

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra farmaceutické technologie



**PŘÍPRAVA POLYMERNÍCH FARMACEUTICKÝCH
NANOČÁSTIC: OPTIMALIZACE PROCESU**

Diplomová práce

Hradec Králové 2018

Michal Bárta

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

Dne V Hradci Králové

.....

Michal Bárta

Děkuji PharmDr. Ondřeji Holasovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce. Děkuji za cenné rady, připomínky, trpělivost a přátelský přístup a ochotu při pomoci realizovat zadané úkoly. Dále bych chtěl poděkovat za zařazení práce do projektu SVV 260 -401.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické technologie

Školitel: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Posluchač: Michal Bárta

Název diplomové práce: Příprava farmaceutických nanočástic: optimalizace procesu

Farmaceutické, polymerní nanočástice fungují mimo jiné jako nosiče léčiv. Unikátní jsou nejen díky subcelulární velikosti, ale také protože jsou biodegradabilní a biokompatibilní. Výhodou je možnost přípravy selektivních částic, které jsou schopny kontrolovaně a dlouhodobě uvolňovat léčivo. K tvorbě polymerních nanočástic se používají metody přípravy z hotových polymerů nebo polymerací z monomerů. Cílem této práce byla optimalizace procesu tvorby polymerních nanočástic a studování vlivu použitého rozpouštědla. Využívalo se metody odpařování rozpouštědla a nanoprecipitace. Sledovanými parametry byla velikost výsledných částic, jejich polydisperzita a zeta potenciál. Granulometrické a elektrické vlastnosti částic byly měřeny na přístroji Zetasizer ZS 90. Měření dokázalo, že pro přípravu malých nanočástic s nízkou polydisperzitou a dostatečnou stabilitou je vhodnější použít metodu nanoprecipitace. Z výsledků granulometrické analýzy nanočástic připravených metodou odpařování je zjevné, že menší částice poskytují převážně větvené polymery. Jako nejlepší rozpouštědlo se ukázala směs acetonu s ethanolem v poměru 7:3.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Pharmaceutical Technology

Consultant: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Student: Michal Bárta

Title of Thesis: Preparation of pharmaceutical nanoparticles: optimization process

Pharmaceutical, polymer nanoparticles besides others work as well as a drug carriers. Their uniqueness is not only because of their subcellular size, but as well because of the biodegradability and biocompatibility they hold. The benefit of these nanoparticles is the possibility of creation of selective nanoparticles which are able to control long-term release. The formulation of polymer nanoparticles can be reached within methods using preformed polymer or with polymerization of monomers. The main goal of my thesis was to optimize the production process of polymer nanoparticles and the observation of the solvent influences. The methods used for this research were evaporation method and nanoprecipitation. Granulometric and electrical characteristics of particles were measured with Zetasizer ZS 90. Measurements have proved, that it is preferable to use the nanoparticle method for the preparation of the small nanoparticles with low polydispersity and sufficient stability. From the results of the granulometric analysis of nanoparticles made by the evaporation method is clear that the smaller particles provide mainly branched polymers. As the best solvent has shown the mixture of acetone with ethanol in ratio 7:3.

OBSAH

1. ZADÁNÍ PRÁCE.....	1
2. SEZNAM ZKRATEK.....	2
3. ÚVOD.....	3
4. TEORETICKÁ ČÁST.....	4
4.1. Poly(α -hydroxykyseliny).....	4
4.1.1. Biodegradabilita.....	5
4.1.2. Pevné polymerní nanočástice.....	6
4.2. Metody přípravy polymerních nanočástic.....	7
4.2.1. Metody přípravy z hotových polymerů.....	8
4.2.1.1. Odpařování rozpouštědla.....	8
4.2.1.2. Nanoprecipitace.....	9
4.2.1.3. Vysolování.....	10
4.2.1.4. Dialýza.....	11
4.2.1.5. Nadkritické fluidní metody.....	12
4.2.1.5.1. Rapidní expanze superkritického roztoku (RESS).....	12
4.2.1.5.2. Rapidní expanze superkritického roztoku do kapalného rozpouštědla.....	13
4.2.2. Metody přípravy nanočástic polymerací monomerů.....	13
4.2.2.1. Emulzní polymerace.....	14
4.2.2.1.1. Konvenční emulzní polymerace.....	14
4.2.2.1.2. Polymerace bez povrchově aktivních látek.....	14
4.2.2.1.3. Miniemulzní polymerace.....	14
4.2.2.1.4. Mikroemulzní polymerace.....	15
4.2.2.1.5. Mezifázová polymerace.....	16
4.2.2.1.6. Řízená radikálová polymerace(C/LRP).....	16
4.3. Modifikace povrchu nanočástic.....	17
4.3.1. PEGylace.....	17

4.3.2. Poloxamery a poloxaminy.....	18
4.3.3. Chitosan.....	19
4.3.4. Polysorbáty.....	19
4.4. Využití nanočástic v medicíně a farmacii.....	19
4.4.1. Imunitní systém.....	19
4.4.1.1. Vakcinace pomocí PLGA nanočástic.....	19
4.4.1.2. Targeting imunitního systému.....	20
4.4.1.3. Imunoterapie rakoviny.....	21
4.4.2. Léčba rakoviny pomocí PLGA nanočástic.....	22
4.4.2.1. Pasivní targeting.....	22
4.4.2.2. Aktivní targeting.....	22
4.4.2.3. Chemoterapie.....	23
4.4.2.4. Diagnostika a zobrazování rakoviny.....	24
4.4.2.5. Specifické nedostatky nanočástic v léčbě rakoviny.....	25
4.4.3. Léčba zánětu pomocí PLGA nanočástic.....	25
4.4.3.1. Targeting zánětu.....	25
4.4.3.2. Revmatoidní artritida.....	25
5. PRAKTICKÁ ČÁST.....	26
5.1. Použité přístroje.....	26
5.2. Použité chemikálie.....	26
5.3. Pracovní postup.....	27
5.3.1. Příprava vnitřní fáze.....	27
5.3.2. Příprava vnější fáze.....	27
5.3.3. Příprava suspenze nanočástic.....	27
5.3.4. Příprava nanočástic s rhodaminem B.....	28
5.3.5. Kvantifikace enkapsulovaného rhodaminu B.....	29
5.3.6. Měření velikosti a zeta potenciálu částic.....	29
5.3.7. Princip měření velikosti částic.....	30
5.3.8. Princip měření zeta potenciálu.....	31
5.3.9. Použitá rozpouštědla a jejich vlastnosti.....	32

5.4. Složení vzorků.....	34
5.5. Výsledky měření.....	35
6. DISKUZE.....	51
7. ZÁVĚR.....	56
8. SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ.....	57
9. SEZNAM TABULEK.....	59
10. POUŽITÁ LITERATURA.....	60

1. ZADÁNÍ PRÁCE

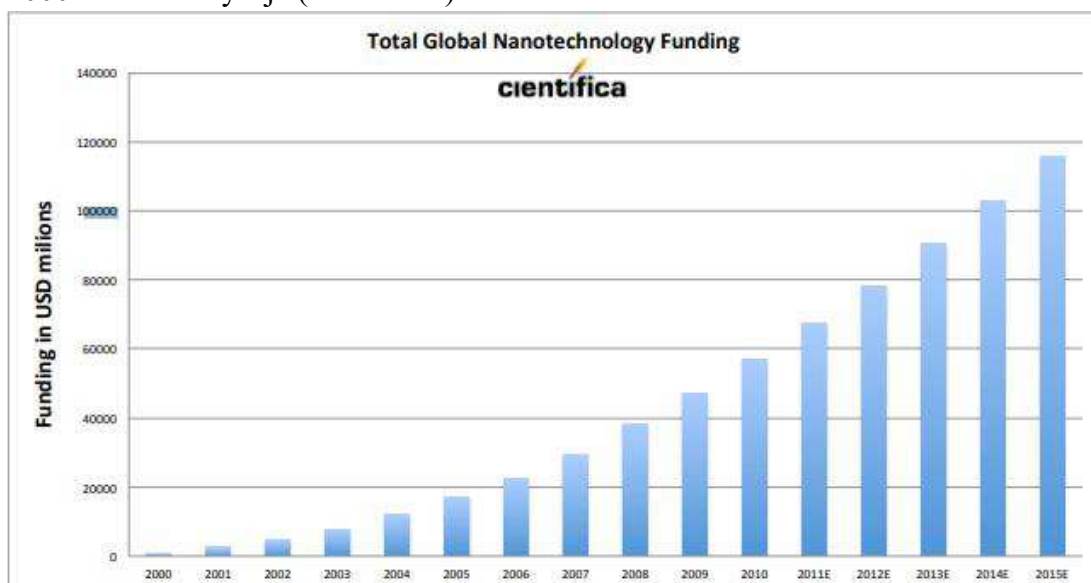
Cílem této práce bylo zjistit vliv použitého organického rozpouštědla na velikost a morfologii vzniklých nanočástic. Jako materiál byly zvoleny kopolymery poly laktid-co-glykolid syntetizovaná na KFT. Rozpouštědla byla zvolena podle své mísitelnosti s vodou na základě použité metody. Použita byla rozpouštědla a jejich směsi, které jsou v literatuře popsána jako vhodná pro tuto aplikaci. V literatuře dosud chybí podobná srovnávací studie studující vliv rozpouštědla podobným způsobem. Cílem bylo nalézt takové nastavení procesu tvorby nanočástic s optimální velikostí (cca 200 nm) a co nejnižší polydisperzitou.

2. SEZNAM ZKRATEK

AC	aceton
ACN	acetonitril
APS	amonium persulfát
CD8 ⁺ , 4 ⁺	klastr diferenciace
CLR	C-typ lektin receptor
C/LRP	řízená/living radikálová polymerace
DB	dendritické buňky
DCM	dichlormethan
DMSO	dimethyl sulfoxid
EMK	ethylmethyl keton
EPR	zvýšená permeabilita a retence
ETAC	ethyl acetát
ETOH	ethanol
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
PDI	polydisperzita
PDLLA	kyselina DL-polymléčná
PEG	polyethylen glykol
PGA	kyselina polyglykolová
PLA	kyselina polymléčná
PLLA	kyselina L-polymléčná
PLGA	kopolymer kyseliny DL-mléčné s kyselinou glykolovou
PNP's	polymerní nanočástice
RES	retikuloendoteliální systém
RESS	rychlá expanze superkritického roztoku
RESOLV	rychlá expanze superkritického roztoku do kapalného rozpouštědla
STAT 3	signální transduktor a aktivátor transkripce 3
TAA	tumor asociované antigeny
TLR	toll-like receptor

3. ÚVOD

Nanotechnologie se zabývá tvorbou a využitím nanomateriálů. Ty mají široké uplatnění v oborech jako je například medicína, farmacie, textilní průmysl, zemědělství, stavebnictví, potravinářství a další. Tato široká paleta možného využití v mnoha odvětvích se odráží na obrovské poptávce po nových objevech. Tento fakt je dobře viditelný na přílivu financí do vývoje nanotechnologií, který se od roku 2000 neustále zvyšuje (viz Obr. 1).



Obr. 1¹ Investice do nanotechnologií mezi lety 2000 až 2015.¹

V posledních několika desetiletích můžeme ve vývoji farmaceutické technologie pozorovat odklon od klasických lékových forem jako jsou tablety, kapsle nebo parenterální roztoky k vývoji násobných forem léčiv jako jsou mikro- a nanočástice.² Je to z důvodu mnoha předností částicových systémů. Jedná se hlavně o možnost cílené distribuce léčiv a jejich řízené uvolňování, dále o zmírnění nežádoucích účinků a tím pádem o zvýšení terapeutické účinnosti léčiv. K léčbě je navíc zapotřebí nižší množství účinné látky.

Z pohledu farmaceutického využití hrají velkou roli polymerní nanočástice (PNP's), které umožňují cílenou distribuci celé řady hydrofilních i lipofilních látek do specifických tkání nebo buněk. Modifikací jejich povrchu lze přesně určit jakou tkáň budou ovlivňovat. Nanočástice tak mohou uskutečnit i prostup hydrofilních léčiv skrz lipofilní membrány. Toho se využívá například v onkologické léčbě.

Enkapsulované látky je použito méně a navíc působí převážně jen v patologické tkáni, což výrazně snižuje dopady na zdravou tkáň. Výhodou pro transport léčiv je nesporně jejich malá velikost, proto se dostanou i na místa kam by se samotné léčivo dostat nemohlo. PNP's jsou určeny pro transport účinných látek při perorálním, parenterálním i lokálním podání.

Nedostatky nanočásticových systémů jsou nízká enkapsulační efektivita pro poměrně velkou část léčiv, nákladnost léčby a fakt, že zatím nejsou dostatečně prozkoumána rizika, které s sebou může tato terapeutická metoda nést. Očekáván je od nich řízený transport cytostatik, specifické doručení antibiotik a antiparazitik, ale například i využití v perorálních transportních systémech pro inzulin, proteiny a geny.² Navíc mohou být dobrým nástrojem pro diagnostiku různých onemocnění.

4. TEORETICKÁ ČÁST

4.1. Poly(α -hydroxykyseliny)

Přírodní polymery, jako jsou například proteiny nebo polysacharidy, jsou v posledních desetiletích využívány k přípravě nanočástic stále méně zejména kvůli jejich čistotě, která se často liší mezi konkrétními substancemi, ale také protože často vyžadují zesítnění, které ovlivňuje enkapsulovanou látku.³ Díky tomu se dnes často používají syntetické lineární polymery odvozené od α -hydroxykyselin jako je PLA (kyselina polylactonová), PGA (kyselina polyglykolová) nebo PLGA (kopolymer kyseliny glykolové a kyseliny mléčné). Tyto látky vynikají svou biokompatibilitou a biodegradabilitou. Navíc velkou výhodou PLGA je možnost ovlivnit rychlost jejich degradace a podobně i rychlost uvolňování potenciálně enkapsulovaného léčiva. To se děje na základě poměru kyselin v kopolymeru. PLA zvyšuje hydrofobní charakter a PGA zvyšuje hydrofilní charakter PLGA.³ Obsahuje-li tedy matrice více PLA než PGA prodlužuje se poločas eliminace polymeru i uvolňování léčiva z něj.

Polykondenzační reakcí α -hydroxykyselin s vícesytnými alkoholy nebo cukry (mannitol, glukosa, pentaerythritol, PVA) je možné získat oligoestery a nízkomolekulární polyestery s větvenými molekulami.⁴ Uplatňují se hlavně větvené polymery s nižší molární hmotností, kvůli jejich kratšímu intervalu

degradace ve fyziologických podmínkách. Syntéza větvených polyesterů probíhá stupňovou kopolymerací kyseliny glykolové a kyseliny DL-mléčné, systém je navíc doplněn o větvicí složku, která může mít různou koncentraci.⁴ Zvolená větvicí látka a její koncentrace má vliv na výsledné větvení a molární hmotnost polyesteru. Molární hmotnost polymeru klesá při vyšší koncentraci větvicí složky.

Kyselina glykolová je jednoduchou α -hydroxykyselinou, která neobsahuje opticky aktivní atom. Ovšem kyselina mléčná obsahuje jedno chirální centrum a rozlišují se u ní produkty polymerace L-mléčné kyseliny (krystalická PLLA), D-mléčné kyseliny (amorfní PDLA) nebo racemátu DL- mléčné kyseliny (PDLLA), který je využíván nejčastěji. PLGA, v poměru kyselin 1:1, je kopolymer, který obsahuje stejné molární množství kyseliny DL-mléčné a glykolové. Může obsahovat jejich monomery, cyklické dimery a v některých případech i lakton kyseliny DL-mléčné.

4.1.1. Biodegradabilita

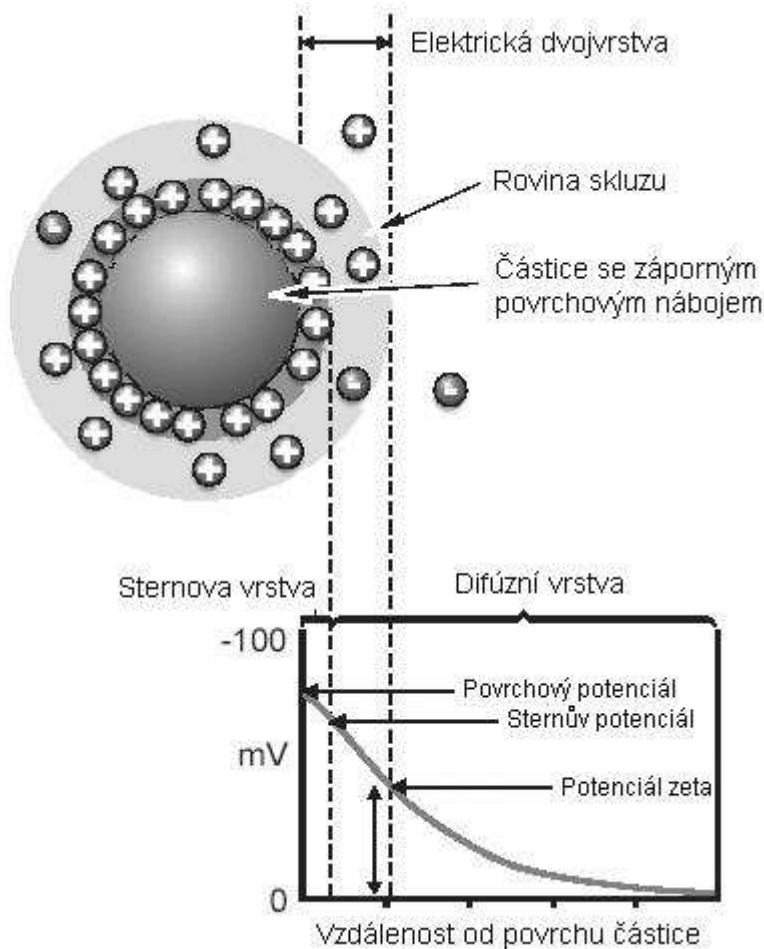
Přítomnost esterových vazeb v polymerech umožňuje jejich biodegradabilitu ve fyziologickém prostředí.⁵ V organismu dochází k postupnému vstupu vody do polymerní matrice. Nastává esterová hydrolýza polymeru a zároveň se snižuje molární hmotnost nanonosiče. Proces se primárně uskutečňuje uvnitř tělesa. Štěpením vznikají oligomery a monomery mléčné a glykolové kyseliny, ty jsou rozpustné ve vodě a migrují směrem k pórům na povrchu a skrz ně do okolního prostředí.⁴ Během degradace dochází k nárůstu počtu karboxylových skupin, což má za následek autokatalýzu esterové hydrolýzy. Odbourávání malých částic může být pomalejší než odbourávání větších těles.⁶ Pokud je rychlost vstupu vody do polymerní matrice stejná nebo vyšší než rychlost difuze oligomerů a monomerů z polymeru, jedná se o homogenní degradaci. O heterogenní rozklad se jedná pokud je vstup vody pomalejší než difuze rozpustných produktů hydrolýzy.⁷ Poslední fází je zpracování monomerů kyselin. Kyselina mléčná vstupuje do citrátového cyklu a tam je rozložena na oxid uhličitý a vodu. Kyselina glykolová je z těla vyloučena v nezměněném stavu nebo minoritně také vstupuje do citrátového cyklu.⁸

Rychlost biodegradace ovlivňuje řada faktorů. Například složení, molekulová hmotnost, polydisperzita, krystalinita nebo stupeň větvení polymeru. Dále hraje roli pH prostředí, okolní teplota atd.

4.1.2. Pevné polymerní nanočástice

Polymerní nanočástice jsou definovány jako pevné koloidní částice o velikosti 10-1000 nanometrů.⁹ Většinou však jde o rozměr 100-500 nanometrů. Velmi často se k jejich vytvoření používají právě poly(α -hydroxykyseliny) a můžeme je dále dělit na nanokapsle a nanosféry. Nanosféry jsou celistvé, matricové částice, zatímco nanokapsle jsou v podstatě rezervoáry, ve kterých jsou uzavřeny látky do dutiny, která je tvořena kapalným jádrem a kolem něj je pevný plášť.¹⁰ Toto jádro může mít charakter hydrofilní nebo lipofilní. Nanosféry fungují jako nosič léčiva tak, že se účinná látka naadsorbuje na jejich povrch nebo je enkapsulována v částici.

Velkou výhodou těchto částic je možnost přípravy PNP's o nejrůznější velikosti. Na tom se podílí celá řada faktorů při jejich přípravě, jako je volba pomocných látek ale samozřejmě i samotná volba metody jejich přípravy. Velmi často se používá metoda odpařování rozpouštědla nebo nanoprecipitace. Tento typ nanočástic navíc vykazuje výhodu například oproti lipozómům v tom, že jsou stabilnější a jsou schopny uvolňovat látky kontrolovaně. Jejich stabilitu vyjadřuje náboj na povrchu částic. Kapalina obklopující částici se dělí na vnitřní Sternovu vrstvu, kde jsou ionty silně vázány k povrchu a vnější difuzní oblast, kde je vazba iontů slabší. V difuzní vrstvě je teoretická hranice tzv. rovina skluzu a potenciál, který se na této hranici nachází se označuje jako zeta potenciál (viz Obr. 2).¹¹ Hladina, která značí, že se jedná o stabilní koloidní systém je ± 30 mV. Pokud mají všechny částice v suspenzi velký záporný nebo kladný zeta potenciál, pak se budou navzájem odpuzovat a nebudou mít tendenci k flokulaci.¹¹



Obr. 2 Schématické znázornění elektrických vrstev částice.¹¹

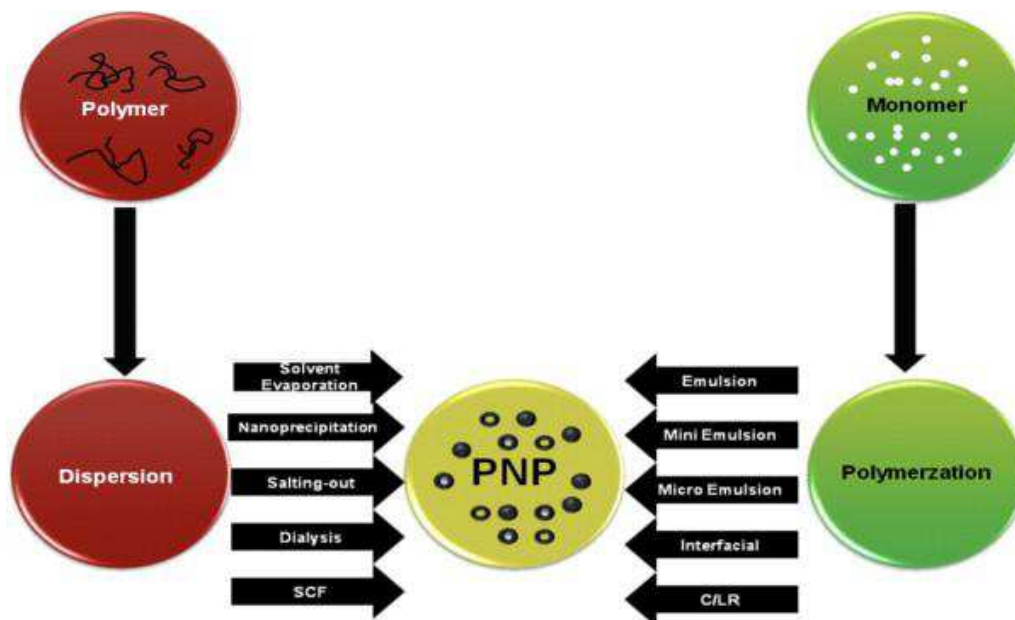
4.2. Metody přípravy polymerních nanočástic

Pro přípravu polymerních nanočástic (PNP's) se používají 2 základní strategie. Tou první je vytvoření disperze pomocí připraveného polymeru (top to bottom). Druhá možnost je využití monomerů a jejich přímá polymerace (bottom to top).¹⁰ Poté je možné zvolit vhodnou techniku pro produkci nanočástic. Výběr metody je závislý na mnoha faktorech jako je například: velikost požadovaných částic, jejich distribuce nebo místo v lidském organismu, kde efekt nanočástic zamýšlíme atd. V medicíně a farmacii se volí metoda i na základě toho, aby produkt neobsahoval rezidua rozpouštědel nebo zbytky surfaktantu.

Na finální vlastnosti nanonosičů má kromě procesních parametrů přípravy nanočástic velký vliv i volba pomocných látek ze skupiny stabilizátorů fázového rozhraní rozpouštědla, nebo zvoleného polymeru či monomeru atd.

- Metody přípravy z hotových polymerů
 - Odpařování rozpouštědla
 - Nanoprecipitace
 - Vysolování
 - Dialýza
 - Nadkritické fluidní metody

- Metody přípravy polymerací monomeru
 - Emulzní polymerace
 - Mezifázová polymerace
 - Řízená radikálová polymerace



Obr. 3 Schématické rozdělení přípravy polymerních nanočástic.¹⁰

4.2.1. Metody přípravy z hotových polymerů

Jak je zobrazeno na Obr. 3, z preformovaných polymerů vzniká nejdříve disperze a různými technikami jsou následně utvořeny pevné polymerní nanočástice.

4.2.1.1. Odpařování rozpouštědla

Odpařování rozpouštědla bylo první vyvinutou metodou pro přípravu PNP's z předpřipravených polymerů.¹² Dodnes je nejpoužívanější metodou. V minulosti se využívala zejména chlorovaná rozpouštědla a to hlavně DCM (dichlormethan)

a chloroform. Ty však mají nevyhovující toxikologický profil, proto byly nahrazeny bezpečnějšími látkami jako je ETAC (ethyl acetát). Principem této metody je vznik emulze a následně její převedení na suspenzi nanočástic. Děje se tak vlivem odpařování těkavého rozpouštědla a vznikem nanočástic ve vnější vodné fázi.¹³ Jedná se tedy nejčastěji o jednoduché emulze typu o/v nebo dvojité emulze typu v/o/v. Olejovou fází tvoří polymer v rozpouštědle nemísitelném s vodou a vodná fáze je roztokem surfaktantu ve vodě. Tyto metody využívají vysokorychlostní homogenizaci nebo homogenizaci ultrazvukem pro tvorbu emulze. Roztok polymeru je tak ve formě nanokapeček dispergován do vodné složky emulze. Poté dochází za stálého míchání na magnetické míchačce k odpaření rozpouštědla. K tomu dochází za laboratorní teploty, nebo se proces odpaření dá urychlit zvýšením teploty a snížením tlaku. Odpařování rozpouštědla vede k formulaci nanočástic v suspenzi. Jakmile je všechno organické rozpouštědlo odpařeno, je produkt v několika cyklech centrifugován, supernatant je odpipetován a objem je doplněn čištěnou vodou na původní hodnotu.¹⁰ Poté se produkt lyofilizuje. Mnohé pokusy dokázaly, že na výsledné velikosti částic se podílí volba kopolymeru či polymeru, použité rozpouštědlo, stabilizátor a zvolená koncentrace těchto složek. Z výsledků studií je patrné, že hraje vliv i to, zda využijeme jednoduché nebo dvojité emulze. Zanedbatelný faktor není ani molekulová hmotnost polymeru.¹⁰ Metoda odpařování rozpouštědla je celkem jednoduchou metodou přípravy nanočástic ale je také náročná na čas. Nevýhodou je také to, že během odpařování se může vyskytnout v suspenzi koalescence a ovlivnit tak finální velikost částic a jejich morfologii.

4.2.1.2. Nanoprecipitace

Další metodou je nanoprecipitace, která je někdy také nazývána metodou vytlačování rozpouštědla. Základní princip spočívá v mezifázové separaci polymeru po vytlačení semipolárního rozpouštědla, které je mísitelné s vodou z lipofilního roztoku. Následuje rychlá difúze rozpouštědla do nerozpustné fáze, což vede ke snížení mezifázového napětí mezi dvěma kapalinami a následně ke zvýšení plochy povrchu. Vytvoří se malé kapičky organického rozpouštědla.¹⁴ Vlivem pozvolného vytékání tohoto rozpouštědla dochází k formulaci nanočástic ve vodném prostředí.

Celý nanoprecipitační systém je tvořen třemi hlavními komponenty: polymerem, který může být syntetický, polosyntetický nebo přírodního původu,

rozpouštědlem, které je mísitelné s vodou a navíc dobře odpařitelné a fází ve které polymer není rozpustný - tou je většinou voda. Často používané polymery jsou PLA, PLGA, PCA (polykryanoakrylát), PACA (polyalkylkryanoakrylát) nebo přírodní látky, jako je škrob či estery dextranu. Jak bylo uvedeno výše, rozpouštědlo se volí tak, aby bylo mísitelné s vodou a dobře odpařitelné, proto na tomto poli hraje největší roli aceton, ethanol, hexan, dioxan aj., popřípadě jejich binární směsi. Třetí část systému tvoří takzvané nerozpouštědlo nebo kombinace nerozpouštědel. Většinou obsahuje vodu a jednu či více povrchově aktivních látek. Ačkoliv u nanoprecipitace stabilizátor není přímo zapotřebí pro formulaci PNP's, bylo zjištěno, že svou povahou a koncentrací ovlivňuje velikost částic.¹⁵ Navíc přídavek surfaktantu pomáhá ochránit suspenzi nanočástic před aglomerací při dlouhodobém skladování.¹⁴

Nanočástice jsou při této metodě připravovány pomalým přidáváním organické fáze do vodné fáze za stálého míchání na magnetické míchače. Výhodou je, že tento krok se dá uskutečnit i opačně, což znamená, že i po přidání vodné fáze do organické dochází k formulaci PNP's. Velkou roli hraje zvolená metoda mísení, rychlost míchání a rychlost jakou je přidávána organická fáze do té vodné. Tyto aspekty ovlivňují fyzikálně-chemické vlastnosti částic. Charakteristiku PNP's také samozřejmě ovlivní koncentrace zvolených komponent.¹⁶ Celý proces nanoprecipitace se dá shrnout do tří fází. Tou první je nukleace neboli tvorba jader, na ní navazuje růst částic a agregace. Rychlost každého kroku určuje velikost nanočástic.¹⁷

Tato metoda produkuje částice s velmi dobře definovanou velikostí. Jedná se o techniku, která je celkem jednoduchá, časově nenáročná a slouží zejména k přípravě nanosfér.

4.2.1.3. Vysolování

Tato metoda nevyžaduje přídavek tenzidu ani chlorovaných rozpouštědel, které mají nevyhovující toxikologický profil. To je nespornou výhodou například oproti odpařování rozpouštědla.

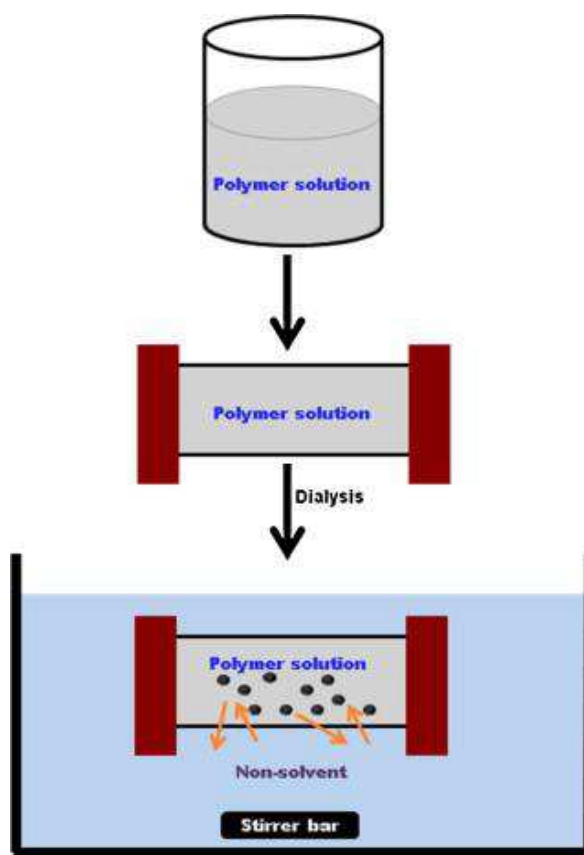
Emulze je tvořena pomocí rozpouštědla, které je dobře mísitelné s vodou, jako je tomu u nanoprecipitace. Soustava je tvořena vhodným polymerem jako je např. PLGA, PDLLA, PTMC (polytrimethylen karbonát) rozpuštěném v rozpouštědle mísitelném s vodou a vodným roztokem soli nebo sacharózy, která

má silný vysolovací potenciál.¹⁰ Vhodnými elektrolyty jsou například: hexahydrát chloridu hořečnatého, chlorid vápenatý nebo tetrahydrát magnesiumu acetátu. Mísitelnost vody s organickým rozpouštědlem je snížena právě přidáním těchto elektrolytů.¹³ Zpětným vysolovacím efektem dosaženým zředěním emulze nadbytkem vody dojde k vysrážení polymeru rozpuštěného v kapičkách emulze. Ve skutečnosti na základě zředění nastává migrace rozpouštědla polymeru z kapiček emulze, která je vyvolána snížením koncentrace soli nebo sacharózy ve vnější fázi emulze.¹⁸ Tímto způsobem lze očekávat formulaci nanosfér.

4.2.1.4. Dialýza

Tato metoda je jednoduchá a velmi efektivní v přípravě malých nanočástic.¹⁴ Polymer je rozpuštěn v organickém rozpouštědle DMF (dimethylformamid), DMSO (dimethyl sulfoxid) aj. a vložen do dialyzační trubice. Uvnitř dialyzační membrány je nahrazeno rozpouštědlo roztokem, ve kterém polymer není rozpustný, což je následováno progresivní agregací polymeru a vytvořením homogenní suspenze PNP's. V současnosti však celý tento proces formulace nanočástic není zcela pochopen. Předpokládá se však, že mechanismus je podobný nanoprecipitaci popsané Fessim a kolektivem.¹⁴

Popsán byl i způsob přípravy založený na osmóze.¹⁹ Principem je využití speciální dialyzační membrány nebo jednoduché semipermeabilní membrány, která umožňuje pasivní transport rozpouštědla za účelem zpomalení mísení polymerního roztoku s nerozpouštědlem. Schématicky je tato metoda zobrazena na obr. 4.



Obr. 4 Schématické zobrazení dialyzační metody založené na osmóze.¹⁰

4.2.1.5. Nadkritické fluidní metody

Ostatní metody zahrnují využití organického rozpouštědla. Proto byly vědci vyvinuty tyto metody, které jsou o mnoho šetrnější pro životní prostředí. Superkritické kapaliny jsou velmi perspektivní k přípravě čistých nanočástic bez nutnosti použití neekologického a často i toxického rozpouštědla.²⁰ Obecně superkritické kapaliny mají hustotu blízkou kapalinám a viskozitu podobnou plynům. Prozatím byly popsány dvě metody.

4.2.1.5.1. Rychlá expanze superkritického roztoku (RESS)

Zde je polymer rozpuštěn v superkritické tekutině a vzniká roztok. Nasycený roztok je vystaven rychlému snížení tlaku a expanzi. Rychlá expanze roztoku proběhne skrz kapiláru do okolního vzduchu. To vede k nukleaci dobře dispergovaných částic.¹⁰ Touto metodou vznikají jak nanočástice, tak i mikročástice.

Takto připravil nanočástice PSFTE v roztoku CO₂ například Chernyak a kolektiv.²¹ Ti připravili roztok polymeru při laboratorní teplotě, ale za velmi vysokého tlaku. CO₂ bylo zaváděno do PSFTE (poly(perfluoropolyether) diamid) injekční pumpou, poté byl roztok zahříván v předexpanzní jednotce. Částice pak byly rozprášeny vlivem rychlé expanze roztoku kapilárou na skličko. Koncentrace, stupeň nasycení polymeru a molekulová hmotnost má samozřejmě obrovský vliv na velikost a tvar částic.¹⁰ Nevýhodou metody RESS je velikost vznikajících částic. Ty mají spíše rozměry v řádu milimetrů než v nanometrech, tento nedostatek řeší metoda RESOLV.

4.2.1.5.2. Rapidní expanze superkritického roztoku do kapalného rozpouštědla

Rozdíl od předešlé popisované metody je v tom, že zde superkritický roztok tryská kapilárou do kapalného rozpouštědla. To má za následek potlačení růstu částic a vznikají tak spíše PNP's.¹⁰ Takto se dají připravit nanočástice PHDFDA (poly(heptadekafluorodecyl) akrylát) v roztoku CO₂. Ty byly rozptýleny do vody, která měla laboratorní teplotu. Částice ve vodě precipitovaly, ovšem samotná voda se později ukázala jako méně vhodná, protože PNP's se vlivem agregace časem zvětšily. Proto se voda nahradila vodným roztokem NaCl. V tomto roztoku se suspenze stala mnohem stabilnější.²² S výhodou se u této metody využívá také kosolventu, který zvyšuje rozpustnost polymeru v superkritickém CO₂.

Navzdory tomu, že existuje celá řada superkritických kapalin (voda, n-pentan, CO₂, amoniak aj.), většina polymerů je v těchto látkách obtížně rozpustná, nebo zcela nerozpustná.²³

4.2.2. Metody přípravy nanočástic polymerací monomerů

Dosáhnout požadovaných vlastností nanočástic vyžaduje mimo jiné i ideální složení polymeru. Toho lze dosáhnout polymerací monomerů. Podle použití povrchově aktivních látek může být klasifikována jako konvenční polymerace a polymerace bez povrchově aktivních látek.²⁴

4.2.2.1. Emulzní polymerace

4.2.2.1.1. Konvenční emulzní polymerace

Jedná se o nejpoužívanější emulzní polymerační metodu. Pro uskutečnění je zapotřebí voda, monomer, který je ve vodě špatně rozpustný, surfaktant a iniciátor. Iniciátor je naopak ve vodě rozpustný. Zahájení polymerace nastává srážkou iniciátoru a monomeru, který je již ve vodě rozpuštěn. Iniciátorem je volný radikál nebo ion. Nejčastěji používaným iniciátorem je APS (amonium persulfát) nebo KPS (persulfát draselný).¹⁰ Další možností je vytvoření zahajujícího monomeru pomocí vysokoenergetického záření. Tím může být γ -záření, UV záření nebo silné viditelné světlo.¹⁰ Oddělení fází a vznik částic probíhá před nebo po ukončení polymerační reakce. Průměr nanočástic závisí na typu použitého tenzidu.^[21] Touto metodou vznikají PNP's o velikosti 100 nm. Nevýhodou je zde však fakt, že finální produkt musí být zbaven reziduí povrchově aktivních látek. Toho se dá často dosáhnout jen velmi obtížně.²⁵ Proto se jeví jako lepší možnost použít metodu emulzní polymerace bez použití tenzidu.

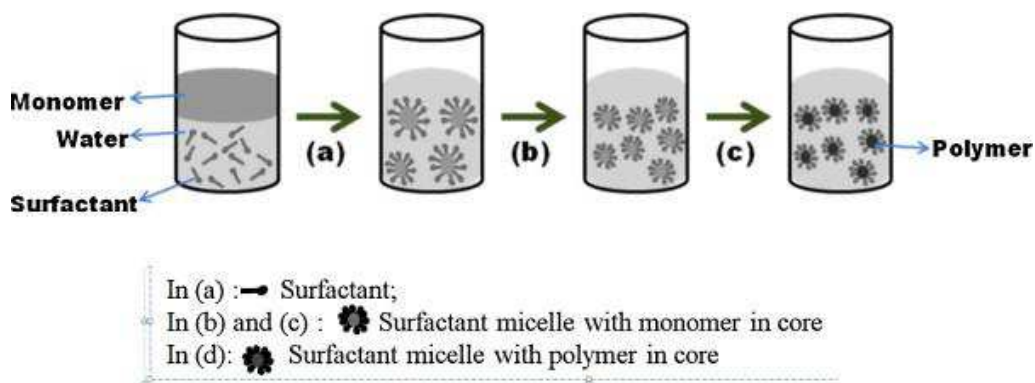
4.2.2.1.2. Polymerace bez povrchově aktivních látek

Suroviny potřebné pro uskutečnění této polymerace jsou deionizovaná voda, iniciátor rozpustný ve vodě a samozřejmě monomery (nejčastěji vinylové nebo akrylové). Ke stabilizaci částic zde dochází pomocí ionizovatelných iniciátorů nebo iontových ko-monomerů. Nukleace a růst částic je popsána více mechanismy. Pro příklad se jedná o micelární nukleaci²⁶ nebo homogenní nukleaci. Rozdílem mezi těmito mechanismy je rozpustnost monomeru ve vodě.²⁷ Na velikost částic má vliv koncentrace monomeru. Tato metoda se dá považovat za ekologicky výhodnou právě kvůli absenci surfaktantu.

4.2.2.1.3. Miniemulzní polymerace

Zde se polymerační systém skládá z vody, iniciátoru, monomerní směsi, ko-stabilizátoru a surfaktantu. Klíčový rozdíl mezi emulzní a miniemulzní polymerací je ve využití nízkomolekulárních sloučenin, ko-stabilizátoru a také ve využití vysokoenergetických zařízení (ultrazvuk atd.).²⁴ Mini emulze vyžadují velkou energii k dosažení ustáleného stavu. Jejich povrchové napětí je vždy více než nula.

Na povahu a vlastnosti nanočástic mají převládající vliv zvolené iniciátory a ko-stabilizátory a jejich koncentrace v soustavě. Za použití ve vodě rozpustného iniciátoru APS vznikají mikročástice, ale za použití lipofilních radikálních iniciátorů, jako je azo-bis-isobutyronitril, byly připraveny výrazně menší částice o průměru 80-150 nm.²⁸ Na tomto příkladu je patrné, jak obrovský význam má výběr iniciátoru. Průběh této metody shrnuje obr. 5.



Obr. 5 Schématické zobrazení procesu miniemulzní polymerace (a) preemulzifikace, (b) vysokoenergetická emulzifikace, (c) polymerace.¹⁰

4.2.2.1.4. Mikroemulzní polymerace

Tato metoda se na první pohled jeví velmi podobná metodě jednoduché emulze. Obě tyto techniky ve výsledku produkují koloidní polymerní nanočástice s vysokou molekulovou hmotností, rozdíl je ovšem v kinetice těchto reakcí. Klasická emulzní polymerace se skládá ze tří intervalů reakční rychlosti, zatímco mikroemulzní metoda má pouze dva intervaly. Navíc velikost PNP's a průměrný počet řetězců v částici je u mikroemulzní metody značně menší.¹⁰

Iniciátor, který je ve vodě rozpustný, je přidáván do vodné fáze termodynamicky stálé mikroemulze. Ta obsahuje nabobtnalé micely. Tato metoda je závislá na velkém přídavku povrchově aktivních látek.

Polymerace tedy začne spontánně z termodynamicky stabilní emulze. Díky surfaktantu se mezifázové napětí v systému o/v přibližuje k nule. Částice jsou v podstatě úplně pokryty surfaktantem. Zpočátku jsou polymerní řetězce formovány jen v menším množství kapének. Později vlivem osmotického a elastického tlaku dojde k destabilizaci mikroemulze. To má za následek zvětšení částic, tvorbu prázdných micel a sekundární nukleaci nanočástic.²⁹

Kinetiku reakce a velikost výsledných částic ovlivňuje řada faktorů: typ iniciátoru, koncentrace tenzidu, zvolený monomer a reakční teplota.

4.2.2.1.5. Mezifázová polymerace

Tato metoda závisí na polymeraci dvou reaktivních monomerů nebo látek, z nichž každý je rozpuštěný v jedné fázi (kontinuální nebo diskontinuální). Reakce se odehrává na rozhraní dvou kapalin.³⁰ Vznikají duté nanočástice, a to díky mezifázovým polymerním reakcím, jako je polyadice, polykondenzace nebo radikálová polymerace.¹⁰ Polymeraci monomerů na rozhraní mikroemulze olej/voda byly připraveny nanokapsle obsahující olej.³¹ Organické rozpouštědlo, které je plně mísitelné s vodou, funguje jako nosič monomeru a mezifázová polymerace pak probíhá na povrchu olejových kapiček, které se utvořily během emulgate. Polymer se tedy hromadí na rozhraní fází a precipitací dochází k formulaci nanokapsul.

Pro přípravu nanotobolek je doporučeno použití spíše aprotických rozpouštědel jako je aceton nebo acetonitril. Na druhou stranu pokud je cílem vytvořit spíše nanosféry, je vhodné zvolit protická rozpouštědla. Tedy ethanol, isopropanol apod.³²

Alternativním způsobem je použití membránového reaktoru.³³ Pomocí něj můžeme dosáhnout kontrolovaného přídavku organické fáze do vodné, a to tak, že do proudu kontinuální fáze je pod tlakem membránou dávkována dispergovaná fáze.¹⁰ Výběrem membrány a jejími parametry navíc můžeme ovlivnit výslednou velikost částic. Tato metoda je však finančně velice náročná.

4.2.2.1.6. Řízená radikálová polymerace(C/LRP)

Podnětem pro vznik této metody byla snaha o snížení nežádoucích dopadů na životní prostředí. S tím jsme se již setkali i při snaze využívat enviromentálně bezpečných rozpouštědel jako je voda nebo superkritický CO₂. Radikálová polymerace je široce využívána hlavně při emulzní polymeraci. Primárním cílem byla kontrola vlastností polymeru jako je molární hmotnost, funkce a morfologie částic.

C/LRP můžeme rozdělit do tří základních využívaných technik: NMP (nitroxidem zprostředkovaná polymerace), ATRP (Radikálová polymerace pomocí

přenosu atomu) a RAFT (polymerace přenosem skupin).¹⁰ Společným problémem všech tří technik je vysoká koncentrace zbytků kontrolní látky v produktu. Odstranit kontrolní látku z vodné disperze je totiž těžší než ji odstranit z homogenního roztoku. Zbytky kontrolní látky mohou mít dopad na samotnou stabilitu, barvu nebo pach.

Velikost nanočástic ovlivňuje hlavně povaha a koncentrace kontrolního agens, iniciátor, emulzní typ a monomer.¹⁰

4.3. Modifikace povrchu nanočástic

Před tím než se rozhodneme, jakou metodu využijeme pro syntézu nanočástic, musíme vzít v úvahu povahu léčiva, které má být částicemi nesené. Zvážit je také nutné dobu, která je požadována pro to, aby se léčivo dostalo na zamýšlené místo. Tyto atributy ovlivní to, jak připravíme nanočástice.

V podstatě se dá říct, že naše tělo rozpoznává hydrofobní nanočástice jako cizorodé a buňky našeho retikuloendoteliálního systému je rychle fagocytují. Při intravenózním podání hydrofobních nanočástic jsou tedy rychle pozřeny makrofágy a končí v játrech nebo ve slezině.³ Pokud tedy nechceme přímo ovlivnit jaterní tkáň nebo slezinu, je vhodné upravit povrch částic. Cílem je tedy “schovat” částici před RES. Povrch se tak zdá jako hydrofilní a není makrofágy rozpoznán. Lipofilní molekuly totiž bývají ve fyziologickém prostředí, které je hydrofilní, často považovány za antigen.

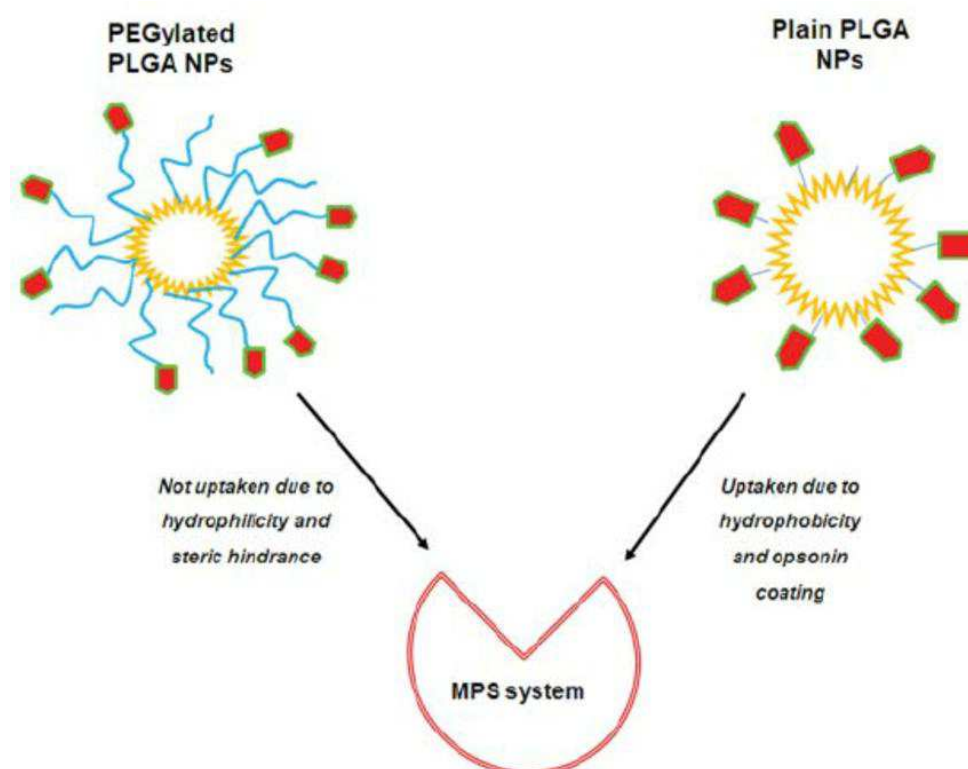
4.3.1. PEGylace

PEGylace je v současnosti nejčastěji používanou metodou. PEG je hydrofilní, neionický a biokompatibilní polymer. Může se k nanočásticím vázat mnoha způsoby: kovalentní vazbou, jako součást reakční směsi během přípravy PNP's, nebo se na povrch adsorbuje.³ Obalením povrchu se výrazně zvýší doba, po kterou jsou nanočástice schopné cirkulovat v krevním řečišti. Navíc řetězce PEGu snižují schopnost enzymů a proteinů vázat se na povrch částic, což značně prodlužuje biodegradaci nanonosičů. Stupeň adsorbce proteinů se dá minimalizovat zvýšením hustoty a molekulové hmotnosti PEGu na povrchu částic.³⁴

Leroux et al.³⁵ Prokázali, že vyšší molekulová hmotnost PEG výrazně snížila interakce částic a RES (Obr. 6). To zaručilo delší systémovou cirkulaci PLGA-PEG.

Li et al.³⁶ dokázali prodloužit poločas eliminace hovězího sérového albuminu (BSA) na myším modelu z třinácti a půl minuty na čtyři a půl hodiny, a to právě enkapsulací BSA do PLGA nanočástic, jejichž povrch byl modifikován molekulami PEG.

Další výhodou je, že po perorálním podání se usnadňuje průchod částic Peyerovými pláty do lymfatického systému.³⁷ Navíc proběhl i experiment, který simuloval chování PLA nanočástic v žaludečním prostředí. Z výsledků vyplývá, že po čtyřech hodinách se rozložilo na laktát o dvě třetiny méně nanočástic, které byly PEGylovány.³⁸



Obr. 6 Zobrazení rozdílu přístupu buněk RES k modifikované a nemodifikované nanočástici.³⁹

4.3.2. Poloxamery a poloxaminy

Tyto látky se také osvědčily jako vhodná modifikace povrchu. Obdobně snížily aktivitu makrofágů vzhledem k hydrofobním nanočásticím.

Navíc bylo dokázáno, že pokud byly PLGA částice obaleny poloxamerem 407 a poloxaminem 908, poločas eliminace některých léčivých nebo diagnostických látek se mnohokrát zvýšil. Pokus byl proveden s bengálskou červení. Pokud

je do krevního řečiště aplikována samotná červeň, zbyde jí po pěti minutách asi 8%. Naopak naměřené hodnoty u PLGA modifikovaných nosičů se pohybovaly kolem 30% po jedné hodině.⁴⁰

4.3.3. Chitosan

Modifikace PLGA chitosanem zvýšilo průnik těchto nanočástic sliznicemi.⁴¹ Chitosan zlepšil průchod nosní a intestinální sliznicí. Navíc CS zvyšuje pozitivní zeta potenciál částic. Toho bylo využito při enkapsulaci toxoidu tetanu, která se právě díky tomu signifikantně zvýšila. Toxoid byl navíc radioaktivně značen pomocí jodu ¹²⁵I a následným měřením bylo prokázáno, že přítomnost ¹²⁵I v lymfatických uzlinách je o mnoho vyšší právě když využijeme CS.³⁷ Z toho plyne, že tato modifikace může mít do budoucna obrovský potenciál při moderní vakcinaci.

4.3.4. Polysorbáty

Kreuter et al.⁴² dokázali doručit několik látek přes hematoencefalickou bariéru za použití nanočástic poly-butylyano akrylátu obalených polysorbátem 80. Má se za to, že po podání takto upravených PNP's se na polysorbát adsorboval apolipoprotein E. Takto upravený povrch molekul v podstatě napodobil v těle LDL a částice tak mohly skrz bariéru projít pomocí receptoru pro LDL.

4.4. Využití nanočástic v medicíně a farmacii

Velký přínos nanočástic jako nosičů léčivých, diagnostických nebo vakcinačních látek je v posledních letech velmi populární oblastí vědy. Výzkum se soustředí hlavně na cílenou léčbu nemocí, která by měla snížit rizika nežádoucích účinků léčiv.

4.4.1. Imunitní systém

Nanočástice mohou do budoucna představovat obrovský přínos i v imunologii.

4.4.1.1. Vakcinace pomocí PLGA nanočástic

Studie ukazují, že nanonosiče mohou usnadnit antigen prezentujícím buňkám příjem antigenů a adjuvancií.⁴³ Adjuvans je látka nebo celá bakterie, která zesiluje

imunitní reakci na podaný antigen. PLGA nanočástice poskytují v tomto oboru mnoho výhod.

Do PNP's již bylo úspěšně zavedeno mnoho antigenů jako například: proteiny, peptidy, lipopeptidy, buněčné lyzáty, plasmidy aj.⁴⁴ Při očkování může prodloužené uvolňování enkapsulovaného antigenu přinést lepší imunitní odpověď, a také snížit riziko imunitní tolerance.⁴⁵ Velkou výhodou je i to, že částice může obsahovat kombinaci antigenů nebo kombinaci antigenu a adjuvans. Navíc nanočástice obsahují jen velmi malé množství těchto látek, a i tak jsou schopny vyvolat silnou reakci T lymfocytů.⁴⁶ Použití co nejmenšího množství obou látek snižuje riziko vedlejších účinků, které jsou často způsobeny právě vysokým přídávkem adjuvancií.

Prezentace antigenu přes hlavní histokompatibilní řetězec I je nesmírně důležitá pro kontrolu infekčních nemocí nebo potenciálně vznikajících nádorů. Je to totiž cesta ke stimulaci cytotoxických CD8⁺ T lymfocytů.

4.4.1.2. Targeting imunitního systému

Funkcionalizace nanočástic pomocí ligandů namířených proti povrchovým receptorům buněk umožňuje targeting imunitního systému.⁴⁷ Jako cílicí ligandy mohou být použity peptidy, bílkoviny, protilátky, polysacharidy nebo lektiny.⁴⁸ Pozření nanočástic antigen prezentujícími buňkami závisí na několika faktorech, jako je velikost, tvar, povrchový náboj a hydrofilní nebo hydrofobní charakter.⁴⁹ Tyto vlastnosti lze modifikovat už přípravou PLGA nanočástic. Asi nejdůležitějším atributem je velikost částic. Ideální rozměr nanočástic je stále předmětem výzkumu, ovšem víme, že antigen prezentující buňky se vyvinuly tak, aby bojovaly především proti virům (20-100 nm) a bakteriím, popřípadě i buňkám (rozměr v mikrometrech).⁵⁰

Ačkoliv periferní dendritické buňky (DB) mohou pohltnout nanočástice už v pokožce nebo škáře, zdá se výhodnější aplikovat je přímo do lymfatických uzlin, kde je většina dendritických buněk nezralých a reagují na tento signál plným vyvinutím. Pokud však cílíme rovnou na uzliny, musíme zvážit velikost částic. Výchozí lymfatické cévy mají průměr okolo 10-60 μm , kdežto sinusoidy ve slezině dosahují průměru 150 nm až 200 nm.⁵¹ Z toho plyne, že částice menší než 200 nm se mohou dostat přímo do lymfatických orgánů, zatímco větší vyžadují APB a na to, aby dorazily do uzlin potřebují okolo 24 hodin.⁵²

Antigen prezentující buňky mají na svém povrchu celou řadu receptorů. Jedná se o tzv. PRR (pattern recognition receptory), které se zapojují do zahájení, podpory i provedení celé řady imunitních procesů. Jedná se zejména o TLR (Toll-like receptory), NOD-like receptory, scavenger receptory a CLR (C-type lectin receptory). Tyto receptory dokážou rozeznat mnohé struktury na povrchu patogenu. Rozeznávají tzv. PAMP (pathogen associated molecular patterns).⁵³

Jak se ukázalo, tak přímá stimulace pomocí agonisty TLR na CD4⁺ a CD8⁺ lymfocytech T a na lymfocytech B výrazně zesiluje proliferaci těchto imunitních buněk.⁵⁴ Použití TLR agonisty jako adjuvans spolu s vakcínou se tedy jeví jako velmi zajímavá myšlenka do budoucna.

4.4.1.3. Imunoterapie rakoviny

PLGA nanočástice byly již dříve testovány jako nosiče protinádorových vakcín enkapsulací tzv. tumor asociovaných antigenů (TAA).⁵⁵ Dokonce i v kombinaci s TLR ligandy jako adjuvans.⁵⁶ Tato strategie vyvolala o mnoho silnější imunitní odpověď než podání samotného TAA, které nebylo enkapsulováno do nanonosičů.

Jeden z největších nedostatků imunoterapie rakoviny je fakt, že v prostředí tumoru je imunita značně oslabená.⁵⁷ Proto jsou vyvíjeny stále nové terapeutické strategie, které mají za úkol obnovit obranyschopnost u pacientů s rakovinou.

Jedním z možných řešení se zdá být inhibice „signálního transduktoru a aktivátoru transkripce 3“ (STAT3). Tato látka je v nádorových buňkách neustále produkována a brání tak DB zasáhnout. DB jsou díky ní vůči tumoru téměř netečné. Proto byla do PLGA nanočástic enkapsulována látka JSI-124, která funguje jako STAT3 inhibitor⁵⁸ Později i s TLR ligandem.

Budoucích řešení se však nabízí více.⁴⁴

- Zjednodušení vstřebání nanočástic dendritickými buňkami použitím ligandů cílených na PRR. Například na CLR.
- Plná aktivace dendritických buněk použitím TLR ligandů.
- Použití STAT3 inhibitoru.
- Využití TAA, ty jsou čteně zastoupeny v nádorech a dostatečně rozpoznány lymfocyty T.

4.4.2. Léčba rakoviny pomocí PLGA nanočástic

Chemoterapeutika napadají i zdravé tkáně. To vede k systematické toxicitě a velkému množství nežádoucích účinků, což značně limituje maximální pacientem tolerovanou dávku, a tím pádem se snižuje terapeutická účinnost těchto léčiv. Proto se do budoucna upírá velká pozornost na nanočástice, ty mohou ovlivnit tumor buď pasivním nebo aktivním targetingem (Obr. 7).⁴⁴

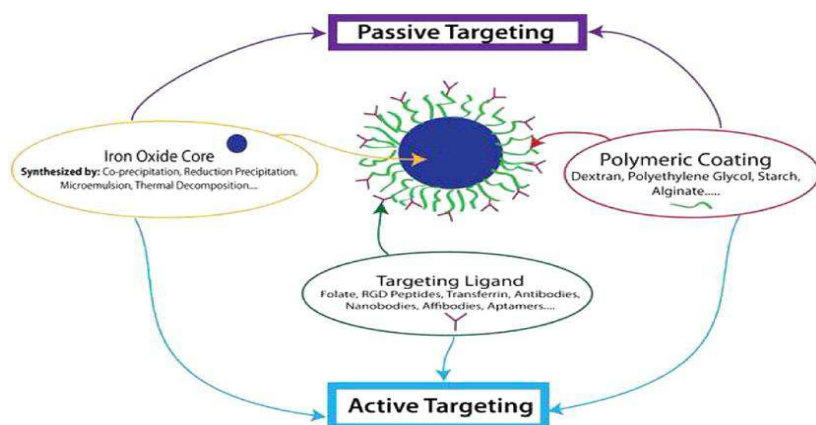
4.4.2.1. Pasivní targeting

Zde je velkou výhodou nanočástic jejich velikost, díky které mohou lépe prostupovat do nádoru. Částice navíc mohou využít unikátní anatomické abnormality nádorového cévního systému. To jim dává možnost akumulace v intersticiu tumoru. V nádorech navíc nejsou lymfatické cévy nebo jsou neefektivní. Je tedy velmi nepravděpodobný odvod látek z této patologické tkáně. Tento fakt vede k retenci nanočástic.

Dohromady jsou oba dva fenomény známy jako EPR efekt (enhanced permeability and retention effect).⁵⁹

4.4.2.2. Aktivní targeting

Povrch nanočástic je obohacen o specifické ligandy.⁶⁰ Ty jsou zvoleny tak, aby cílily na receptory, které jsou exprimovány nádorovými buňkami nebo vaskulaturou tumoru. Nanočástice tedy zasahují rakovinné buňky nebo endotel nádorových cév. Buněčné receptory, na které se dají ligandy zaměřit jsou například: transferinový receptor, folátový receptor, receptor pro epidermální růstový faktor nebo integriny. Pokud chceme ovlivnit endotel cév, můžeme cílit například na receptory VEGFR-1, VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptors) nebo na VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1).⁴⁴ Zničením endotelu cév můžeme dosáhnout usmrcení buněk nádoru vlivem nedostatku živin a kyslíku.⁶⁰



Obr. 7 Schématické zobrazení modifikované funkcionalizované nanočástice.⁶¹

4.4.2.3. Chemoterapie

Do dnešního dne již byla zkoušena enkapsulace mnoha chemoterapeutik. Důvodů pro využití nanonosičů je mnoho. Omezení nežádoucích účinků, zlepšení terapeutického efektu, možnost prodloužení účinku, targeting aj.

Doxorubicin je anthracyklin, který se užívá v terapii už dlouhý čas. Nicméně má celkem závažné nežádoucí účinky, zejména na srdce. Enkapsulací této látky do PLGA nanočástic, které byly pegylovány, došlo k drastickému snížení kardiomyopatií ve srovnání s lypozomálním doxorubicinem.⁶²

Terapie nádorů mozku, např. glioblastomu, je v současnosti hodně neefektivní. Je to dáno zejména neprostupností většiny chemoterapeutik přes hematoencefalickou bariéru. Pokus o řešení tohoto problému proběhl zatím jen na modelu krysího mozku. Nicméně PLGA nanočástice s doxorubicinem byly modifikovány na povrchu poloxamerem 188 a tyto částice prošly přes bariéru až do mozku a navíc efektivně snížily růst nádoru.⁶³

Paklitaxel je rostlinný alkaloid ze skupiny taxanů, který působí jako mitotický jed. Jeho nevýhodou je nízký terapeutický index, velmi nízká rozpustnost ve vodě a z mechanismu účinku vycházející závažné nežádoucí účinky. Enkapsulace do PLGA nanočástic silně zvyšuje toxický efekt na rakovinné buňky oproti registrovanému přípravku Taxol.⁶⁴ Navíc obrovskou výhodou těchto částic je možnost opatřit jejich povrch ligandy, které přímo cílí na patologickou tkáň.

Další látkou, která byla úspěšně enkapsulována je 9-nitrokamptecin. Ta se zaměřuje na jaderný enzym topoizomeráza I, který inhibuje. Tento derivát je ale silně nestabilní ve fyziologickém pH a navíc je skoro nerozpustný ve vodě.

Ovšem při použití PLGA nanočástic se z nich 9-nitrokamptecin kontrolovaně uvolňoval po 160 hodin.⁶⁵

Mnohé preklinické studie ukázaly, že aktivní targeting buněk nebo endotelu cév nádoru je efektivnější. Například úprava povrchu folátem u nanočástic PLGA s doxorubicinem dosahovala asi jeden a půlkrát vyšší účinnost při léčbě nádoru prsu. Tyto částice cílily na buňky MCF-7.⁴⁴ Nanočástice PEG-PLGA s paklitaxelem, znovu na povrchu modifikovány folátem, vykazovaly mnohokrát vyšší cytotoxicitu vůči HEC-1A buňkám (human endometrium cancer cells). V tomto případě je využit aktivní i pasivní targeting.⁶⁶

Velkou pozornost v posledních letech přitahuje možnost perorálního podání chemoterapeutických látek. Z výsledků studií například vyplývá, že po podání PLGA nanočástic s tamoxifenem se biodostupnost léčiva zvýšila až jedenáctkrát.⁶⁷

V současné době je však výzkum pouze v preklinických fázích nebo se výsledky interpretují na hodnotách získaných v podmínkách in vitro. Do budoucna jsou však obrovským příslibem další postupy. Jedná se zejména o cílenou genovou terapii pomocí enkapsulace plasmidů nebo biologickou léčbu v podobě PLGA nanočástic se specifickými proteiny.

4.4.2.4. Diagnostika a zobrazování rakoviny

Zobrazovací metody hrají v klinické onkologii klíčovou roli. Pomáhají identifikovat solidní nádory, determinovat recidivující tumor a samozřejmě také odpověď na léčbu. Od doby, co je možné pomocí ligandů na povrchu nanočástic cílit na požadovanou tkáň, je možné zavést kontrastní látku pouze na místo, kde její přítomnost potřebujeme.⁶⁸

Enkapsulaci superparamagnetických oxidů železa do PLGA nanočástic došlo k výraznému zvýšení poločasu eliminace kontrastní látky a navíc se do značné míry odbouraly její nežádoucí účinky. Pomocí magnetické rezonance bylo možné pořídit snímek nádoru.⁶⁹ Dalším příkladem může být enkapsulace radioaktivně značeného indikátoru ^{99m}Tc k zobrazení takzvaných "sentinel" lymfatických uzlin. To jsou uzliny, které jsou jako první zasaženy metastázemi při rakovinném bujení. K zobrazení se využívá scintigrafie.⁶⁸

4.4.2.5. Specifické nedostatky nanočástic v léčbě rakoviny

Jeden z největších problémů se zdá být pasivní targeting a EPR efekt, jehož intenzita je značně individuální u každého pacienta, ale i u každého druhu nádoru. Další nedostatek související s aktivním targetingem, který by měl být teoreticky účinnější, vězí v tom, že je doprovázen zvýšenou imunogenitou a adsorbci proteinů na částice. Ovšem i tak jsou cílené nanočástice v léčbě efektivnější.⁶⁰

4.4.3. Léčba zánětu pomocí PLGA nanočástic

Lokální podání imunosupresiv se do budoucna jeví jako zajímavý úkol. Systémové podávání protizánětlivých léků je v dlouhodobém měřítku spojeno se závažnými nežádoucími účinky.

4.4.3.1. Targeting zánětu

PLGA nanočástice jsou schopny přímo cílit na místo zánětu a navíc enkapsulovanou látku uvolňují dlouhodobě.⁷⁰ Po systémovém podání částic dojde k jejich fagocytóze pomocí buněk retikuloendoteliálního systému. Děje se tak hlavně v zánětlivé tkáni, a to proto, že v tomto místě je koncentrace makrofágů, lymfocytů a dendritických buněk několikanásobně zvýšena. Nanočástice se v místě zánětu kumulují. Modifikací povrchu PNP's můžeme cílit na specifické antigeny, buňky nebo receptory, které se vyskytují pouze v zánětu. Aktivní targeting lze nasměrovat např. na integrin $\alpha_v\beta_3$.⁷¹

4.4.3.2. Revmatoidní artritida

RA je chronická zánětlivá nemoc způsobující poškození kloubů a kostí. Terapie spočívá hlavně v potlačování jejích symptomů. Často dochází i k dlouhodobému užívání glukokortikoidů, ty však mají závažné nežádoucí účinky. Proto se i zde vyskytly pokusy o využití nanotechnologie. Ve studiích bylo dokázáno, že částice z nebiokompatibilních a nebiodegradabilních polymerů mohou vyvolat nežádoucí efekt, tzv. krystaly navozenou bolest.⁴⁴ Proto se jako nosič protizánětlivých léků používají PLGA nanočástice.

PLGA nanočástice byly podány injekčně přímo do kloubního pouzdra krysy. Zatímco PLGA mikrosféry zůstaly pouze v synoviální tekutině, tak nanočástice byly

fagocytovány makrofágy a dostaly se i do kloubu a kostí. Enkapsulovanou látkou byl betamethason.⁷²

Studie ukázaly, že po podání nanočástic o velikosti 300-490 nm přímo do kloubního pouzdra došlo k postupnému uvolňování účinné látky. Experiment byl prováděn na králících.⁷³

5. PRAKTICKÁ ČÁST

5.1. Použité přístroje

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

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

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

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

Zetasizer ZS 90, (Malvern Panalytical, Malvern, Spojené království)

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

Centrifuga Micro 7 (Fischer Scientific, Hampton, Spojené státy americké)

Vakuová odparka IKA RV 10 (IKA, Staufen, Německo)

Spektrofotometr Helios γ (Thermo scientifica, Varšava, Polsko)

5.2. Použité chemikálie

T3: Terpolymer kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerytritolu (3%) ,
syntéza na KFT

Kopolymer kyseliny DL-mléčné s kyselinou glykolovou (1:1), syntéza na KFT

Aceton, Penta, Chrudim

Acetonitril Sigma-Aldrich, Praha

Dichlormethan, Honeywell, Olomouc

Dimethyl sulfoxid, Honeywell, Olomouc

Ethanol, Penta, Chrudim

Ethylacetát, Lachema, Neratovice

Ethylmethyleketon, Lachema, Neratovice

Koliphor 188, Sigma-Aldrich, Praha

Pluronic F127, Sigma-Aldrich, Praha

Rhodamin B, Sigma-Aldrich, Praha

5.3. Pracovní postup

5.3.1. Příprava vnitřní fáze

Na analytických vahách bylo naváženo vždy 25 mg polymeru. Pro své měření jsem používal jeden lineární polymer, tím bylo PLGA (1:1) nebo větvený polymer T3. Následně byl polymer rozpuštěn v jednom mililitru zvoleného rozpouštědla nebo ve směsi organických rozpouštědel, jejichž poměr byl předem zvolen. Jediný problém představovala rozpustnost polymerů v DMSO, protože PLGA i T3 jsou v něm obtížně rozpustné. Vnitřní fáze byla připravena vždy až v čas potřeby.

5.3.2. Příprava vnější fáze

Vnější fáze byla tvořena 1% roztokem povrchově aktivní látky v čištěné vodě. Do dostatečně široké kádinky byl navážen Koliphor® 188 nebo Pluronic® F127 a doplněn vodou. Roztok byl míchán do úplného rozpuštění surfaktantu. Většinou bylo připravováno 100 ml vodné fáze.

5.3.3. Příprava suspenze nanočástic

Suspenze byla připravena dvěma způsoby:

Odpařování rozpouštědla

Do kádinky s vnější fází byla přidána vnitřní fáze. Obě fáze se zřetelně oddělily. Poté byla kádinka okamžitě umístěna pod homogenizátor, na kterém byly postupně zvyšovány otáčky až na maximum. Homogenizace trvala 60 sekund. Čas byl měřen na stopkách. Poté byly otáčky pomalu snižovány na minimum. Takto vzniklá emulze byla v kádince umístěna na magnetickou míchačku. Tam se po dobu asi 2-3 hodin odpařovalo při laboratorní teplotě a atmosférickém tlaku organické rozpouštědlo. Doba odpařování hodně závisela na zvoleném solventu nebo jejich kombinaci. Na základě informací z literatury je doba 3 hodin dostatečná

pro odpaření organického rozpouštědla.¹⁰ Takto vzniklá vodná suspenze nanočástic pak byla přefiltrována přes membránový filtr o velikosti pórů 0,8 μm .

Nanoprecipitace

Vodná fáze surfaktantu byla v dostatečně široké kádince umístěna na magnetickou míchačku. Připravená vnější fáze byla natažena do injekční stříkačky bez jehly nebo do pipety. Takto bylo snadno vyřešeno pozvolné přikapávání vnější fáze. Tato fáze byla přidávána do kádinky frekvencí zhruba jedné kapky za dvě sekundy. Pro měření tohoto intervalu byly použity stopky. Poté byla kádinka ponechána 2-3 hodiny na magnetické míchačce. To byla doba nutná k odpaření veškerého rozpouštědla. Tento čas však byl pro každý solvent individuální. Zpravidla po třech hodinách již vzorek neobsahoval rozpouštědlo. Pro urychlení procesu odpařování byla použita v jednom případě i vakuová odparka. Poté byla suspenze podrobena granulometrickému měření na Zetasizeru.

5.3.4. Příprava nanočástic s rhodaminem B

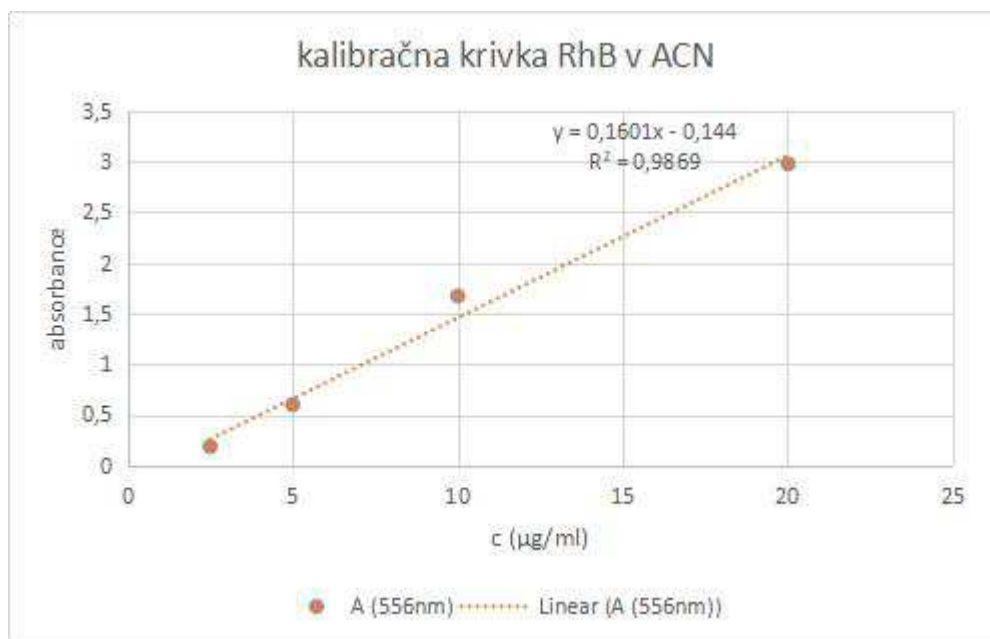
Na analytických vahách bylo naváženo do kádinky 25 mg polymeru a zároveň 0,25 mg rhodaminu B. Obě tyto látky byly rozpuštěny v rozpouštědle nebo kombinaci rozpouštědel a suspenze nanočástic byla utvořena metodou odpařování rozpouštědla. Jako stabilizátor byl použit Koliphor® 188 v koncentraci 1% vodného roztoku. Poté byly nanočástice s enkapsulovaným rhodaminem podrobeny měření na zetasizeru. Poté bylo odměřeno do eppendorfky množství 1,5 ml suspenze a takto zpracovaný vzorek byl vložen do centrifugy na 15 minut při 10 000 RPM. Po prvním centrifugačním cyklu byl ze vzorku odebrán supernatant a nahrazen 1,5 ml vody. Voda byla přidána tak, aby redispergovala sediment. Poté byl vzorek opět 15 minut centrifugován při 10 000 RPM. Znova byl odebrán supernatant a nahrazen vodou tak, aby se zvrátil sediment. Poté došlo k poslední centrifugaci a supernatant byl následně nahrazen 1 ml acetonitrilu. Vzorek pak byl vložen do měrné kyvety a na spektrofotometru byla změřena koncentrace enkapsulovaného rhodaminu B. Měření proběhlo při vlnové délce světla 556 nm proti slepému vzorku acetonitrilu.

5.3.5. Kvantifikace enkapsulovaného rhodaminu B

Po rozpuštění suspenze nanočástic v acetonitrilu byl vzorek vložen do měrné kyvety a na spektrofotometru byla změřena koncentrace enkapsulovaného rhodaminu B. Měření proběhlo při absorpčním maximu roztoku rhodaminu B v acetonitrilu. Tato hodnota byla 556 nm. Naměřené hodnoty absorbance byly vloženy do kalibrační křivky (Obr. 8). Z ní byla odečtena koncentrace enkapsulovaného rhodaminu B dosazením do vzorečku.

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

Kde y je naměřená absorbance a x je koncentrace enkapsulovaného rhodaminu B

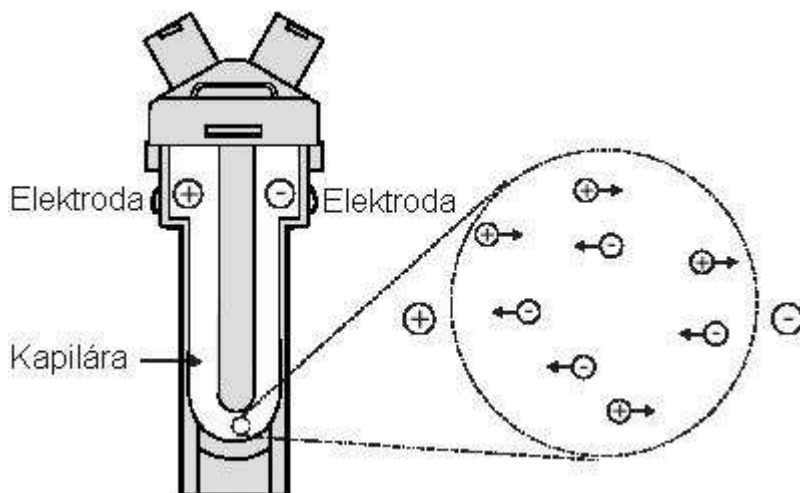


Obr. 8 Kalibrační křivka roztoku rhodaminu B v acetonitrilu při 556 nm.

5.3.6. Měření velikosti a zeta potenciálu částic

K měření hodnot byl použit přístroj Zetasizer ZS 90. Do plastové měrné kyvety bylo přidáno 0,05 ml suspenze nanočástic a vzorek byl doplněn destilovanou vodou na 2,0 ml. Kyveta byla vložena do přístroje a proběhlo měření velikosti částic a jejich polydisperzity. Měření každého vzorku přístroj provedl třikrát.

Poté byl stejným způsobem zředěn vzorek na měření zeta potenciálu. Vzorek byl pomocí injekční stříkačky aplikován do speciální kvivety s kapilárou a elektrodami (Obr. 9). Ta byla vložena do přístroje, který každý vzorek proměřil třikrát.



Obr. 9 Schématické zobrazení měrné kvivety pro měření zeta potenciálu.¹¹

5.3.7. Princip měření velikosti částic

Metoda měření velikosti částic využívá jevu takzvaného dynamického rozptylu světla.

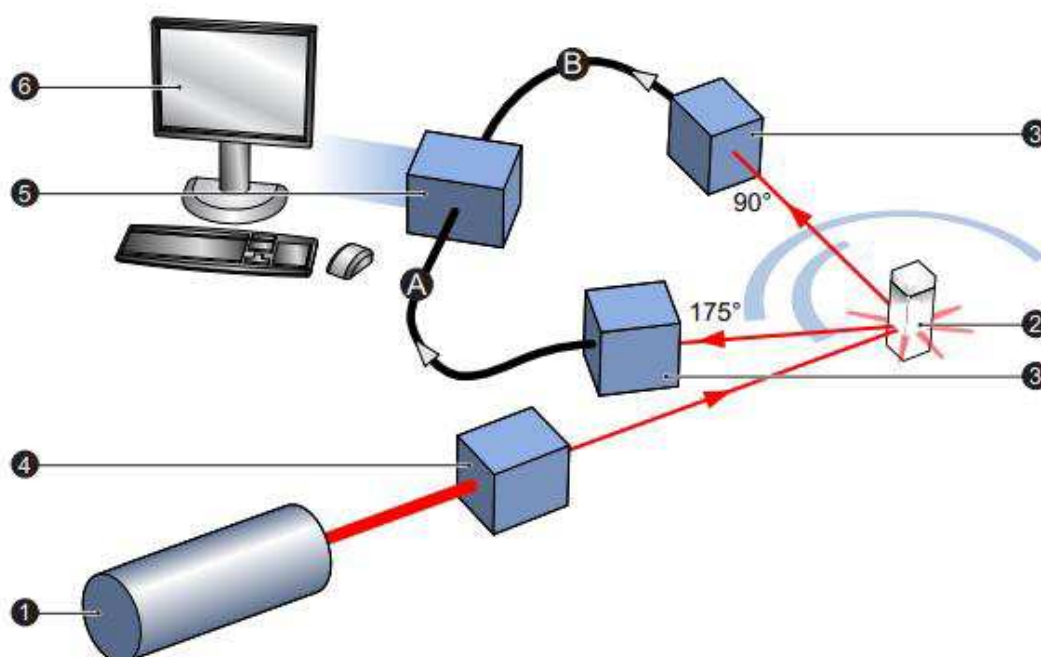
Částice se v disperzi neustále pohybují. Vykazují tzv. Brownův pohyb, což je jev, kdy neustále dochází ke srážkám částic s molekulami okolní kapaliny a následkem toho je chaotický pohyb částic. V našem případě je kapalinou voda. Velmi důležitým rysem tohoto pohybu je fakt, že menší částice se pohybují rychleji než větší. Vztah mezi velikostí částic a rychlostí jejich pohybu je definován Stokes-Einsteinovou rovnicí.⁷⁴

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Kde $d(H)$ je hydrodynamický průměr částice, D je koeficient difúze, k je Boltzmannova konstanta, T je absolutní teplota a η je viskozita disperzního prostředí.

Zetasizer měří intenzitu odraženého laserového světla v čase. Lépe řečeno, měří rychlost kolísání intenzity rozptýleného světla. Toto se děje pomocí digitálního korelátoru. Ten v podstatě měří podobnost mezi dvěma signály po určitém čase. Každý signál se s přibývajícím časem mění. Rychlost této změny závisí na velikosti částic. Výstupní hodnotou přístroje je distribuce velikosti částic. Základní distribucí velikosti je distribuce intenzity rozptýleného světla, která je funkcí velikosti částic. Tu lze převést i na distribuci objemu materiálu interagujícího s paprskem. Míru velikosti nejednotnosti částic definuje polydisperzita (PDI).^[87]

Sledované atributy tedy jsou: intenzita zaznamenaného signálu (větší částice rozptylují mnohem více světla než menší) a rychlost migrace bodů (částic) generujících danou intenzitu rozptylu světla (menší částice se pohybují rychleji než větší). Schématicky znázorňuje měření velikosti částic Obr. 10.



Obr. 10 Kde 1 je laser, 2 je kvjeta, 3 je detektor, 4 je atenuátor laserového paprsku, 5 je korelátor a 6 je počítač.⁷⁴

5.3.8. Princip měření zeta potenciálu

Důsledkem existence elektrických nábojů na povrchu částic je jejich pohyb v aplikovaném elektrickém poli. Vykazují tzv. elektrokinetické efekty. Pro měření na zetasizeru je důležitý efekt elektroforézy, což znamená, že nabitě částice vykazují pohyb vzhledem ke kapalině, ve které jsou suspendovány, pod vlivem aplikovaného

elektrického pole.¹¹ Pokud na elektrolyt aplikujeme elektrické pole, tak jsou suspendované částice přitahovány směrem k elektrodě s opačným nábojem. Tomuto pohybu do jisté míry brání viskozita elektrolytu. Rychlost částice je závislá na síle elektrického pole, dielektrické konstantě elektrolytu, viskozitě elektrolytu a zeta potenciálu.¹¹ Rychlost se označuje jako elektroforetická pohyblivost a zeta potenciál z ní lze vypočítat aplikováním Henryovy rovnice.

$$U_e = \frac{2\varepsilon z f(Ka)}{3\eta}$$

Kde U_e je elektroforetická pohyblivost, ε je dielektrická konstanta, z je zeta potenciál, $f(Ka)$ je Henryova funkce a η je viskozita. Za $f(Ka)$ se při měření ve vodném prostředí dosazuje tzv. Smoluchovskioho aproximace, která nabývá hodnoty 1,5.

Technika měření zeta potenciálu v kyvetě s elektrodami a aplikovaným napětím se nazývá laserová Dopplerova velocimetrie. Tato metoda zachycuje rychlost nanočástic v proudu kapaliny.¹¹ Měření je závislé také na hodnotě pH. Při našem měření byly částice suspendovány ve vodě. Proto lze říct, že pH měření bylo 7

5.3.9. Použitá rozpouštědla a jejich vlastnosti

Pro výběr rozpouštědla je důležité zvážit k jaké metodě bude použito. Při metodě odpařování rozpouštědla je žádoucí, aby solvent nebyl mísitelný s vodou zcela nebo jen velmi omezeně. Naopak při nanoprecipitaci bylo zvoleno rozpouštědlo mísitelné s vodou, které má zároveň schopnost rozpustit celkem lipofilní kopolymer PLGA 1:1. U všech použitých rozpouštědel byla požadována schopnost, aby byly těkavé a do několika hodin lehce odpařitelné při laboratorní teplotě. To bylo zaručeno jejich nízkou hodnotou bodu varu.

Pro metodu odpařování rozpouštědla byl použit DCM, ethylacetát (ETAC) a ethylmethyl keton (EMK) neboli butan-2-on nebo jejich směsi. Dichlormethan (CH_2Cl_2) je nepolární rozpouštědlo s typickým nasládlým zápachem a jeho výhodou

je jeho těkavost. S ostatními organickými solventy se dá dobře mísit. Ovšem jeho nevýhodou je nevyhovující toxikologický profil.

EMK a ETAC se tedy jeví jako bezpečnější látky. ETAC má funkční vzorec $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ a je to ester ethanolu a kyseliny octové. Má nasládlou vůni, která je důležitá pro detekci organického rozpouštědla v emulzi, ze které je suspenze nanočástic utvořena. Butan-2-on je bezbarvá kapalina typického karamelového zápachu. Jeho funkční vzorec $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$ naznačuje jeho obtížnou mísitelnost s vodou. Má dráždivé účinky, nicméně jen při dlouhodobé expozici velkým množstvím této látky. Jeho nevýhodou je delší doba nutná k jeho odpaření při laboratorní teplotě.

Při nanoprecipitaci byl použit ethanol (ETOH), aceton (AC), acetonitril (ACN) a jejich směsi nebo samotný DMSO. Ethanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) je protické polární rozpouštědlo, které je neomezeně mísitelné s vodou. Pro tento účel se používá pouze koncentrovaný (96%), ale i tak se k rozpouštění polymerů samotný nehodí kvůli jeho převládajícímu polárnímu profilu. Proto se nabízí jeho použití ve směsi, například s acetonem.

AC nebo také dimehylketon má funkční vzorec $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$. Je to bezbarvá kapalina, která má charakteristický zápach. Jedná se o aprotické, nepolární rozpouštědlo, které je s vodou neomezeně mísitelné. Nevýhodou je, že při vyšších laboratorních teplotách se odpařuje velmi rychle a vysoká koncentrace par acetonu působí tlumivým účinkem na centrální nervový systém. Proto je důležitá při manipulaci s ním práce v digestoři. Při běžném použití vykazuje jen mírnou toxicitu a nejsou dostatečné důkazy pro chronické účinky na zdraví.⁷⁵

ACN (CH_3CN) je nejjednodušší organický nitril. Je to bezbarvá, těkáva kapalina, která je dobře mísitelná s vodou i jinými organickými rozpouštědly. Má povahu semipolárního solventu. Acetonitril má v nízkých dávkách jen malou toxicitu.⁷⁶ V těle však může být metabolizován na kyanovodík.

DMSO má funkční vzorec $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$. Je to bezbarvá kapalina, která má povahu semipolárního, aprotického rozpouštědla. Je dobře mísitelný s vodou i celou řadou organických solventů. Při vyšší koncentraci par má dráždivý potenciál.

5.4. Složení vzorků

Tabulka 1 Složení vzorků.

Číslo vzorku	Polymer (nav. 25mg)	Rozpouštědlo (1ml)	Surfakant (10 ml, 1%)	Metoda přípravy
1	T3	DCM	Koliphor 188	Odpař. rozpouštědla
2	T3	ETAC	Koliphor 188	Odpař. rozpouštědla
3	T3	EMK	Koliphor 188	Odpař. rozpouštědla
4	T3	EMK:DCM 1:1	Koliphor 188	Odpař. rozpouštědla
5	T3	ETAC:EMK 1:1	Koliphor 188	Odpař. rozpouštědla
6	T3	DCM:ETAC 1:1	Koliphor 188	Odpař. rozpouštědla
7	T3	DCM:EMK 7:3	Koliphor 188	Odpař. rozpouštědla
8	T3	DCM:ETAC 7:3	Koliphor 188	Odpař. rozpouštědla
9	PLGA5/5	DCM	Koliphor 188	Odpař. rozpouštědla
10	PLGA5/5	ETAC	Koliphor 188	Odpař. rozpouštědla
11	PLGA5/5	EMK	Koliphor 188	Odpař. rozpouštědla
12	PLGA5/5	EMK:DCM 1:1	Koliphor 188	Odpař. rozpouštědla
13	PLGA5/5	ETAC:EMK 1:1	Koliphor 188	Odpař. rozpouštědla
14	PLGA5/5	DCM:ATAC 1:1	Koliphor 188	Odpař. rozpouštědla
15	PLGA5/5	DCM:EMK 7:3	Koliphor 188	Odpař. rozpouštědla
16	PLGA5/5	DCM :ETAC 7:3	Koliphor 188	Odpař. rozpouštědla
17	T3	AC:ETOH 1:1	Pluronic F127	Nanoprecipitace
18	T3	AC:ETOH 7:3	Pluronic F127	Nanoprecipitace
19	T3	ACN	Pluronic F127	Nanoprecipitace
20	T3	ACN:AC 1:1	Pluronic F127	Nanoprecipitace
21	T3	ACN:AC 7:3	Pluronic F127	Nanoprecipitace
22	T3	ACN:AC 3:7	Pluronic F127	Nanoprecipitace
23	T3	DMSO	Pluronic F127	Nanoprecipitace
24	PLGA 5/5	AC:ETOH 1:1	Pluronic F127	Nanoprecipitace

25	PLGA 5/5	AC:ETOH 7:3	Pluronic F127	Nanoprecipitace
26	PLGA 5/5	ACN	Pluronic F127	Nanoprecipitace
27	PLGA 5/5	ACN:AC 1:1	Pluronic F127	Nanoprecipitace
28	PLGA 5/5	ACN:AC 7:3	Pluronic F127	Nanoprecipitace
29	PLGA 5/5	ACN:AC 3:7	Pluronic F127	Nanoprecipitace
30	PLGA 5/5	DMSO	Pluronic F127	Nanoprecipitace

Tabulka 2 Složení vzorků s rhodaminem B.

Číslo vzorku	Polymer (nav. 25mg)	Rozpouštědlo (1ml)	Surfaktant (10 ml, 1%)	Rhodamin B (navážka v mg)
31	PLGA 5/5	DCM: ETAC 7:3	Koliphor 188	0,28
32	PLGA 5/5	DCM:EMK 7:3	Koliphor 188	0,24

5.5. Výsledky měření

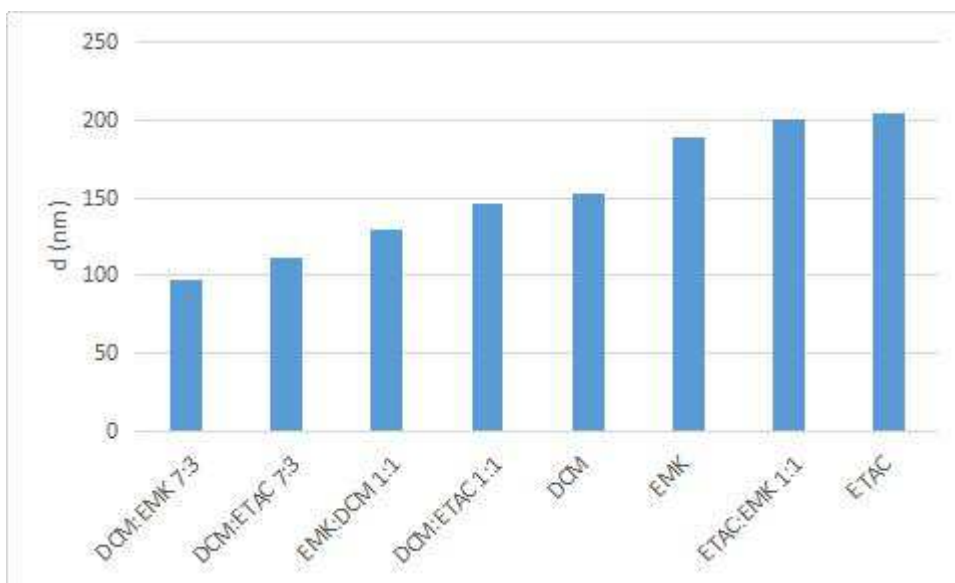
Tabulka 3 Velikost vzniklých nanočástic a jejich polydisperzita.

Číslo vzorku	Průměrná velikost částic [nm]	Směrodatná odchylka	Průměrná polydisperzita	Směrodatná odchylka
1	152,8	±16,534	0,266	±0,042
2	204,5	±1,450	0,431	±0,018
3	189,4	±7,914	0,379	±0,074
4	128,9	±0,330	0,226	±0,006
5	201,0	±6,479	0,300	±0,047
6	146,1	±1,250	0,223	±0,002
7	97,6	±0,188	0,216	±0,017
8	111,1	±0,471	0,210	±0,018
9	527,9	±26,000	0,738	±0,008

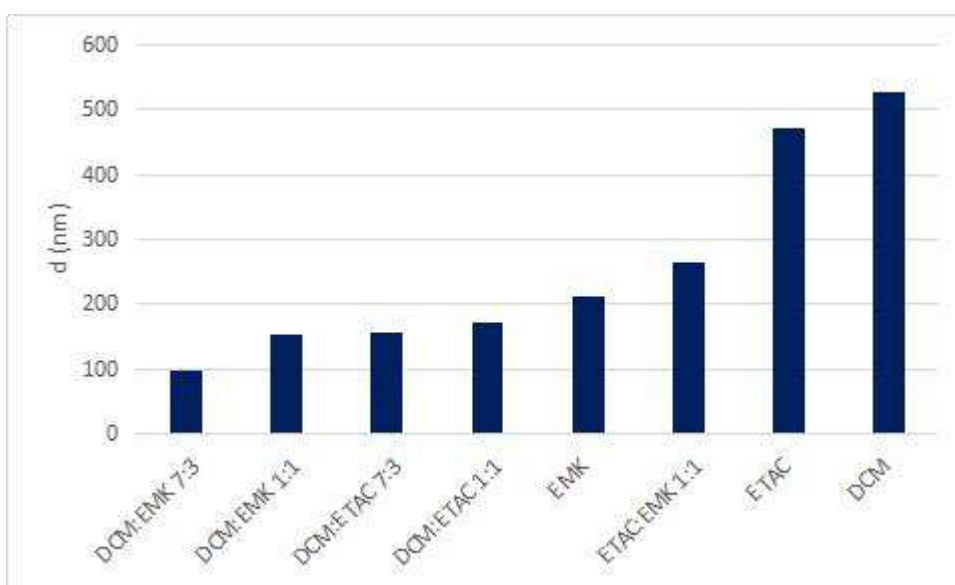
10	470,7	±51,150	0,665	±0,123
11	211,3	±8,000	0,300	±0,010
12	154,0	±1,674	0,265	±0,009
13	263,1	±8,948	0,425	±0,074
15	95,8	±0,404	0,287	±0,017
16	155,3	±1,376	0,112	±0,018
17	151,0	±1,837	0,132	±0,019
18	198,2	±1,406	0,098	±0,023
19	209,6	±1,330	0,175	±0,008
20	200,9	±0,981	0,145	±0,005
21	207,3	±3,586	0,174	±0,007
22	179,4	±1,173	0,096	±0,026
23	128,4	±1,257	0,067	±0,007
24	164,9	±0,741	0,112	±0,019
25	165,5	±1,558	0,125	±0,010
26	219,6	±0,403	0,213	±0,006
27	193,7	±2,123	0,157	±0,007
28	194,0	±0,957	0,084	±0,005
29	159,3	±2,290	0,100	±0,003
30	96,8	±0,426	0,097	±0,012

Tabulka 4 Velikost vzniklých nanočástic s enkapsulovaným rhodaminem B.

Číslo vzorku	Průměrná velikost částic [nm]	Směrodatná odchylka	Průměrná polydisperzita	Směrodatná odchylka
31	296,8	±8,572	0,432	±0,031
32	191,3	±4,453	0,444	±0,066



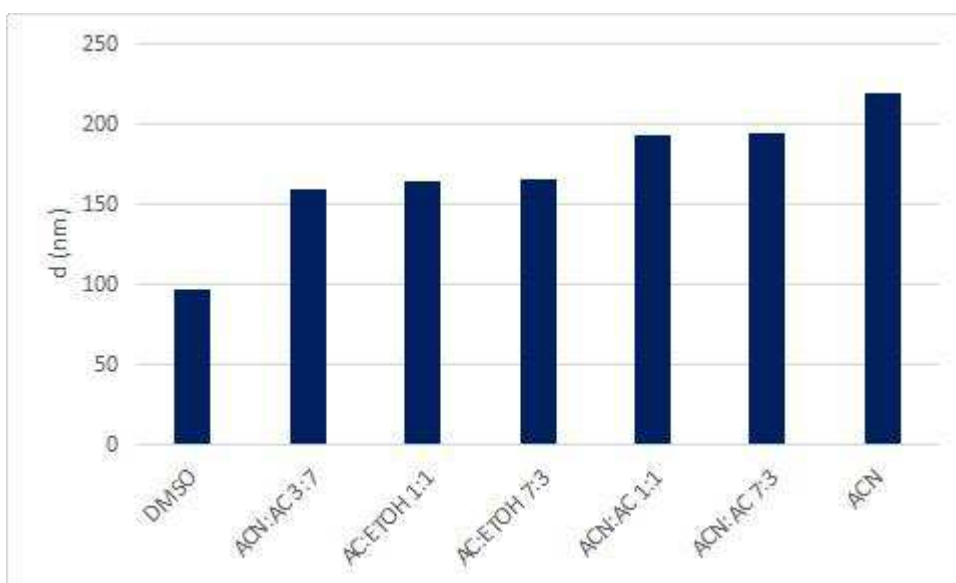
Graf 1 Velikosti nanočástic, seřazené od nejmenšího rozměru, vznikajících z polymeru T3, připravených odpařováním rozpouštědla.



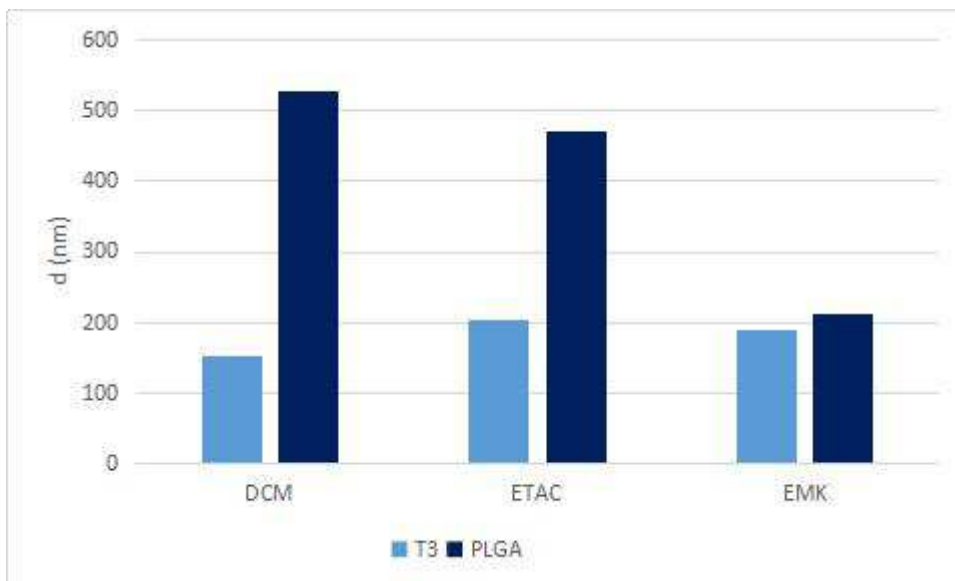
Graf 2 Velikosti nanočástic, seřazené od nejmenšího rozměru, vznikajících z polymeru PLGA 5/5, připravených odpařováním rozpouštědla.



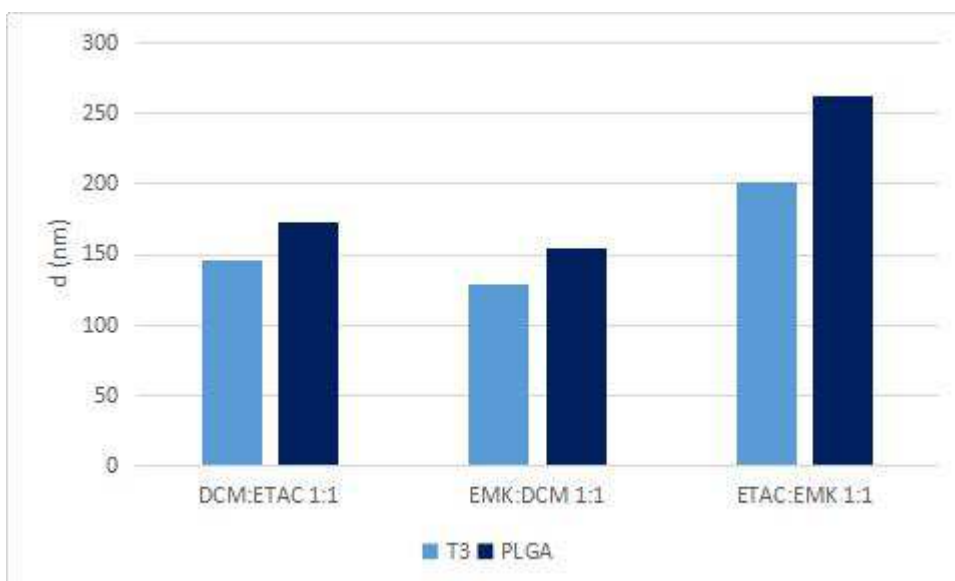
Graf 3 Velikosti nanočástic, seřazené od nejmenšího rozměru, vznikajících z polymeru T3, připravených nanoprecipitací.



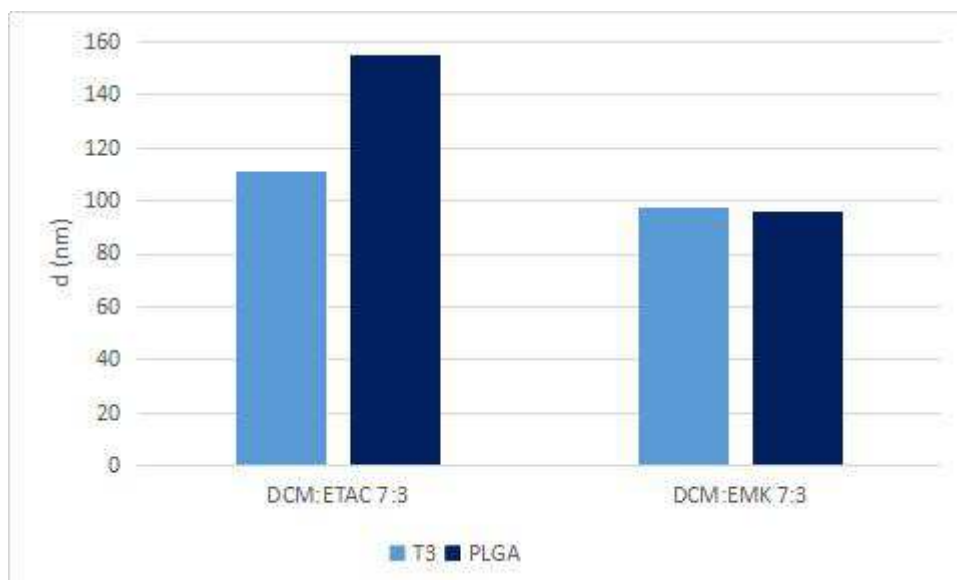
Graf 4 Velikosti nanočástic, seřazené od nejmenšího rozměru, vznikajících z polymeru PLGA 5/5, připravených nanoprecipitací.



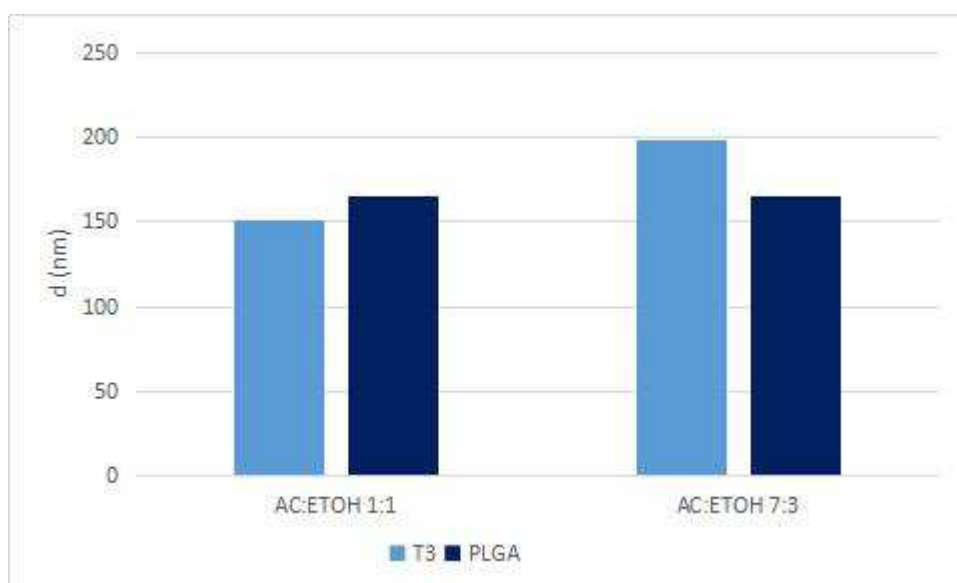
Graf 5 Srovnání obou polymerů ve vztahu k velikosti částic: DCM, ETAC a EMK (metoda odpařování rozpouštědla).



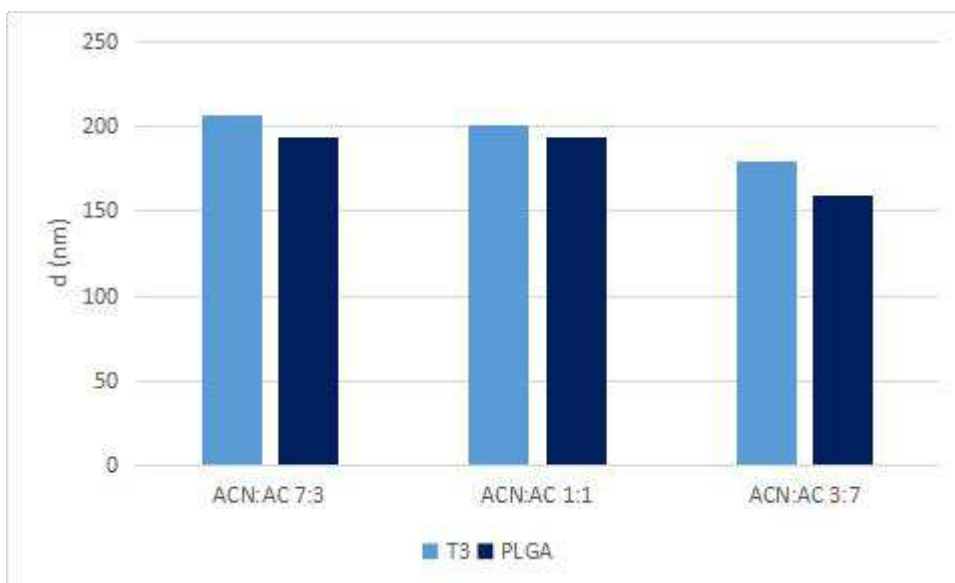
Graf 6 Srovnání obou polymerů ve vztahu k velikosti částic: DCM:ETAC 1:1, EMK:DCM 1:1 a ETAC:EMK 1:1 (metoda odpařování rozpouštědla).



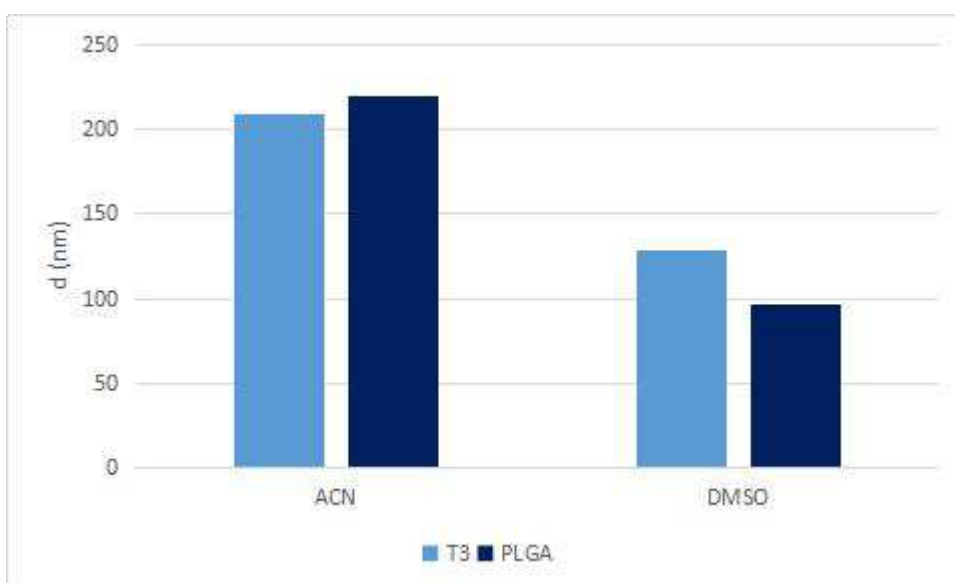
Graf 7 Srovnání obou polymerů ve vztahu k velikosti částic: DCM:ETAC 7:3 a DCM:EMK 7:3 (metoda odpařování rozpouštědla).



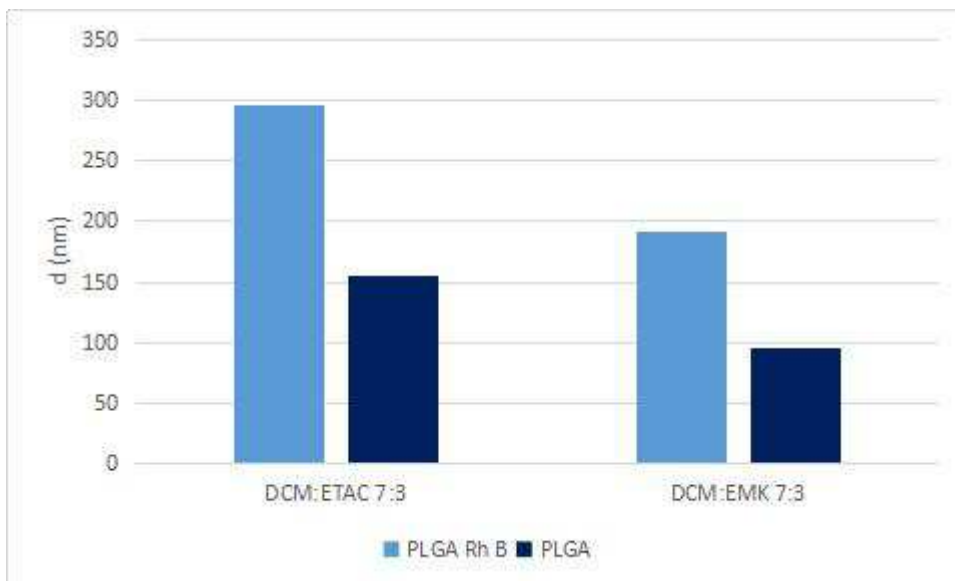
Graf 8 Srovnání obou polymerů ve vztahu k velikosti částic: AC:ETOH 1:1 a AC:ETOH 7:3 (metoda nanoprecipitace).



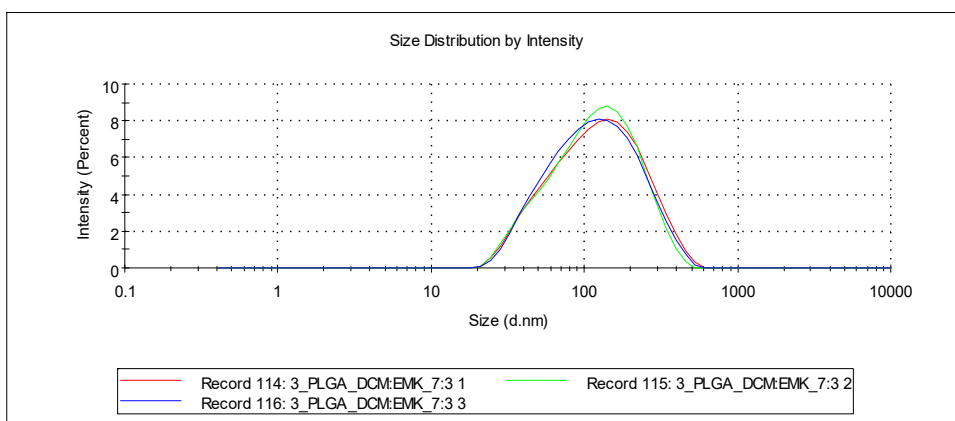
Graf 9 Srovnání obou polymerů ve vztahu k velikosti částic: ACN:AC 7:3, ACN:AC 1:1 a ACN:AC 3:7 (metoda nanoprecipitace).



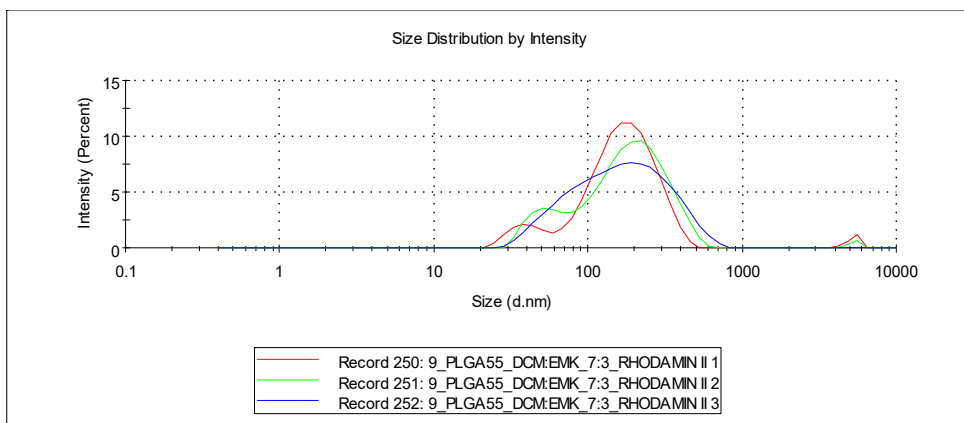
Graf 10 Srovnání obou polymerů ve vztahu k velikosti částic: ACN a DMSO (metoda nanoprecipitace).



Graf 11 Srovnání velikosti nanočástic s enkapsulovaným rhodaminem B a bez enkapsulovaného rhodaminu B (DCM:ETAC 7:3 a DCM:EMK 7:3).



Graf 12 Distribuce intenzity rozptýleného světla prázdných nanočástic PLGA (DCM:EMK 7:3). Uvedeno jako srovnání ke grafu 13.



Graf 13 Distribuce intenzity rozptýleného světla nanočástic PLGA s rhodaminem B (DCM:EMK 7:3).

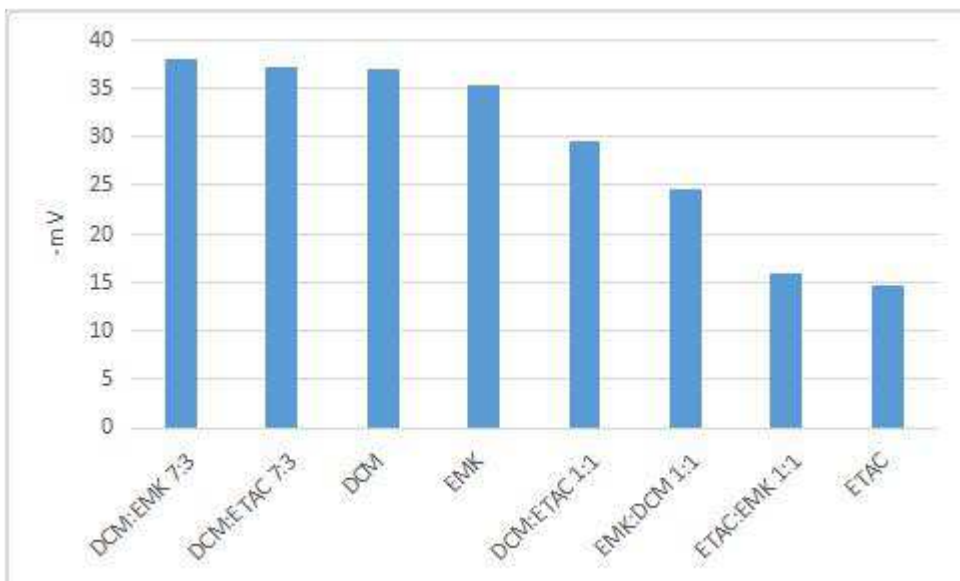
Tabulka 5 Průměrný zeta potenciál nanočástic.

Číslo vzorku	Průměrný zeta potenciál [mV]	Směrodatná odchylka
1	-37,0	±1,389
2	-14,7	±0,741
3	-35,3	±3,989
4	-24,5	±3,536
5	-16,0	±2,716
6	-29,5	±0,531
7	-38,0	±1,050
8	-37,1	±1,768
9	-34,1	±1,112
10	-39,6	±1,300
11	-41,5	±0,883
12	-29,5	±1,951
13	-16,0	±2,716
14	-8,6	±2,115
15	-40,0	±0,741
16	-38,6	±1,525

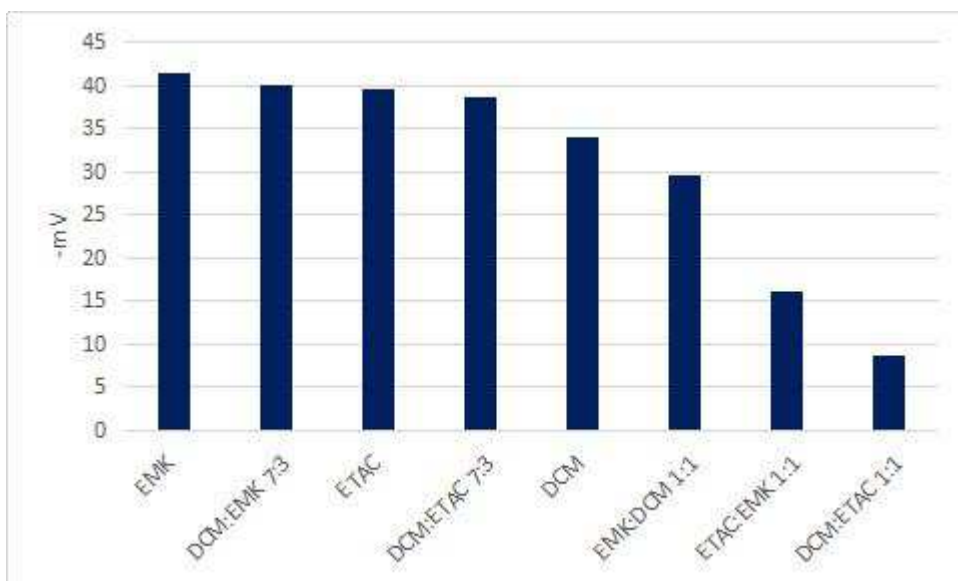
17	-29,1	±2,304
18	-27,4	±0,806
19	-41,0	±0,946
20	-31,0	±0,329
21	-35,8	±0,419
22	-31,0	±0,245
23	-27,5	±0,170
24	-28,5	±2,978
25	-21,0	±0,834
26	-35,9	±1,613
27	-28,6	±0,793
28	-27,0	±1,347
29	-18,8	±1,838
30	-32,0	±0,735

Tabulka 6 Průměrný zeta potenciál nanočástic s enkapsulovaným rhodaminem B.

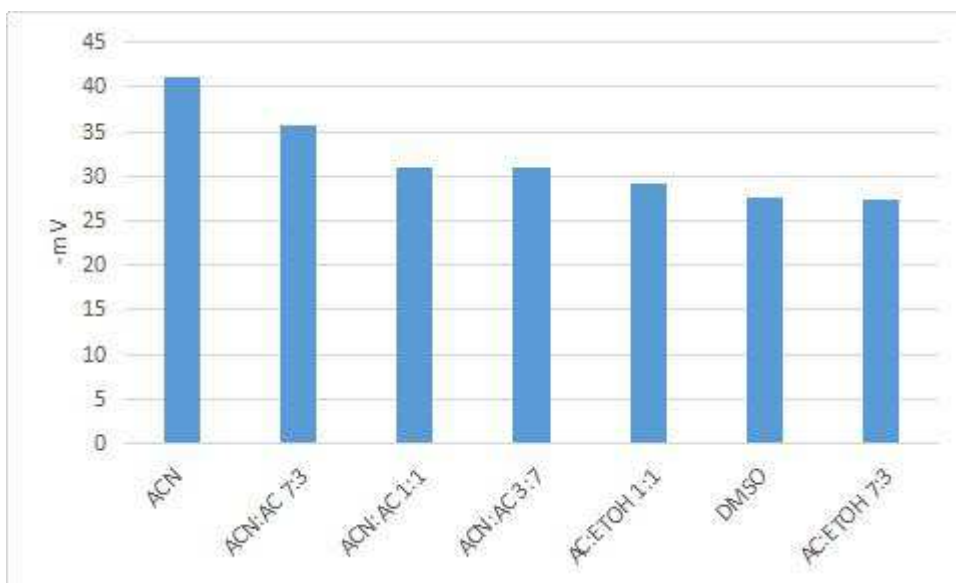
Číslo vzorku	Průměrný zeta poenciál [mV]	Směrodatná odchylka
31	-55,8	±3,646
32	-41,0	±0,735



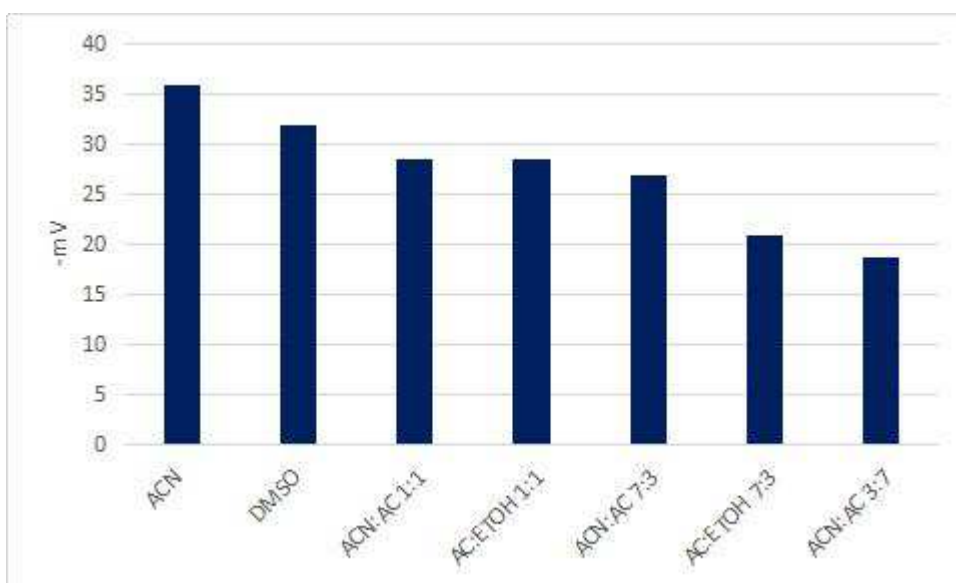
Graf 14 Zeta potenciál nanočástic (seřazené od nejstabilnějších částic po nejméně stabilní) vznikajících z polymeru T3, připravených odpařováním rozpouštědla.



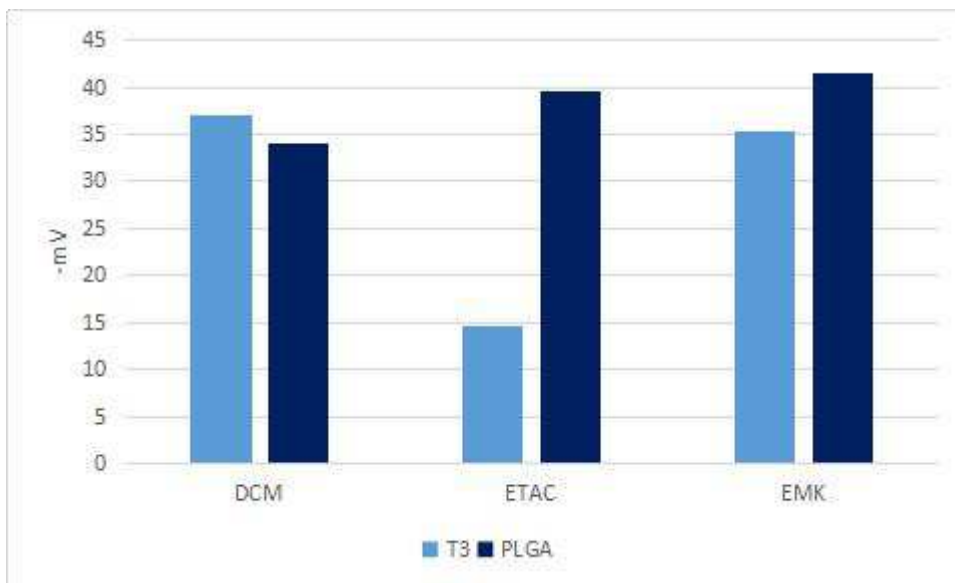
Graf 15 Zeta potenciál nanočástic (seřazené od nejstabilnějších částic po nejméně stabilní) vznikajících z polymeru PLGA 5/5, připravených odpařováním rozpouštědla.



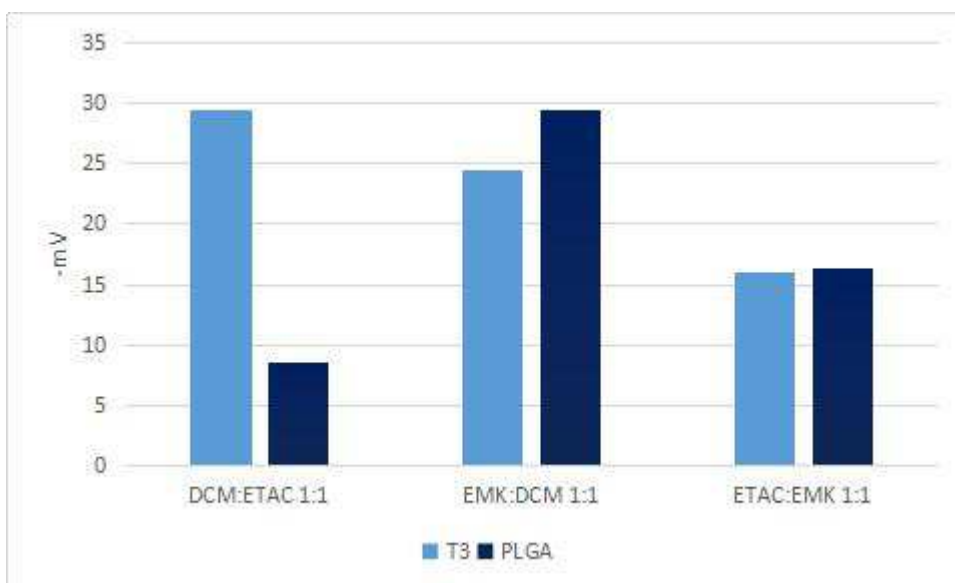
Graf 16 Zeta potenciál nanočástic (seřazené od nejstabilnějších částic po nejméně stabilní) vznikajících z polymeru T3, připravených nanoprecipitací.



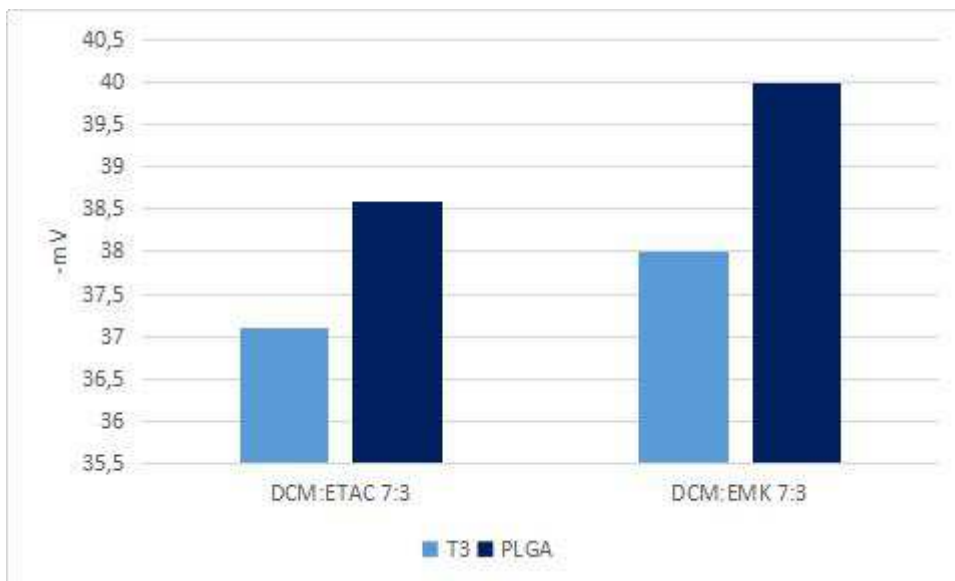
Graf 17 Zeta potenciál nanočástic (seřazené od nejstabilnějších částic po nejméně stabilní) vznikajících z polymeru PLGA 5/5, připravených nanoprecipitací.



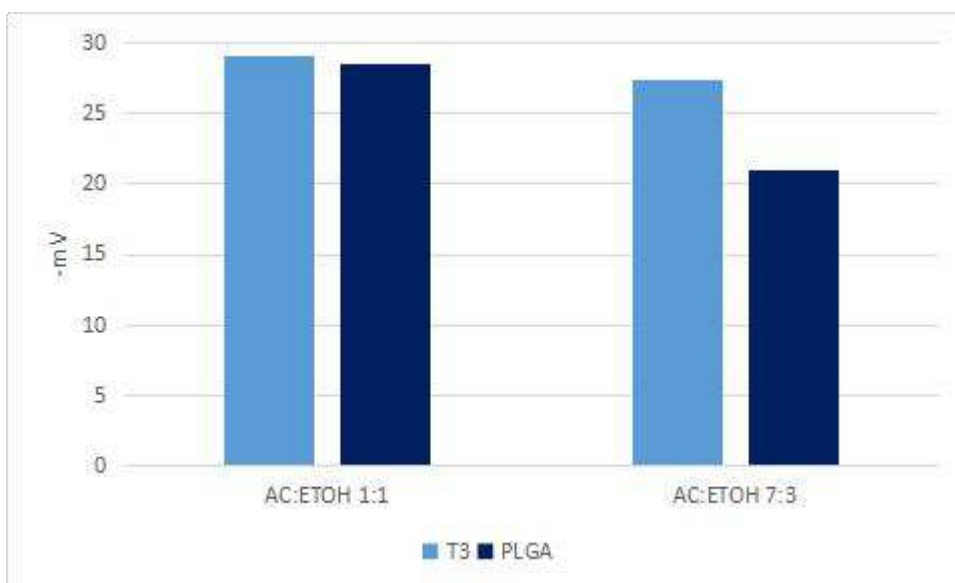
Graf 18 Výsledný zeta potenciál. Porovnání obou polymerů ve vztahu k zeta potenciálu: DCM, ETAC a EMK (metoda odpařování rozpouštědla).



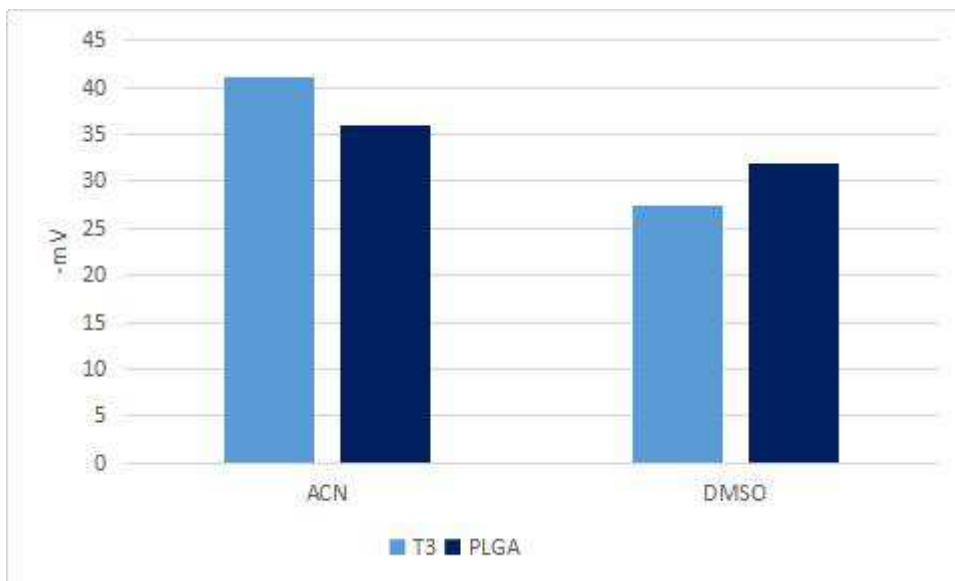
Graf 19 Výsledný zeta potenciál. Porovnání obou polymerů ve vztahu k zeta potenciálu: DCM:ETAC 1:1, EMK:DCM 1:1 a ETAC:EMK 1:1 (metoda odpařování rozpouštědla).



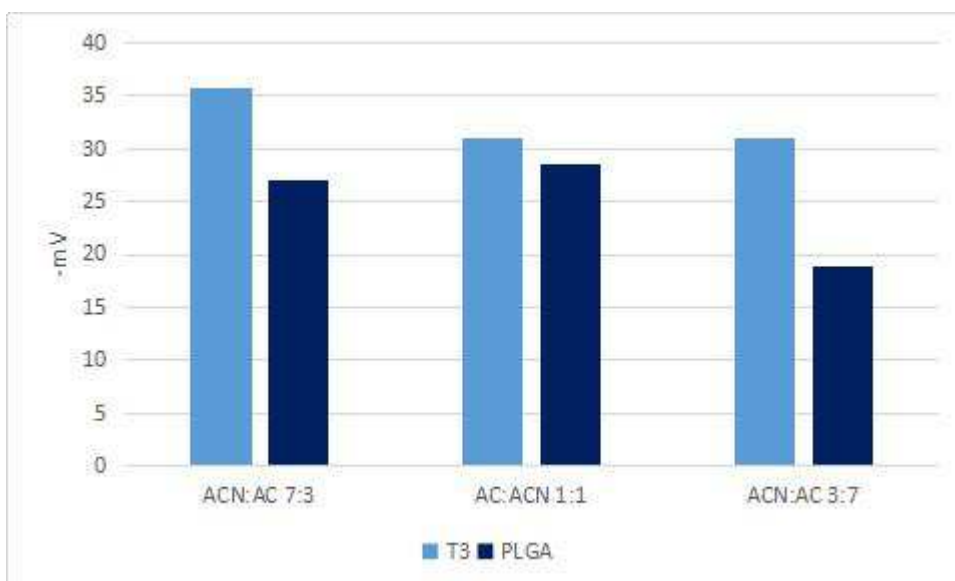
Graf 20 Výsledný zeta potenciál. Porovnání obou polymerů ve vztahu k zeta potenciálu: DCM:ETAC 7:3 a DCM:EMK 7:3 (metoda odpařování rozpouštědla).



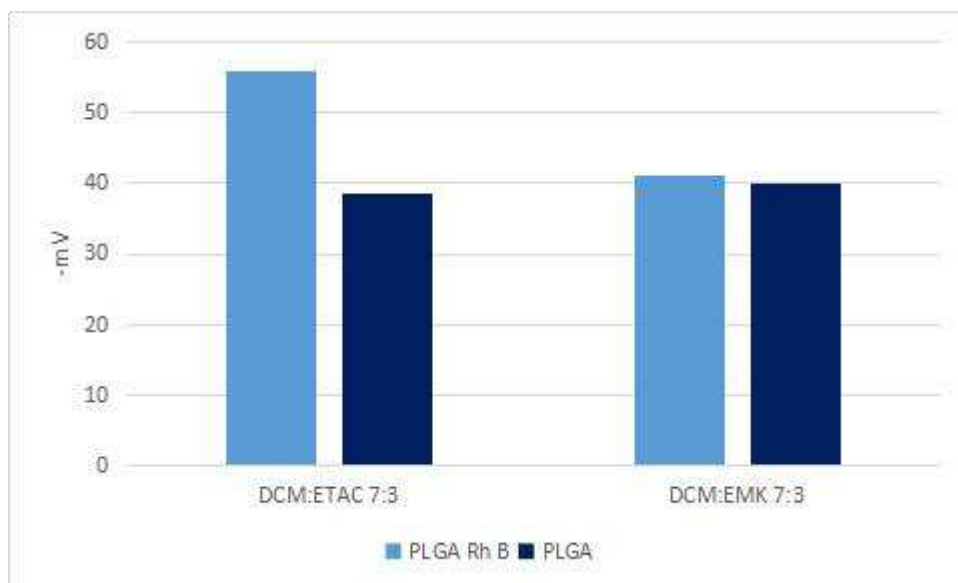
Graf 21 Výsledný zeta potenciál. Porovnání obou polymerů ve vztahu k zeta potenciálu: AC:ETOH 1:1 a AC:ETOH 7:3 (metoda nanoprecipitace).



Graf 22 Výsledný zeta potenciál. Porovnání obou polymerů ve vztahu k zeta potenciálu: ACN a DMSO (metoda nanoprecipitace).



Graf 23 Výsledný zeta potenciál. Porovnání obou polymerů ve vztahu k zeta potenciálu: ACN:AC 7:3, ACN:AC 1:1 a ACN:AC 3:7 (metoda nanoprecipitace).



Graf 24 Srovnání zeta potenciálu nanočástic s enkapsulovaným rhodaminem B a bez enkapsulovaného rhodaminu B (DCM:ETAC 7:3 a DCM:EMK 7:3).

Tabulka 7 Enkapsulační efektivita rhodaminu B.

Číslo vzorku	Absorbance při 556 nm	Koncentrace [μg/ml]	Enkapsulační efektivita [%]
31	0,922	6,658	7,93
32	0,583	4,541	6,31

6. DISKUZE

V této práci byl zkoumán vliv rozpouštědla, použitého při tvorbě nanočástic emulzní odpařovací metodou a nanoprecipitační metodou na velikost, polydisperzitu a elektrické vlastnosti připravených částic. Experimentální měření bylo uskutečněno na dvou typech polymerů. Jedním byl lineární PLGA 5/5, tím druhým byl větvený T3. V práci byl zohledněn použitý typ polymeru a jeho dopad na výsledné granulometrické vlastnosti nanočástic připravených za použití rozdílných rozpouštědel a následně kombinací těchto solventů.

Výsledky granulometrické analýzy

Odpařování rozpouštědla

K této metodě byla použita rozpouštědla nebo směsi rozpouštědel, která nejsou mísitelné s vodou: DCM, EMK, ETAC, ETAC:EMK 1:1, DCM:EMK 1:1, DCM:ETAC 1:1, DCM:EMK 7:3 a DCM:ETAC 7:3. Přesné složení vzorků obsahuje tabulka 1.

Při srovnání EMK, DCM a ETAC je z grafu 5 patrné, že nejmenší částice vznikají kombinací DCM s větveným polymerem T3 (152,8 nm). Tyto částice mají navíc nízkou polydisperzitu (PDI 0,266). Oproti tomu kombinace ETAC nebo DCM s lineární PLGA 5/5 poskytla o mnoho větší nanočástice (527,9 nm pro DCM a 470,7 nm pro ETAC), navíc s vysokou polydisperzitou (PDI 0,738 pro DCM a 0,665 pro ETAC). Z toho plyne, že tato kombinace polymeru a rozpouštědla se pro splnění cíle mé práce nehodí. Při použití EMK došlo k formulaci PNP's s průměrem okolo 200 nm (189,4 nm pro T3 a 211,3 nm pro PLGA 5/5) a slibnou polydisperzitou, jejíž hodnota se pohybovala mezi 0,3-0,38. EMK se osvědčil jako vhodný solvent. Již z grafu 5 je čitelné, že velikost vzniklých částic ovlivňuje volba typu polymeru. Je patrné, že PNP's utvořené z lineárního polymeru jsou větší (DCM 527,9 nm, ETAC 470,9 nm, EMK 211,3 nm, DCM:EMK 1:1 154,0 nm, ETAC:EMK 1:1 263,1 nm, DCM:ETAC 1:1 172,6 nm, DCM:ETAC 7:3 155,3 nm) než při použití T3 (DCM 152,8 nm, ETAC 204,5 nm, EMK 189,4 nm, DCM:EMK 1:1 128,9 nm, ETAC:EMK 1:1 201,0 nm, DCM:ETAC 1:1 146,1 nm, DCM:ETAC 7:3 111,1 nm).

Tento fenomén se nakonec potvrdil téměř u všech vzorků připravených emulzní odpařovací metodou. Jedinou výjimkou byl vzorek připravený s DCM:EMK 7:3 (95,7 nm pro PLGA 5/5 a 97,6 pro T3).

Granulometrickou analýzou vzniklých nanočástic bylo dokázáno, že menší částice vznikají spíše při použití směsi rozpouštědel (DCM: EMK 7:3 96-98 nm, DCM: ETAC 7:3 111-155 nm), jak je patrné z grafu 1 a 2.

Další zkoušenou směsí solventů byla kombinace DCM:EMK 1:1. Tato kombinace se ukázala jako velmi dobrá, zejména protože vzniklé nanočástice disponovaly nízkou polydisperzitou (0,226 pro T3 a 0,265 pro PLGA 5/5). Částice měly průměr mezi 129-154 nm. Stejně tak se osvědčilo i použití DCM:ETAC 1:1. Vzniklé částice měly nízkou polydisperzitu (0,223-0,310) a velikost mezi 146 nm až 173 nm. Přesné hodnoty pro oba polymery lze najít v tabulce 3. Z grafu 6 je znovu patrný fenomén použitého typu polymeru.

Vzhledem k tomu bylo dále postupováno volbou směsí rozpouštědel s větším podílem dichlormethanu. Z grafu 7 vyplývá, že touto cestou vznikaly částice o menších rozměrech (95-155 nm). Navíc, jak je doloženo v tabulce 3, takto vzniklé PNP's mají velmi nízkou polydisperzitu. Její hodnota se nachází v intervalu od 0,112 do 0,287. Zajímavé je, že u samotného DCM se polydisperzita pohybuje od 0,266 pro T3 až do 0,738 pro PLGA 5/5.

Z výsledků tedy vyplývá, že pro přípravu malých nanočástic metodou odpařování rozpouštědla (v rozmezí od 95 nm do 170 nm) s nízkou polydisperzitou (PDI 0,110-0,310), jsou vhodné tyto směsi rozpouštědel: DCM:EMK 7:3, DCM:ETAC 7:3, DCM:EMK 1:1, DCM:ETAC 1:1. Optimální velikost částic, tedy okolo 200 nm, poskytuje EMK (189,4-211,3 nm) a kombinace EMK:ETAC 1:1 s větveným polymerem T3 (201,0 nm). U všech polymerů, až na jednu výjimku (DCM:EMK 7:3), se potvrdil fenomén zvoleného typu polymeru, ze kterého plyne, že polymer T3 poskytuje s danými solventy částice o menším průměru než při použití PLGA 5/5.

Nanoprecipitace

Pro tuto metodu byla použita rozpouštědla mísitelná s vodou: DMSO, ACN, AC:ETOH 1:1, AC:ETOH 7:3, ACN:AC 1:1, ACN:AC 7:3 a ACN:AC 3:7. Z tabulky 3 lze vyvodit, že touto metodou vznikají spíše malé nanočástice (96-220 nm) s velmi nízkou polydisperzitou. Polydisperzita všech vzorků připravených nanoprecipitací je v rozmezí 0,067-0,213. Vliv použitého polymeru na morfologii PNP's byl při použití této metody zanedbatelný ve srovnání s PNP's vzniklými metodou odpařování rozpouštědla.

V grafu 10 je znázorněno porovnání DMSO a ACN. DMSO se osvědčil jako velmi dobré rozpouštědlo pro přípravu malých částic (96,8 nm pro PLGA 5/5 a 128,4 nm pro T3) s velmi nízkou polydisperzitou. PDI se u těchto vzorků pohybuje v rozmezí 0,067-0,097, a to jsou nejnižší zaznamenané hodnoty v rámci této práce. Jeho velkou nevýhodou je však dráždivost a nevhodný toxikologický profil. ACN poskytuje částice o velikosti 209,6 nm (PDI 0,175) pro T3 a 219,6 nm (PDI 0,213) pro PLGA 5/5. Jedná se naopak o největší částice připravené touto metodou. Jelikož v literatuře se velmi často popisuje vliv AC na velikost nanočástic a jedná se o nejčastěji používané rozpouštědlo, tak samotný pro tuto práci využit nebyl. Ovšem v mnohých studiích je snadno dohledatelné, že takto vznikají částice o velikosti 110 nm až 208 nm.³

První zkoušenou směsí solventů byla kombinace acetonu a ethanolu. Zde je nutné podotknout, že se nehodí použít směs s vyšším podílem ethanolu. Je to z důvodu, že tato směs by nebyla schopna rozpustit ani jeden z polymerů. Byl tedy zvolen pouze podíl AC:ETOH 1:1 a 7:3. Výsledné hodnoty jsou zaneseny do grafu 8 a vyplývá z nich, že takto připravené částice mají velikost 150-200 nm. Pro T3 se jedná o hodnoty AC:ETOH 1:1 151,0 nm (PDI 0,132) a AC:ETOH 7:3 198,2 nm (PDI 0,098) a u PLGA 5/5 je průměr částic pro AC:ETOH 1:1 164,9 nm (PDI 0,112) a AC:ETOH 7:3 165,5 nm (PDI 0,125). Z těchto výsledků je patrné, že větší podíl ETOH má vliv pouze na velikost nanočástic vzniklých z větveného T3. Při použití AC:ETOH 1:1 vznikají menší částice než při použití AC:ETOH 7:3.

Nejmenší nanočástice vznikaly bez ohledu na volbu polymeru při použití DMSO (96,8 nm pro PLGA 5/5 a 128,4 nm pro T3). Naopak největší vznikly při použití ACN (210-220 nm). Toto lze vyvodit ze souhrnných grafů 3 a 4. Z obou grafů je navíc

zřetelný fenomén přidavku acetonitrilu. Se stoupajícím podílem ACN se průměrná velikost vzniklých nanočástic zvyšovala a vůbec nejvyšší byla při použití samotného ACN. Tento jev byl pozorovatelný u obou typů polymeru.

Detailněji se tímto fenoménem zabývá graf 9 u kombinace ACN:AC v různých poměrech. Zde vidíme, jak se postupně se zvyšujícím se podílem ACN zvyšuje i velikost částic. Jejich diametr stoupá u PLGA 5/5 od 159 nm do 194 nm (PDI 0,084-0,157). U T3 se jedná o hodnoty od 179 nm do 200 nm (PDI 0,096-0,174). Jsou to tedy PNP's menších rozměrů s nízkou polydisperzitou.

Stabilita částic

Za stabilní nanočástice jsou považovány ty, které mají hodnotu zeta potenciálu ± 30 mV.

Ze souhrnných grafů 14 a 15 je patrné, že velká část PNP's připravených metodou odpařování rozpouštědla je stabilních. Velká nestabilita se však ukázala u vzorků, které vznikly za použití ETAC (-14,7 mV) nebo kombinace ETAC s EMK 1:1 (-16 mV) s větveným polymerem T3. U PLGA 5/5 se jedná vzhledem k významné nestabilitě o vzorky vzniklé při použití ETAC s EMK 1:1 (-16 mV) a DCM s ETAC 1:1 (-8,6 mV).

Při nanoprecipitaci se u polymeru T3 nevyskytovaly vzorky, které by byly velmi nestabilní. Z grafu 16 lze vyvodit, že zeta potenciál těchto nanočástic se pohyboval od -27,4 mV do -41,0 mV. Podrobněji shrnuje výsledky tabulka 5. Ovšem u lineárního PLGA 5/5 vykazoval nižší stabilitu vzorek připravený se směsí ACN:AC 3:7 (-18,8 mV). Ostatní vzorky vykazovaly hodnoty od -21 mV do -36 mV. To je naznačeno v grafu 17.

V grafech 18-23 je znázorněno porovnání obou typů polymeru ve vztahu k zeta potenciálu a ke zvolenému rozpouštědлу. Z těchto grafů nelze vypožorovat žádný jednoznačný fenomén, který by se týkal přímého vlivu polymeru na hodnotu zeta potenciálu.

Podle teorie by měl být zeta potenciál úměrný velikosti částic. Čím větší je částice tím větší by měl být i její elektrický náboj na povrchu. To je zapříčiněno

skutečností, že větší částice mají oproti menším významně menší plochu povrchu a náboj je tak na povrchu výraznější. To však toto měření zcela nepotvrdilo. Je tedy pravděpodobné, že do stability částic zasahuje více faktorů. Jedním z nich může být u tohoto experimentu i zvolená koncentrace povrchově aktivní látky.

Enkapsulaci rhodaminu B

Rhodamin B zastupuje lipofilní látku ($\log P = 6,71$). Pro přípravu byl zvolen lineární polymer PLGA 5/5. Jako rozpouštědlo byla zvolena směs dichlormethanu s ethylmethylketonem 7:3 a směs DCM s EMK 7:3. Použita byla metoda odpařování rozpouštědla. Přesné složení vzorků ukazuje tabulka 2.

Průměr a polydisperzita nanočástic s enkapsulovanou látkou (tabulka 4) nabývá signifikantně větších hodnot než v případě prázdných PNP's (s rhodaminem B 190-300 nm, prázdné PNP's 96-155 nm). Toto lze vidět v grafu 11. Polydisperzita je u nanočástic s rhodaminem 0,432-0,444. U prázdných částic je nízká a nabývá hodnot 0,111-0,287. Lze usuzovat, že je to dáno právě enkapsulací látky do nanonosičů. Srovnání distribuce intenzity rozptylu svěla částicemi je znázorněno na grafech 12 a 13.

Pokud se zaměříme na stabilitu takto vzniklých nanočástic, tak z tabulky 6 můžeme vyvodit, že se jedná o velice stabilní částice s vysokým záporným zeta potenciálem (-55 mV pro nanočástice připravené v DCM:EMK 7:3 a -41 mV pro DCM:ETAC 7:3). To je pravděpodobně způsobeno adsorbí barviva na povrch PNP's nebo změnou elektrických vlastností PLGA ve směsi s rhodaminem B. Srovnání s prázdnými nanočásticemi je v grafu 24.

Enkapsulační efektivita rhodaminu B do nanočástic ukazuje tabulka 7. Z těchto hodnot je patrné, že tato metoda enkapsulace poskytuje nízkou enkapsulační efektivitu.

7. ZÁVĚR

V práci byly vyzdviženy přednosti biodegradovatelných polymerů, ze kterých vznikají farmaceutické nanočástice. Dále byly shrnuty metody jejich přípravy a možné využití v medicíně a farmacii.

V experimentální části diplomové práce byly připraveny nanočástice metodou odpařování rozpouštědla a metodou nanoprecipitace. Zkoumán byl zejména vliv rozpouštědla na granulometrické a elektrické vlastnosti částic. Později byly připraveny i PNP's s enkapsulovanou látkou. Z výsledků vyplývá, že pro přípravu malých nanočástic (95-220 nm) s nízkou polydisperzitou (PDI 0,065-0,210) a dostatečnou stabilitou (-19 mV až -41 mV) je vhodnější použít metodu nanoprecipitace. Pro splnění cíle této práce a přípravu částic o průměru okolo 200 nm s nízkou polydisperzitou se při metodě nanoprecipitace nejvíce osvědčila tato rozpouštědla v kombinaci s polymerem T3: AC:ETOH 7:3 (198,2 nm, PDI 0,098), ACN:AC 1:1 (200,9 nm, PDI 0,145) a ACN:AC 7:3 (207,3 nm, PDI 0,174). V kombinaci s PLGA 5/5 se pak jedná o ACN:AC 1:1 (193,7 nm, PDI 0,157) a ACN:AC 7:3 (194,0 nm, PDI 0,084).

U emulzní metody odpařování rozpouštědla vznikaly menší nanočástice z větveného polymeru T3 (97-205 nm, PDI 0,210-0,430). Z PLGA 5/5 vznikaly částice o velikosti 95-530 nm. Jejich polydisperzita byla v rozmezí 0,110-0,730. Pro tvorbu menších nanočástic s nízkou polydisperzitou (96-170 nm, PDI 0,110-0,310) jsou vhodné tato rozpouštědla: DCM:EMK 7:3, DCM:ETAC 7:3, DCM:EMK 1:1, DCM:ETAC 1:1. K tvorbě částic s diametrem okolo 200 nm je nejvhodnější pro T3: EMK (189,4 nm PDI 0,379), ETAC:EMK 1:1 (201,0 nm, PDI 0,300) a ETAC (204,5 nm, PDI 0,431). Pro lineární PLGA 5/5 se jedná jen o EMK (211,3 nm, PDI 0,300). Je tedy zřejmé, že ačkoliv tato metoda poskytuje požadovaný rozměr částic jejich PDI je vyšší než u PNP's vzniklých nanoprecipitací. Stabilita částic připravených odpařováním rozpouštědla se pohybovala od -8,6 mV pro PLGA5/5-DCM:ETAC 1:1 do -41,5 pro PLGA5/5-EMK.

Enkapsulací rhodaminu B vznikaly částice o velikosti 190-300 nm s vysokou polydisperzitou (PDI 0,430-0,440). Tyto PNP's byly velmi stálé (-41 mV až -55 mV). Enkapsulační efektivita této látky byla nízká a v procentech dosahovala hodnot jen okolo 6,3-8%.

8. SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ

Obrázky:

- Obr. 1 Investice do nanotechnologií mezi lety 2000 až 2015. - str. 3
- Obr. 2 Schématické znázornění elektrických vrstev čáscice. - str. 7
- Obr. 3 Schématické rozdělení přípravy polymerních nanočástic. - str. 8
- Obr. 4 Schématické zobrazení dialyzační metody založené na osmóze. - str. 12
- Obr. 5 Schématické zobrazení procesu miniemulzní polymerace. - str. 15
- Obr. 6 Zobrazení rozdílu přístupu buněk RES k modifikované a nemodifikované nanočástici. - str. 18
- Obr. 7 Schématické zobrazení modifikované funkcionalizované nanočástice. - str. 23
- Obr. 8 Kalibrační křivka roztoku rhodaminu B v acetonitrilu při 556 nm. - str. 29
- Obr. 9 Schématické zobrazení měrné kyvety pro měření zeta potenciálu. - str. 30
- Obr. 10 Schématické znázornění funkce zetasizeru ZS 90. - str. 31

Grafy:

- Graf 1 Velikosti nanočástic, seřazené od nejmenšího rozměru, vznikajících z polymeru T3, připravených odpařováním rozpouštědla. - str. 37
- Graf 2 Velikosti nanočástic, seřazené od nejmenšího rozměru, vznikajících z polymeru PLGA 5/5, připravených odpařováním rozpouštědla. - str. 37
- Graf 3 Velikosti nanočástic, seřazené od nejmenšího rozměru, vznikajících z polymeru T3, připravených nanoprecipitací. - str. 38
- Graf 4 Velikosti nanočástic, seřazené od nejmenšího rozměru, vznikajících z polymeru PLGA 5/5, připravených nanoprecipitací. - str. 38
- Graf 5 Srovnání obou polymerů ve vztahu k velikosti částic: DCM, ETAC a EMK (metoda odpařování rozpouštědla). - str. 39
- Graf 6 Srovnání obou polymerů ve vztahu k velikosti částic: DCM:ETAC 1:1, EMK:DCM 1:1 a ETAC:EMK 1:1 (metoda odpařování rozpouštědla). - str. 39
- Graf 7 Srovnání obou polymerů ve vztahu k velikosti částic: DCM:ETAC 7:3 a DCM:EMK 7:3 (metoda odpařování rozpouštědla). - str. 40
- Graf 8 Srovnání obou polymerů ve vztahu k velikosti částic: AC:ETOH 1:1 a AC:ETOH 7:3 (metoda nanoprecipitace). - str. 40

Graf 9 Srovnání obou polymerů ve vztahu k velikosti částic: ACN:AC 7:3, ACN:AC 1:1 a ACN:AC 3:7 (metoda nanoprecipitace). - str.41

Graf 10 Srovnání obou polymerů ve vztahu k velikosti částic: ACN a DMSO (metoda nanoprecipitace). - str.41

Graf 11 Srovnání velikosti nanočástic s enkapsulovaným rhodaminem B a bez enkapsulovaného rhodaminu B (DCM:ETAC 7:3 a DCM:EMK 7:3). - str. 42

Graf 12 Distribuce intenzity rozptýleného světla prázdných nanočástic PLGA (DCM:EMK 7:3). Uvedeno jako srovnání ke grafu 13. - str. 42

Graf 13 Distribuce intenzity rozptýleného světla nanočástic PLGA s rhodaminem B (DCM:EMK 7:3). - str. 43

Graf 14 Zeta potenciál nanočástic (seřazené od nejstabilnějších částic po nejméně stabilní) vznikajících z polymeru T3, připravených odpařováním rozpouštědla. - str. 45

Graf 15 Zeta potenciál nanočástic (seřazené od nejstabilnějších částic po nejméně stabilní) vznikajících z polymeru PLGA 5/5, připravených odpařováním rozpouštědla. - str. 45

Graf 16 Zeta potenciál nanočástic (seřazené od nejstabilnějších částic po nejméně stabilní) vznikajících z polymeru T3, připravených nanoprecipitací. - str. 46

Graf 17 Zeta potenciál nanočástic (seřazené od nejstabilnějších částic po nejméně stabilní) vznikajících z polymeru PLGA 5/5, připravených nanoprecipitací. - str. 46

Graf 18 Výsledný zeta potenciál. Porovnání obou polymerů ve vztahu k zeta potenciálu: DCM, ETAC a EMK (metoda odpařování rozpouštědla). - str. 47

Graf 19 Výsledný zeta potenciál. Porovnání obou polymerů ve vztahu k zeta potenciálu: DCM:ETAC 1:1, EMK:DCM 1:1 a ETAC:EMK 1:1 (metoda odpařování rozpouštědla). - str. 47

Graf 20 Výsledný zeta potenciál. Porovnání obou polymerů ve vztahu k zeta potenciálu: DCM:ETAC 7:3 a DCM:EMK 7:3 (metoda odpařování rozpouštědla). - str. 48

Graf 21 Výsledný zeta potenciál. Porovnání obou polymerů ve vztahu k zeta potenciálu: AC:ETOH 1:1 a AC:ETOH 7:3 (metoda nanoprecipitace). - str. 48

Graf 22 Výsledný zeta potenciál. Porovnání obou polymerů ve vztahu k zeta potenciálu: ACN a DMSO (metoda nanoprecipitace). - str. 49

Graf 23 Výsledný zeta potenciál. Porovnání obou polymerů ve vztahu k zeta potenciálu: ACN:AC 7:3, ACN:AC 1:1 a ACN:AC 3:7 (metoda nanoprecipitace). - str. 49

Graf 24 Srovnání zeta potenciálu nanočástic s enkapsulovaným rhodaminem B a bez enkapsulovaného rhodaminu B (DCM:ETAC 7:3 a DCM:EMK 7:3). - str. 50

9. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Složení vzorků. - str. 34

Tabulka 2 Složení vzorků s rhodaminem B. - str. 35

Tabulka 3 Velikost vzniklých nanočástic a jejich polydisperzita. - str. 35

Tabulka 4 Velikost vzniklých nanočástic s enkapsulovaným rhodaminem B. - str. 36

Tabulka 5 Průměrný zeta potenciál nanočástic. - str. 43

Tabulka 6 Průměrný zeta potenciál nanočástic s enkapsulovaným rhodaminem B. - str. 44

Tabulka 7 Enkapsulační efektivita rhodaminu B. - str. 50

10. POUŽITÁ LITERATURA

- 1 HARPER, T., *The Global Funding Of Nanotechnologies & Its Impact*, [online], Cientifica Ltd, July 2011, [cit. 2018-05-01]
<http://cientifica.com/wpcontent/uploads/downloads/2011/2007/GlobalNanotechnology-Funding-Report-2011.pdf>.
- 2 RABIŠKOVÁ, M.: Nanočástice pro lékové formy. *Remedia*. 2007, **17**(5), s. 495–501, ISSN 0862-8947
- 3 HANS, M.L a A.M LOWMAN.: Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 2002, **6**(4), s. 319-327 ISSN 1359-0286
- 4 ŠNEJDROVÁ, E., DITTRICH, M., Poly (α -hydroxykyseliny) jako nosiče léčiv, *Chemické listy*, 2011, **105**(1), s. 27-33, ISSN 1213-7103
- 5 ASAL, Rahul M., Amol V. JANORKAR a D. E. HIRT.: Poly(lactic acid) modifications, *Progress in Polymer Science*, 2010, **35**(3), s. 338-356, ISSN 0079-6700
- 6 GRIZZI, I., H. GARREAU, S. LI a M. VERT.: Hydrolytic degradation of devices based on poly(dl-lactic acid) size-dependence, *Biomaterials*, 1995, **16**(4), s. 305-311, ISSN 0142-9612
- 7 GÖPFERICH, A.: Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*, 1996, **17**(2), 103-114, ISSN 0142-9612
- 8 MIDDLETON, John C a Arthur J TIPTON.: Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices, *Biomaterials*, 2000, **21**(23), s. 2335-2346, ISSN 0142-9612
- 9 JÖRG KREUTER.: *Colloidal drug delivery systems*, 1994, New York, NY u.a: Dekker, 368 s., ISBN 9780824792145

-
- 10 RAO, J. Prasad a Kurt E. GECKELER.: Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters, *Progress in Polymer Science*, 2011, **36**(7), s. 887-913, ISSN 00796700
- 11 *Zetasizer Nano Series User Manual, "Zeta Potential Theory," Chapter 13*, Apr., 2013, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Haydon, UK
- 12 VANDERHOFF JW, EL AASSER MS, UGELSTAD J.: *Polymer emulsification process*, Patent No: US 4,177,177A. Apr. 12, 1979
- 13 ALLÉMANN, E., R. GURNY a E. DOELKER.: 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), 247-253, ISSN 0378-5173
- 14 FESSI, H., F. PUISIEUX, J.Ph. DEVISSAGUET, N. AMMOURY a S. BENITA.: Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement, *International Journal of Pharmaceutics*, 1989, **55**(1), ISSN 03785173
- 15 MOINARD-CHÉCOT, D., Y. CHEVALIER, S. BRIANÇON, L. BENEY a H. FESSI.: Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion–diffusion process, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2008, **317**(2), s. 458-468, ISSN 0021-9797
- 16 FERRANTI, V, H MARCHAIS, C CHABENAT, A.M ORECCHIONI a O LAFONT.: Primidone-loaded poly-ε-caprolactone nanocapsules: incorporation efficiency and in vitro release profiles, *International Journal of Pharmaceutics*, 1999, **193**(1), s. 107-111, ISSN 0378-5173

-
- 17 LINCE, F., D. L. MARCHISIO a A. A. BARRESI.: Strategies to control the particle size distribution of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2008, **322**(2), s. 505-515
ISSN 0021-9797
- 18 SLAVÍČEK, A.: Polyesterové nanočástice s terbinafinem, Diplomová práce, 2012, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 65 s
- 19 CHRONOPOULOU, L., I. FRATODDI, C. PALOCCI, I. VENDITTI a M. V. RUSSO.: Osmosis Based Method Drives the Self-Assembly of Polymeric Chains into Micro- and Nanostructures, *Langmuir*, 2009, **25**(19), s. 11940-11946, ISSN 0743-7463
- 20 YORK, P.: Strategies for particle design using supercritical fluid technologies, *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1999, **2**(11), s. 430-440, ISSN 1461-5347
- 21 CHERNYAK, Y., F. HENON, R. B. HARRIS, R. D. GOULD, R. K. FRANKLIN, J. R. EDWARDS, J. M. DESIMONE a R.G. CARBONELL.: Formation of Perfluoropolyether Coatings by the Rapid Expansion of Supercritical Solutions (RESS) Process. Part 1: Experimental Results, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2001, **40**(26), s. 6118-6126, ISSN 0888-5885
- 22 MEZIANI, M. J., P. PATHAK, R. HUREZEANU, M. C. THIES, R. M. ENICK a Y. SUN.: Supercritical-Fluid Processing Technique for Nanoscale Polymer Particles, *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, **43**(6), s. 704-707 ISSN 1433-7851
- 23 MEZIANI, M. J., P. PATHAK, W. WANG, T. DESAI, A. PATIL a Y. SUN.: Polymeric Nanofibers from Rapid Expansion of Supercritical Solution, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2005, **44**(13), s. 4594-4598, ISSN 0888-5885

-
- 24 SULÍKOVÁ, B.: Biodegradabilní submikronové částice s terbinafinem, Rigorózní práce, 2012, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 94 s
- 25 VRANCKX, H., DEMOUSTIER, M., DEELERS, M.: A new nanocapsule formulation with hydrophilic core: application to the oral administration of salmon calcitonin in rats, *International Journal of Pharmaceutics*, 1996, **42**(5), s.345-347, ISSN 0939-6411
- 26 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
- 27 HEARN, J., M. C. WILKINSON, A. R. GOODALL a M. CHAINEY.: Kinetics of the surfactant-free emulsion polymerization of styrene: -The post nucleation stage, *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*, 1985, **23**(7), s. 1869-1883, ISSN 0360-6376
- 28 KRIWET, B., E. WALTER a T. KISSEL.: 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 01683659
- 29 ANTONIETTI, M., LANDFESTER, K: Polyreactions in miniemulsions, *Progress in Polymer Science*, 2002, **27**(4), s. 689-757 ISSN 0079-6700
- 30 ARODE, S.K., S.S. KULKARNI, A.K. SURESH a R.A. MASHELKAR.: New insights into kinetics and thermodynamics of interfacial polymerization, *Chemical Engineering Science*, 1998, **53**(15), s. 2649-2663, ISSN 0009-2509
- 31 AL KHOURI FALLOUH, N., L. ROBLOT-TREUPEL, H. FESSI, J.Ph DEVISSAGUET a F. PUISIEUX.: Development of a new process for the

manufacture of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules, *International Journal of Pharmaceutics*, 1986, **28**(2-3), s. 125-132, ISSN 0378-5173

32 PUGLISI, G., M. FRESTA, G. GIAMMONA a C.A. VENTURA.: Influence of the preparation conditions on poly(ethylcyanoacrylate) nanocapsule formation, *International Journal of Pharmaceutics*, 1995, **125**(2), s. 283-287, ISSN 0378-5173

33 DRIOLI, E., A. CRISCUOLI a E. CURCIO.: Membrane Contactors and Catalytic Membrane Reactors in Process Intensification, *Chemical Engineering & Technology*, 2003, **26**(9), s. 975-981, ISSN 0930-7516

34 GREF, R., M. LÜCK, P. QUELLEC, M. MARCHAND, E. DELLACHERIE, S. HARNISCH, T. BLUNK a R.H MÜLLER.: 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

35 LEROUX, J-C., E. ALLÉMANN, F. DE JAEGHERE, E. DOELKER a R. GURNY.: Biodegradable nanoparticles — From sustained release formulations to improved site specific drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 1996, **39**(2-3), s. 339-350, ISSN 0168-3659

36 LI, Ya-P., Y-Y. PEI, X-Y. ZHANG, et al.: PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats, *Journal of Controlled Release*, 2001, **71**(2), s. 203-211, ISSN 0168-3659

-
- 37 VILA, A., A. SÁNCHEZ, M. TOBÍO, P. CALVO a M.J. ALONSO.: Design of biodegradable particles for protein delivery, *Journal of Controlled Release*, 2002, **78**(1-3), s. 15-24, ISSN 0168-3659
- 38 TOBÍO, M., A. SÁNCHEZ, A. VILA, I. SORIANO, C. EVORA, J.L VILA-JATO a M.J ALONSO.: The role of PEG on the stability in digestive fluids and in vivo fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2000, **18**(3-4), s. 315-323, ISSN 0927-7765
- 39 JAIN, A. K., M. DAS, N. K. SWARNAKAR a S. JAIN.: Engineered PLGA Nanoparticles: An Emerging Delivery Tool in Cancer Therapeutics, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2011, **28**(1), s. 1-45, ISSN 0743-4863
- 40 REDHEAD, H.M., S.S. DAVIS a L. ILLUM.: 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
- 41 JANES, K.A., P. CALVO a M.J. ALONSO.: Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, **47**(1), s. 83-97, ISSN 0169-409X
- 42 KREUTER, J.: Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, **47**(1), s. 65-81, ISSN 0169-409X
- 43 WILSON, K. D., S. G. RANEY, L. SEKIROV, G. CHIKH, S. D. DEJONG, P. R. CULLIS a Y. K. TAM.: Effects of intravenous and subcutaneous administration on the pharmacokinetics, biodistribution, cellular uptake and immunostimulatory

activity of CpG ODN encapsulated in liposomal nanoparticles, *International Immunopharmacology*, 2007, **7**(8), s. 1064-1075, ISSN 1567-5769

44 DANHIER, F., E. ANSORENA, J. M. SILVA, R. COCO, A. LE BRETON a V. PRÉAT.: PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications, *Journal of Controlled Release*, 2012, **161**(2), s. 505-522, ISSN 0168-3659

45 JIANG, W., R. GUPTA, M. DESHPANDE a S. SCHWENDEMAN.: 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

46 BRUNNER, R., E. JENSEN-JAROLIM a I. PALI-SCHÖLL.: The ABC of clinical and experimental adjuvants-A brief overview, *Immunology Letters*, 2010, **128**(1), s. 29-35, ISSN 0165-2478

47 ALEXIS, F., E. PRIDGEN, L. K. MOLNAR a O. C. FAROKHZAD.: Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles, *Molecular Pharmaceutics*, 2008, **5**(4), s. 505-515, ISSN 1543-8384

48 KELLY, C., C. JEFFERIES a S-A CRYAN.: Targeted Liposomal Drug Delivery to Monocytes and Macrophages, *Journal of Drug Delivery*, 2011, **2011**, s. 1-11 ISSN 2090-3014

49 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 01429612

-
- 50 BACHMANN, M. F. a G. T. JENNINGS.: Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns, *Nature Reviews Immunology*, 2010, **10**(11), 787-796, ISSN 1474-1733
- 51 CHO, K., X. WANG, S. NIE, Z. CHEN a D. M. SHIN.: Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer, *Clinical Cancer Research*, 2008, **14**(5), s. 1310-1316, ISSN 1078-0432
- 52 MANOLOVA, V., A. FLACE, M. BAUER, K. SCHWARZ, P. SAUDAN a M. F. BACHMANN.: Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size, *European Journal of Immunology*, 2008, **38**(5), s. 1404-1413, ISSN 00142980
- 53 KADOWAKI, N.: Dendritic Cells-A Conductor of T Cell Differentiation, *Allergology International*, 2007, **56**(3), s. 193-199, ISSN 1323-8930
- 54 BEKEREDJIAN-DING, I. a G. JEGO.: Toll-like receptors - sentries in the B-cell response, *Immunology*, 2009, **128**(3), s. 311-323, ISSN 0019-2805
- 55 ZHANG, Z., S. TONGCHUSAK, Y. MIZUKAMI, et al.: Induction of anti-tumor cytotoxic T cell responses through PLGA-nanoparticle mediated antigen delivery, *Biomaterials*, 2011, **32**(14), s. 3666-3678, ISSN 0142-9612
- 56 HAMDY, S., O. MOLAVI, Z. MA, et al.: Co-delivery of cancer-associated antigen and Toll-like receptor 4 ligand in PLGA nanoparticles induces potent CD8+ T cell-mediated anti-tumor immunity, *Vaccine*, 2008, **26**(39), s. 5046-5057, ISSN 0264-410X

-
- 57 YAGUCHI, T., H. SUMIMOTO, C. KUDO-SAITO, et al.: The mechanisms of cancer immunoescape and development of overcoming strategies, *International Journal of Hematology*, 2011, **93**(3), s. 294-300, ISSN 0925-5710
- 58 MOLAVI, O., A. MAHMUD, S. HAMDY, R. W. HUNG, R. LAI, J. SAMUEL a A. LAVASANIFAR.: 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. 364-374, ISSN 1543-8384
- 59 MASUMURA Y., H. MAEDA.: A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs, *Cancer Research*, 1986, **46**(12), s. 6387–6392, ISSN 1538-7445
- 60 DANHIER, F., O. FERON a V. PRÉAT.: To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 2010, **148**(2), s. 135-146, ISSN 0168-3659
- 61 ROSEN, J. E., L. CHAN, D-B. SHIEH a F. X. GU.: Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2012, **8**(3), s. 275-290, ISSN 15499634
- 62 PARK, J., P. M. FONG, J. LU, K. S. RUSSELL, C. J. BOOTH, W. M. SALTZMAN a T. M. FAHMY.: PEGylated PLGA nanoparticles for the improved delivery of doxorubicin, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2009, **5**(4), s. 410-418, ISSN 15499634

-
- 63 WOHLFART, S., A. S. KHALANSKY, S. GELPERINA, O. MAKSIMENKO, C. BERNREUTHER, M. GLATZEL, J. KREUTER a M. G. CASTRO.: Efficient Chemotherapy of Rat Glioblastoma Using Doxorubicin-Loaded PLGA Nanoparticles with Different Stabilizers, *PLoS ONE*, 2011, **6**(5), e19121, ISSN 1932-6203
- 64 DANHIER, F., N. LECOUTURIER, B. VROMAN, C. JÉRÔME, J. MARCHAND-BRYNAERT, O. FERON a V. PRÉAT.: Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation, *Journal of Controlled Release*, 2009, **133**(1), s. 11-17,ISSN 01683659
- 65 DERAKHSHANDEH, K., M. ERFAN a S. DADASHZADEH.: Encapsulation of 9-nitrocamptothecin, a novel anticancer drug, in biodegradable nanoparticles: Factorial design, characterization and release kinetics, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2007, **66**(1), s. 34-41, ISSN 0939-6411
- 66 LIANG, C., Y. YANG, Y. LING, Y. HUANG, T. LI a X. LI.: Improved therapeutic effect of folate-decorated PLGA–PEG nanoparticles for endometrial carcinoma, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2011, **19**(13), s. 4057-4066, ISSN 0968-0896
- 67 JAIN, A. K., N. K. SWARNAKAR, C. GODUGU, R. P. SINGH a S. JAIN.: 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
- 68 ACHARYA, S. a S. K. SAHOO.: 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

-
- 69 WANG, Y., Y. W. NG, Y. CHEN, B. SHUTER, J. YI, J. DING, S.-C. WANG a S. S. FENG.: 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
- 70 GREF, R., Y. MINAMITAKE, M. PERACCHIA, V. TRUBETSKOY, V. TORCHILIN a R. LANGER.: Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres, *Science*, 1994, **263**(5153), s. 1600-1603, ISSN 0036-8075
- 71 SIMONE, E., B.-S. DING a V. MUZYKANTOV.: Targeted delivery of therapeutics to endothelium, *Cell and Tissue Research*, 2009, **335**(1), s.283-300, ISSN 0302-766X
- 72 HORISAWA, E., K. KUBOTA, I. TUBOI, K. SATO, H. YAMAMOTO, H. TAKEUCHI a Y. KAWASHIMA.: Size-dependency of DL-lactide/glycolide copolymer particulates for intra-articular delivery system on phagocytosis in rat synovium, *Pharmaceutical Research*, 2002, **19**(2), s. 132-139, ISSN 0724-8741
- 73 HORISAWA, E., T.i HIROTA, S. KAWAZOE, J. YAMADA, H. YAMAMOTO, H. TAKEUCHI a Y. KAWASHIMA.: Prolonged anti-inflammatory action of DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres containing betamethasone sodium phosphate for an intraarticular delivery system in antigen-induced arthritic rabbit, *Pharmaceutical Research*, 2002, **19**(4), s. 403-410, ISSN 0724-8741
- 74 *Zetasizer Nano Series User Manual*, "Size Theory," Chapter 11, Apr., 2013, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Haydon, UK
- 75 LIKHODII, S. S., I. SERBANESCU, M. A. CORTEZ, P. MURPHY, O. C. SNEAD a W. M. BURNHAM.: Anticonvulsant properties of acetone, a brain

ketone elevated by the ketogenic diet, *Annals of Neurology*, 2003, **54**(2), s. 219-226, ISSN 0364-5134

76 WEXLER, Philip a Bruce D. ANDERSON, *Encyclopedia of toxicology*, 2nd ed. Oxford: Elsevier, c2005. ISBN 0-12-745354-7