPOOR, Deepak N, Amit BHATIA, Ripandeep KAUR, Ruchi SHARMA, Gurvinder KAUR a Sanju DHAWAN. PLGA: a unique polymer for drug delivery. *Therapeutic Delivery* [online]. 2015, 6(1), 41-58 [cit. 2022-12-29]. ISSN 2041-5990. Dostupné z: doi:10.4155/tde.14.91
- [17] ŠKLUBALOVÁ, Zdeňka. *Základní praktická cvičení z farmaceutické technologie*. Praha: Karolinum, 2020. ISBN 978-80-246-4561-2.
- [18] MARTÍNEZ RIVAS, Claudia Janeth, Mohamad TARHINI, Waisudin BADRI, et al. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2017, 532(1), 66-81 [cit. 2022-12-31]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2017.08.064
- [19] ZIELIŃSKA, Aleksandra, Filipa CARREIRÓ, Ana M. OLIVEIRA, et al. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules* [online]. 2020, 25(16) [cit. 2022-12-31]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25163731

- [20] YOO, Jihye, Changhee PARK, Gawon YI, Donghyun LEE a Heebeom KOO. Active Targeting Strategies Using Biological Ligands for Nanoparticle Drug Delivery Systems. *Cancers* [online]. 2019, 11(5) [cit. 2023-01-09]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers11050640
- [21] KUMARI, Preeti, Balaram GHOSH a Swati BISWAS. Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. *Journal of Drug Targeting* [online]. 2016, 24(3), 179-191 [cit. 2023-01-09]. ISSN 1061-186X. Dostupné z: doi:10.3109/1061186X.2015.1051049
- [22] M. RABANEL, J., V. AOUN, I. ELKIN, M. MOKHTAR a P. HILDGEN. Drug-Loaded Nanocarriers: Passive Targeting and Crossing of Biological Barriers. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2012, 19(19), 3070-3102 [cit. 2023-01-13]. ISSN 09298673. Dostupné z: doi:10.2174/092986712800784702
- [23] DOBROVOLSKAIA, Marina A., Parag AGGARWAL, Jennifer B. HALL a Scott E. MCNEIL. Preclinical Studies To Understand Nanoparticle Interaction with the Immune System and Its Potential Effects on Nanoparticle Biodistribution. *Molecular Pharmaceutics* [online]. 2008, 5(4), 487-495 [cit. 2023-01-13]. ISSN 1543-8384. Dostupné z: doi:10.1021/mp800032f
- [24] Bartneck M, Warzecha KT, Tacke F. Therapeutic targeting of liver inflammation and fibrosis by nanomedicine. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2014 Dec;3(6):364-76. doi: 10.3978/j.issn.2304-3881.2014.11.02. PMID: 25568860; PMCID: PMC4273112.
- [25] HELLERBRAND, Claus. Hepatic stellate cells—the pericytes in the liver. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* [online]. 2013, 465(6), 775-778 [cit. 2023-01-14]. ISSN 0031-6768. Dostupné z: doi:10.1007/s00424-012-1209-5

- [26] HU, Qiaobin, Ji-Young LEE a Yangchao LUO. Nanoparticles Targeting Hepatic Stellate Cells for the Treatment of Liver Fibrosis. *Engineered Science* [online]. 2019 [cit. 2023-01-14]. ISSN 2576988X. Dostupné z: doi:10.30919/es8d507
- [27] GREISH, Khaled. Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: A royal gate for targeted anticancer nanomedicines. *Journal of Drug Targeting* [online]. 2008, 15(7-8), 457-464 [cit. 2023-01-14]. ISSN 1061-186X. Dostupné z: doi:10.1080/10611860701539584
- [28] BYRNE, James D., Tania BETANCOURT a Lisa BRANNON-PEPPAS. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2008, 60(15), 1615-1626 [cit. 2023-01-15]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2008.08.005
- [29] SHAHRIARI, Mahsa, Prashant KESHARWANI, Thomas P. JOHNSTON a Amirhossein SAHEBKAR. Anticancer potential of curcumin-cyclodextrin complexes and their pharmacokinetic properties. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2023, 631 [cit. 2023-01-18]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2022.122474
- [30] HATCHER, H., R. PLANALP, J. CHO, F. M. TORTI a S. V. TORTI. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2008, 65(11), 1631-1652 [cit. 2023-01-18]. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-008-7452-4
- [31] HASSANIZADEH, Shirin, Mehrnaz SHOJAEI, Mohammad BAGHERNIYA, Alexander N. OREKHOV a Amirhossein SAHEBKAR. Effect of nano-curcumin on various diseases: A comprehensive review of clinical trials. *BioFactors* [online]. [cit. 2023-01-19]. ISSN 0951-6433. Dostupné z: doi:10.1002/biof.1932

- [32] NASSIR, Fatiha. NAFLD: Mechanisms, Treatments, and Biomarkers. *Biomolecules* [online]. 2022, 12(6) [cit. 2023-01-20]. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom12060824
- [33] STETEFELD, Jörg, Sean A. MCKENNA a Trushar R. PATEL. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews* [online]. 2016, 8(4), 409-427 [cit. 2023-03-08]. ISSN 1867-2450. Dostupné z: doi:10.1007/s12551-016-0218-6
- [34] Zeta potenciál | ANAMET. *Anamet* | *ANAMET* [online]. Dostupné z: <https://www.anamet.cz/zeta-potencial/#pristroje-href>
- [35] ZATORSKA, Maria, Grzegorz ŁAZARSKI, Urszula MAZIARZ, et al. Drug-loading capacity of polylactide-based micro- and nanoparticles – Experimental and molecular modeling study. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2020, 591 [cit. 2023-04-07]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2020.120031
- [36] LIU, Yun, Guangze YANG, Song JIN, Letao XU a Chun-Xia ZHAO. Development of High-Drug-Loading Nanoparticles. *ChemPlusChem* [online]. 2020, 85(9), 2143-2157 [cit. 2023-04-07]. ISSN 2192-6506. Dostupné z: doi:10.1002/cplu.202000496
- [37] KOZÁČKOVÁ, Daniela. *Polymerní částice pro cílenou terapii a zvýšení biodostupnosti*. Hradec Králové, 2022. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie. Vedoucí práce Holas, Ondřej.
- [38] BLAŽKOVÁ, Jiřina. *Studium vlastností biodegradovatelných nanočástic na bázi polyesterů*. Hradec Králové, 2020. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie. Vedoucí práce Holas, Ondřej.

- [39] ANAND, Preetha, Hareesh B. NAIR, Bokyung SUNG, Ajaikumar B. KUNNUMAKKARA, Vivek R. YADAV, Rajeshwar R. TEKMAL a Bharat B. AGGARWAL. RETRACTED: Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. *Biochemical Pharmacology* [online]. 2010, 79(3), 330-338 [cit. 2023-05-13]. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2009.09.003