

**UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra farmaceutické technologie



**FARMACEUTICKÉ APLIKACE POLYESTERŮ  
JAKO NANONOSIČŮ LÉČIV**

Diplomová práce

**Hradec Králové 2018**

**Petra Staňková**

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem.

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.

Dne ..... V Hradci Králové

.....

**Petra Staňková**

Na tomto místě bych ráda poděkovala PharmDr. Ondřeji Holasovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce a zařazení do projektu SVV 260 401. Děkuji za cenné rady, připomínky, trpělivost a přátelský přístup.

# OBSAH

1	ÚVOD .....	1
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	3
2.1	Klasifikace nanočástic .....	3
2.1.1	Polymerní nanočástice .....	3
2.1.2	Dendrimery .....	3
2.1.3	Fosfolipidické nanosystémy .....	4
2.1.4	Peptidické nanočástice .....	5
2.1.5	Křemičité nanočástice .....	5
2.1.6	Nanočástice z ušlechtilých kovů .....	5
2.1.7	Fullereny .....	5
2.2	Poly( $\alpha$ -hydroxykyseliny) .....	6
2.2.1	Syntéza .....	7
2.2.2	Biodegradace .....	9
2.3	Přehled metod přípravy polymerních nanočástic .....	10
2.3.1	Top to bottom metody .....	11
2.3.2	Bottom to top metody .....	15
2.4	Modifikace povrchu nanočástic .....	18
2.4.1	Pegylace .....	19
2.5	Využití nanočásticových systémů ve farmacii .....	19
2.5.1	Onkologie .....	20
2.5.2	Imunologie .....	24
2.5.3	Další možnosti .....	25
3	PRAKTICKÁ ČÁST .....	26

3.1	Použité přístroje .....	26
3.2	Použité suroviny .....	26
3.3	Laboratorní postup .....	27
3.3.1	Metoda odpařování rozpouštědla .....	27
3.3.2	Nanoprecipitační metoda .....	28
3.3.3	Enkapsulační efektivita .....	29
3.4	Principy měření nanočástic .....	31
3.4.1	Princip měření velikosti nanočástic .....	31
3.4.2	Princip měření zeta potenciálu nanočástic .....	31
3.5	Výsledky .....	33
3.5.1	Přehled vzorků .....	33
3.5.2	Velikost nanočástic .....	34
3.5.3	Zeta potenciál .....	38
3.5.4	Enkapsulační efektivita .....	43
4	DISKUZE .....	45
4.1	Granulometrická analýza .....	45
4.1.1	Metoda odpařování rozpouštědla .....	45
4.1.2	Nanoprecipitační metoda .....	47
4.2	Zeta potenciál nanočástic .....	48
4.2.1	Metoda odpařování rozpouštědla .....	48
4.2.2	Nanoprecipitační metoda .....	50
4.3	Enkapsulační efektivita rhodaminu B .....	50
5	ZÁVĚR .....	52
6	SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK .....	53
7	SEZNAM LITERATURY .....	55

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Školitel: PharmDr. Ondřej Holas, PhD.

Posluchač: Petra Staňková

Název diplomové práce: Farmaceutické aplikace polyesterů jako nanonosičů léčiv

Nanočástice jsou v současné době intenzivně studovaným a perspektivním typem lékové formy, jejíž potenciál spočívá především v možnosti cílené distribuce a řízeného uvolňování léčiva.

Teoretická část práce se věnuje jednotlivým druhům nanočástic a syntetickým biodegradabilním polymerům odvozených od  $\alpha$ -hydroxykyselin (PLA, PGA, PLGA). Velký důraz je kladen na metody přípravy nanočástic, a to jak z již předem připravených polymerů, tak z přímo polymerizovaných monomerů. V dalších kapitolách se práce zabývá modifikací povrchu částicových systémů a praktickým využitím nanomedicíny ve zdravotnictví.

V experimentální části je zkoumán vliv různých derivátů PLGA a jejich navážky na velikost, polydisperzitu, zeta potenciál nanočástic a enkapsulační efektivitu rhodaminu B. Nanočástice byly připraveny nanoprecipitační metodou nebo metodou odpařování rozpouštědla. Měření velikosti nanočástic a zeta potenciálu bylo zajištěno přístrojem Zetasizer ZS 90.

Bylo prokázáno, že pro tvorbu nanočástic je nejvhodnější navážka polymeru 25 mg, vzorky s touto navážkou vykazují vysokou míru reprodukovatelnosti. Jediný polymer, u kterého byl vliv navážky na výslednou velikost nanočástic prakticky zanedbatelný, je PLGA 3:7. Nanoprecipitační metodou byly vytvořeny nanočástice s mnohem menší polydisperzitou než metodou odpařování rozpouštědla. Oběma metodami lze docílit vzniku stabilních nanočástic se zeta potenciálem  $\pm 30$  mV.

# ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradci Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Consultant: PharmDr. Ondřej Holas, PhD.

Student: Petra Staňková

Title of Thesis: Pharmaceutical applications of polyesters as drug nanocarriers

Nanoparticles are nowadays intensively studied and perspective type of a drug carrier. Its potential is based on a possibility of targeted drug delivery and controlled drug release.

The theoretical part is about nanoparticles types, polymers derived from  $\alpha$ -hydroxyacids (PLA, PGA, PLGA). Focus is given on methods of nanoparticles preparation: dispersion of preformed polymers or the polymerization of monomers. The modification of particles surface and practical use of nanomedicine in healthcare are described in other chapters.

The research in experimental part is focused on the influence of different types of PLGA and their weighing on the size, polydispersity, nanoparticles zeta potential and encapsulation efficiency of rhodamine B. Nanoparticles were prepared by nanoprecipitation method or by solvent evaporation method. The Zetasiser ZS 90 device was used to measure the size of the nanoparticles and to measure zeta potential.

The result of the research shows the most suitable weighing for creation of nanoparticles is 25 mg. The samples of this weighing show a high reproductive rate. Polymer PLGA 3:7 was the only polymer where the influence of weighing was negligible when examining final size of nanoparticles. In comparison to solvent evaporation method nanoparticles with much smaller polydispersity were created by using nanoprecipitation method. Both methods were successful in creation of stable nanoparticles with zeta potential  $\pm 30\text{mV}$ .

## ZADÁNÍ

Cílem této práce je studium vlivu molekulárního uspořádání a molární hmotnosti poly-laktid-*co*-glykolidu (PLGA) na vlastnosti připravených farmaceutických nanočástic. V minulosti byla na KFT v rámci skupiny Doc. Milana Dittricha, CSc. syntetizována celá řada derivátů PLGA lišících se geometrií molekuly, stupněm větvení a molární hmotností. Jak tyto parametry ovlivňují vlastnosti výsledných nanočástic, bylo zkoumáno pomocí emulzní-odpařovací metody a nanoprecipitační metody přípravy nanočástic. Optimální parametry částic jsou velikost pod 200 nm s nízkou mírou polydisperzity.

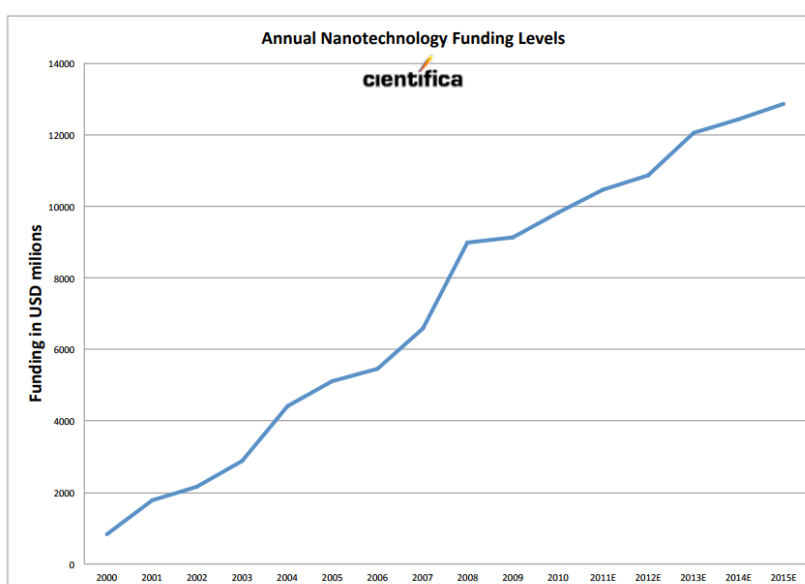


## SEZNAM ZKRATEK

1T, 3T, 5T	Kopolymery kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerytritolu, lišící se jeho poměrovým zastoupením (1 %, 3 %, 5 %)
APC	Antigen prezentující buňka
DOX	Doxorubicin
PEG	Polyethylenglykol
PLA	Polymléčná kyselina
PGA	Polyglykolová kyselina
PLGA	Kopolymer kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové
PNP	Polymerní nanočástice
PTX	Paklitaxel
RES	Retikuloendoteliální systém
RESS	Rychlá expanze superkritického roztoku
RESOLV	Rychlá expanze superkritického roztoku do kapaliny
RhB	Rhodamin B
Z-Ave	Celkový střední rozměr
PdI	Polydisperzita

# 1 ÚVOD

Nanotechnologie je vědní obor, který se zabývá tvorbou a využitím nanočásticových materiálů. Díky svým unikátním vlastnostem zaznamenávají nanočástice v posledních desetiletích velký úspěch nejen na poli medicíny, ale také v textilním průmyslu, zemědělství, stavebnictví, elektronice, forenzních vědách a mnoha dalších oborech. V období posledních dvou dekad sledujeme stále rostoucí investice do rozvoje nanotechnologických metod (viz obr. 1). Odvětví se rychle vyvíjí, široká škála možností využití nanočástic souvisí i s vysokou poptávkou na trhu.



Obr. 1: Celosvětové financování nanotechnologií v letech 2000 až 2015<sup>1</sup>

Nanočástice jsou v současné době intenzivně studovaným a perspektivním typem lékové formy. Největší potenciál částicových systémů spočívá v možnosti cílené distribuce a řízeného uvolňování léčiv. Využívají se také k maskování chuti léčiv, enkapsulaci těžkých léčiv a ochraně léčiv před metabolizací nebo jinými nežádoucími vlivy okolního prostředí.<sup>2</sup>

Moderní farmakoterapie cílí na udržování konstantní terapeutické hladiny léčiv v krevní plazmě, což je umožněno řízeným uvolňováním léčiv v požadované dávce po stanovený čas. To vede ke zvýšení účinnosti léčiva, což znamená, že k terapii je potřeba jeho menší celková dávka. Z toho vyplývá velká výhoda v podobě vysoké compliance a convenience pacienta.<sup>2</sup> Uvolňování z nosiče může být kontinuální

nebo pulzní. Kontinuální uvolňování je umožněno díky kontrolované difúzi léčivé látky nebo časově závislé degradaci polymeru. Pulzní uvolňování probíhá tak, že nosič uvolňuje léčivou látku jako reakci na specifický stimul, čímž simuluje chování lidského těla (při např. uvolňování hormonů).<sup>3</sup>

Polyesterové nanočástice umožňují cílenou distribuci hydrofilních/hydrofobních léčiv do specifických orgánů, tkání nebo buněk. Příkladem je léčba onkologických onemocnění, kdy léčivo působí efektivněji na zhoubné buňky, čímž se sníží nežádoucí účinky na zdravou tkáň. Transport léčiv do různých částí těla, které zůstávají jiným lékovým formám nedostupné, je umožněn díky subcelulární velikosti nosičů. Použitý materiál, metoda přípravy částic a modifikace jejich povrchu rozhoduje, kde budou nosiče s léčivem působit. Nosiče jsou určeny pro cílené uvolňování léčiv při perorálním, parenterálním i lokálním podání, pro aplikaci do oka i do nosu.<sup>4</sup>

Nevýhodou částicových systémů je nutná rekonstituce suspenze před parenterální aplikací. Ohrožena je i stabilita některých léčiv, především peptidů, protože při degradaci matrice dochází uvnitř částice ke změně pH. Denaturaci mohou zavinit i používaná organická rozpouštědla.<sup>2</sup> Velkým nedostatkem nanočásticových systémů je nízká enkapsulační efektivita pro značnou část léčivých látek. Léčba je velmi nákladná a zatím nejsou prozkoumána veškerá její rizika (teratogenita, neurotoxicita). Faktem je i to, že laboratorní výsledky nemusí být shodné s výsledky v klinické praxi.<sup>82</sup>

Očekávaným přínosem nanomedicíny je diagnostika a léčba mnohých onemocnění. Kromě cíleného transportu cytostatik se očekává využití při specifickém podávání antibiotik, antiparazitik, inzulínu, proteinů, vakcín a dalších.<sup>4</sup>

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Klasifikace nanočástic

#### 2.1.1 Polymerní nanočástice

Polymerní nanočástice (PNP) jsou definovány jako pevné koloidní částice o rozměrech 10-1000 nm v průměru.<sup>5,6</sup> Dělíme je na nanosféry a nanotobolky.

Nanosféry jsou matricové částice, jejichž objem je celistvý. Látky se mohou adsorbovat buď na povrch částice, nebo mohou být do částic enkapsulovány.<sup>7</sup>

Nanotobolky jsou vezikulární systémy chovající se podobně jako rezervoáry. Látky jsou zachyceny v uzavřené dutině, která je tvořena tekutou složkou (olej, voda) a vytváří tak jádro nanotobolky. Jádro je obklopeno pevným polymerním pláštěm.<sup>8</sup>

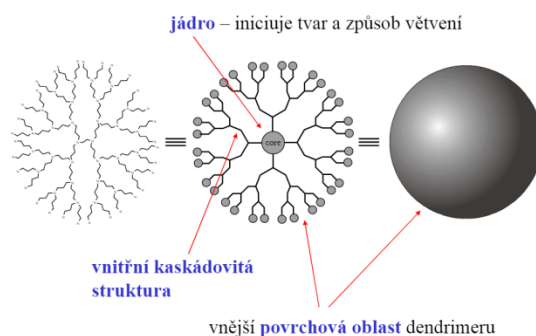


Obr. 2: Klasifikace polymerních nanočástic

A – nanosféry, B – nanotobolky obsahující olej, C – nanotobolky obsahující vodu<sup>9</sup>

#### 2.1.2 Dendrimery

Dendrimery jsou monodisperzní nanostruktury sférického tvaru o velikosti 1-10 nm. Jedná se o molekuly s přesně definovanou strukturou a velikostí. Nevznikají náhodnou polymerací, ale přesnými větvcími kroky, což z nich dělá vysoce organizované struktury. Skládají se z jádra, vnitřního prostoru a povrchu – tyto tři složky ovlivňují velikost, tvar, flexibilitu a fyzikálně-chemické vlastnosti nanostruktury. Při syntéze dendrimery se střídají dva typy reakcí: reakce růstu a reakce aktivace. Podle způsobu růstu struktury rozlišujeme konvergentní a divergentní metodu. Při divergentní metodě roste dendrimer od jádra směrem ven. Konvergentní metoda je založena na spojování jednotek povrchu s monomery, které při určitém stupni velikosti spojí s jádrem za vzniku dendrimery.<sup>10</sup>



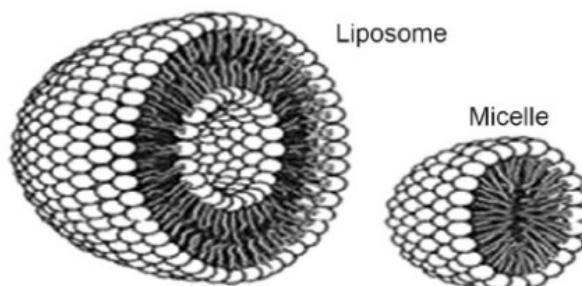
Obr. 3: Struktura dendrimerů<sup>11</sup>

### 2.1.3 Fosfolipidické nanosystémy

Micely jsou koloidní útvary o velikosti 5 až 150 nm tvořené pouze jednou dvojvrstvou fosfolipidů. Vznikají v roztocích povrchově aktivních látek po překročení kritické micelární koncentrace. Jejich povrch je hydrofilní, zatímco hydrofobní část micely se orientuje směrem dovnitř. Využívají se jako nosiče hydrofobních látek.<sup>12</sup>

Liposomy jsou vezikulární systémy o velikosti 20 nm až 100 μm tvořené více lipidickými dvojvrstvami. Hydrofilní část tvoří vnější i vnitřní hranici částice, v jádru lze tedy transportovat hydrofilní látky a fosfolipidová dvojvrstva slouží k transportu hydrofobních látek. Rozlišujeme:

- konvenční liposomy – využití k cílené distribuci do RES, obvykle negativní náboj,
- stericky chráněné liposomy – modifikace povrchu hydrofilními skupinami, dlouhodobá cirkulace v séru,
- cílené liposomy – navázaný ligand, interakce s povrchovými strukturami buněk,
- kationické liposomy – pozitivní náboj, interakce s negativně nabitou DNA.<sup>13</sup>



Obrázek 4: Struktura liposomu a micely<sup>14</sup>

### **2.1.4 Peptidické nanočástice**

Peptidické nanočástice se využívají pro usnadnění buněčné internalizace peptidů a nukleových kyselin. Přestup nanočástic do nitra buňky je umožněn díky buňkou pronikajícím peptidům (CPP), což jsou krátké sekvence 6 až 30 aminokyselin, které jsou konjugovány na povrch nanočástice, případně inkorporovány přímo do její struktury. Sekvence aminokyselin může být polykationická, amfipatická či nepolární, tyto atributy ovlivňují buněčné vychytávání. Nejočekávanějším přínosem peptidických nanočástic je možnost perorálního podávání inzulínu.<sup>15</sup>

### **2.1.5 Křemičité nanočástice**

Nanočástice na bázi křemíku ( $\text{SiO}_2$ ) mají specifické povrchové vlastnosti – disponují vysoce porézním povrchem a tím pádem vytváří velký počet vazebných míst pro distribuovanou molekulu léčiva či kontrastní látky. Jejich příprava je jednoduchá a finančně nenáročná. Nevýhodou je jejich toxicita (oxidační stres, poškození membrán buněk), kterou lze redukovat povrchovou úpravou aminoheptylaminoethyltrimethoxysilanem.<sup>16</sup>

### **2.1.6 Nanočástice z ušlechtilých kovů**

Pro kovové nanočástice je typická velikost 1 až 5 nm, prakticky nulová cytotoxicita a jen nízký výskyt alergických reakcí. Zlaté a platinové nanočástice se používají v diagnostice a léčbě rakoviny, stříbrné nanočástice se osvědčily jako antimikrobní agens. Lze je využít pro cílenou distribuci i vyhřívání tkání.<sup>17</sup>

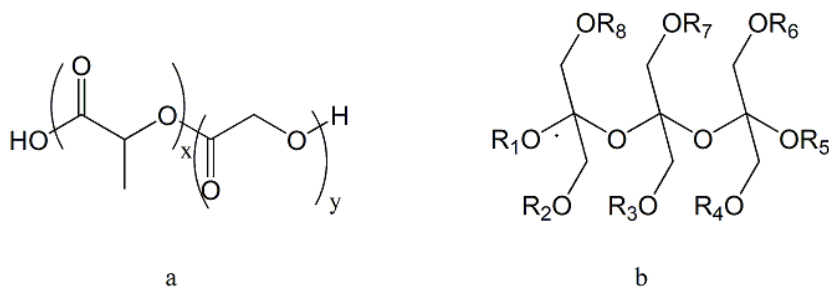
### **2.1.7 Fullereny**

Fullereny jsou nanočástice o velmi malé velikosti ( $\text{C}_{60}$  – 1,1 nm) tvořené výhradně atomy uhlíku. Jejich charakteristickou vlastností je vysoká stabilita, jsou odolné vůči vnějším vlivům, jako je teplota nebo tlak. Pokud jde o kulovitou strukturu, atomy uhlíku jsou uspořádané do pětiúhelníků či šestiúhelníků a vytvářejí uzavřenou strukturu s vnitřní dutinou, do které lze vložit molekuly léčiv. Fullereny mohou mít i podobu trubiček nebo desek.<sup>18</sup>

## 2.2 Poly( $\alpha$ -hydroxykyseliny)

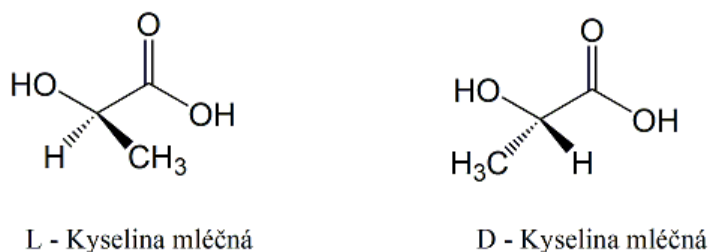
K přípravě polymerních nanočástic se využívají přírodní nebo syntetické polymery. Přírodní polymery (proteiny, polysacharidy) se pro přípravu nanočástic využívají méně kvůli rozdílům v čistotě a potřebě síťování, které by mohlo později enkapsulovaná léčiva denaturovat. Hlavní roli v přípravě nanočástic hrají polymery syntetické, především ty odvozené od  $\alpha$ -hydroxykyselin – homopolymery PLA (poly-lactic acid), PGA (poly-glycolic acid) a jejich kopolymer PLGA (poly-lactide-*co*-glycolide-acid). Polykondenzační reakce  $\alpha$ -hydroxykyselin s vícesytnými alkoholy umožňuje vznik oligoesterů a nízkomolekulárních polyesterů s větvenými molekulami. Výhodou těchto polymerů je jejich netoxicitata, biokompatibilitata a schopnost resorpce přirozenými cestami. Míra degradace a rychlost uvolňování léčiva mohou být upraveny poměrovým zastoupením kyselin v kopolymeru (PLA zvyšuje hydrofobicitu, PGA zvyšuje hydrofilitu).<sup>19,20</sup>

Ideálními nosiči léčiv jsou větvené polymery s nižší molární hmotností, které degradují za několik hodin, maximálně dnů. Pro syntézu větvených polyesterů se využívají tzv. větvicí složky (mannitol, pentaerythritol, polyvinylalkohol) o různé koncentraci. Ty reagují s ekvimolární směsí kyseliny glykolové a kyseliny mléčné při stupňové kopolymeraci. Molární hmotnost nosičů s rostoucí koncentrací větvicí složky klesá, což je důsledek vzrůstajícího přebytku hydroxylů. Stupeň větvení nosičů vzrůstá s rostoucí koncentrací dipentaerythritolu a klesá při použití mannitolu. Tento efekt je u mannitolu pravděpodobně způsoben vyšší reaktivitou primárních hydroxylů oproti dvěma delším řetězcům. Dipentaerythritol oproti němu disponuje šesti rovnocennými hydroxyly, což vede ke vzniku pravidelné molekuly.<sup>20</sup>



Obr. 5: Lineární PLGA (a) a hvězdicovitě rozvětvený kopolymer z mléčné kyseliny, glykolové kyseliny a tripentaerythritolu (b). R1-R8 je větvení PLGA.<sup>21</sup>

Kyselina mléčná obsahuje chirální centrum, v závislosti na něm rozlišujeme produkty polymerace odvozené od chirálně čisté kyseliny L-mléčné (PLLA – krystalická forma), D-mléčné (PDLA – amorfni forma) či racemátu (PDLLA). V praxi je preferován racemát pro možnost více homogenní disperze léčiva v polymerní matici a rychlosti degradace. Monomer kyseliny mléčné, resp. D- i L- izomery, lze získat biologickými a chemickými metodami. Biologická metoda je založena na bakteriální fermentaci škrobů a polysacharidů a v případě upravených kmenů *Lactobacillus* lze docílit zisku L-kyseliny mléčné. Chemickým procesem vzniká racemická směs D- a L-izomerů.<sup>22, 23</sup> Kyselina glykolová je nejjednodušší  $\alpha$ -hydroxykyselina a nemá chirální centrum. Monomer lze získat extrakcí nebo purifikací z cukernatých rostlin nebo laboratorní syntézou. PGA je vysoce krystalický alifatický polyester.<sup>24</sup> Kopolymery kyseliny DL-mléčné (1:1) a kyseliny glykolové označujeme jako PLGA, jsou to zpravidla ekvimolární směsi monomerů, popřípadě cyklických dimerů kyseliny glykolové a kyseliny DL-mléčné či jejího cyklického laktonu.<sup>20</sup>



Obr. 6: Izomery kyseliny mléčné<sup>23</sup>

## 2.2.1 Syntéza

V následující kapitole jsou popsány možnosti syntézy biodegradabilních polymerů.

### 2.2.1.1 Přímá polykondenzace za přítomnosti katalyzátoru a sníženého tlaku

Polymerní produkty této metody se vyznačují nízkou molární hmotností a nízkou mechanickou pevností. Jednotky monomerů reagují za uvolnění molekul vody, které se z reakční směsi těžko odstraňují a posouvají tak rovnováhu směrem



k hydroxykyselině. Další nevýhodou je nemožnost regulace stereoizomerie během reakce. Zvýšit molekulovou hmotnost produktu lze při použití prepolymerů.<sup>20, 23</sup>

### 2.2.1.2 Jednostupňová azeotropická kondenzační polymerace

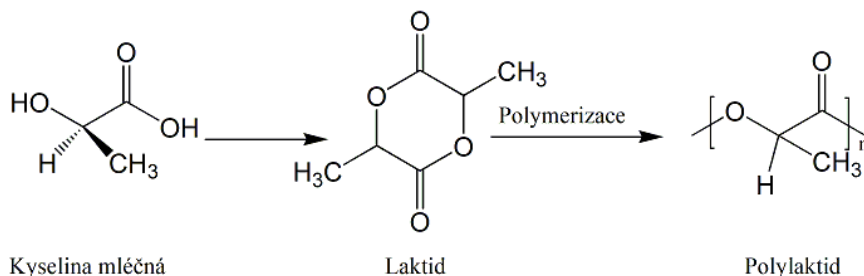
Touto metodou lze získat vysokomolekulární polyestery za použití vysoce účinného katalyzátoru a vhodného azeotropického rozpouštědla. Během polykondenzace lze předejít depolymerizaci a racemizaci zvolením reakční teploty pod teplotou tání polymeru. Voda se jako vedlejší produkt reakce odstraní azeotropicky.<sup>20, 23</sup>

### 2.2.1.3 Polymerace v pevném stavu

Nejdůležitějším bodem této metody je zvolit správnou reakční teplotu – nad teplotu skelného přechodu a pod teplotu tání semikrystalického prepolymeru o nízké molekulové hmotnosti. Díky tomu dochází k reakcím v amorfní části polymeru s důsledkem nárůstu řetězce a eliminaci nežádoucích reakcí v krystalické fázi.<sup>20, 23</sup>

### 2.2.1.4 Polymerace za otevření kruhu

Tato metoda umožňuje vznik polymerů o vysoké molekulové hmotnosti a její velkou výhodou je vysoký stupeň regulace stereoizomerie. K provedení jsou potřeba cyklické dimery, které se získávají z nízkomolekulárních oligomerů za vysoké teploty a nízkého tlaku s použitím katalyzátoru. Cyklické šestičlenné dimery se poté otvírají a právě z nich je vytvořen prodlužující se řetězec s požadovanou molekulovou hmotností. Dle mechanismu a iniciátoru rozlišujeme aniontovou, kationtovou nebo koordinačně-insertní metodu.<sup>20, 23</sup>

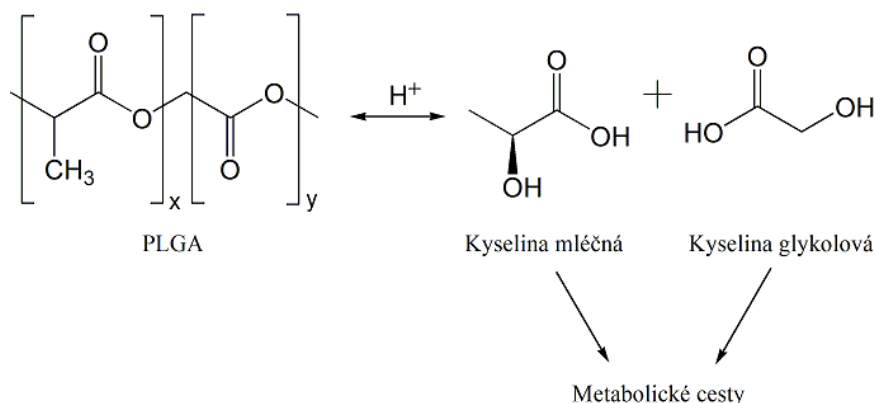


Obr. 7: Polymerace za otevření kruhu<sup>23</sup>

## 2.2.2 Biodegradace

Biodegradace PLGA je proces, kdy dochází k převodu polymeru na jednodušší sloučeniny a jejich následnému vyloučení z těla. Ve vodném prostředí dochází k rozložení PLGA díky penetraci vody do matrice. Polymer podléhá esterové hydrolýze, čímž dochází k náhodnému štěpení řetězců za vzniku oligomerů a monomerů mléčné a glykolové kyseliny. To vede ke snížení molární hmotnosti i hmotnosti tělesa. Během degradace dochází k nárůstu počtu karboxylových skupin, což má za následek autokatalýzu esterové hydrolýzy. Oligomery a monomery jsou rozpustné ve vodě, za vzniku pórů unikají z matrice do okolního prostředí, čímž postupně dochází k úplnému odbourání matrice. Terminální fází je biodegradace monomerů. Kyselina mléčná vstupuje do citrátového cyklu a z těla je eliminována ve formě oxidu uhličitého a vody. Kyselina glykolová se buď v nezměněné podobě vylučuje ledvinami, nebo také vstoupí do citrátového cyklu. Pokud je rychlost penetrace vody do matrice stejná nebo vyšší než rychlost difuze degradačních produktů z matrice, označujeme degradaci jako homogenní. Pokud je rychlost menší, jedná se o heterogenní degradaci.<sup>20, 23, 25</sup>

Rychlost biodegradace je ovlivnitelná řadou faktorů. Roli hraje chemické složení kopolymeru, zda se jedná o polymery odvozené od čisté kyseliny L-mléčné či racemické směsi nebo pH media. Nezanedbatelnými faktory jsou také molekulová hmotnost, stupeň krystalinity, případná přítomnost nečistot a reakční teplota.<sup>26, 27</sup>

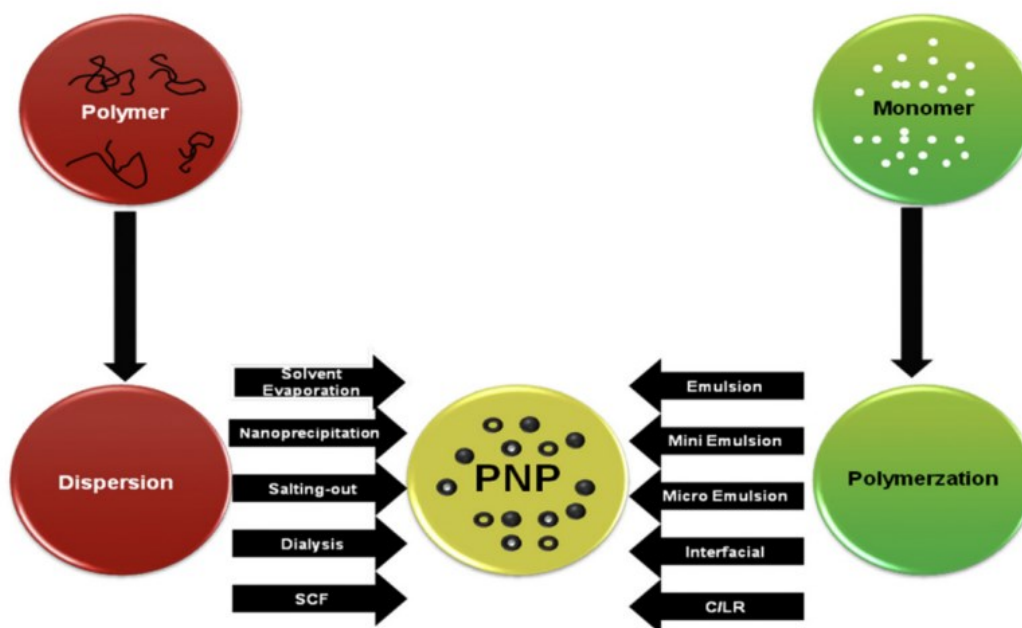


Obr. 8: Biodegradace PLGA<sup>82</sup>

## 2.3 Přehled metod přípravy polymerních nanočástic

Polymerní nanočástice mohou být připravovány jak z předem připravených polymerů, tak z přímo polymerizovaných monomerů. Metody jako odpařování rozpouštědla, nanoprecipitace, vysolování, dialýza a technologie superkritických kapalin zahrnující rychlou expanzi superkritického roztoku do vzduchu nebo kapaliny, se využívají pro přípravu PNP z předem připravených polymerů (top to bottom metody). Pro polymerizační techniky jako mikroemulze, miniemulze, emulze bez tenzidu, mezifázová polymerace a radikálová polymerace jsou výchozí surovinou monomery (bottom to top metody).<sup>9</sup>

Výběr metody přípravy PNP ovlivňuje mnoho faktorů jako požadavky na velikost částic, místo aplikace nebo polymerační systém. Polymerní systémy, které jsou vyvíjeny pro využití v biomedicině nebo oblasti životního prostředí, by neměly zahrnovat přísady nebo reaktanty jako jsou surfaktanty nebo zbytky organických rozpouštědel.<sup>9</sup>



Obr. 9: Schématické znázornění různých technik přípravy nanočástic (SCF – technologie superkritických kapalin, C/LR – koordinační/living radikálová polymerace)<sup>9</sup>

### 2.3.1 Top to bottom metody

V následující kapitole jsou popsány metody přípravy nanočástic z předem připravených polymerů.

#### 2.3.1.1 Metoda odpařování rozpouštědla

Metoda odpařování rozpouštědla je první metodou, která se začala pro přípravu nanočástic z předem připravených polymerů používat.<sup>28</sup> Rozmach metody nastal právě v odvětví farmaceutické technologie, kde se z biodegradabilních polymerů připravují nanonosiče léčiv.<sup>29</sup>

Roztoky polymerů se připravují pomocí těkavých rozpouštědel. V minulosti se využíval dichlormethan a chloroform, ale ty jsou nyní nahrazeny ethylacetátem disponujícím lepším toxikologickým profilem. Roztok polymerů se emulguje do kontinuální vodné fáze, ve které je rozpuštěna povrchově aktivní látka stabilizující emulzi. Základním principem metody je vytvoření emulze a její převedení na suspenzi nanočástic, což je jev, který nastává díky difúzi rozpouštědla polymeru do vnější fáze a jeho následnému odpařování. Obecně platí, že polymer rozpuštěný v organickém rozpouštědle tvoří olejovou fázi, vodnou fázi tvoří stabilizátory rozpuštěné ve vodě.<sup>30, 31</sup>

Z hlediska přípravy emulzí se využívají dva hlavní způsoby, a to příprava buď jednoduché emulze jako například olej ve vodě (o/v), nebo dvojité emulze jako je voda v oleji ve vodě (v/o)/v. U těchto metod se uplatňuje vysokorychlostní homogenizace nebo ultrazvuk – polymerní roztok je tak dispergován do vnější fáze ve formě nanokapeček. Následuje odpařování rozpouštědla, které probíhá za stálého míchání na magnetické míchače za pokojové teploty nebo za zvýšené teploty/sníženého tlaku. Odpařování rozpouštědla vede k precipitaci polymeru a formulaci nanočástic. Po odpaření rozpouštědla mohou být nanočástice separovány ultracentrifugací a promyty destilovanou vodou za účelem odstranění povrchově aktivních látek. Na závěr je produkt lyofilizován.<sup>9</sup>

Jedná se o poměrně jednoduchou metodu k přípravě nanosfér. Nevýhodou je časová náročnost a riziko koalescence během odpařování rozpouštědla, což může mít vliv na finální strukturu a velikost částic.<sup>9</sup>

### 2.3.1.2 Nanoprecipitace

Nanoprecipitační metoda je často nazývána metodou vytlačení rozpouštědla nebo metodou mezifázové depozice. Využívá se k přípravě nanosfér.<sup>32</sup>

K přípravě polymerních nanočástic nanoprecipitační metodou jsou potřeba tři základní komponenty: polymer (syntetický, semisyntetický, přírodní), rozpouštědlo polymeru a kapalina, ve které je polymer nerozpustný. Z polymerů se nejčastěji používají biodegradabilní polyestery, především PCL (poly( $\epsilon$ -caprolactone)<sup>33</sup>, PLA<sup>34</sup> a PLGA<sup>35</sup>, ale využít lze i Eudragit<sup>36</sup> nebo PACA (polyalkylcyanoacrylate)<sup>37</sup>. Z přírodních polymerů lze použít škrob<sup>38</sup> nebo dextran<sup>39</sup>. Jako rozpouštědlo polymeru je zvoleno organické rozpouštědlo mísitelné s vodou, které se dá snadno odstranit odpařením. Nejpoužívanější je pro tuto metodu aceton, případně ethanol, methanol, dichlormethan nebo dioxan. Používají se i kombinace těchto rozpouštědel. Nerozpustná fáze obsahuje nerozpouštědlo (často vodu) nebo směs nerozpouštědel doplněnou o povrchově aktivní látky. Přidání tenzidu ovlivňuje velikost částic a zároveň suspenzi chrání před nežádoucí aglomerací částic.<sup>40, 41</sup>

PNP se vytváří pomalým přidáváním organické fáze do fáze vodné za mírného míchání, postup je ale možné i obrátit. I při přidávání vodné fáze do organické se PNP formulují. Principem metody je „vytlačení“ (semi)polárního rozpouštědla mísitelného s vodou z lipofilního roztoku a následná mezifázová separace polymeru. Kvůli rychlé difuzi organického rozpouštědla do nerozpustné fáze dochází k zvýšení mezifázového napětí mezi těmito dvěma fázemi, to zvýší plochu povrchu a vede k vytvoření malých kapiček organického rozpouštědla.<sup>42</sup>

Proces tvorby částic zahrnuje tři kroky: nukleaci, růst, agregaci. Vlastnosti nově vzniklých PNP ovlivňuje doba trvání každého kroku, koncentrace polymeru a jeho rozpustnost ve směsi. Záleží i na rychlosti vstřikování organické fáze do vodné,

rychlosti míchání, zvolené metodě mísení a přidání aditiv. Vždy záleží na povaze a koncentraci jednotlivých složek.<sup>42, 43</sup>

Výhody nanoprecipitační metody spočívají ve využití méně toxických rozpouštědel a snížení spotřeby energie – není potřeba ultrazvuk ani vysokorychlostní homogenizace, stačí mírný stupeň míchání.<sup>9</sup>

### **2.3.1.3 Vysolování**

Metoda vysolování je určena k přípravě nanosfér a její největší výhodou je, že se obejde bez použití povrchově aktivních látek a chlorovaných rozpouštědel. K přípravě organické fáze se používají rozpouštědla mísitelná s vodou, nejčastěji aceton. Vodná fáze obsahuje vysolovací složku ve vysoké koncentraci, např. elektrolyt ( $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ). Z těchto složek se vytvoří emulze, ovšem mísitelnost fází je výrazně snížena právě přidáním vysolovací složky. Emulze se následně zředí nadbytkem čištěné vody. Aceton obsažený v kapičkách emulze začne do vodného prostředí difundovat a to vede k vysrážení v něm rozpuštěného polymeru, tedy tvorbě nanočástic.<sup>44, 45</sup>

### **2.3.1.4 Dialýza**

Dialýza je jednoduchá a efektivní metoda pro přípravu malých nanočástic. Polymer je rozpuštěn v organickém rozpouštědle a umístěn do dialyzační trubice. V dialyzační membráně poté proběhne záměna organického rozpouštědla za nerozpouštědlo polymeru, což se projeví progresivní agregací polymeru a vytvořením homogenní suspenze nanočástic. Mechanismus formování nanočástic není zatím zcela objasněn, ale předpokládá se, že je velmi podobný nanoprecipitaci.<sup>46</sup> Pro přípravu nanočástic lze aplikovat i metodu založenou na působení osmotického tlaku. Polymer rozpuštěný v organickém rozpouštědle se umístí do dialyzační trubice a ta do nádoby s nerozpouštědlem polymeru. S použitím speciální dialyzační membrány nebo běžné semipermeabilní membrány je umožněn pasivní transport roztoků. To vede ke zpomalení mísení organického rozpouštědla s nerozpouštědlem polymeru.<sup>47</sup>

### 2.3.1.5 Technologie superkritických kapalin

Technologie superkritických kapalin jsou velmi atraktivní, neboť k přípravě nanočástic není potřeba organické rozpouštědlo. Produkty těchto metod jsou tím pádem šetrné k životnímu i fyziologickému prostředí.<sup>48</sup>

Superkritické kapaliny jsou látky, které překročily hranici kritické teploty a tlaku, dosáhly tedy tzv. superkritického bodu, za kterého látka existuje v rovnováze mezi plynnou a kapalnou fází.<sup>49</sup>

Superkritické kapaliny se pro přípravu nanočástic používají v metodách:

- a) rychlá expanze superkritického roztoku (RESS),
- b) rychlá expanze superkritického roztoku do kapaliny (RESOLV).

#### **Rychlá expanze superkritického roztoku (RESS)**

Polymer je rozpuštěn v superkritické kapalině a následně je tryskou expandován do okolního vzduchu. Při rozptylu dochází k vysokému stupni nasycení a rychlému snížení tlaku. V důsledku toho se rozpouštěcí vlastnosti superkritické kapaliny sníží, což vede k homogenní nukleaci a tvorbě dobře zformovaných částic. Touto metodou dochází k produkci směsi mikro- a nanočástic, mikročástice převažují.<sup>50</sup>

#### **Rychlá expanze superkritického roztoku do kapaliny (RESOLV)**

Tato metoda vznikla úpravou předcházející metody. Polymer je rozpuštěn v superkritické kapalině a poté expandován do tekutého media. Tato jednoduchá záměna způsobí omezení růstu částic, tím pádem je zajištěna primárně tvorba nanočástic.<sup>51</sup>

Pro přípravu nanočástic se nejčastěji používá superkritický CO<sub>2</sub>, pro nehořlavost, netoxicitu a nízkou cenu. Dalšími možnostmi jsou n-pentan, voda nebo amoniak. Velkou nevýhodou je to, že polymery jsou v superkritických kapalinách špatně rozpustné či nerozpustné, což užívání RESS a RESOLV limituje. Řešením nerozpustnosti polymeru v superkritické může být technika SAS (supercritical antisolvent). Při této metodě se použije tekuté rozpouštědlo, nejčastěji methanol, které je mísitelné se superkritickým rozpouštědlem a zároveň je v něm rozpustný daný polymer. Superkritická kapalina je umístěna ve vysokotlaké

nádobě. Poté dochází ke smísení rozpuštěného polymeru v organickém rozpouštědle a superkritické kapaliny. Organické rozpouštědlo rychle difunduje do superkritické kapaliny a tím nastává precipitace a tvorba nanočástic.<sup>52</sup>

### 2.3.2 Bottom to top metody

V následující kapitole jsou popsány metody přípravy nanočástic, pro které jsou výchozí surovinou monomery.

#### 2.3.2.1 Emulzní polymerace

Emulzní polymerace je nejběžnější metoda pro přípravu širokého spektra polymerních nanočástic. Jako disperzní medium se používá voda, ta je šetrná k životnímu prostředí a zároveň se využívá pro odvod tepla, které během polymerace vzniká. Na základě použití surfaktantu metody rozdělujeme na konvenční emulzní polymeraci a emulzní polymeraci bez tenzidu.<sup>53</sup>

**Konvenční emulzní polymerace** je nejpoužívanější emulzní polymerační metoda. Její realizace zahrnuje použití vody, ve vodě špatně rozpustného monomeru, ve vodě rozpustného iniciátoru a tenzidu. Výsledné nanočástice dosahují velikosti řádově  $10^2$  nm. Iniciací je zahájena kolizí monomeru rozpuštěného v kontinuální fázi s iniciátorem (ion nebo volný radikál). Alternativně lze iniciující monomer připravit pomocí vysokoenergetického záření, tzn. gama zářením, UV zářením nebo silným viditelným světlem. Separace fází a vznik pevných nanočástic může probíhat před i po terminaci polymerační reakce. Velikost částic závisí na typu použitého tenzidu – při použití lauryl esteru polyethylenoxidu je velikost 50 nm, při použití anionických tenzidů až 300 nm. Handicapem této metody je nezbytnost použití tenzidů. Jejich odstranění je finančně i časově náročné.<sup>54</sup>

**Emulzní polymerace bez tenzidu** je jednoduchou a ekologickou alternativou k předchozí metodě přípravy nanočástic. Pro tuto metodu je nezbytná deionizovaná voda, ve vodě rozpustný iniciátor a monomery. Částice jsou stabilizovány za použití ionizovatelných iniciátorů nebo iontových komonomerů. Nukleace a růst částic může probíhat různými mechanismy, například micelární nukleací nebo homogenní nukleací. Tyto mechanismy se liší rozpustností monomeru ve vodě.<sup>55, 56</sup>



### 2.3.2.2 Miniemulzní polymerace

K provedení miniemulzní polymerace jsou potřeba následující suroviny: voda, směs monomerů, kostabilizátor, tenzid a iniciátor. V této metodě se na rozdíl od emulzní polymerace používají nízkomolekulární sloučeniny (kostabilizátor) a vysokoenergetická zařízení (ultrazvuk). K dosažení ustáleného stavu miniemulze je potřeba velké množství energie. Povrchové napětí miniemulze je vždy mnohem více než nula.<sup>57, 9</sup> Zásadní vliv na výslednou podobu nanočástic mají použité typy a koncentrace kostabilizátorů a iniciátorů. Příkladem může být použití ve vodě rozpustného iniciátoru amonium persulfátu za vzniku mikročástic nebo lipofilního azobisisobutyronitrilu, kdy jsou výsledným produktem nanočástice o rozměrech 80 až 150 nm. Ačkoliv si tato metoda zakládá na pouze malém množství použitého tenzidu, jeho zbytky v nanočásticích zůstávají.<sup>58</sup> Aby byla jejich přítomnost ve finálním produktu minimalizována, začaly se ke stabilizaci některých miniemulzí využívat extrémně hydrofobní SMA (stearyl metacrylate) a DMA (dodecyl methacrylate), které plní roli kotenzidů.<sup>59</sup>

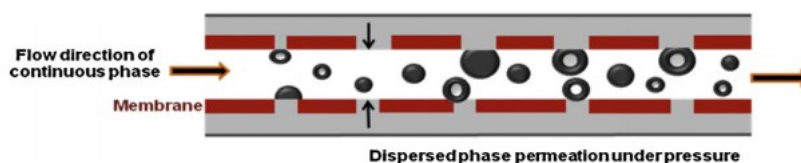
### 2.3.2.3 Mikroemulzní polymerace

Mikroemulzní polymerace je efektivní metodou pro přípravu polymerních nanočástic a na první pohled se velmi podobá emulzní polymeraci – produktem obou metod jsou PNP o vysoké molekulové hmotnosti. Odlišnost metod spočívá v kinetice procesu. Emulzní polymerace má tři intervaly reakční rychlosti, zatímco mikroemulzní polymerace pouze dva. Velikost částic a počet řetězců na částici jsou u mikroemulzní polymerace značně menší.<sup>60</sup> Ve vodě rozpustný iniciátor je přidáván do vodné fáze termodynamicky stabilní mikroemulze obsahující zbobtnalé micely. Při této metodě se používá velké množství povrchově aktivních látek. Ty kompletně pokryjí povrch vzniklých nanočástic a zajišťují hodnoty mezifázového napětí mezi vrstvami emulze blízké k nule. Iniciace polymerace neprobíhá v celém systému současně, takže se polymerní řetězce nejprve vytvoří jen v některých mikrokapkách. Později dochází na základě působení osmotických a elastických vlivů vzniklých řetězců k destabilizaci mikroemulze, což má za následek růst nanočástic, vznik prázdných

micel a sekundární nukleaci.<sup>61</sup> Kinetiku a vlastnosti výsledných PNP ovlivňuje nejen typ a koncentrace iniciátoru, tenzidu a monomeru, ale i reakční teplota. Nevýhodou metody je množství použitého tenzidu, které ovlivňuje stabilitu polymeru.<sup>9</sup>

#### 2.3.2.4 Mezifázová polymerace

Tato metoda je založena na reakci dvou monomerů nebo látek, které jsou rozpuštěné ve dvou fázích, a samotná polymerace probíhá právě na mezifázovém rozhraní těchto dvou kapalin.<sup>62</sup> Metoda je díky své jednoduchosti preferována v mnoha oblastech, od enkapsulace farmaceutických látek po přípravu vodivých polymerů.<sup>63</sup> Duté polymerní nanočástice lze připravit mezifázovými síťovacími reakcemi (polyadice, polykondenzace<sup>64</sup>, radikálová polymerace<sup>65</sup>). Polymerací monomerů na mezifázi velmi jemné mikroemulze typu olej ve vodě vznikají nanotobolky obsahující olej.<sup>66</sup> Organické rozpouštědlo plně mísitelné s vodou slouží jako nosič monomeru. Předpokládá se, že mezifázová polymerace monomeru pak probíhá na povrchu kapek oleje vytvořených emulgací.<sup>67</sup> Pro tvorbu nanotobolek jsou vhodná aprotická rozpouštědla (aceton, acetonitril), pro tvorbu nanosfér rozpouštědla protická (ethanol, n-butanol).<sup>68</sup> Finančně náročnou a ekologicky nešetrnou alternativou této metody je použití membránového reaktoru (viz obr. 10), kdy dispergovaná fáze pod tlakem prochází póry membrány a vytváří kapičky v proudu kontinuální fáze. Výběr membrány (velikosti pórů) a možnost kontroly mísení fází (rychlost, tlak) výrazně ovlivňuje výslednou velikost částic.<sup>69</sup>



Obr. 10: Schéma použití membránového reaktoru<sup>9</sup>

#### 2.3.2.5 Radikálová polymerace

Vzhledem k rychlé radikálové terminaci typu radikál-radikál jsou limitujícími faktory této metody nedostatek kontroly nad molekulovou hmotností, molárním

objemem a makromolekulární strukturou.<sup>70</sup> Řízené nebo „živé“ radikálové polymerace se využívají díky trendu environmentální šetrnosti a rychlému rozvoji farmaceutických aplikací hydrofilních polymerů.<sup>71</sup> Techniky C/LRP lze rozdělit na nitroxidem zprostředkovanou polymeraci, radikálovou polymeraci pomocí přenosu atomu a polymeraci přenosem skupin. Nevýhodou těchto procesů je jejich náročnost, vysoké náklady a přítomnost reziduí ve finálním produktu. Ty mají vliv na produkt (stabilita, barva, zápach) a jejich odstranění je složité. K úspěšné komercializaci produktů této metody musí být nedostatky odstraněny.<sup>9</sup>

## 2.4 Modifikace povrchu nanočástic

Nanočástice v lidském těle nacházejí místo svého působení nejen na základě velikosti, ale také dle charakteru jejich povrchu. Lidské tělo značný podíl částic v krevní cirkulaci vyhodnocuje jako cizí – částice podléhají opsonizaci a jsou fagocytovány makrofágy. Jsou tak zachyceny retikuloendoteliálním systémem a hromadí se v játrech a slezině.<sup>72</sup> Cílem modifikace povrchu částic je oddálit jejich zachycení RES a prodloužit tak přítomnost částic v systémové cirkulaci, případně usnadnit průchod přes biologické membrány.<sup>73</sup>

K povrchovým úpravám se nejčastěji používají polyethylenglykol (viz níže), poloxamery, poloxaminy, chitosan a polysorbáty. Úpravou povrchu poloxamery a poloxaminy se docílí snížení záchytu makrofágy a prodlouží se doba přítomnosti částic v systémové cirkulaci.<sup>74</sup> Chitosan je kationický polymer, který usnadňuje průchod sliznicemi a zvyšuje kladný zeta potenciál nanočástic. Povrchové úpravy chitosanem se využívají při enkapsulaci anatoxinu tetanu.<sup>81</sup> Polysorbáty hrají významnou roli v cílené terapii mozkových nádorů. Díky povrchové úpravě polybutylkyanoakrylátových (PBCA) částic polysorbátem 80 došlo k úspěšné distribuci doxorubicinu přes hematoencefalickou membránu.<sup>75</sup>

Velmi důležitým atributem je velikost částic. Částice o velikosti 6–10  $\mu\text{m}$  jsou zachyceny v plicích.<sup>76</sup> Částice velké 100 nm až 6  $\mu\text{m}$  zachycuje RES a tím pádem dochází k jejich kumulaci v játrech a ve slezině, přičemž částice velké 100–300 nm se v játrech a slezině kumulují nejvíce.<sup>77,78</sup> Pokud je průměr nanočástic menší

než 30 nm, dochází k jejich rychlé renální exkreci. Částice o velikosti 30–100 nm vykazují prodloužený biologický poločas, protože je RES nezachycuje a nedochází u nich k rychlé renální exkreci.<sup>79</sup>

Charakter částic také ovlivňuje možnosti cíleného podání. Je prokázáno, že neutrální částice RES rozpoznává pomaleji než částice nesoucí náboj a hydrofobní částice jsou oproti hydrofilním opsonizovány velmi rychle.<sup>79</sup>

### **2.4.1 Pegylace**

Nejčastější modifikací povrchu nanočástic je úprava polyethylenglykolem. PEG je hydrofilní, neionický a biokompatibilní polymer. Spojení s částicí lze docílit několika způsoby, a to přimícháním v průběhu přípravy, kovalentní vazbou nebo adsorpcí na povrch. Pegylace prodlužuje dobu cirkulace částic v krevním řečišti a redukuje adsorpci proteinů a enzymů na povrch částic. Částice nejsou tak rychle opsonizovány a doba biodegradace PLGA se prodlužuje. Adsorpce proteinů a enzymů na povrch částice je závislá na hustotě a molární hmotnosti aplikovaného PEG. Bylo prokázáno, že vyšší molekulová hmotnost PEG použitého na PLGA nanočásticích měla za následek výrazné snížení interakcí s RES a prodloužení doby v systémové cirkulaci.<sup>80</sup> Při perorálním podání procházejí pegylované částice snadněji přes peyerovy pláty do lymfatického systému.<sup>81</sup>

## **2.5 Využití nanočásticových systémů ve farmacii**

Potenciál polyesterových nanonosičů spočívá v cílené biodistribuci léčivé látky do konkrétního místa (orgán, tkáň, buňky). Výhodou je zvýšená koncentrace léčivé látky v cílové tkáni, omezení systémových nežádoucích účinků a ochrana látky před metabolickými procesy lidského těla. Je nezbytné, aby během transportu nedocházelo k nescifickým interakcím s necílovými tkáněmi a aby se léčivo uvolnilo z nosiče právě v cílové tkáni, ve které bude schopné se udržet a působit. Cílová tkáň musí být specifická a musí se lišit od okolního prostředí. Ve většině případů se setkáváme s parenterálním podáním, protože vstup do systémové cirkulace zajišťuje dosažení cílové tkáně.<sup>82,4</sup>

## 2.5.1 Onkologie

Chemoterapeutika poškozují kromě nádorové i zdravou tkáň, což vede k systémové toxicitě a řadě nežádoucích účinků. Toxicita těchto léčiv značně omezuje pacientem maximální tolerovanou dávku a tím se snižuje efektivita účinku terapie. Jako řešení těchto problémů se nabízí využití PLGA nanočástic, které umožňují dodávku léčiva do konkrétní postižené tkáně skrz pasivní nebo aktivní targeting.<sup>82</sup>

### 2.5.1.1 Pasivní targeting

Pasivní targeting využívá velikosti nanočástic a unikátních patologických a anatomických vlastností nádorového vaskulárního systému. Tyto specifické atributy umožňují nanočásticím extravazací proniknout do nádorového intersticia, kde se následně kumulují. Tumory nedisponují funkčním systémem lymfatických cév (cévy jsou inaktivní nebo zcela chybí). To znemožňuje eliminaci částic z tumoru a dochází tak k jejich retenci v nádorové tkáni. Tyto dva fenomény jsou známy pod názvem Enhanced permeability and retention (EPR).<sup>83</sup>

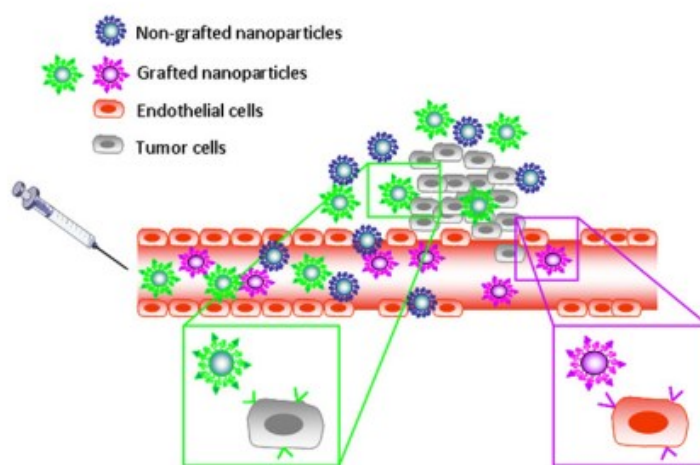
### 2.5.1.2 Aktivní targeting

U aktivního targetingu jsou na povrch nanočástic umístěny specifické ligandy, které interagují s receptory, které nadměrně exprimují nádorové buňky nebo vaskulární systém tumoru. Zdravé tkáně tyto receptory neexprimují. Při výběru ligandu hraje roli homogenita exprese receptoru na všech cílených buňkách. Cílem zásahu nanočástic jsou tedy nádorové buňky nebo endotel nádorových cév. U nádorových buněk se nadměrně vyskytuje několik typů receptorů např. transferinový receptor, folátový receptor, receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR) nebo integriny.

Pokud je cílem nanočástic endotel nádorových cév, ligandy musí umět rozeznat např. VEGFR-1, VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptors), integriny ( $\alpha\beta3$ ,  $\alpha5\beta1$ ), VCAM-1 (the vascular cell adhesion molecule-1) nebo MMPs (matrix metalloproteinases). Zničením nádorového endotelu nastává smrt tumoru v důsledku nedostatku živin a kyslíku.<sup>84</sup>

Na základě výsledků preklinických studií lze říci, že aktivní targeting je v cílené nádorové terapii efektivnější metodou než ten pasivní. Velmi často se využívá kombinace těchto dvou zacílení.<sup>82</sup>

Příkladem jsou pegylované PLGA nanočástice s enkapsulovaným paklitaxelem, na jejichž povrch byly umístěny jako ligandy foláty. Tyto částice vykazovaly mnohem větší cytotoxickou aktivitu vůči HEC-1A (human endometrial cells) nádorovým buňkám při *in vitro* a *in vivo* testování.<sup>85</sup>



Obr. 11: Pasivní a aktivní targeting v protinádorové terapii<sup>82</sup>

### 2.5.1.3 Chemoterapie

Doxorubicin je anthracyklinové chemoterapeutikum, které se používá k léčbě široké škály nádorových onemocnění. Je značně toxický, což má za následek nevýhodu nežádoucích účinků v podobě kardiomyopatií a následného srdečního selhávání. V porovnání s použitím samotné látky zvyšuje enkapsulace doxorubicinu do pegylovancých PLGA nanočástic protinádorovou účinnost léčiva a oproti liposomální formulaci doxorubicinu Doxil® disponuje výrazným snížením kardiotoxicity.<sup>86</sup> Doxorubicin se používá i v terapii mozkových nádorů, kdy se využívá povrchové modifikace PLGA nanočástic poloxamerem 188 nebo PBCA nanočástic polysorbátem 80. Léčivo projde přes hematoencefalickou bariéru a omezuje růst nádoru (testováno na krysách).<sup>87</sup>

Paklitaxel je inhibitor depolymerace mikrotubulů, narušuje děj mitózy v buňce. Je to ve vodě špatně rozpustné léčivo s úzkým terapeutickým indexem. Taxol® je komerčně dostupný prostředek obsahující PTX v koncentraci 6 mg/ml rozpuštěný ve směsi ethanolu a Cremophoru® EL (1:1). Oproti němu dosahují PLGA nanočástice s enkapsulovaným PTX výraznějšího cytotoxického efektu *in vitro*<sup>88</sup> i *in vivo*.<sup>89</sup>

9-nitrokamptothecin (9-NC) je inhibitor topoizomerázy I a vzhledem k jeho nestabilitě ve fyziologickém pH a nízké rozpustnosti ve vodě je jeho dodávka do cílové tkáně náročná. Při enkapsulaci 9-NC do PLGA nanočástic proběhlo řízené uvolňování této látky po dobu 160 hodin.<sup>90</sup>

V poslední době se velký zájem vědy ubírá k orálnímu podání cytostatik. Například enkapsulovaný paklitaxel v PLGA nanočásticích s přidáním vitamínem E TPGS poskytuje desetkrát lepší biodostupnost než Taxol®.<sup>91</sup> Výbornou biodostupnost vykazuje v porovnání s podáním čisté látky také enkapsulovaný Tamoxifen.<sup>92</sup>

#### **2.5.1.4 Biologická léčba a genová protinádorová terapie**

Biologická léčba se věnuje enkapsulaci peptidů a proteinů. Příkladem je Endostar, což je endostatin určený k léčbě solidních nádorů. K dosažení terapeutického efektu je potřeba opakované injekční podání a vysoké dávky. Enkapsulace do pegylovaných PLGA částic vedla k prodloužení biologického poločasu, větší množství látky v nádoru a silnější inhibiční a anti-angiogenní působení v porovnání s podáním čisté látky.<sup>93</sup>

V genové terapii se nanočástice používají jako vektory plazmidů a siRNA. Cílem je zvýšit uptake látky tumorem, aby došlo k inhibici jeho růstu a vyvolání apoptózy.<sup>94</sup>

#### **2.5.1.5 Zobrazování a diagnostika nádorového onemocnění**

Zobrazovací metody jsou pro klinickou onkologii zcela klíčové. Umožňují identifikaci solidních tumorů, determinaci recidivy a monitorování úspěšnosti léčby a odpovědi organismu. Cílem je vyvinout neinvazivní metodu, která dokáže

nádorové onemocnění odhalit v nejranějších stádiích. Nanočásticové systémy slouží v tomto oboru jako nosiče kontrastních látek<sup>95</sup>.

Aplikace PLGA nanočástic s enkapsulovanými supermagnetickými oxidy železa umožňuje detekovat tumor pomocí magnetické rezonance. Výhodou je lepší zobrazení, prodloužení biologického poločasu a redukce nežádoucích účinků kontrastní látky.<sup>96</sup>

Pro detekci tumoru scintigrafickými metodami byly použity PLGA nanočástice s enkapsulovaným radioaktivním techneciem-99m (<sup>99m</sup>Tc). Částice se používají k detekci sentinelových lymfatických uzlin, ty vykazují největší záchyt radionuklidu a jejich odstranění je pro pacienty trpící metastazujícím nádorovým onemocněním často zásadní.<sup>95</sup>

#### **2.5.1.6 Teranostika**

Teranostika je definována jako spojení terapie a diagnostiky – umožňuje simultánní podání léčivé a kontrastní látky. V jediné platformě je zahrnut pasivní i aktivní targeting a následné uvolnění léčiva s kontrastní látkou. Teranostika umožňuje v reálném čase sledovat odpověď organismu na léčbu.<sup>97</sup> Příkladem je enkapsulace DOX do magnetických částic, které jsou vestavěny do PLGA částic kvůli hydrofobním interakcím. Přítomnost magnetických částic nijak neovlivnila uvolňování DOX.<sup>98</sup> Na těchto magnetických/PLGA částicích byla testována také duální enkapsulace hydrofilní karboplatiny a hydrofobního PTX a rapamycinu. Magnetická rezonance prokázala, že nanočástice poskytují lepší kontrastní zobrazení než komerčně dostupné kontrastní látky.<sup>99</sup>

#### **2.5.1.7 Specifické nedostatky nanočástic v léčbě rakoviny**

Závažným nedostatkem pasivního targetingu je heterogenita EPR efektu. Intenzita tohoto jevu se výrazně liší u různých typů nádoru, ale bohužel i u různých pacientů. Uptake aktivně označených nanočástic nádorovou buňkou je efektivnější.

Hlavní výhodou aktivního targetingu oproti pasivnímu by teoreticky měla být mnohem účinnější a rychlejší distribuce do cílové tkáně. Faktem je, že zavedením



aktivně označených nosičů často nastává nežádoucí zvýšení imunogenity a adsorpce proteinů na jejich povrch.<sup>100</sup>

## **2.5.2 Imunologie**

### **2.5.2.1 Vakcinace**

Při vakcinaci slouží PLGA nanočástice jako nosiče antigenu, kombinace antigenů nebo kombinace antigenu a adjuvancií.<sup>101</sup> Díky prolongovanému uvolňování antigenu z částice může nastat mnohem efektivnější odpověď imunitního systému. Zároveň dochází k redukci rizika tolerance či nutnosti dalšího podání látky pro vyvolání ochranné imunity.<sup>102</sup> Částice obsahují pouze malé množství antigenů s adjuvancií, přesto dokáží vyvolat velmi silnou reakci T-lymfocytů. Použití menších dávek je výhodné nejen z pohledu snížení nežádoucích účinků, které obvykle způsobují právě pomocné látky, ale i z ekonomického hlediska.<sup>103</sup>

### **2.5.2.2 Targeting imunitního systému**

Targeting imunitního systému funguje na principu „označení“ částice ligandy (peptidy, bílkoviny, protilátky, lektiny, polysacharidy), které reagují s povrchovými receptory buněk.<sup>104</sup> Uptake nanočástic antigen prezentujícími buňkami (APC) je závislý na mnoha faktorech jako hydrofobním/hydrofilním charakteru, povrchovém náboji, tvaru a především na velikosti částic, která je stále diskutovaným tématem.<sup>105</sup> Jako výhodná se ukázala aplikace částic přímo do lymfatických uzlin, kde se nachází mnoho nezralých dendritických buněk. Těm je předán aktivační signál způsobující jejich dozrání. Sinusoidy ve slezině dosahují rozměrů 150 až 200 nm, zatímco iniciální lymfatické cévy 10 až 60  $\mu\text{m}$ .<sup>106</sup> Z toho vyplývá, že přímo do lymfatických orgánů proniknou částice menší než 200 nm, zatímco větší částice vyžadují APC a v lymfatických uzlinách jsou lokalizovány až za 24 hodin.<sup>107</sup> Targetingem imunitního systému lze dosáhnout dvou specifických imunitních reakcí. Zaprvé lze zavedením ligandů cílit na povrchové receptory konkrétních buněk imunitního systému (např. dendritických buněk) a zvýšit aktivitu jejich uptake. Zadruhé lze rozpoznáním specifických ligandů

receptory APC docílit zvýšení imunogenity nanočásticových vakcín, poskytnutím „signálu nebezpečí“, který indukuje aktivaci imunitních mechanismů.<sup>108,109</sup> V praxi se využívají agonisté Toll-like-receptors u CD4+ a CD8+ T-lymfocytů a B lymfocytů, kteří posilují proliferaci, aktivaci a efektorové funkce těchto buněk. Využití TLR agonistů jako součásti vakcín je velmi atraktivním cílem budoucího výzkumu.<sup>110</sup>

### **2.5.2.3 Imunoterapie rakoviny**

PLGA nanočástice byly testovány v protinádorové imunoterapii jako nosiče nádorových lyzátů nebo tumor asociovaných antigenů, které mohou být enkapsulovány společně s TLR ligandy.<sup>111</sup> Podání látek v této formě vyvolalo mnohem silnější imunitní odpověď, než podání samotných látek bez nanonosičů. Problémem v klinické praxi je imunosuprimované prostředí v blízkosti tumoru, proto se výzkum primárně musí zaměřit na obnovení obranyschopnosti pacienta s rakovinným onemocněním.<sup>112</sup>

Jednou ze strategií je použití inhibitoru signálního transduktoru a aktivátoru transkripce 3 (STAT3). Tento protein se podílí nejen na růstu a replikaci buněk, ale především indukuje imunosupresi v nádorovém okolí. Enkapsulací jeho inhibitoru JSI-124 (buď samotného nebo v kombinaci TLR ligandem) do PLGA nanočástic by se mělo docílit obnovy funkce dendritických buněk.<sup>113</sup>

Vzhledem ke složitosti mikroprostředí tumoru a jeho imunitní odpovědi je pro maximalizaci účinku nezbytné do budoucna protinádorové strategie kombinovat. Kromě použití inhibitoru STAT3 se předpokládá použití chemoterapeutik, aktivace dendritických buněk TLR ligandy, využití TAA a dalších látek.<sup>82</sup>

### **2.5.3 Další možnosti**

Aplikace PLGA nanočástic je intenzivně zkoumanou disciplínou v mnoha odvětvích medicíny. Klinické studie zkoumají uplatnění nanočásticových systémů při léčbě revmatoidní artritidy, zánětů, kardiovaskulárních onemocnění, infekcí, diabetu mellitu, mozkových poruch a mnoha dalších onemocnění.<sup>82</sup>

## 3 PRAKTICKÁ ČÁST

### 3.1 Použité přístroje

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

Centrifuga Micro 7 (Fischer Scientific, Hampton, USA)

Homogenizátor Ultra Turrax T10 basic (IKA, Staufen, Německo)  
8000-30000 ot./min., 6 pásem

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

Spektrofotometr Specord 205, Jena Analytik (Durynsko, Německo)

Stopky DS 35 ZPA PRAGOTRON (Pragotron, Praha, Česká republika)

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

Zetasizer ZS 90 (Malvern Panalytical, Malvern, UK)

### 3.2 Použité suroviny

Aceton, Penta spol. s.r.o., Chrudim

Acetonitril, Penta spol. s.r.o., Chrudim

Čištěná voda, KFT FaF UK

Ethylacetát, Lachema, Neratovice

Kolliphor® P 188, Sigma-Aldrich s.r.o.

Kopolymer kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové (PLGA 3:7), syntéza na KFT  
FaF UK, doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

Kopolymer kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové (PLGA 5:5), syntéza na KFT  
FaF UK doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

Pluronic® F-127, Sigma-Aldrich s.r.o.

Rhodamin B, Sigma-Aldrich s.r.o.

Kopolymery kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerytritolu (1T), (3T),  
(5T), syntéza na KFT FaF UK, doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

## **3.3 Laboratorní postup**

### **3.3.1 Metoda odpařování rozpouštědla**

#### **3.3.1.1 Příprava vnitřní fáze**

Na analytických vahách bylo do vialky naváženo 12,5 mg, 25 mg nebo 50 mg polymeru PLGA 5:5, PLGA 3:7, 1T, 3T nebo 5T (viz tab. 2). Navážený polymer byl doplněn 1 ml ethylacetátu, ve kterém se kompletně rozpustil. Příprava probíhala vždy v čase potřeby.

#### **3.3.1.2 Příprava vnější fáze**

Jako vnější fáze byl při metodě odpařování rozpouštědla používán 1% roztok Kolliphor® P 188. Na analytických vahách byla do kádinky navážena povrchově aktivní látka Kolliphor® 188, ke které bylo přidáno odpovídající množství čisté vody. K rozpuštění surfaktantu došlo při míchání na magnetické míchače za laboratorní teploty.

#### **3.3.1.3 Příprava vzorku suspenze nanočástic**

Do vialky obsahující vnitřní fázi bylo přidáno 10 ml 1% roztoku Kolliphor® 188, přičemž okamžitě po smísení fází začal proces homogenizace, který trval 60 sekund. Turbína vysokorychlostního homogenizátoru byla umístěna 1 cm ode dna vialky a otáčky postupně zvyšovány až na maximální stupeň (tj. 26 000 otáček za minutu). Po uplynutí jedné minuty byly otáčky snižovány a poté byl homogenizátor vypnut. Turbínu bylo nezbytné po každém měření opláchnout lihem a otřít buničinou. Zhomogenizovaný vzorek byl přelit do kádinky s magnetickým míchadlem a umístěn do digestoře na magnetickou míchačku. Odpaření rozpouštědla vnitřní fáze za stálého míchání trvalo 2 až 3 hodiny. Po odpaření rozpouštědla byl vzorek přefiltrován přes stříkačkový membránový filtr 0,8  $\mu\text{m}$  a zředěn v závislosti na navážce polymeru (viz tab. 1). K analyzování tak byly připraveny 2 ml vzorku, které byly podrobeny měření velikosti nanočástic a zeta potenciálu. Každý vzorek byl přístrojem Zetasizer měřen třikrát. Měření probíhalo vždy při teplotě 25°C.

Tabulka 1: Ředění vzorků v závislosti na navážce polymeru

Navážka polymeru (mg)	Množství suspenze nanočástic (μl)	Čištěná voda (μl)	Celkové množství vzorku (μl)
12,5	100	1900	2000
25,0	50	1950	2000
50,0	25	1975	2000

### 3.3.2 Nanoprecipitační metoda

#### 3.3.2.1 Příprava vnitřní fáze

Na analytických vahách bylo do vialky naváženo 25 mg polymeru PLGA 5:5, PLGA 3:7, 1T, 3T nebo 5T (viz tab. 2). Navážený polymer byl doplněn 1 ml acetonu, ve kterém se kompletně rozpustil. Příprava vnitřní fáze probíhala vždy v čase potřeby.

#### 3.3.2.2 Příprava vnější fáze

Jako vnější fáze byl při nanoprecipitační metodě použitý 1% roztok Pluronic® F-127. Na analytických vahách byla do kádinky navážena povrchově aktivní látka Pluronic® F-127, ke které bylo přidáno odpovídající množství čisté vody. K rozpuštění surfaktantu došlo při míchání na magnetické míchačce za laboratorní teploty.

#### 3.3.2.3 Příprava vzorku suspenze nanočástic

Do kádinky s míchadlem bylo odměřeno 10 ml 1% roztoku Pluronic® F-127. Kádinka byla umístěna na magnetickou míchačku a rychlostí 1 kapka za 2 sekundy do ní byla přidávána vnitřní fáze. Po přidání vnitřní fáze byla kádinka umístěna do digestoře, kde došlo během 1-2 hodin za stálého míchání k odpaření acetonu. Po odpaření acetonu byl vzorek přefiltrován přes stříkačkový membránový filtr 0,8 μm a zředěn čistou vodou v poměru 50:1950 (viz tab. 2). K analyzování tak byly připraveny 2 ml vzorku, které byly podrobeny měření velikosti nanočástic a zeta potenciálu. Každý vzorek byl přístrojem Zetasizer měřen třikrát. Měření probíhalo vždy při teplotě 25°C.

### **3.3.3 Enkapsulační efektivita**

Rhodamin B je fluorescenční barvivo, kterým jsme indikovali enkapsulační efektivitu u nanočástic vytvořených metodou odpařování rozpouštědla.

#### **3.3.3.1 Příprava vnitřní fáze**

Na analytických vahách bylo do vialky naváženo 25 mg polymeru PLGA 5:5 nebo PLGA 3:7 společně s 0,25 mg rhodaminu B (viz tab. 2). Navážený polymer s barvivem byly doplněny 1 ml ethylacetátu, ve kterém se kompletně rozpustily. Příprava vnitřní fáze probíhala vždy v čase potřeby.

#### **3.3.3.2 Příprava vnější fáze**

Jako vnější fáze byl používán 1% roztok Kolliphor® P 188. Na analytických vahách byla do kádinky navážena povrchově aktivní látka Kolliphor® 188, ke které bylo přidáno odpovídající množství čištěné vody. K rozpuštění surfaktantu došlo při míchání na magnetické míchače za laboratorní teploty.

#### **3.3.3.3 Příprava vzorku suspenze nanočástic**

Do vialky obsahující vnitřní fázi bylo přidáno 10 ml 1% roztoku Kolliphoru® 188, přičemž okamžitě po smísení fází začal proces homogenizace, který trval 60 sekund. Turbína homogenizátoru byla umístěna 1 cm ode dna vialky a otáčky postupně zvyšovány až na maximální stupeň. Po uplynutí jedné minuty byly otáčky snižovány a poté byl homogenizátor vypnut. Zhomogenizovaný vzorek byl přelit do kádinky s magnetickým míchadlem a umístěn do digestoře na magnetickou míchačku. Odpaření rozpouštědla vnitřní fáze trvalo za stálého míchání 2 až 3 hodiny. Po odpaření rozpouštědla byl vzorek přefiltrován přes stříkačkový membránový filtr 0,8  $\mu\text{m}$  a zředěn destilovanou vodou v poměru 50:1950 (viz tab. 1). K analyzování tak byly připraveny 2 ml vzorku, které byly podrobeny měření velikosti nanočástic a zeta potenciálu. Každý vzorek byl přístrojem Zetasizer měřen třikrát. Měření probíhalo vždy při teplotě 25°C.

### 3.3.3.4 Měření enkapsulační efektivity

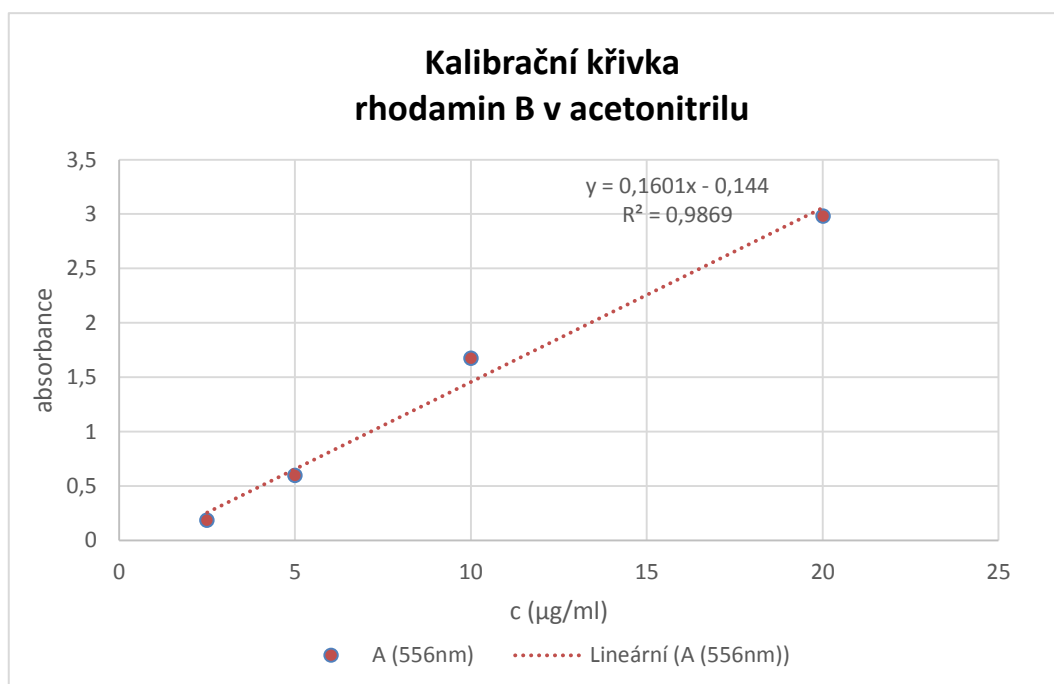
Po odpaření rozpouštědla bylo z kádinky odebráno 1,5 ml vzorku do mikrozkušavky typu eppendorf. Vzorek byl podroben 15 minut dlouhé centrifugaci (10 000 RPM). Po 15 minutách centrifugace byl z mikrozkušavky opatrně odstraněn supernatant automatickou pipetou tak, aby nedošlo ke zvržení sedimentu. Poté byl sediment doplněn 1 ml destilované vody a dispergován. Celý proces byl opakován celkem třikrát. Po třetím kole centrifugace byl odebrán supernatant, sediment byl doplněn 1 ml acetonitrilu a vzorek spektrofotometricky změřen při vlnové délce 556 nm. Měření absorbance bylo proti slepému vzorku acetonitrilu.

Na základě znalosti absorbance byla z kalibrační křivky (viz obr. 12) odečtena koncentrace enkapsulovaného rhodaminu B. Výpočet proběhl dosazením do vzorce uvedeného níže. Podílem koncentrace enkapsulovaného rhodaminu B v suspenzi a jeho navážky byla zjištěna enkapsulační efektivita.

$$y = 0,1601x - 0,144$$

$$y = \text{absorbance}$$

$$x = \text{koncentrace } (\mu\text{g/ml})$$



Obr. 12: Kalibrační křivka pro roztok rhodaminu B v acetonitrilu ( $A=556\text{ nm}$ )

## 3.4 Principy měření nanočástic

### 3.4.1 Princip měření velikosti nanočástic

Měření velikosti nanočástic je založeno na detekci Brownova pohybu, který vykazují jednotlivé částice, a který souvisí s jejich velikostí (menší částice se pohybují rychleji než velké). Při měření probíhá proces dynamického rozptylu světla – během měření prochází skrz kyvetu laserový paprsek, při pohybu jej částice odrážejí mnoha směry, a to zachytí detektor.

Zetasizer ZS 90 identifikuje rychlost kolísání intenzity laserového paprsku, které je způsobené neustálým pohybem částic. Součástí přístroje je digitální korelátor, jehož úkolem je porovnávat kolísání intenzity paprsku v čase. Přes korelátor a Stokes-Einsteinovu rovnici tak dokáže přístroj přepočítat rychlost pohybu částic na jejich velikost. Výsledkem je vypočítání distribuce velikosti částic, kdy základní je tzv. distribuce intenzity. Distribuce intenzity se dá převést na distribuci objemu a ta na distribuci počtu. Změny v distribuci částic udává polydisperzita, která charakterizuje systém obsahující částice mnoha různých velikostí.<sup>114</sup>

### 3.4.2 Princip měření zeta potenciálu nanočástic

Velikost zeta potenciálu naznačuje potenciální stabilitu koloidního systému.

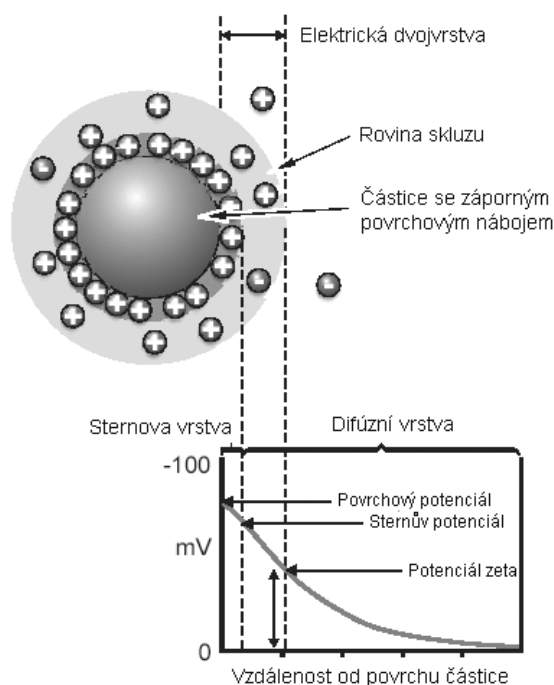
Na povrchu částic vzniká síťový náboj, který ovlivňuje distribuci iontů v okolní oblasti. Těsně u povrchu je zvýšená koncentrace iontů s opačným nábojem než má částice. Okolo částice se tak vytváří vyrovnávací náboj a vzniká elektrická dvojvrstva.

Medium obklopující částici je rozděleno do vrstev. V těsném kontaktu s povrchem částice je tzv. Sternova vrstva, kde jsou ionty silně vázané. Následuje GouyChapmanova difúzní vrstva, kde jsou ionty vázané méně silně. Koncentrace vyrovnávacích iontů se vzdáleností od povrchu částice klesá a naopak přibývají opačně nabitě ionty. Uvnitř difúzní vrstvy existuje hranice (tzv. rovina skluzu), která má měřitelný zeta potenciál – elektrický potenciál mezi rovinou skluzu a disperzním mediem. Ionty před touto hranicí vytvářejí s částicí stabilní jednotku.



Částice s hodnotou zeta potenciálu  $\pm 30$  mV lze považovat za stabilní. Čím vyšší potenciál mají, tím spíše se vzájemně odpuzují a nemají tendence flokulovat.

Díky svému elektrickému povrchovému náboji vykazují částice pod vlivem aplikovaného elektrického pole tzv. elektrokinetické efekty. Jedním z těchto efektů je elektroforéza – nabité částice pod vlivem aplikovaného elektrického pole vykazují pohyb vůči kapalině, ve které jsou suspendovány. Pokud je na elektrolyt aplikované elektrické pole, nabité částice suspendované v elektrolytu jsou přitahované směrem k elektrodě s opačným nábojem. Viskózní síly, které na částice působí, mají sklon tomuto pohybu bránit. Když je dosažena rovnováha mezi těmito dvěma protichůdnými silami, částice se pohybují konstantní rychlostí. Rychlost částice v elektrickém poli se označuje jako elektroforetická pohyblivost a závisí na několika faktorech – síle elektrického pole, dielektrické konstantě elektrolytu, viskozitě elektrolytu a zeta potenciálu. Se znalostí elektroforetické rychlosti lze získat hodnoty zeta potenciálu aplikací Henryovy rovnice.<sup>115</sup>



Obr. 13: Distribuce iontů v okolí částice a jejich vrstvy<sup>116</sup>

## 3.5 Výsledky

V této kapitole jsou prezentovány výsledky všech měření.

### 3.5.1 Přehled vzorků

Tabulka 2: Přehled vzorků

Číslo vzorku	Polymer	Navážka polymeru	Metoda
1	PLGA 3:7	12,5 mg	Odpařování rozpouštědla
2	PLGA 3:7	25 mg	Odpařování rozpouštědla
3	PLGA 3:7	50 mg	Odpařování rozpouštědla
4	PLGA 5:5	12,5 mg	Odpařování rozpouštědla
5	PLGA 5:5	25 mg	Odpařování rozpouštědla
6	PLGA 5:5	50 mg	Odpařování rozpouštědla
7	1T	12,5 mg	Odpařování rozpouštědla
8	1T	25 mg	Odpařování rozpouštědla
9	1T	50 mg	Odpařování rozpouštědla
10	3T	12,5 mg	Odpařování rozpouštědla
11	3T	25 mg	Odpařování rozpouštědla
12	3T	50 mg	Odpařování rozpouštědla
13	5T	12,5 mg	Odpařování rozpouštědla
14	5T	25 mg	Odpařování rozpouštědla
15	5T	50 mg	Odpařování rozpouštědla
16	PLGA 3:7	25 mg	Nanoprecipitace
17	PLGA 5:5	25 mg	Nanoprecipitace
18	1T	25 mg	Nanoprecipitace
19	3T	25 mg	Nanoprecipitace
20	5T	25 mg	Nanoprecipitace
21	PLGA 5:5 + rhodamin B	25 mg	Odpařování rozpouštědla
22	PLGA 3:7 + rhodamin B	25 mg	Odpařování rozpouštědla

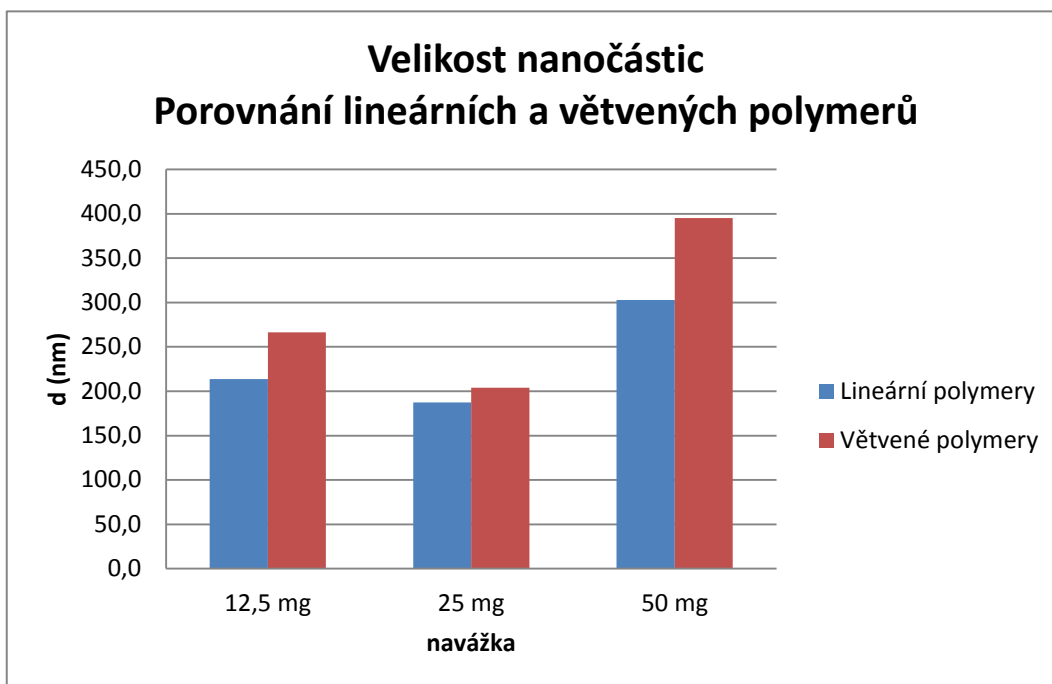
### 3.5.2 Velikost nanočástic

V této kapitole jsou popsány velikostní parametry nanočástic, kterých jsme dosáhli při přípravě nanočástic metodou odpařování rozpouštědla a nanoprecipitační metodou.

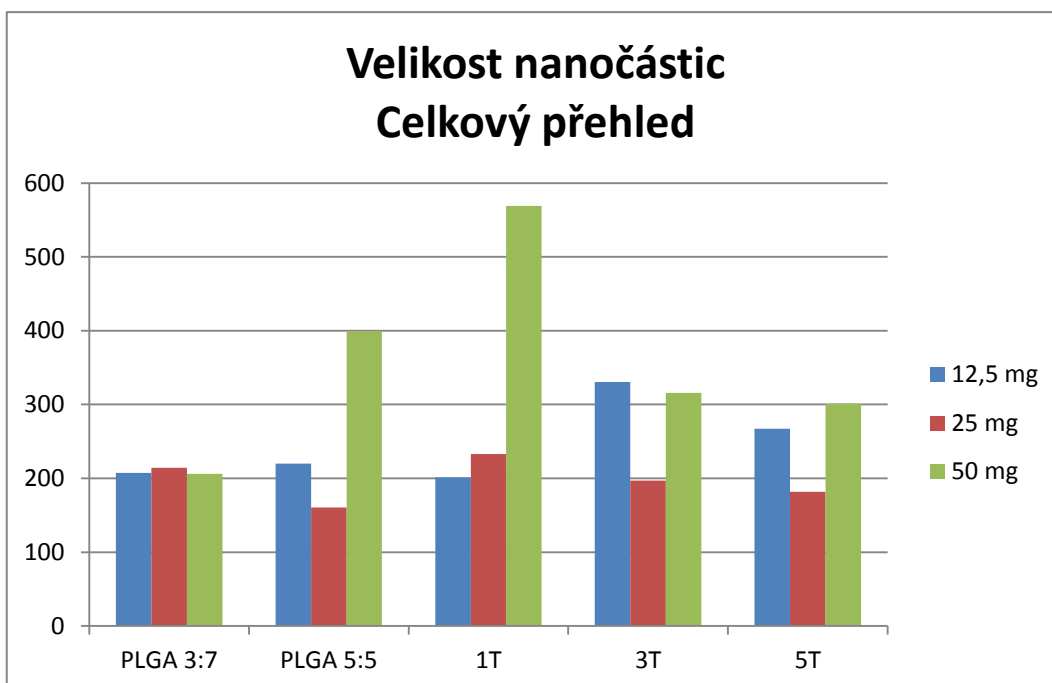
#### 3.5.2.1 Metoda odpařování rozpouštědla

Tabulka 3: Metoda odpařování rozpouštědla – velikost nanočástic

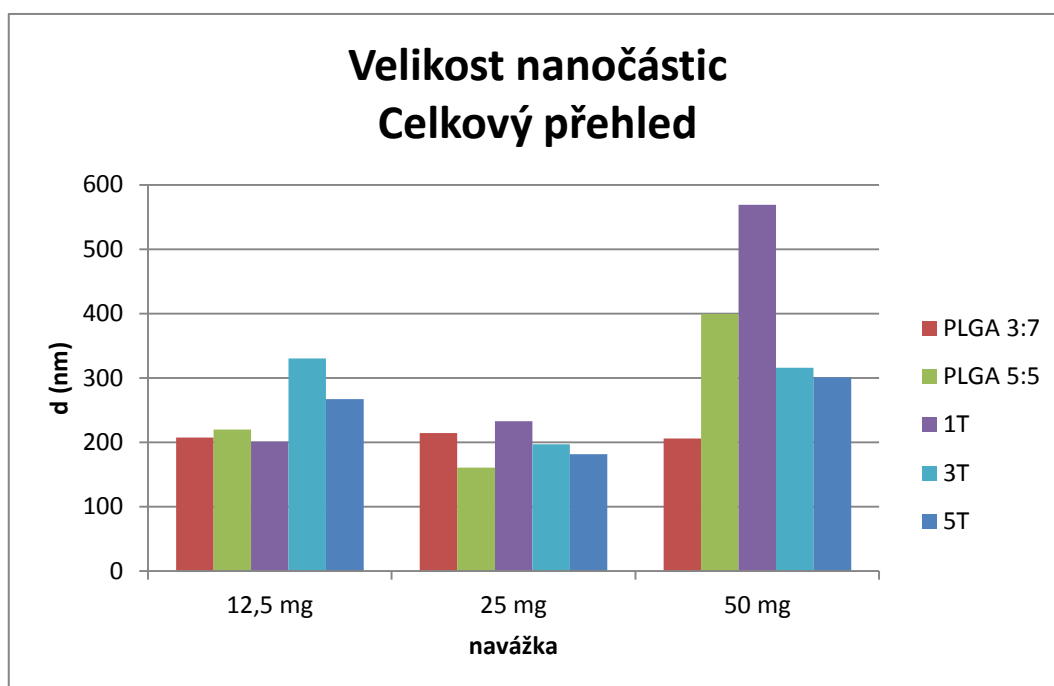
Číslo vzorku	Průměr Z-Ave [d.nm]	Průměr Z-Ave [d.nm] směrodatná odchylka	Průměr PdI	Průměr PdI směrodatná odchylka	Peak Nejvyšší intenzita Velikost [d.nm]	Peak Nejvyšší intenzita Zastoupení [%]
1	207,5	1,96	0,144	0,013	-	-
2	214,3	22,90	0,296	0,041	164,2	24,2
3	206,2	6,67	0,270	0,051	162,2	25,3
4	220,1	2,15	0,222	0,008	-	-
5	160,7	5,64	0,272	0,008	164,2	21,1
6	399,3	24,40	0,417	0,023	190,1	29,2
7	201,1	1,25	0,284	0,002	220,2	9,7
8	232,8	5,99	0,280	0,033	164,2	21,5
9	569,1	36,91	0,316	0,001	712,4	17,7
10	330,6	2,31	0,333	0,034	295,3	17,5
11	197,0	1,76	0,298	0,021	164,2	26,7
12	316,1	10,54	0,356	0,032	164,2	39,5
13	267,3	5,16	0,285	0,036	255,0	14,2
14	181,9	1,66	0,256	0,021	-	-
15	300,9	8,49	0,388	0,002	255,0	25,2



Obr. 14: Porovnání lineárních a větvených polymerů  
metoda odpařování rozpouštědla – velikost nanočástic



Obr. 15: Vliv typu polymeru na velikost nanočástic  
metoda odpařování rozpouštědla – celkový přehled

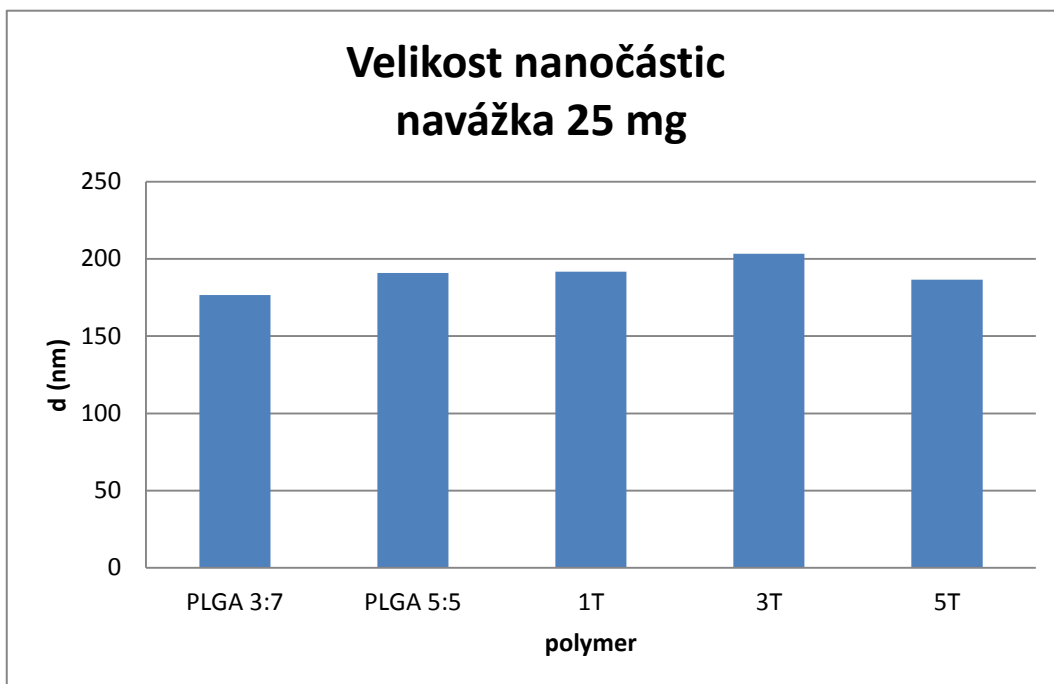


Obr. 16: Vliv navážky na velikost nanočástic  
metoda odpařování rozpouštědla – celkový přehled

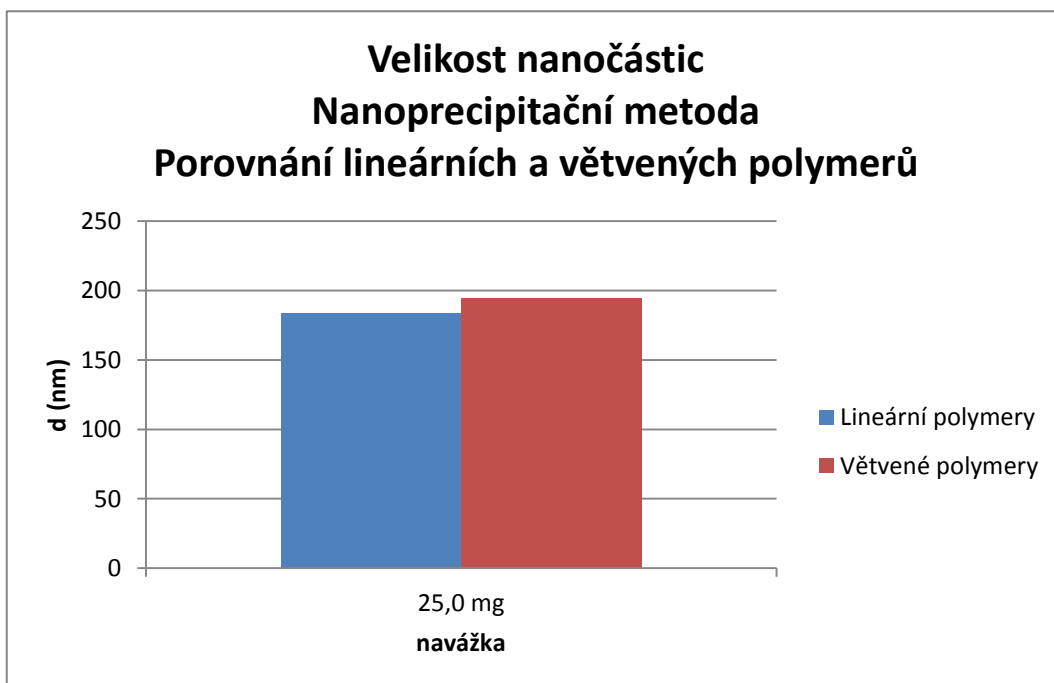
### 3.5.2.2 Nanoprecipitační metoda

Tabulka 4: Nanoprecipitační metoda – velikost nanočástic

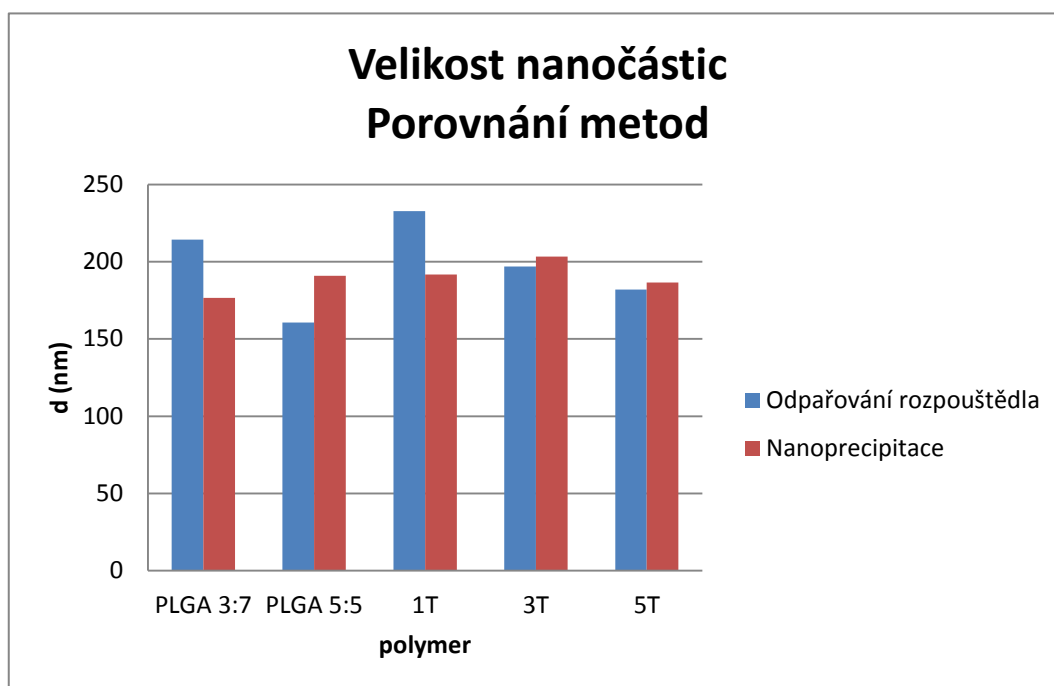
Číslo vzorku	Průměr Z-Ave [d.nm]	Průměr Z-Ave [d.nm] sm. odchylka	Průměr PDI	Průměr PDI sm. odchylka
16	176,7	1,56	0,073	0,017
17	190,9	0,12	0,096	0,006
18	191,8	2,76	0,08	0,004
19	203,3	1,00	0,138	0,016
20	186,6	1,32	0,107	0,016



Obr. 17: Vliv typu polymeru na velikost nanočástic  
nanoprecipitační metoda – navážka polymeru 25 mg



Obr. 18: Porovnání lineárních a větvených polymerů  
nanoprecipitační metoda – velikost nanočástic



Obr. 19: Velikost nanočástic porovnání z hlediska metody přípravy

### 3.5.3 Zeta potenciál

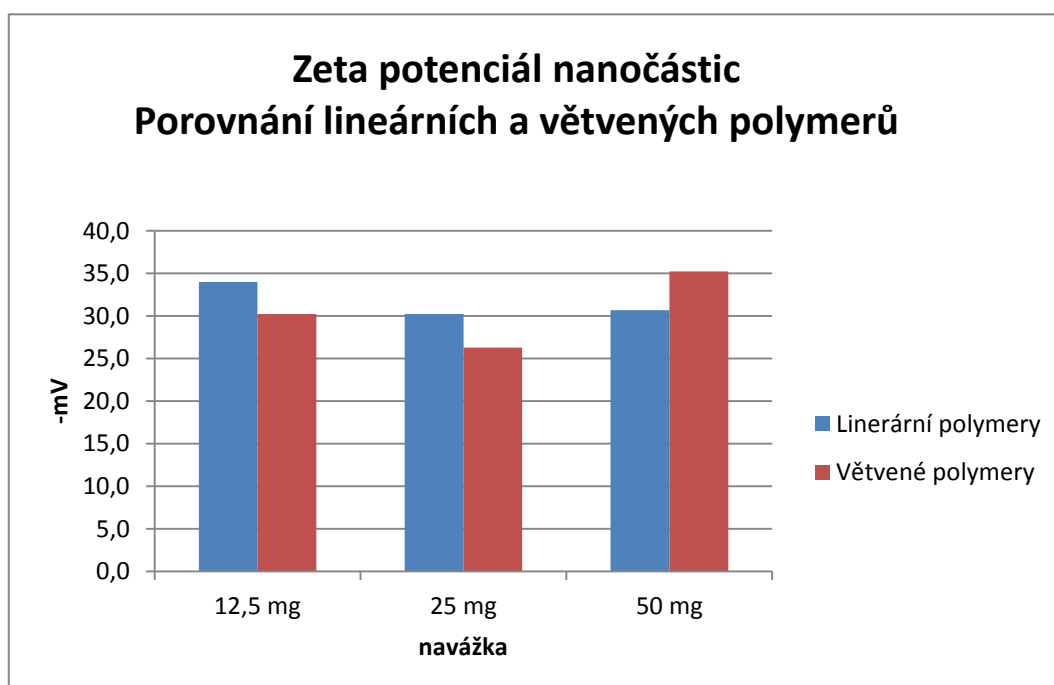
V této kapitole jsou popsány naměřené hodnoty zeta potenciálu nanočástic, kterých jsme dosáhli při přípravě nanočástic metodou odpařování rozpouštědla a nanoprecipitační metodou.

#### 3.5.3.1 Metoda odpařování rozpouštědla

Tabulka 5: Metoda odpařování rozpouštědla – zeta potenciál nanočástic

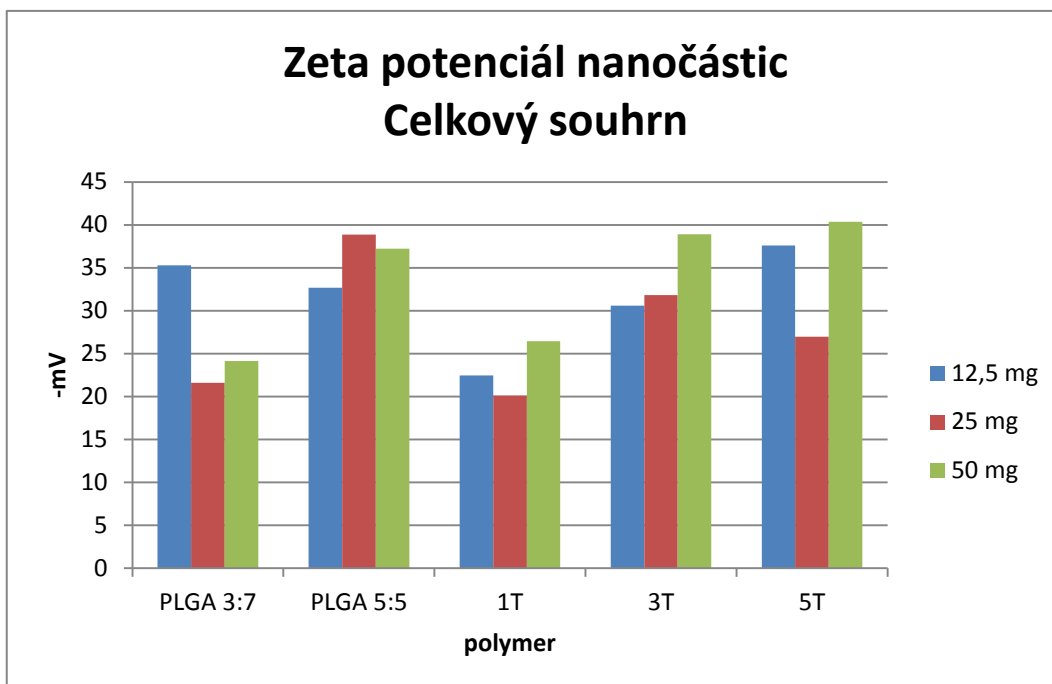
Číslo vzorku	Průměr Zeta potenciál [mV]	Průměr Zeta potenciál [mV] směrodatná odchylka
1	-35,3	0,62
2	-21,6	1,47
3	-24,1	1,63
4	-32,7	1,68
5	-38,9	5,97

Číslo vzorku	Průměr Zeta potenciál [mV]	Průměr Zeta potenciál [mV] směrodatná odchylka
6	-37,2	5,93
7	-22,5	6,12
8	-20,1	1,91
9	-26,5	2,9
10	-30,6	2,80
11	-31,8	3,70
12	-38,9	3,44
13	-37,6	1,35
14	-27,0	0,95
15	-40,4	5,86

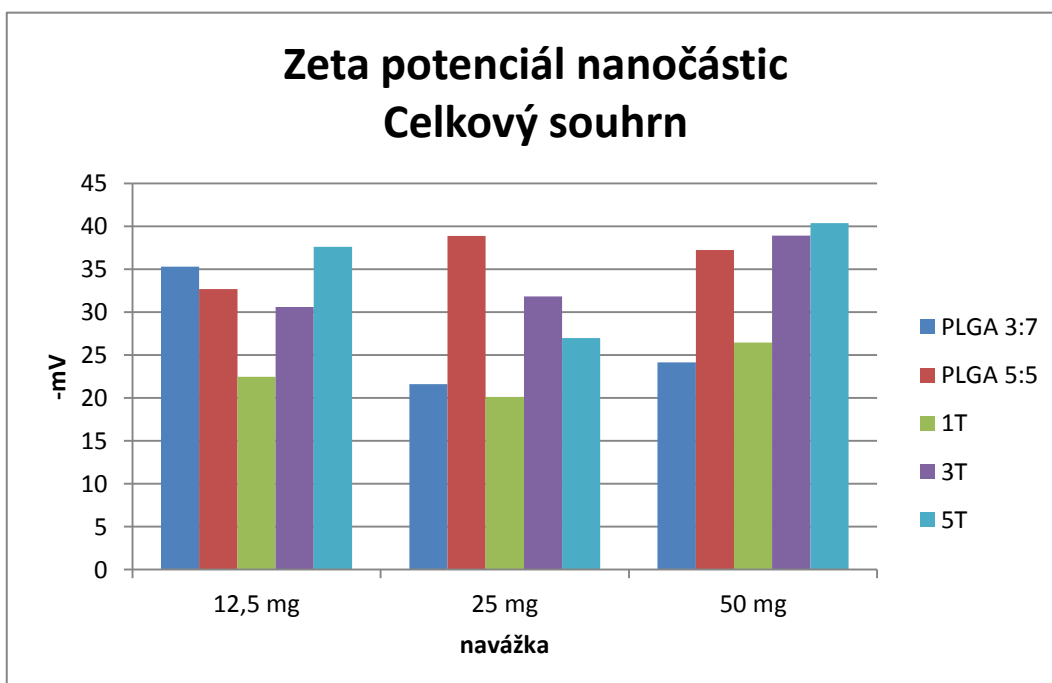


Obr. 20: Porovnání lineárních a větvených polymerů  
metoda odpařování rozpouštědla – zeta potenciál nanočástic





Obr. 21: Vliv typu polymeru na zeta potenciál nanočástic  
metoda odpařování rozpouštědla – celkový přehled

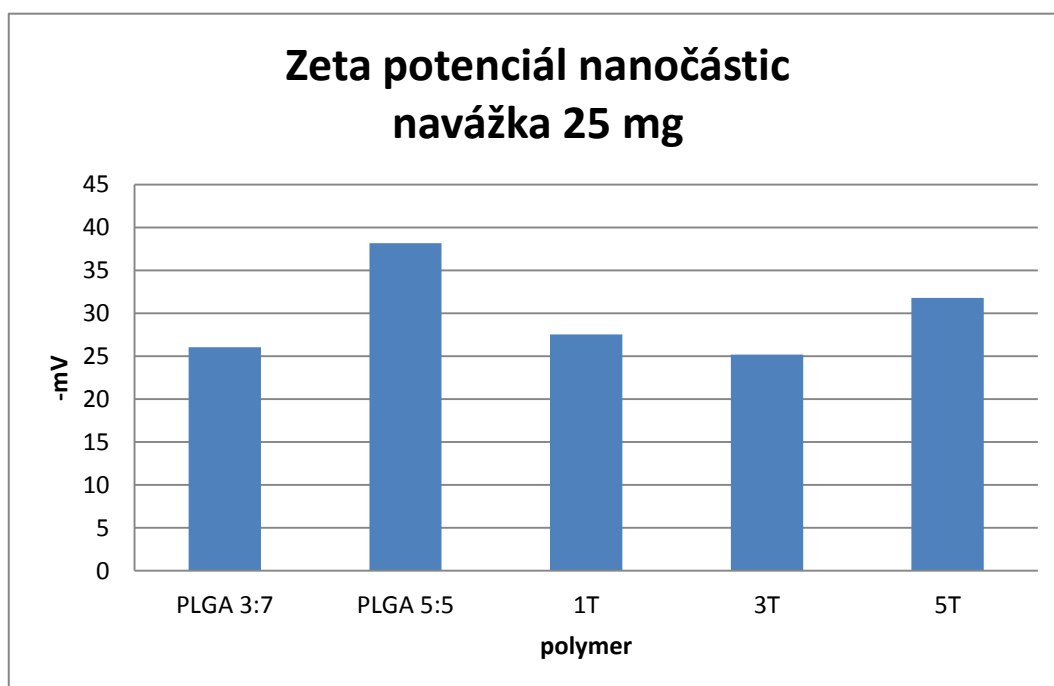


Obr. 22: Vliv navážky polymeru na zeta potenciál nanočástic  
metoda odpařování rozpouštědla – celkový přehled

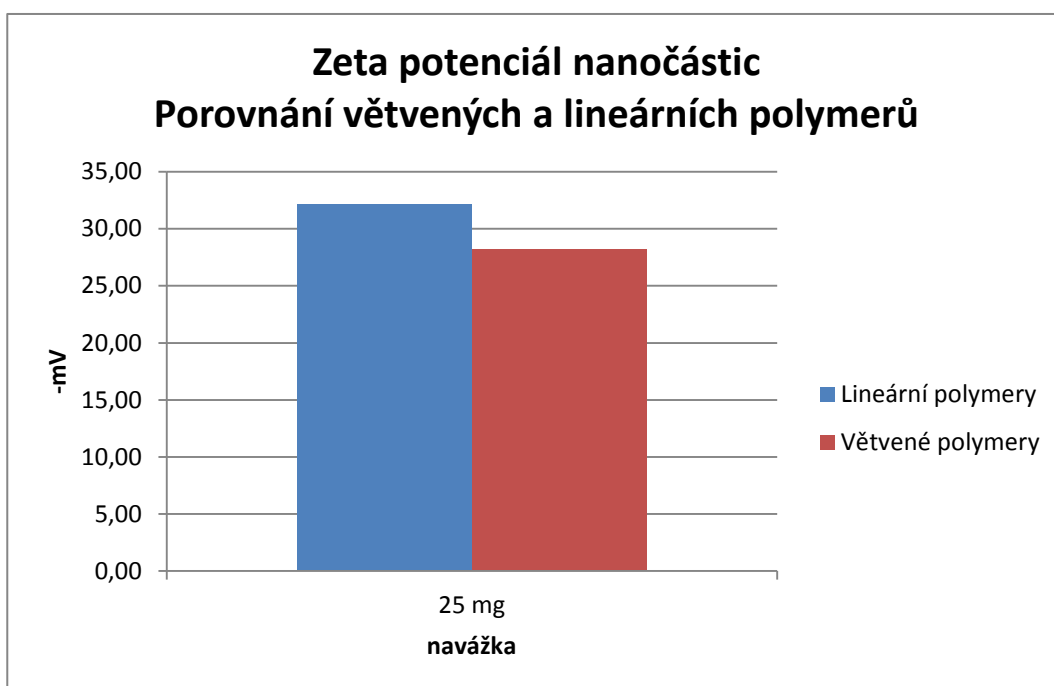
### 3.5.3.2 Nanoprecipitační metoda

Tabulka 6: Nanoprecipitační metoda – zeta potenciál nanočástic

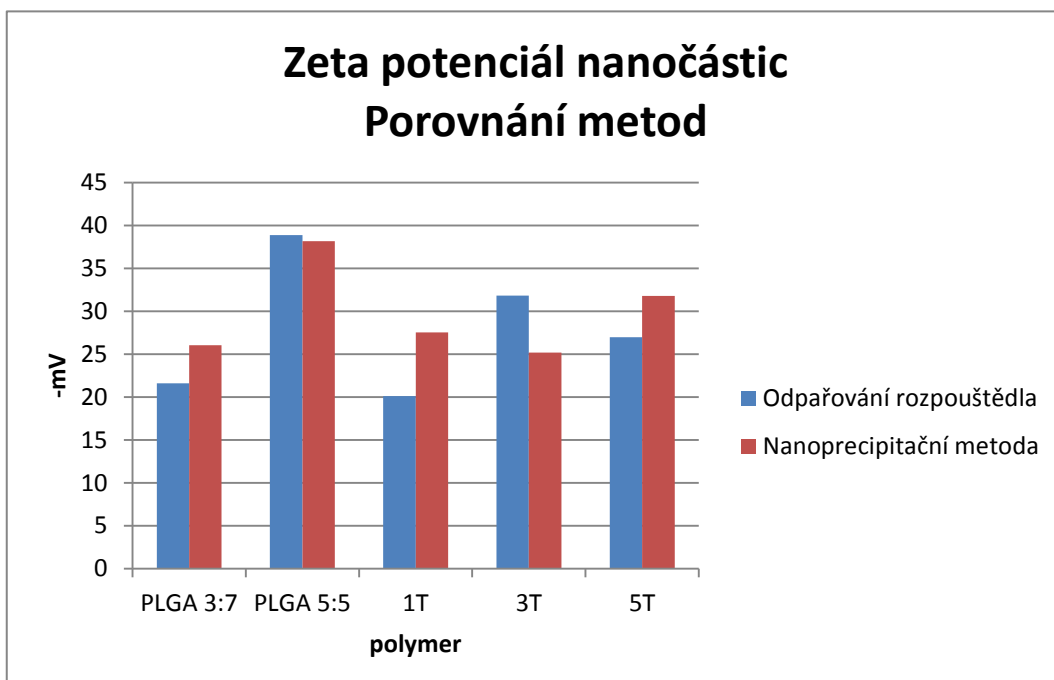
Číslo vzorku	Průměr Zeta potenciál [mV]	Průměr Zeta potenciál [mV] směrodatná odchylka
16	-26,0	0,46
17	-38,2	0,40
18	-27,5	0,71
19	-25,2	0,61
20	-31,8	1,0



Obr. 23: Vliv typu polymeru na zeta potenciál nanočástic  
nanoprecipitační metoda – navážka polymeru 25 mg



Obr. 24: Porovnání lineárních a větvených polymerů nanoprecipitační metoda – zeta potenciál nanočástic



Obr. 25: Zeta potenciál nanočástic porovnání z hlediska metody přípravy

### 3.5.4 Enkapsulační efektivita

#### 3.5.4.1 Velikost nanočástic

Tabulka 7: Velikost nanočástic s rhodaminem B

Číslo vzorku	Průměr Z-Ave [d.nm]	Průměr Z-Ave [d.nm] směrodatná odchylka	Průměr Pdl	Průměr Pdl směrodatná odchylka	Peak Nejvyšší intenzita Velikost [d.nm]	Peak Nejvyšší intenzita Zastoupení [%]
21	325,0	12,79	0,324	0,012	255,0	25,7-
22	266,6	23,74	0,323	0,039	164,2	29,3

#### 3.5.4.2 Zeta potenciál nanočástic

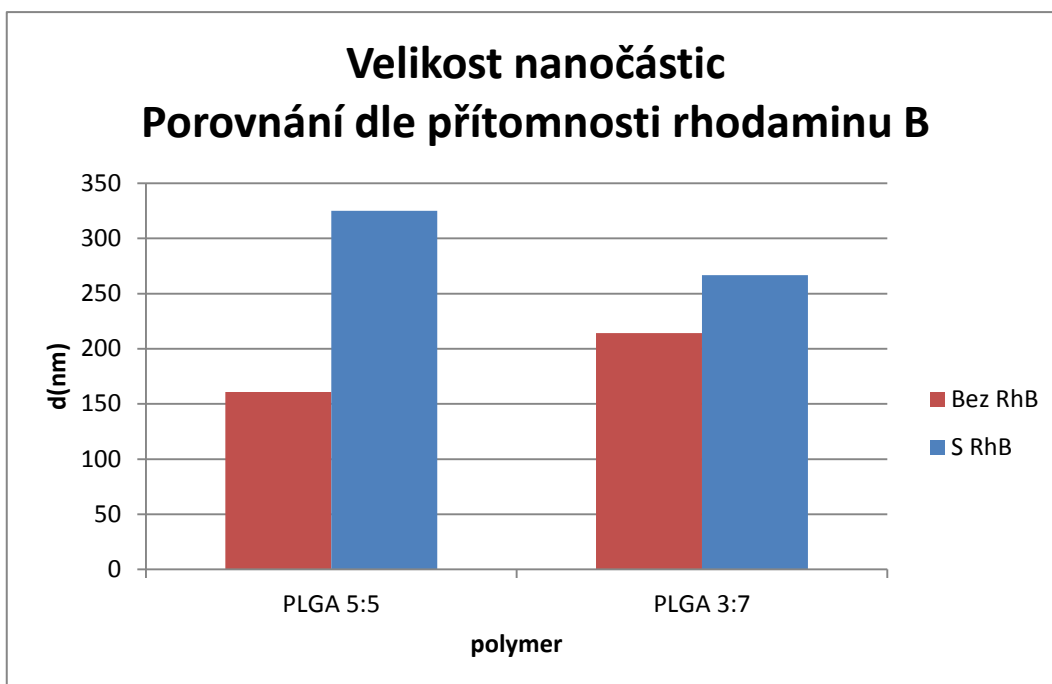
Tabulka 8: Zeta potenciál nanočástic s rhodaminem B

Číslo vzorku	Průměr Zeta potenciál [mV]	Průměr Zeta potenciál [mV] směrodatná odchylka
21	-34,6	2,72
22	-21,8	3,09

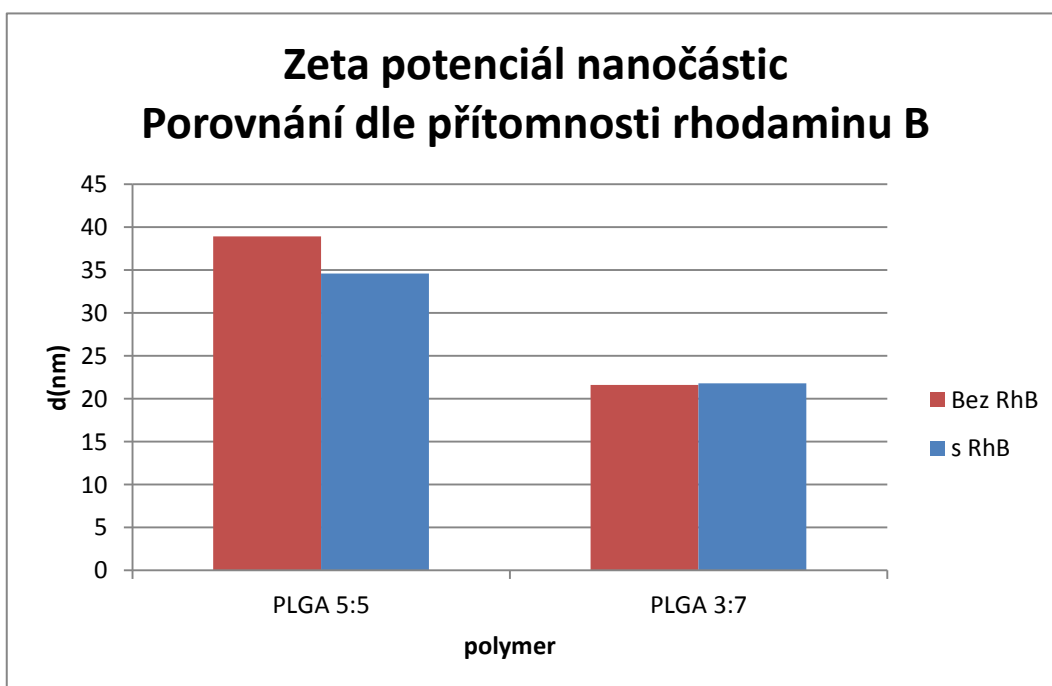
#### 3.5.4.3 Absorbance a koncentrace

Tabulka 9: Koncentrace a enkapsulační efektivita rhodaminu B

Číslo vzorku	Absorbance [ $\lambda = 556 \text{ nm}$ ]	Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Enkapsulační efektivita [%]
21	3,010	17,90	23,45
22	3,314	21,60	25,71



Obr. 26: Porovnání dle přítomnosti rhodaminu B  
metoda odpařování rozpouštědla – velikost nanočástic



Obr. 27: Porovnání dle přítomnosti rhodaminu B  
metoda odpařování rozpouštědla – zeta potenciál nanočástic

## 4 DISKUZE

Předmětem práce bylo na zkoumání vlivu různých derivátů PLGA a jejich navážky na velikost, polydisperzitu, zeta potenciál nanočástic a enkapsulační efektivitu rhodaminu B. Z lineárních polymerů byly k měření použity kopolymery kyseliny mléčné a glykolové v poměru 5:5 a 7:3 s majoritním podílem kyseliny mléčné. Z větvených polymerů byly použity kopolymery kyseliny mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerythritolu. Tripentaerythritol je větvicí složka a jednotlivé polymery se lišily jejím poměrovým zastoupením (1 %, 3 %, 5 %). Pro přípravu nanočástic byly použity dvě top to bottom metody – metoda odpařování rozpouštědla a nanoprecipitační metoda.

### 4.1 Granulometrická analýza

Dle zadání práce jsou optimální parametry nanočástic velikost pod 200 nm s nízkou mírou polydisperzity

#### 4.1.1 Metoda odpařování rozpouštědla

Aplikací metody odpařování rozpouštědla vznikly nanočástice o velikosti v rozmezí 160,7 až 569,1 nm s polydisperzitou 0,144 až 0,417. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3 a jejich grafická zpracování na obr. 15 a obr. 16.

U vzorků s navážkou 12,5 mg vznikaly nanočástice o velikosti 201,1 až 330,6 nm s polydisperzitou 0,144 až 0,333. Nejmenší nanočástice vznikly při použití polymeru 1T s polydisperzitou 0,284, největší při použití polymeru 3T, jehož vzorek disponoval zároveň největší polydisperzitou, což pravděpodobně ukazuje na agregaci těchto primárních částic. Použitím polymeru PLGA 5:5 a 5T byly připraveny částice o velikosti 220,1 nm s polydisperzitou 0,222, respektive 267,3 nm s polydisperzitou 0,285. Tyto rozdílné výsledky mohou být důsledkem nízké koncentrace polymeru (1,14 mg/ml), jež může mít dopad na tvorbu větších kapének, které nepodlehnu dokonalé homogenizaci, vzhledem k velkému objemu vodné fáze a rozpouštědla.

U vzorků s navážkou 25 mg vznikaly nanočástice o velikosti v rozmezí 160,7 až 232,8 nm s polydisperzitou 0,272 až 0,298. Nejmenší velikost byla zaznamenána u vzorku polymeru PLGA 5:5, kdy vzniklé nanočástice dosáhly

velikosti 160,7 nm s polydisperzitou 0,272. Největší velikost nanočástic vykazoval vzorek polymeru 1T s hodnotou diametru 232,8 nm a polydisperzitou 0,280. Použitím polymeru PLGA 3:7 byly získány nanočástice o velikosti 214,3 nm s největší polydisperzitou 0,296. U vzorků větvených polymerů 3T a 5T byly naměřeny hodnoty velikosti 197,0 nm (PdI 0,298), respektive 181,9 nm (PdI 0,256). Na obr. 16 lze pozorovat, že vzorky s navázkou 25 mg vykazují vysokou míru reprodukovatelnosti.

U vzorků s navázkou 50 mg pozorujeme trend vzniku nanočástic s největší velikostí a polydisperzitou. Výjimkou je pouze vzorek polymeru PLGA 3:7, kdy byly produkovány nanočástice o velikosti 206,2 nm s polydisperzitou 0,270. U ostatních polymerů došlo k tvorbě nanočástic o velikosti 300,9 až 569,1 nm s polydisperzitou 0,316 až 0,417. Největší nanočástice vznikly použitím polymeru 1T s polydisperzitou 0,316. Použitím polymeru PLGA 5:5 vznikly nanočástice o velikosti 399,25 nm s největší polydisperzitou 0,417. Hodnoty velikosti nanočástic u vzorků polymeru 3T a 5T jsou 316,1 nm s polydisperzitou 0,356, respektive 300,9 nm s polydisperzitou 0,388. Nárůst velikosti částic je pravděpodobně způsoben příliš vysokou koncentrací polymeru ve vzorku (4,55 mg/ml), v jejímž důsledku dochází k agregaci jednotlivých nanočástic, čemuž napovídají i vysoké hodnoty polydisperzity.

Z obr. 15 je možné vypozorovat, že jediným polymerem, u kterého nelze reflektovat výrazný vliv navážky na velikost vzniklých nanočástic, je PLGA 3:7. Příčinou tohoto jevu může být lipofilní povaha polymeru, díky níž může docházet k dynamičtějšímu průběhu tvorby nanočástic ve vodném prostředí. U polymerů PLGA 5:5, 3T a 5T lze zaznamenat trend nárůstu velikosti nanočástic u vzorků s navážkami 12,5 mg a 50 mg oproti vzorkům s navázkou 25 mg (viz obr. 15). Použitím navážky 12,5 mg u polymeru 1T došlo ke vzniku nejmenších nanočástic ze všech patnácti měření, naopak u vzorku s navázkou 50 mg polymeru 1T vznikly největší nanočástice ze všech měření.

Z porovnání velikosti nanočástic z hlediska použití lineárních či větvených polymerů vyplývá, že při použití lineárních polymerů vznikaly menší částice než při použití polymerů větvených (viz obr. 14). Vzorky větvených polymerů často vykazovaly

zároveň vyšší polydisperzitu. Příkladem je příprava nanočástic z větveného polymeru 3T, kdy při navážce 12,5 mg vznikly nanočástice o velikosti 330,6 nm s polydisperzitou 0,333, zatímco u lineárních polymerů vznikly nanočástice o velikosti 207,5 nm a polydisperzitou 0,144 (PLGA 3:7) a 220,1 nm s polydisperzitou 0,222 (PLGA 5:5). Tyto výsledky jsou uvedeny v tab. 3.

U vzorků s polydisperzitou vyšší než 0,270 byla z grafů odečtena maxima píku intenzity, pro zjištění nejvyššího procentuálního zastoupení určité velikostní frakce ve vzorku. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 3.

#### **4.1.2 Nanoprecipitační metoda**

Použitím nanoprecipitační metody došlo k tvorbě nanočástic o velikosti v rozmezí 176,7 až 203,3 nm s polydisperzitou 0,073 až 0,138. Navážka polymerů ve všech vzorcích byla 25 mg. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 4 a jejich grafické zpracování na obr. 17.

Nejmenší nanočástice vznikly při použití lineárního polymeru PLGA 3:7, přičemž tento vzorek disponuje zároveň nejmenší polydisperzitou. Produkci největších částic o velikosti 203,3 nm s polydisperzitou 0,138 lze pozorovat u vzorku větveného polymeru 3T. Při použití lineárního polymeru PLGA 5:5 vznikly nanočástice o velikosti 190,9 nm s polydisperzitou 0,096, použitím polymeru 1T vznikly nanočástice o velikosti 191,8 nm s polydisperzitou 0,08 a použitím polymeru 5T došlo ke vzniku nanočástic o velikosti 186,6 nm s polydisperzitou 0,107.

Při porovnání lineárních a větvených polymerů s ohledem na velikosti vzniklých nanočástic lze opět pozorovat trend vzniku větších nanočástic v případě použití větvených polymerů (viz obr. 18). Rozdíly ve velikosti jsou ale minimální, pouze 5 nm, což je zanedbatelné.

Porovnáním metody odpaření rozpouštědla a nanoprecipitační metody lze dojít k jednoznačnému závěru, že u všech vzorků v případě nanoprecipitační metody byla dosažena výrazně nižší polydisperzita. U vzorků polymerů PLGA 3:7 a 1T připravovaných nanoprecipitační metodou pozorujeme vznik menších nanočástic, než při použití metody odpařování rozpouštědla. U polymeru PLGA 3:7 činil rozdíl



velikostí 37,7 nm (nanoprecipitace: 176,6 nm, odpařování rozpouštědla: 214,3 nm), u polymeru 1T 41 nm (nanoprecipitace: 191,8 nm, odpařování rozpouštědla: 232,8 nm). U polymerů PLGA 5:5, 3T a 5T je trend opačný, nanoprecipitační metodou vznikly větší nanočástice, než při použití metody odpařování rozpouštědla. U polymeru PLGA 5:5 činil rozdíl velikostí 30,2 nm (nanoprecipitace: 190,9 nm, odpařování rozpouštědla: 160,7 nm), u polymeru 3T 6,3 nm (nanoprecipitace: 203,3 nm, odpařování rozpouštědla: 197,0 nm), u polymeru 5T 4,7 nm (nanoprecipitace: 186,6 nm, odpařování rozpouštědla: 181,9 nm) viz obr. 19.

## 4.2 Zeta potenciál nanočástic

Za stabilní se považují nanočástice dosahující hodnoty zeta potenciálu  $\pm 30$  mV.<sup>115</sup>

### 4.2.1 Metoda odpařování rozpouštědla

Částice připravené metodou odpařování rozpouštědla lze téměř všechny považovat za stabilní. Rozmezí zeta potenciálu u všech vzorků je -20,1 až -40,4 mV. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5, a jejich grafická zpracování na obr. 21-22.

Jediným polymerem, u kterého byl naměřený zeta potenciál v případě všech navážek vyšší než -30 mV, je 1T, který dosáhl hodnot -22,5 mV u navážky 12,5 mg, -20,1 mV u navážky 25 mg, -26,5 mV u navážky 50 mg.

U polymeru PLGA 3:7 byly méně stabilní nanočástice rozpoznány u navážek 25 mg s hodnotou zeta potenciálu -21,6 mV a 50 mg s hodnotou zeta potenciálu -24,1 mV. V případě navážky 12,5 mg polymeru PLGA 3:7 byl naměřen zeta potenciál -35,3 mV. Vysoký zeta potenciál u nižších navážek polymeru může souviset s tím, že došlo k produkci menšího počtu částic a vrstva iontů u povrchu částic je tím pádem více zhuštěná. Vzorek polymeru PLGA 5:5 vykazuje stabilní nanočástice v případě všech tří navážek – 12,5 mg -32,7 mV, 25 mg -38,9 mV, 50 mg -37,2 mV, stejně jako vzorek polymeru 3T – 12,5 mg -30,6 mV, 25 mg -31,8 mV, 50 mg -38,9 mV.

Nejvyšší hodnota zeta potenciálu byla naměřena u navážky 50 mg polymeru 5T, a to -40,4 mV.

V případě větvených polymerů byla maxima absolutních hodnot zeta potenciálu dosažena u navážek 50 mg. Z výsledků vyplývá, že čím více je polymer větvený, tím výraznější je zeta potenciál nanočástic, což zřejmě souvisí se vzrůstající koncentrací hydroxylových skupin v polymeru.

U polymerů PLGA 3:7, 1T a 5T byly dosaženy vyšší absolutní hodnoty zeta potenciálu vzorků s navážkou 12,5 mg a 50 mg ve srovnání s navážkou 25 mg. V případě PLGA 3:7 dosáhl nejvyšší absolutní hodnoty vzorek s navážkou 12,5 mg, a to -35,3 mV. U navážky 50 mg byly naměřeny hodnoty -24,1 mV, u navážky 25 mg -21,6 mV. U polymerů 1T a 5T dosáhly nejvyšší absolutní hodnoty vzorky s navážkou 50 mg. V případě 1T byly naměřeny hodnoty -26,4 mV (50 mg), -22,5 mV (12,5 mg) a -20,1 mV (25 mg), v případě 5T -40,4 mV (50 mg), -37,6 mV (12,5 mg) a -27 mV (25 mg). U polymeru PLGA 5:5 dosáhl nejvyšší absolutní hodnoty zeta potenciálu vzorek s navážkou 12,5 mg (-32,7 mV), nejvyšší s navážkou 25 mg (-38,9 mV). U vzorku s navážkou 50 mg byla naměřena hodnota zeta potenciálu -37,2 mV. Polymer 3T je jediný, u kterého pozorujeme trend vyšší stability nanočástic se stoupající navážkou. Absolutní hodnoty zeta potenciálu dosáhly hodnot -30,6 mV (12,5 mg), -31,8 mV (25 mg), -38,9 mV (50 mg). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5, grafické zpracování vlivu typu polymeru na hodnotu zeta potenciálu na obr. 21.

Při porovnání lineárních a větvených polymerů z hlediska zeta potenciálu lze u navážek 12,5 mg a 25 mg pozorovat vyšší stabilitu částic připravených z lineárních polymerů. Při navážce 50 mg vznikaly stabilnější nanočástice při použití větvených polymerů (viz obr. 20).

Ve výsledcích měření zeta potenciálu nelze nalézt mnoho trendů, velikost nanočástic ani navážka polymeru s absolutními hodnotami zeta potenciálu příliš nekorrespondují. Je pravděpodobné, že zeta potenciál nanočástic bude nejvíce ovlivňovat zvolený surfaktant.

## 4.2.2 Nanoprecipitační metoda

Nanoprecipitační metodou, při které byly proměřovány vzorky s navázkou 25 mg, bylo docíleno hodnot zeta potenciálu v rozmezí -25,2 mV až -38,9 mV, z čehož vyplývá, že vzniklé nanočástice lze považovat za stabilní. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6, jejich grafické zpracování na obr. 18. Nejnižší hodnota zeta potenciálu byla naměřena u vzorku polymeru 3T, nejvyšší u vzorku polymeru PLGA 5:5. Použitím polymeru PLGA 3:7 bylo dosaženo hodnoty -26,03 mV, použitím polymeru 1T -27,5 mV a použitím polymeru 5T -31,8 mV. V porovnání s metodou odpařování rozpouštědla došlo ke zvýšení absolutní hodnoty zeta potenciálu u polymerů PLGA 3:7 o 4,4 mV (nanoprecipitace: -26,0 mV, odpařování rozpouštědla: -21,6 mV), 1T o 7,4 mV (nanoprecipitace: -27,5 mV, odpařování rozpouštědla: -20,1 mV) a 5T o 4,8 mV (nanoprecipitace: -31,8 mV, odpařování rozpouštědla: -27,0 mV). U polymerů PLGA 5:5 a 3T byly naměřené absolutní hodnoty v porovnání s metodou odpařování rozpouštědla nižší o 0,7 mV (nanoprecipitace: -38,2 mV, odpařování rozpouštědla: -38,9 mV), respektive o 6,6 mV (nanoprecipitace: -25,2 mV, odpařování rozpouštědla: -31,8 mV) viz obr. 18.

## 4.3 Enkapsulační efektivita rhodaminu B

Pro zkoumání enkapsulační efektivy lipofilního fluorescenčního barviva rhodaminu B byly pro tvorbu nanočástic použity lineární polymery PLGA 3:7 a PLGA 5:5 o navázce 25 mg. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulkách č. 7-9.

Velikost nanočástic i polydisperzita se u vzorků s enkapsulovaným rhodaminem B zvýšily. U polymeru PLGA 3:7 dosáhly nanočástice s enkapsulovaným barvivem velikosti 266,6 nm a polydisperzity 0,325, zatímco bez enkapsulovaného barviva byla velikost nanočástic 214,3 nm s polydisperzitou 0,296. V případě polymeru PLGA 5:5 byla naměřena velikost nanočástic s enkapsulovaným barvivem 325,0 nm a polydisperzita 0,323, zatímco nanočástice bez enkapsulovaného barviva disponovaly velikostí 160,7 nm s polydisperzitou 0,272. Zvětšení částic je očekávatelné, protože předpokládáme inkorporaci rhodaminu B do nanočástic,

či jeho navázání na povrch nanočástic. Porovnání velikostí je graficky znázorněno na obr. 26.

Změna hodnoty zeta potenciálu oproti prázdným nanočásticím je v případě polymeru PLGA 3:7 zanedbatelná, lišila se pouze o 0,2 mV. Nanočástice s enkapsulovaným barvivem dosáhly hodnoty zeta potenciálu -21,8 mV, nanočástice bez enkapsulovaného barviva -21,6 mV. U polymeru PLGA 5:5 se hodnoty zeta potenciálu lišily o 4,3 mV. U částic s enkapsulovaným barvivem byla hodnota zeta potenciálu -34,6 mV, bez enkapsulovaného barviva -38,9 mV. V případě PLGA 3:7 se jedná o méně stabilní nanočástice, nanočástice vzniklé z polymeru PLGA 5:5 lze považovat za stabilní. Porovnání velikostí zeta potenciálu je graficky znázorněno na obr. 27.

Enkapsulační efektivita rhodaminu B je uvedena v tab. 9. Hodnoty u polymeru PLGA 3:7 dosáhly 25,71 %, u polymeru PLGA 5:5 23,45 %.

## 5 ZÁVĚR

Experimentální část je zaměřena na zkoumání vlivu různých derivátů PLGA a jejich navážky na výslednou velikost, polydisperzitu a zeta potenciál nanočástic. U nanočástic připravených z lineárních polymerů byla zkoumána enkapsulační efektivita rhodaminu B.

Optimální navážka pro měření parametrů nanočástic uvedených výše je 25 mg. U vzorků s touto navážkou byla sledována vysoká míra reprodukovatelnosti. Jediný polymer, u kterého nelze reflektovat výrazný vliv navážky na velikost vzniklých nanočástic je PLGA 3:7.

Pro přípravu polymerních nanočástic o velikosti menší než 200 nm jsou vhodné lineární polymery. U větvených polymerů často dochází k agregaci částic, což má za následek větší velikost i polydisperzitu částic.

Polymerní částice připravené nanoprecipitační metodou disponovaly úzkou distribucí požadované velikosti částic a v porovnání s metodou odpařování rozpouštědla výrazně menší polydisperzitou. Všechny nanočástice vzniklé touto metodou lze z hlediska hodnot jejich zeta potenciálu považovat za stabilní. Výsledky této metody jsou reprodukovatelnější než výsledky získané metodou odpařování rozpouštědla.

Zeta potenciál nanočástic není výrazně závislý na velikosti nanočástic a v případě lineárních polymerů ani na navážce polymeru. U větvených polymerů byl vyzorován trend, kdy se stoupajícím podílem větvicí složky vrostl i zeta potenciál částic. Jedinou výjimkou byla navážka 25 mg větveného polymeru 3T. U větvených polymerů dosahují nejvyšších hodnot zeta potenciálu vzorky s navážkou 50 mg.

Nanočástice s enkapsulovaným rhodaminem B dosahují větší velikosti i polydisperzity v důsledku inkorporace barviva do částic či adsorpce barviva na jejich povrch. Hodnoty zeta potenciálu nanočástic s enkapsulovaným rhodaminem B se výrazně nelišily od hodnot zeta potenciálu naměřeného u částic bez enkapsulovaného barviva. Hodnoty enkapsulační efektivity rhodaminu B dosáhly u polymeru PLGA 3:7 hodnoty 25,71 %, u polymeru PLGA 5:5 23,45 %.

## 6 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1: Celosvětové financování nanotechnologií v letech 2000 až 2015 <sup>1</sup> .....	1
Obrázek 2: Klasifikace polymerních nanočástic (A – nanosféry, B – nanotobolky obsahující olej, C – nanotobolky obsahující vodu) <sup>9</sup> .....	3
Obrázek 3: Struktura dendrimerů <sup>11</sup> .....	4
Obrázek 4: Struktura liposomu a micely <sup>14</sup> .....	4
Obrázek 5: Lineární PLGA (a) a hvězdicovitě rozvětvený terpolymer z mléčné kyseliny, glykolové kyseliny a tripentaerythritolu (b). R1-R8 je větvení PLGA. <sup>21</sup> ....	6
Obrázek 6: Izomery kyseliny mléčné .....	7
Obrázek 7: Polymerace za otevření kruhu <sup>23</sup> .....	8
Obrázek 8: Biodegradace PLGA <sup>82</sup> .....	9
Obrázek 9: Schématické znázornění různých technik k přípravě nanočástic (SCF – technologie superkritických kapalin, C/LR – koordinační/living radikálová polymerace) <sup>9</sup> .....	10
Obrázek 10: Schéma použití membránového reaktoru <sup>10</sup> .....	17
Obrázek 11: Pasivní a aktivní targeting v protinádorové terapii <sup>82</sup> .....	21
Obrázek 12: Kalibrační křivka pro roztok rhodaminu B v acetonitrilu (A=556 nm) 30	
Obrázek 13: Distribuce iontů v okolí částice a jejich vrstvy <sup>116</sup> .....	32
Obrázek 14: Porovnání lineárních a větvených polymerů (metoda odpařování rozpouštědla – velikost nanočástic) .....	35
Obrázek 15: Vliv typu polymeru na velikost nanočástic (metoda odpařování rozpouštědla – celkový přehled) .....	35
Obrázek 16: Vliv navážky na velikost nanočástic (metoda odpařování rozpouštědla – celkový přehled) .....	36
Obrázek 17: Vliv typu polymeru na velikost nanočástic (nanoprecipitační metoda – navážka polymeru 25 mg).....	37
Obrázek 18: Porovnání lineárních a větvených polymerů (nanoprecipitační metoda – velikost nanočástic).....	37
Obrázek 19: Velikost nanočástic (porovnání z hlediska metody přípravy).....	38

Obrázek 20: Porovnání lineárních a větvených polymerů (metoda odpařování rozpouštědla – zeta potenciál nanočástic).....	39
Obrázek 21: Vliv typu polymeru na zeta potenciál nanočástic (metoda odpařování rozpouštědla – celkový přehled) .....	40
Obrázek 22: Vliv navážky polymeru na zeta potenciál nanočástic (metoda odpařování rozpouštědla – celkový přehled) .....	40
Obrázek 23: Vliv typu polymeru na zeta potenciál nanočástic (nanoprecipitační metoda – navážka polymeru 25 mg).....	41
Obrázek 24: Porovnání lineárních a větvených polymerů (nanoprecipitační metoda – zeta potenciál nanočástic) .....	42
Obrázek 25: Zeta potenciál nanočástic (porovnání z hlediska metody přípravy).....	42
Obrázek 26: Porovnání dle přítomnosti rhodaminu B (metoda odpařování rozpouštědla – velikost nanočástic) .....	44
Obrázek 27: Porovnání dle přítomnosti rhodaminu B (metoda odpařování rozpouštědla – zeta potenciál nanočástic).....	44
Tabulka 1: Ředění vzorků v závislosti na navážce polymeru.....	28
Tabulka 2: Přehled vzorků .....	33
Tabulka 3: Metoda odpařování rozpouštědla – velikost nanočástic .....	34
Tabulka 4: Nanoprecipitační metoda – velikost nanočástic .....	36
Tabulka 5: Metoda odpařování rozpouštědla – zeta potenciál nanočástic.....	38
Tabulka 6: Nanoprecipitační metoda – zeta potenciál nanočástic .....	41
Tabulka 7: Velikost nanočástic s rhodaminem B .....	43
Tabulka 8: Zeta potenciál nanočástic s rhodaminem B .....	43
Tabulka 9: Koncentrace a enkapsulační efektivita rhodaminu B .....	43

## 7 SEZNAM LITERATURY

---

1. Global funging of nanotechnologies & its impact. In: *Cientifica - Smart Textiles, Wearable Technologies, Nanotechnology, Graphene, Market Research and Consultancy* [online]. London: Cientifica, 2011. Dostupné z: <http://cientifica.com/wp-content/uploads/downloads/2011/07/Global-Nanotechnology-Funding-Report-2011.pdf>
2. VYSLOUŽIL, J., DVOŘÁČKOVÁ, K., KEJDUŠOVÁ, M., RABIŠKOVÁ M. Příprava léčivých mikročástic metodou odpařování rozpouštědla. *Chemické listy*. 2013, 107(1), s. 16-23. ISSN 1213-7103.
3. KOVÁCSOVÁ, D. *Nanočástice ve farmaceutické technologii - biodegradabilní polymerní částice jako systémy cílené biodistribuce léčiv*. Hradec Králové, 2006. Rigorózní práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta.
4. RABIŠKOVÁ, M. Nanočástice pro lékové formy. *Remedia*. 2007, 17(5), s. 495-501. ISSN 0862-8947.
5. KREUTER, J., DEKKER, M. *Colloidal drug delivery systems*. 1994. New York, CRC Press, 368 s. ISBN 0-8247-9214-9.
6. COUVREUR, P. Polyalkylecyanoacrylates as colloidal drug carriers. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*. 1988, 5(1), s. 1-20. ISSN 0743-4863.
7. VAUTHIER, C., COUVREUR, P., WISE, D., L. *Handbook of pharmaceutical controlled release technology*. 2000, New York, CRC Press, s. 902. ISBN: 978-0824703691. *Development of nanoparticles made of polysaccharides as novel drug carrier systems* s. 13–429



- 
8. COUVREUR, P., DUBERNET, C., PUISIEUX, F. Controlled drug delivery with nanoparticles: Current possibilities and future trends. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1995, 41(1), s. 2-13. ISSN 0939-6411.
9. RAO, J., P., GECKELER, K., E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*. 2011, 36(7), s. 887-913. ISSN 0079-6700.
10. ŠČUDLOVÁ, J. *Studie strukturních a mechanických vlastností dendrimerů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 49 s.
11. LHOTÁK, P. Dendrimery. In: *Prague: Institute of Organic Chemistry and Biochemistry* [online]. Praha, 2005 Dostupné z: <http://docplayer.cz/9165579-Dendrimery-pavel-lhotak.html>
12. LARSON, N., GHANDEHARI, H. Polymeric conjugates for drug delivery. *Chemistry of Materials*. 2013, 24(5), s. 840-853. ISSN 0897-4756.
13. TURÁNEK, J. *Liposomy pro konstrukci cílených terapeutik a vakcín*. Brno, 2016. Habilitační práce. Masarykova univerzita Přírodovědecká fakulta, Ústav biochemie.
14. TIWARI, G., TIWARI, R. Drug delivery systems: An updated review. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2012, (2)1, s. 2-11. ISSN 2230-9713.

---

15. BARBARI, G., R., DORKOOSH, F., A., AMINI, M. A novel nanoemulsion-based method to produce ultrasmall, water-dispersible nanoparticles from chitosan, surface modified with cell-penetrating peptide for oral delivery of proteins and peptides. *International Journal Of Nanomedicine*. 2017, 12(5), s. 3471-3483 ISSN 1178-2013.

16. VACULÍKOVÁ, E., PLACHÁ, D., JAMPÍLEK, J. Toxikologie nanoforem nosičů léčiv. *Chemické listy*. 2015, 109(5), s. 346-352. ISSN 0862-8947.

17. RAI, M., INGLE, A., P., BIRLA, S. Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine. *Critical Reviews In Microbiology*. 2016, 42(5), s. 696-719, ISSN 1549-7828.

18. AMER, M., S. *Raman spectroscopy, fullerenes and nanotechnology*. 2010, Cambridge, Royal Society of Chemistry, 287 s. ISBN 9781847552402.

19. HANS, M., L., LOWMAN, A., M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2002, 6(4), s. 319-327. ISSN 1359-0286.

20 ŠNEJDROVÁ, E., DITTRICH, M. Poly( $\alpha$ -hydroxykyseliny) jako nosiče léčiv. *Chemické listy*. 2011, 105(5), s. 27-33. ISSN 1213-7103.

21. DITTRICH, M., SNEJDROVA, E. Cyclic Swelling as a Phenomenon Inherent to Biodegradable Polyesters. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2014, 103(11), s. 3560-3566. ISSN 0022-3549.

---

22. THAUVIN, C., SCHWARZ, B., DELIE, F. Functionalized PLA polymers to control loading and/or release properties of drug-loaded nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.11.001 ISSN 0378-5173.

23. GUPTA, A., P., KUMAR, V. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers – Polylactide: A critique. *European Polymer Journal*. 2007, 43(10), s. 4053-4074. ISSN 0014-3057.

24. DATTA, D., KUMAR, S. Modeling using response surface methodology and optimization using differential evolution of reactive extraction of glycolic acid. *Chemical Engineering Communications*. 2015, 202(1), s. 59 – 69 ISSN 1563-5201

25. ANDERSON, J., M, SHIVE, M. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews* . 2012(12), 64, s. 72-82. ISSN 0169-409X

26. BELBELLA, A., VAUTHIER, CH., FESSI, H. In vitro degradation of nanospheres from poly(D,L-lactides) of different molecular weights and polydispersities. *International Journal of Pharmaceutics*. 1996, 129(1), s. 95-102. ISSN 1873-3476

27. PISTNER, H., GUTWALD. R., ORDUNG, R. Poly(L-lactide): a long-term degradation study *in vivo*. I. Biological results. *Biomaterials* .1993, 14(9), s. 671-677 ISSN 0142-9612.

28 VANDERHOFF, J. W., EL-AASSER, M., S., UGELSTAD, J. *Polymer emulsification process*. Patent No: US4177177A. Apr., 12, 1979.

- 
29. GURNY, R., PEPPAS, N., A., HARRINGTON, D., D., BANKER, G., S. Development of Biodegradable and Injectable Latices for Controlled Release of Potent Drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2008, 7(1), s. 1-25. ISSN 0363-9045.
30. ALLÉMAN, E., GURNY, R., DOEKLER, E. Drug-loaded nanoparticles- preparation methods and drug targeting issues. *Eur J Pharm Biopharm*. 1993, 39, s. 173–191. ISSN 1873-3441
31. ANTON, N., BENOIT, J., P., SAULNIER, P. Review: Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates. *Journal of Controlled Release*. 2008, 128(3), s. 185-199. ISSN 0168-3659.
32. CHORNY, M., FISHBEIN, I., DANENBERG, H., GOLOMB, G. Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. *Journal of Controlled Release*. 2002, 83(3), s. 389-400. ISSN 0168-3659
33. ZILI, Z., SFAR, S., FESSI, H. Pharmaceutical Nanotechnology: Preparation and characterization of poly-ε-caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005, 294(1), s. 261-267. ISSN 0378-5173.
34. LEGRAND, P., LESIEUR, S., BOCHOT A. et al. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007, 344(1), s. 33-43. ISSN 0378-5173.

---

35. YALLAPU, M., M., GUPTA, B., K., JAGGI, M. et al. Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. *Journal of Colloid And Interface Science*. 2010, 351(1), s. 19-29. ISSN 0021-9797.

36. CHANG, J., JALLOULI, Y., KROUBI, M., et al. Characterization of endocytosis of transferrin-coated PLGA nanoparticles by the blood–brain barrier. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009, 379(2), s. 285-292. ISSN 0378-5173.

37. STELLA, B., ARPICCO, S., ROCCO, F., et al. Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007, 344(1), s. 71-77. ISSN 0378-5173.

38. TAN, Y., WANG, P., XU, K., et al. Designing Starch-Based Nanospheres to Make Hydrogels with High Mechanical Strength. *Macromolecular Materials and Engineering*. 2009, DOI: 10.1002/mame.200900182. ISSN 1438-7492.

39. HORNIG, S., BUNJES, H., HEINZE, T. Preparation and characterization of nanoparticles based on dextran–drug conjugates. *Journal of Colloid And Interface Science*. 2009, 338(1), s. 56-62. ISSN 0021-9797.

40. GOVENDER, T., STOLNIK, S., GARNETT, C., M. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of Controlled Release*. 1999, 57(2), s. 171-185. ISSN 0168-3659

- 
41. MISHRA, B., PATEL, B., B., TIWARI, S. Review Article: Colloidal nanocarriers: A review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2010, 6(1), s. 9-24. ISSN 1549-9634.
42. LIMAYEM BLOUZA, I., CHARCOSSET, C., SFAR, S., FESSI, H. Pharmaceutical Nanotechnology: Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006, 325(1), s. 124-131. ISSN 0378-5173.
43. LINCE, F., MARCHISIO, D., L., BARRESI, A. Strategies to control the particle size distribution of poly- $\epsilon$ -caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2008, 322(2), s. 505-515. ISSN 0021-9797
44. ALLÉMANN, E., GURNY, R., DOELKER, E. Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size. *International Journal of Pharmaceutics*. 1992, 87(1-3), s. 247-253. ISSN 0378-5173.
45. GALINDO-RODRIGUEZ, S., ALLÉMANN, E., FESSI, H., et al. Physicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-Out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods. *Pharmaceutical Research*. 2004, 21(8), s. 1428-1439. ISSN 0724-8741.
46. LIU, M., ZHOU, Z., WANG, X., et al. Formation of poly(l,d-lactide) spheres with controlled size by direct dialysis. *Polymer*. 2007, 48(19), s. 5767-5779. ISSN 0032-3861.

- 
47. CHRONOPOULOU, L., FRATODDI, I., PALOCCI, C., et al. Osmosis Based Method Drives the Self-Assembly of Polymeric Chains into Micro- and Nanostructures. *Langmuir*. 2009, 25(19), s. 11940-1194. ISSN 0743-7463.
48. JUNG, J., PERRUT, M. Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2001, 20(3), s. 179-219. ISSN 0896-8446
49. Superkritická tekutina. *Ústav chemických procesů AV ČR, v. v. i.* Praha, 2010 – 2016 Dostupné z: <http://www.icpf.cas.cz/cs/superkriticka-tekutina>
50. SUN, Y. *Supercritical fluid technology in materials science and engineering: synthesis, properties, and applications*. 2002, New York, CRC Press, 600 s. ISBN 9780824706517. WEBER, M., THIES, M. C. *Understanding the RESS proces.* s. 387–437
51. SUN, Y. *Supercritical fluid technology in materials science and engineering: synthesis, properties, and applications*. 2002, New York, CRC Press, 600 s. ISBN 9780824706517. SUN, Y., ROLLING, H., W., BANDARA, J., et al. *Preparation and processing of nanoscale materials by supercritical fluid technology.* s. 491-576
52. KALANI, M., YUNUS, R. Application of supercritical antisolvent method in drug encapsulation: a review. *International Journal Of Nanomedicine*. 2011, 6, s. 1429-42. ISSN 1178-2013.
53. THICKETT, S., C., GILBERT, R., G. Feature Article: Emulsion polymerization. *Polymer*. 2007, 48(24), s. 6965-6991. ISSN 0032-3861.

---

54. KREUTER, J. On the mechanism of termination in heterogeneous polymerization. *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition*. 1982, 20(10), s. 543-545. ISSN 0360-6384.

55 SONG, Zhiqiang a Gary W. POEHLEIN. Kinetics of emulsifier-free emulsion polymerization of styrene. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 1990, 28(9), s. 2359-2392. ISSN 0887-624X

56. GOODALL, A. R., M. C. WILKINSON a J. HEARN. Mechanism of emulsion polymerization of styrene in soap-free systems. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*. 1977, 15(9), s. 2193-2218. ISSN 0360-6376

57. YILDIZ, U., LANDFESTER, K. Miniemulsion polymerization of styrene in the presence of macromonomeric initiators. *Polymer*. 2008, 49(23), s. 4930-4934. ISSN 0032-3861

58. KRIWET, B., WALTER, E., KISSEL, T. Synthesis of bioadhesive poly(acrylic acid) nano- and microparticles using an inverse emulsion polymerization method for the entrapment of hydrophilic drug candidates. *Journal of Controlled Release*. 1998, 56(1-3), s. 149-158. ISSN 0168-3659.

59. CHERN, C., S., SHEU, J., C. Effects of carboxylic monomers on the styrene miniemulsion polymerizations stabilized by SDS/alkyl methacrylates. *Polymer*. 2001, 42(6), s. 2349-2357. ISSN 0032-3861.

60. SALAMONE, J., C. *Polymeric materials Encyclopedia*, 1996, Boca Raton, CRC Press, 9600 s. ISBN 9780849324703. PUIG, J., N. *Microemulsion polymerization (oil-in water)*. s. 4333-41



- 
61. ANTONIETTI, M. Polyreactions in miniemulsions. *Progress in Polymer Science*. 2002, **27**(4), s. 689-757. ISSN 0079-6700.
62. KARODE, S., K., KULKARNI, S., S., SURESH, A., K., et al. New insights into kinetics and thermodynamics of interfacial polymerization. *Chemical Engineering Science*. 1998, **53**(15), s. 2649-2663. ISSN 0009-2509.
63. SREE, U., YAMAMOTO, Y., DEORE, B., et al. Characterisation of polypyrrole nano-films for membrane-based sensors. *Synthetic Metals*. 2002, **131**(1-3), s. 161-165. ISSN 0379-6779.
64. CRESPIY, D., STARK, M., HOFFMANN-RICHTER, C., et al. Polymeric Nanoreactors for Hydrophilic Reagents Synthesized by Interfacial Polycondensation on Miniemulsion Droplets. *Macromolecules*. 2007, **40**(9), s. 3122-3135. ISSN 0024-9297
65. SCOTT, CH., WU, D., HO, CH., et al. Liquid-Core Capsules via Interfacial Polymerization: A Free-Radical Analogy of the Nylon Rope Trick. *Journal of the American Chemical Society*. 2005, **127**(12), s. 4160-4161. ISSN 0002-7863.
66. AL KHOURI FALLOUH, N., ROBLOT-TREUPEL, L., FESSI, H., et al. Development of a new process for the manufacture of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*. 1986, **28**(2-3), s. 125-132. ISSN 03785173
67. VAUTHIER, CH., DUBERNET, C., FATTAL, E., et al. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003, **55**(4), s. 519-548. ISSN 0169-409X.

- 
68. PUGLISI, G., FRESTA, M., GIAMMONA, G., et al. Influence of the preparation conditions on poly(ethylcyanoacrylate) nanocapsule formation. *International Journal of Pharmaceutics*. 1995, 125(2), s. 283-287. ISSN 0378-5173.
- 69 GASCO, M., R., TROTTA, M. Nanoparticles from microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*. 1986, 29, s. 267-268. ISSN 0378-5173.
70. ZETTERLUND, P., B., THICKETT, S., C., PERRIER, S., et al. Controlled/Living Radical Polymerization in Dispersed Systems: An Update. *Chemical Reviews*. 2015, 115(18), s. 9745-9800. ISSN 0009-2665
71. NICOLAS, J., CHARLEUX, B., GUERRET, O., et al. Nitroxide-Mediated Controlled Free-Radical Emulsion Polymerization Using a Difunctional Water-Soluble Alkoxyamine Initiator. Toward the Control of Particle Size, Particle Size Distribution, and the Synthesis of Triblock Copolymers. *Macromolecules*. 2005, 38(24), s. 9963-9973. ISSN 0024-9297
- 72 KUMARI, A., YADAV, S., K., YADAV, S., C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* . 2010, 75(1), s. 1-18. ISSN 0927-7765
73. OWENSIII, D., PEPPAS, N. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* . 2006, 307(1), s. 93-102. ISSN 0378-5173.
74. REDHEAD, H., M., DAVIS, S., S., ILLUM, L. Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release* . 2001, 70(3), s. 353-363. ISSN 0168-3659.

- 
75. GULYAEV, A., E., GELPERINA, S., E., SKIDAN, I., N. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. *Pharmaceutical Research*. 1999, 16(10), s. 1564-9. ISSN 0724-8741
76. KUTSCHER, H., L., CHAO, P., DESHMUKH, M., et al. Threshold size for optimal passive pulmonary targeting and retention of rigid microparticles in rats. *Journal of Controlled Release* . 2010, 143(1), s. 31-37. ISSN 0168-3659.
77. TAMMAM, S., MATHUR, S., AFIFI, N. Preparation and biopharmaceutical evaluation of tacrolimus loaded biodegradable nanoparticles for liver targeting. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2012, 8(3), s. 439-449, ISSN 1550-7041
78. PRIOR, S., GANDER, B., BIARER, N., et al. *In vitro* phagocytosis and monocytemacrophage activation with poly(lactide) and poly(lactide-coglycolide) Microspheres. *Eur J Pharm Sci.* 2002, 15(2), s. 197-207. ISSN 0928-0987
79. TAMMAM, S., N., AZZAZY, H., M., LAMPRECHT, A.. Biodegradable Particulate Carrier Formulation and Tuning for Targeted Drug Delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology.* 2015, 11(4), s. 555-577. ISSN 1550-7033.
80. GREF, R., LÜCK, M., QUELLEC, P., et al. □'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2000, 18(3-4), s. 301-313. ISSN 0927-7765.
81. VILA, A., SÁNCHEZ, A., TOBÍO, M., et al. Design of biodegradable particles for protein delivery. *Journal of Controlled Release.* 2002; 78(1-3), s. 15-24. ISSN 0168-3659

- 
82. DANHIER, F., ANSORENA, E., SILVA, M., et al. Review: PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical application. *Journal of Controlled Release*. 2012, 161(2), s. 505-522. ISSN 0168-3659.
83. MATSUMURA, Y., MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumortropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Research*. 1986, 46(12 Pt 1), s. 6387-92. ISSN 0008-5472.
84. SHERWOOD, L., M., PARRIS, E., E., FOLKMAN, J.. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *New England Journal of Medicine*. 1971, 285(21), s. 1182-1186. ISSN 0028-4793.
85. LIANG, CH., YANG, Y., LING, Y., et al. Improved therapeutic effect of folate-decorated PLGA-PEG nanoparticles for endometrial carcinoma. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2011, 19(13), s. 4057-4066. ISSN 0968-0896.
86. PARK, J., FONG, P., M., LU, J., et al. Research Article: PEGylated PLGA nanoparticles for the improved delivery of doxorubicin. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2009, 5(4), s. 410-418. ISSN 1549-9634.
87. LIANG, CH., YANG, Y., LING, Y., et al. Improved therapeutic effect of folate-decorated PLGA-PEG nanoparticles for endometrial carcinoma. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2011, 19(13), s. 4057-4066. ISSN 0968-0896.
88. FONSECA, C., SIMÕES, S., GASPAR, R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *Journal of Controlled Release*. 2002, 83(2), s. 273-286. ISSN 0168-3659.

---

89. FABIENNE, D., NATHALIE, L., BENOÎT, V., et al. Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*. 2009, 133(1), s. 11-12. ISSN 0168-3659.

90. DERAKHSHANDEH, K., ERFAN, M., DADASHZADEH, S. Research paper: Encapsulation of 9-nitrocamptothecin, a novel anticancer drug, in biodegradable nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007, 66(1), s. 34-41. ISSN 0939-6411.

91. ZHAO, L., FENG, S. Enhanced Oral Bioavailability of Paclitaxel Formulated in Vitamin E-TPGS Emulsified Nanoparticles of Biodegradable Polymers: In Vitro and In Vivo Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010, 99(8), s. 3552-3560. ISSN 0022-3549.

92. JAIN, A., K., SWARNAKAR, N., K., GODUGU, CH., et al. The effect of the oral administration of polymeric nanoparticles on the efficacy and toxicity of tamoxifen. *Biomaterials*. 2011, 32(2), s. 503-515. ISSN 0142-9612.

93. CHOI, S., H., PARK, T., G. Pharmaceutical Nanotechnology: G-CSF loaded biodegradable PLGA nanoparticles prepared by a single oil-in-water emulsion method. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006, 311(1), s. 223-228. ISSN 0378-5173.

94. CHEN, H., GAO, J., LU, Y., et al. Preparation and characterization of PE38KDEL-loaded anti-HER2 nanoparticles for targeted cancer therapy. *Journal of Controlled Release*. 2008, 128(3), s. 209-216. ISSN 0168-3659.

- 
95. ACHARYA, S., SAHOO, S., K. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011, 63(3), s. 170-183. ISSN 0169-409X
96. WANG, Y., NG, Y., G., CHEN, Y., et al. Formulation of Superparamagnetic Iron Oxides by Nanoparticles of Biodegradable Polymers for Magnetic Resonance Imaging. *Advanced Functional Materials*. 2008, 18(2), s. 308-318. ISSN 1616-301X.
97. JANIB, S., M., MOSES, A., S., MACKAY, J., A.. Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010, 62(11), s. 1052-1063. ISSN 0169-409X.
98. LÜBBE, A., S., BERGEMANN, C., HUHNT, W., et al. Preclinical experiences with magnetic drug targeting: tolerance and efficacy. *Cancer Research*. 1996, 56(20), s. 4694-701. ISSN 0008-5472.
99. SINGH, A., DILNAWAZ, F., MEWAR, S., et al. Composite polymeric magnetic nanoparticles for co-delivery of hydrophobic and hydrophilic anticancer drugs and MRI imaging for cancer therapy. *ACS Applied Materials* . 2011, 3(3), s. 842-56. ISSN 1944-8244.
100. DANHIER, F., FERON, O., PRÉAT, V. Review: To exploit the tumor microenvironment. *Journal of Controlled Release*. 2010, 148(2), s. 135-146. ISSN 0168-3659.
101. BRUNNER, R., JENSEN-JAROLIM, E., PALI-SCHÖLL, I. Current Views: The ABC of clinical and experimental adjuvants—A brief overview. *Immunology Letters* . 2010, 128(1), s. 29-35. ISSN 0165-2478.

---

102. JIANG, W., GUPTA, R., K., DESHPANDE, M., C., et al. Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Advanced Drug Delivery Reviews* . 2005, 57(3), s. 391-410. ISSN 0169-409X.

103. ELAMANCHILI, P., LUTSIK, C., M., HAMDY, S., et al. "Pathogen-mimicking" nanoparticles for vaccine delivery to dendritic cells. *Journal Of Immunotherapy (Hagerstown, Md: 1997)*. 2007, 30(4), s. 378-95. ISSN 1524-9557.

104. KELLY, C., JEFFERIES, C., CRYAN, S. Targeted Liposomal Drug Delivery to Monocytes and Macrophages. *Journal of Drug Delivery*. 2011, DOI: 10.1155/2011/727241. ISSN 2090-3014.

105. JAIN, R., A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* . 2000, 21(23), s. 2475-2490. ISSN 0142-9612.

106. CHO, K., WANG, X., NIE, S., et al. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2008, 14(5), s. 1310-1316. ISSN 1078-0432

107. MANOLOVA, V., FLACE, A., BAUER, M., et al. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *European Journal Of Immunology* . 2008, 38(5), s. 1404-13. ISSN 0014-2980.

108. BURGDORF, S., KURTS, CH. Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Current Opinion in Immunology* . 2008, 20(1), s. 89-95. ISSN 0952-7915.

---

109. FERNANDEZ-MEGIA, E., NOVOA-CARBALLAL, R., QUIÑOÁ, E., RIGUERA, R. Conjugation of bioactive ligands to PEG-grafted chitosan at the distal end of PEG. *Biomacromolecules*. 2007, 8(3), s. 833-42. ISSN 1525-7797.

110. BEKEREDJIAN-DING, I., JEGO, G. Toll-like receptors--sentries in the B-cell response. *Immunology*. 2009, 128(3), s. 311-23. ISSN 1365-2567.

111. HANLON, D., J., ALDO, P., B., DEVINE, L., et al. Enhanced Stimulation of Anti-Ovarian Cancer CD8+ T Cells by Dendritic Cells Loaded with Nanoparticle Encapsulated Tumor Antigen. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2011, 65(6), s. 597-609. ISSN 1046-7408.

112. YAGUCHI, T., SUMIMOTO, H., KUDO-SAITO, C., et al. The mechanisms of cancer immunoescape and development of overcoming strategies. *International Journal Of Hematology*. 2011, 93(3), s. 294-300. ISSN 1865-3774.

113. MOLAVI, O., MAHMUD, A., HAMDY, S., et al. Development of a poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) nanoparticle formulation of STAT3 inhibitor JSI-124: implication for cancer immunotherapy. *Molecular Pharmaceutics*. 2010, 7(2), s. 364-74. ISSN 1543-8392.

114. *Zetasizer Nano Series User Manual, "Size Theory," Chapter 11*, Apr., 2013, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Haydon, UK

115. *Zetasizer Nano Series User Manual, "Zeta Potential Theory," Chapter 13*, Apr., 2013, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Haydon, UK



---

116. Krystalografická společnost: Czech and Slovak Crystallographic Association (CSCA). Zeta potenciál zeta [online]. Praha, 2017. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>