

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické technologie



Diplomová práce

Formulace PLGA/Ag nanočástic
Formulation of PLGA/Ag nanoparticles

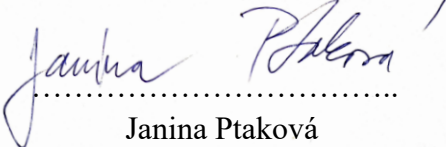
Bc. Janina Ptaková

2025

Prohlášení:

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

Dne 12. 5. 2025
v Hradci Králové



Janina Ptaková

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce Mgr. Monice Smékalové, Ph.D. za ochotu při vedení mé diplomové práce, za její vstřícný a trpělivý přístup, cenné rady a poskytnutý materiál. Také bych chtěla poděkovat panu Ing. Miloši Petříkovi za ochotu a pomoc při měření vzorků. Závěrem bych chtěla poděkovat svým přátelům a také mé rodině za velkou podporu během magisterského studia.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutická technologie

Školitel: Mgr. Monika Smékalová, Ph.D.

Posluchač: Bc. Janina Ptaková

Název diplomové práce: Formulace PLGA/Ag nanočástic

Předmětem této diplomové práce byla formulace nanočástic (AgNP) stříbra a jejich enkapsulace do kyseliny poly(mléčné-ko-glykolové) (PLGA) s cílem vytvořit nanočástice v dostatečné velikosti s vysokou enkapsulační efektivitou, aby mohly být použity pro cílený transport.

První část práce se zabývá syntézou AgNP. AgNP byly připraveny chemickou redukcí za použití maltózy a tetrahydridoboritanu sodného jako reduktantů. Částice připravené s tetrahydridoboritanem sodným vykazovaly menší velikost a vyšší stabilitu než ty připravené s maltózou.

Druhá část práce se zabývá přípravou PLGA a formulací PLGA/Ag nanočástic. PLGA se používalo v koncentraci 1,5, 3,0 a 6,0 mg·cm⁻³ a nanočástice stříbra byly použity v koncentracích 0,005, 0,010, 0,050 a 0,100 mg·cm⁻³.

Poslední část práce je zaměřena na separaci PLGA/Ag nanočástic. Separace byla zkoušena více metodami. První metodou byla agregace pomocí agregačních činidel. Jako agregační činidla byl použit chlorid sodný, poly(diallyldimethylammonium) chlorid, cetrimonium bromid a tetrahydrát dusičnanu vápenatého. Druhou metodou separace byla centrifugace. Enkapsulační efektivita byla hodnocena nepřímo, stanovením neenkapsulovaných AgNP. Odseparované nanočástice poté byly proměřeny metodou ICP-OES. Nejvyšší enkapsulační efektivita (72 % ± 13 %) byla stanovena pro systém připravený z 6 mg·cm⁻³ PLGA a 0,010 mg·cm⁻³ AgNP.

Klíčová slova:

Nanočástice, stříbro, PLGA, cílená, terapie

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Pharmaceutical technology

Mentor: Mgr. Monika Smékalová, Ph.D.

Student: Bc. Janina Ptaková

Title of Thesis: Formulation of PLGA/Ag nanoparticles

The subject of this thesis was the formulation of silver nanoparticles (AgNPs) and their encapsulation in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) in order to produce nanoparticles of sufficient size with high encapsulation efficiency to be used for targeted transport.

The first part of this work deals with the synthesis of AgNPs. AgNPs were prepared by chemical reduction using maltose and sodium tetrahydridoborate as reductants. The particles prepared with sodium tetrahydridoborate showed smaller size and higher stability than those prepared with maltose.

The second part of the work deals with the preparation of PLGA and the formulation of PLGA/Ag nanoparticles. PLGA was used at concentrations of 1,5, 3,0 and 6,0 mg·cm⁻³ and silver nanoparticles were used at concentrations of 0,005, 0,010, 0,050 and 0,100 mg·cm⁻³.

The last part of the work is focused on the separation of PLGA/Ag nanoparticles. The separation was tested by several methods. The first method was aggregation using aggregation reagents. Sodium chloride, poly(diallyldimethylammonium) chloride, cetrimonium bromide and calcium nitrate tetrahydrate were used as aggregating agents. The second method of separation was centrifugation. The encapsulation efficiency was evaluated indirectly by determining the unencapsulated AgNPs. The separated nanoparticles were then screened by ICP-OES. The highest encapsulation efficiency (72% ± 13%) was determined for the system prepared from 6 mg·cm⁻³ PLGA and 0,010 mg·cm⁻³ AgNPs.

Keywords:

Nanoparticles, silver, PLGA, targeted, therapy

Obsah

1	Zadání a cíl práce	8
2	Seznam použitých zkratk	9
3	Úvod	10
4	Teoretická část	11
4.1	Disperzní soustavy	11
4.2	Koloidní soustavy	12
4.2.1	Vlastnosti koloidních soustav	12
4.2.2	Metody přípravy koloidních soustav	14
4.3	Anorganické nanočástice	15
4.4	Nanočástice stříbra	18
4.4.1	Příprava nanočástic stříbra	18
4.4.2	Stabilizace nanočástic	19
4.4.3	Využití nanočástic stříbra	20
4.4.4	Toxicita nanočástic stříbra	21
4.5	PLGA	23
4.6	Příprava PLGA nanočástic	24
4.7	Biodegradace PLGA	25
4.8	Využití PLGA nanočástic	26
5	Experimentální část	29
5.1	Chemikálie	29
5.2	Použité přístroje a zařízení	29
5.3	Příprava nanočástic stříbra	30
5.4	Příprava PLGA nanočástic	32
5.5	Příprava PLGA/Ag nanočástic	32
5.6	Separace PLGA/Ag nanočástic	32
5.7	Stanovení enkapsulační efektivity a drug loading	33

6	Výsledky a diskuze	34
6.1	Nanočástice stříbra	34
6.2.	Nanočástice PLGA	38
6.3.	Separace PLGA/Ag	39
6.4.	Enkapsulační efektivita a Drug loading	50
7	Závěr	53
8	Seznam použité literatury	54

1 Zadání a cíl práce

Cílem této diplomové práce byla příprava AgNP a jejich enkapsulace do polymerního nosiče (PLGA) pro účely cíleného transportu léčiv.

Práce se skládala z následujících kroků:

- 1) Literární rešerše se zaměřením na koloidní systémy, jejich vlastnosti, metody příprav a využití.
- 2) Příprava AgNP využitím několika metod a stabilizačních činidel.
- 3) Příprava hybridních nanočástic AgNP a PLGA.
- 4) Volba vhodné separační metody pro hybridní nanočástice a neenkapsulovanou frakci AgNP.
- 5) Stanovení účinnosti enkapsulace pomocí ICP-OES.

2 Seznam použitých zkratek

AgNP – nanočástice stříbra

ATP – adenosintrifosfát

BPLP – biodegradable photoluminiscent polymer = biologicky rozložitelný fotoluminiscenční polymer

CNP – nanočástice uhlíku

CNT – carbon nanotubes = uhlíkové nanotrubičky

CTAB – cetrimonium bromid

CuNP – nanočástice mědi

DLS – dynamic light scattering = dynamický rozptyl světla

EMA – European Medicines Agency = Evropská léková komise

FBGC – foreign body giant cells = mnohояderné buňky, které vznikly sloučením makrofágů

FDA – Food and Drugs Administration = Úřad pro kontrolu potravin a léčiv

HT-29 – rakovinné buňky kolorektálního adenokarcinomu

IFN γ – interferon gamma

MRSA – methicillin rezistentní *Staphylococcus aureus*

MWCNT – multi-walled carbon nanotube = mnohostěnná uhlíková nanotrubička

PAA – polyakrylová kyselina

PDDA – poly(diallyldimethylammonium) chlorid

PEG – polyethylenglykol

PGA – polyglycolic acid = polyglykolová kyselina

PLA – polylactic acid = polymléčná kyselina

PLGA – poly(lactic-co-glycolic) acid = kyselina poly(mléčná-ko-glykolová)

PVA – polyvinylalkohol

PVP – polyvinylpyrrolidon

ROS – reactive oxygen species = reaktivní formy kyslíku

SDS – sodium dodecyl sulfate = dodecylsulfát sodný

SeNP – nanočástice selenu

SWCNT – single-walled carbon nanotube = jedностěnná uhlíková nanotrubička

VREF – vankomycin rezistentní *Enterococcus faecium*

3 Úvod

Nanotechnologie se stávají posledních několik desítek let stále atraktivnějším oborem pro nové objevy na poli cílené distribuce léčiv. Nanotechnologie spojují více odvětví dohromady – inženýrství, medicínu, biologii, chemii, fyziku. Jedním z důvodů je stále se rozšiřující antibiotická rezistence k známým antibiotikům. Nové látky se hledají stále hůře, a proto se zkouší různé vlastnosti nanočástic a to jak samotné nanočástice tak jejich kombinace s antibiotiky. Nejslibnějšími kandidáty jsou nanočástice stříbra právě díky jejich antibakteriálnímu, antivirovému a obecně antimikrobnímu účinku. Byly zkoušeny i jiné nanočástice, nicméně efekt některých nanočástic byl patrný až ve vysokých koncentracích, což stále činí nanočástice stříbra jedněmi s neefektivnějších a nejvíce prominentních nanočástic v antibiotické léčbě i přes jejich nescifickou toxicitu a možnost vyvinutí rezistence. Dále se testují také kombinace nanočástic s cytostatiky, což by jednou mohlo vést k objevení účinné a hlavně cílené léčby rakoviny. Výhody cílené léčby jsou větší efektivita, menší spotřeba léčiva, menší toxicita s nežádoucími účinky a větší biologická dostupnost. Této cílené léčby se jako jednou z možností dosahuje přes makrofágy. Makrofágy pohlcují molekuly větší než 100 nm. Pokud se stříbrné nanočástice inkorporují do jiného materiálu, kterým je například kyselina poly(mléčná-ko-glykolová), umožní to molekulu zvětšit na detekovatelnou velikost pro makrofágy, kteří ji poté pohltnou. Pohlcení nanočástic tak umožní, transportovat je do nádorové tkáně, potlačit zánět okamžitě v daném místě zablokováním produkce prozánětlivých markerů samotnými makrofágy nebo zabitím samotných patogenů, kteří přežívají v makrofázích.

4 Teoretická část

4.1 Disperzní soustavy

Disperzní soustavy sestávají ze dvou částí. První částí je vnější spojitá část (nazývaná též dispergující) a druhou je část vnitřní (dispergovaná), která může být ve formě drobných kapiček či částic. Disperzní soustava je tvořena jakýmkoliv dvěma skupenstvími, vyjma skupenství plyn – plyn.^{1,2}

Je-li soustava tvořená dvěma fázemi, jedná se o heterogenní soustavu (např. olej a voda). Pokud je však soustava tvořena pouze jednou fází, ale dvěma látkami (jedna látka se v druhé rozpouští), jedná se o homogenní soustavu (např. kuchyňská sůl ve vodě).³

Jednotlivé disperzní soustavy můžeme rozdělit na několik typů. Jedním možným dělením je podle velikosti či tvaru částic. Velikost částic se vyjadřuje stupněm disperzity, což znamená, že čím jsou částice jemnější, tím je stupeň disperzity vyšší.³

Pokud máme v soustavě všechny částice stejně velké, jedná se o soustavu monodisperzní. Jsou-li velikosti různé, jedná se o polydisperzní soustavu. Mají-li v soustavě všechny částice stejný tvar, jedná se o soustavu homodisperzní. Heterodisperzní soustava má tvar částic různý.³

Soustavy s velikostí částic pod 1 nm se nazývají molekulární (analytické) disperze. Částice v nich jsou tak malé, že nejsou vidět elektronovým mikroskopem a jsou na pomezí mezi pravými a koloidními roztoky. Typickým příkladem je glukóza nebo ionty. Koloidní roztoky mají velikost částic mezi 1 nm a 1 μm , přičemž nejsou vidět optickým mikroskopem, ale elektronovým ano. Zde lze jako příklad uvést sérový albumin nebo částice koloidního stříbra. Třetím typem jsou hrubé disperze, které mají svou velikost částic nad 1 μm a sem se řadí suspenze a emulze.^{1,2}

Dle tvaru částic existují tři typy systémů – korpuskulárně, laminárně a fibrilárně disperzní. Korpuskulární systém má všechny částice kulaté. Laminární systém má částice ve tvaru destiček či lamel. Ve fibrilárním systému jsou částice jako vlákna či tyčinky.³

4.2 Koloidní soustavy

Koloidní soustavy mají velikost částic mezi 1 nm a 1 μm . Částice nejsou vidět pouhým okem, ale lze je zobrazit elektronovým mikroskopem. Na základě skupenství dispergující a dispergované fáze lze koloidní soustavy rozdělit do 8 skupin (tab. 1). Skupiny, které patří do plynného disperzního prostředí, mají předponu *aero* (z latiny, předpona *aero* se používá se slovy ve významu vzduchu nebo letadla). Skupiny patřící do kapalného disperzního prostředí mají předponu *lyo* (z řečtiny, předpona *lyo* se používá v souvislosti s rozpustností) a zbylé skupiny jsou v pevném disperzním prostředí označeny jako *soly*.³

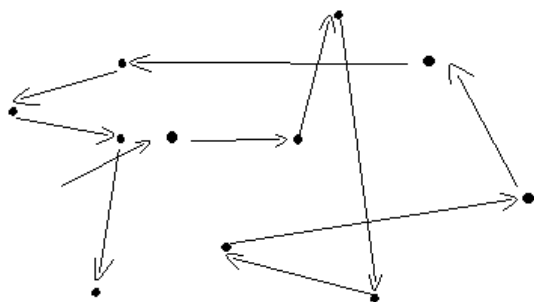
Tabulka 1: Klasifikace koloidních soustav podle složení fází⁴

Dispergující prostředí	Dispergovaná fáze	Označení koloidní soustavy (příklad)
plynné	kapalná	Aerosol (mlha)
	pevná	Aerosol (dým)
kapalné	plynná	Pěna (mýdlová pěna)
	kapalná	Emulze (tělové mléko)
	pevná	Lyosol (barviva)
pevné	plynná	Tuhá pěna (pěna plastu)
	kapalná	Tuhá emulze (černý fosfor)
	pevná	Tuhý sol (drahokam)

Dále lze koloidní soustavy rozdělit podle počtu fází. Fázové koloidy mají více než jednu fázi, z čehož vyplývá, že jsou heterogenní a tím pádem i málo stabilní a pokud koagulují, tak je koagulace nevratná. Druhým typem jsou molekulární koloidy. Ty mají jen jednu fázi, z čehož vyplývá, že vznikají rozpouštěním a jsou tedy homogenní a stálé.⁵

4.2.1 Vlastnosti koloidních soustav

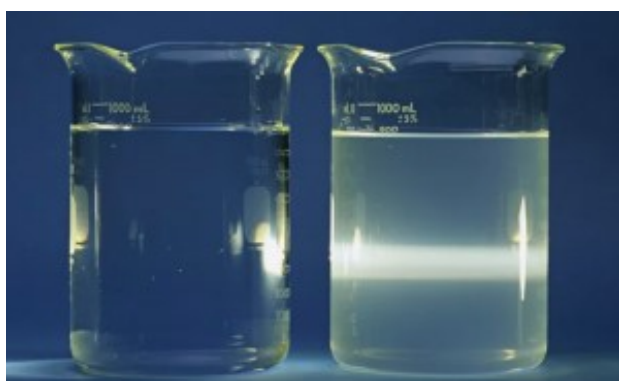
Částice se v koloidní soustavě neustále chaoticky pohybují a narážejí do sebe. Tomuto jevu se říká Brownův pohyb (obr. 1). Ten je intenzivnější, čím jsou částice menší a teplota vyšší.^{3,5}



Obr. 1: Brownův pohyb částice

Koloidní částice nejsou výjimkou a i na ně působí gravitační síla, což má za následek jejich sedimentaci. Proti gravitační síle působí síla vztlaková. Při vyrovnání těchto sil dojde k rovnoměrnému rozptýlení v soustavě. Podstatnou roli hraje také viskozita prostředí. Čím viskóznější prostředí, tím částicím sedimentace trvá déle a je potřeba větší odstředivé síly.^{3,5}

Částice koloidních soustav dále vykazují specifické optické vlastnosti, jakým je kupříkladu Tyndallův jev – rozptyl světla (obr. 2), který je pro ně zcela charakteristický. Jak silný bude rozptyl a jestli k němu dojde, určuje velikost částic a vlnová délka. Platí, že s větší vlnovou délkou je rozptyl větší. Dopadající světlo předá energii kovové částici koloidu, na níž dopadá a vyvolá tím na povrchu elektronovou oscilaci, která se nazývá povrchový plasmon. Změna v intenzitě dopadajícího a odraženého světla se projeví změnou vlnové délky, která odpovídá velikosti částic a používá se v UV/VIS spektroskopii.^{3,5,6}



Obr. 2: Tyndallův jev (vpravo dispergované částice rozptylující světlo)⁷

Koloidní soustavy vykazují i elektrické vlastnosti. Tyto vlastnosti vznikají díky přítomnosti elektrického náboje na fázovém rozhraní mezi částicemi koloidu

a disperzním prostředím. Náboj koloidu je určen buď ionizací funkčních skupin, nebo absorpcí iontů disperzního činidla. Náboj vytváří elektrické pole, které k sobě přitahuje protiionty a vytváří tak elektrickou dvojvrstvu. Dvojvrstva je složená z kompaktní (vnitřní) a difúzní (vnější) vrstvy. Ve vnitřní vrstvě působí adsorpční síly, které udržují dvojvrstvu i při pohybu částice v disperzním prostředí. Oproti tomu v difúzní vrstvě jsou pouze elektrostatické síly. Na rozhraní těchto vrstev se vyskytuje nevykompenzovaný náboj, který zodpovídá za interakci částice s vnějším elektrickým polem, což vede k pohybu částice v prostředí. Tento nevykompenzovaný náboj se nazývá elektrokinetický nebo též ζ -potenciál. Zda bude potenciál kladný či záporný ovlivňuje specifická adsorpce iontů a také koncentrace elektrolytu (čím vyšší koncentrace, tím nižší ζ -potenciál a také nižší stabilita elektrolytu). Elektrostaticky stabilní roztok má stabilní elektrickou dvojvrstvu, kde převyšují odpudivé síly nad těmi přitažlivými a tím nedochází k agregaci. V případě narušení elektrické stability dojde ke změně odpudivých sil a tím ke koagulaci koloidních částic. Tímto typem narušení se zabývá DLVO teorie. DLVO teorie zahrnuje dva typy koagulace: neutralizační a koncentrační. Neutralizační koagulace je způsobena adsorpčními jevy. Překročí-li počet protiiontů velikost povrchového náboje, dojde ke snížení ζ -potenciálu a tím odpudivých sil, což má za následek agregaci částic. Koncentrační koagulace je způsobena stlačením elektrické dvojvrstvy přidáním elektrolytu, což vede ke snížení ζ -potenciálu a následné agregaci částic při překročení koagulačního prahu.³

4.2.2 Metody přípravy koloidních soustav

Fázové koloidy se připravují buď metodami dispergačními (top-down), nebo kondenzačními (bottom-up). Mezi dispergační metody patří mechanické rozrušování hrubých disperzí a to konkrétně drcení, mletí či působením ultrazvuku. Další dispergační metodou je elektrické rozrušování, kam patří stejnosměrný oblouk, vysokofrekvenční metoda a katodické rozprašování (elektrolýza). Poslední dispergační metodou je peptizace. Metody, kterými se koloidy připravují z pravých roztoků, se nazývají kondenzační a patří zde změna fyzikálně-chemických podmínek (změna rozpouštědla, teplota, tlak) nebo příprava chemickou reakcí (srážecí, redukční, hydrolytické, podvojná záměna). Jak již bylo zmíněno výše, je nutnost stabilizovat tyto

koloidy ochrannými koloidy (např. želatina), které vytvoří na povrchu obal a tím brání vzájemnému spojování částic.⁵

Molekulární koloidy vznikají rozpouštěním organických látek ve vhodném rozpouštědle. Látky, které se rozpouštějí na tyto koloidy, mají vysokomolekulární hmotnost. Jedná se hlavně o bílkoviny, polysacharidy, polyestery či nukleové kyseliny.⁵

4.3 Anorganické nanočástice

Nejvíce zkoumanými nanočásticemi jsou ty kovové/anorganické – měď, zlato, stříbro, železo, oxid zinečnatý. Anorganické nanočástice vznikají nejčastěji krystalizací z rozpuštěných solí. Nanočástice mají velikost mezi 1–100 nm a mají odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti od makročástic. Příkladem jsou nanočástice zlata. Zlato je běžně známo jako velmi odolný kov mající zlatožluté zbarvení. To však neplatí v případě jeho nanočástic, které mohou nabírat barvy od červené přes fialovou, modrou až do jiných barev v závislosti na velikosti částic (obr. 3).⁸



Obr. 3: Nanočástice zlata⁹

Nanočástice zlata mají své využití například ve farmacii (cílená protinádorová léčba), medicíně (jako kontrastní látky při zobrazovacích metodách) či strojírenství.⁸

Nanočástice selenu (SeNP) vykazují jen malý antimikrobiální efekt, za to protirakovinný efekt mají významný. Protirakovinný efekt závisí na velikosti, tvaru a náboji nanočástic. Bylo však prokázáno, že při konzumaci 200 µg selenu denně se snížila úmrtnost na rakovinu a snížil se i výskyt rakoviny plic, tlustého střeva, prostaty

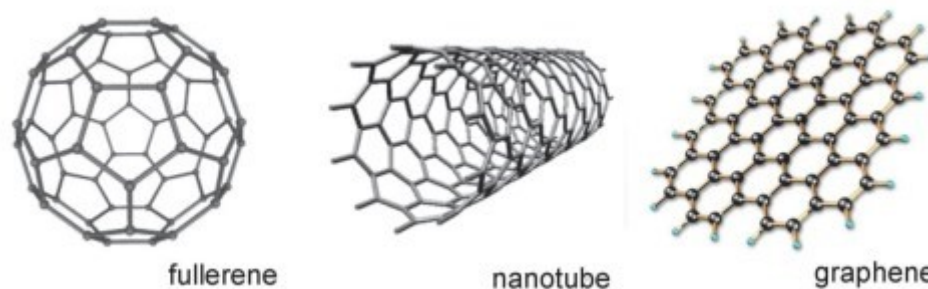
a konečnicku. ¹⁰ SeNP byly použity s anisomycinem, což způsobilo snížení cytotoxicity na normální buňky a zvýšil se tím protirakovinný efekt. ¹¹

Měděné nanočástice (CuNP) si zachovávají elektrickou vodivost, což umožňuje vyrobit z nich vodivý inkoust, který se používá v oblasti elektroniky, ale také se používá jako pojivo u implantátů. ¹² CuNP také absorbují UV záření, čehož by se mohlo využívat v medicínském zobrazování. ¹³ Zachovaly si také své donor-akceptorové vlastnosti, a proto vykazují i antimikrobiální aktivitu. ¹⁴ Poškozují DNA a tím vytváří oxidační stres. Největší efekt byl pozorován u částic, které měly velikost mezi 1 a 10 nm. Na bakterie jako jsou *Escherichia coli* a *Clostridium difficile* měly účinek i částice v rozmezí 22 až 90 nm. ⁸ Bohužel CuNP vykazují také velkou toxicitu. Kumulují se v játrech, ledvinách a slezině. ¹⁵ Také byla pozorována reprodukční toxicita a toxický účinek byl pozorován i v asteroocytech v mozku. ^{16, 17}

Železo je jeden z nejdůležitějších mikroprvků v lidském těle. Nachází se v hemoglobinu či ferritinu. Železo má magnetické vlastnosti, které si zachovávají i nanočástice železa. Používají se nanočástice čistého železa, ale hlavně nanočástice oxidu železa. ²⁰ Jsou studovány převážně z důvodu jejich magnetismu a možnosti použití v zobrazovacích technikách jako je magnetická rezonance. ¹⁸ Lepší magnetické vlastnosti vykazují čisté železné nanočástice, ale bohužel kvůli jejich vysoké reaktivitě se častěji používají nanočástice oxidu železa. ¹⁹ Avšak i přes nepříznivost vysoké reaktivity se zkoušejí nanočástice železa pokryté zlatem v protirakovinné léčbě. ²⁰

Nanočástice oxidu křemičitého jsou dvojího typu – porézní a neporézní. Porézní částice jsou využívány pro dodávání léčiv na základě adsorpce a neporézní částice v sobě léčivo enkapsulují. Využívají se pro dodávání léčiv, DNA či proteinů a také jako látky pro zobrazovací a diagnostické metody. ²¹

Posledními anorganickými nanočásticemi, které se používají, jsou ty z uhlíku (CNP) (obr. 4).



Obr. 4: Typy nanočástic uhlíku ²²

Prvním typem CNP jsou fullereny. Jsou složeny z nejméně 60 uhlíků do podoby fotbalového míče. Fullereny se dělí na 2 typy – endohedrální a exohedrální. Endohedrální fullereny mají uvnitř své molekuly uzavřeny další prvek. ²³ Ty s gadoliniiem inhibovaly růst myšního hepatomu H22, aniž by ovlivnily okolní zdravé buňky. Což poukazuje na fakt, že některé druhy fullerenů by mohly působit chemosenzibilitu nádorových buněk, čímž by se zvýšila efektivita léčby nádorů. ²⁴ Endohedrální fullereny, ale také nacházejí aplikace i jinde jako jsou solární články nebo elektronika. ²⁵ Oproti tomu exohedrální fullereny mají jiné molekuly připojeny na povrchu. ²¹

Další jsou uhlíkové nanotrubičky (CNT). CNT jsou válce složené z navzájem propojených uhlíků, které tvoří šestiúhelníkovou mřížku. Podle počtů vrstev je dělíme na SWCNT (single-walled carbon nanotube) nebo MWCNT (multi-walled carbon nanotube). ²¹ Nanotrubičky se využívají jak k diagnostice, tak ve spojitosti s léčbou. Slouží jako nosiče pro léčiva v cílené léčbě rakoviny, pro vakcíny či antibiotika. Také jsou nosiči DNA v genové terapii nebo slouží jako lešení v regeneraci tkání nebo implantátech díky jejich biokompatibilitě a biodegradaci. Také dokáží projít hemoencefalickou bariérou do mozku, což z nich dělá potenciální nosiče pro léky na léčbu Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby. ²⁶

Posledním typem CNP je grafen. Grafen je plát z navzájem propojených uhlíků tvořících šestiúhelníkovou mřížku. Dalo by se říci, že je to rozříznutá nanotrubička. Jeho výhodou jako nosiče je biokompatibilita, lehkost a velká plocha k navázání molekul pro cílenou léčbu, nicméně je hydrofobní, což vedlo k vytvoření hydrofilního grafen-oxidu. ²⁷ Příkladem jeho použití je nedávné objevení manganu navázaného na grafen, jenž cílí na sacharidy v buněčné stěně patogenu a způsobuje jeho rozklad. Bylo

testováno i jeho pozitivní působení na nejodolnější bakterie jako je methicillin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomycin rezistentní *Enterococcus faecium* (VREF), multirezistentní *E. coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Bohužel efekt byl patrný až ve vysokých koncentracích.²⁸

4.4 Nanočástice stříbra

Stříbro je známo již od starověku. V přírodě se vyskytuje ve formě samotného kovu, ve formě rud – argentit, akantit (Ag_2S), či ve formě minerálů v kombinaci se sulfidy jiných kovů – rtuť zlato, měď či platina (např. argentopyrit, proustit, pyrargyrit či stefanit).²⁹ Je to měkký kov šedobílé barvy s výbornou tepelnou a elektrickou vodivostí. Na základě těchto vlastností je používán v širokém spektru aplikací. První antibakteriální účinky sledovali už starověcí Egypťané a Řekové. Nádoby ze stříbra používali k uskladňování potravin a vody.³⁰ Hippokrates zkoumal účinky práškového stříbra při léčbě zranění a vředů.³¹ V 16. století zkoumal účinky stříbra v léčbě onemocnění a hojení ran i Paracelsus. Od 17. století se začal používat dusičnan stříbrný k hojení ran, vředů, kožních nemocí a v 19. století lékař Carl Siegmund Franz Credé rozšířil použití dusičnanu stříbrného na léčbu novorozenecké konjunktivitidy.³²

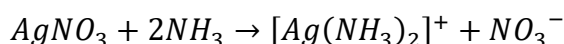
Právě tyto antibakteriální vlastnosti vedly k rychlé expanzi nanočástic stříbra. Výzkum v této oblasti rozšířil jejich použití z medicíny i do ostatních oborů a to na základě jejich fyzikálně chemických vlastností, které byly odlišné od klasického kovového stříbra. Menší částice mají větší povrch, což zajišťuje větší možnost reakcí s patogenem a tím zvýšení antibakteriálního účinku. Tvar částic se také podílí na jejich vlastnostech a využití. Tvary, které mají větší povrch, se rozpouštějí rychleji a tím i rychleji tvoří stříbrné kationty, které poskytují antibakteriální aktivitu.^{31, 33}

4.4.1 Příprava nanočástic stříbra

Nanočástice stříbra jsou nejčastěji připravovány chemickou redukcí působením redukčních činidel na stříbrné kationty. Mezi nejpoužívanější činidla patří cukry, borohydrid sodný a citrát.³⁴

Tollensova metoda je založena na redukcí diaminstříbrného iontu cukrem. Diaminstříbrný ion vzniká při reakci dusičnanu stříbrného s amoniakem v alkalickém

prostředí, které je zajištěno hydroxidem sodným (obr. 5). Použitý cukr jako redukční činidlo může být jak monosaccharid (galaktosa, glukosa) tak i disacharid (laktosa, maltosa). Po finální redukci stříbrného iontu vznikají stříbrné nanočástice. Finální nanočástice je vhodné stabilizovat, čímž se eliminuje jejich tendence agregovat.³⁵



Obr. 5: Vznik diaminstříbrného komplexu

Borohydridová metoda nebo také Creightonova metoda je metoda, kdy se dusičnan stříbrný redukuje pomocí silného redukčního činidla – tetrahydridoboritanem sodným (NaBH₄). Příprava nanočástic touto metodou vede k velmi úzkému spektru velikosti a to kolem 10 nm.³⁶

Jednou z dalších metod z chemických redukcí je citrátová metoda nebo také Lee-Meiselova metoda. Zde se jako redukční činidlo pro redukci stříbrných iontů, jejichž prekurzorem je dusičnan stříbrný, používá citrát sodný, kdy reakce probíhá za varu. Citrát zde také plní úlohu stabilizátoru, což je výhodou. Nevýhodou však je vysoká polydisperzita částic, které jsou navíc méně stabilní než ty připravené pomocí borohydridu.^{37,38}

Další možností je fyzikální redukce, při níž se používají mikrovlny, ultrazvuk nebo gamma záření, případně tzv. zelené metody, které k redukci používají řasy, bakterie, houby či extrakty rostlin.³⁹

4.4.2 Stabilizace nanočástic

Limitujícím problémem přípravy AgNP je jejich nestabilita vůči agregaci. Aby AgNP měly co největší antimikrobní aktivitu, tak je nutná jejich, co nejmenší velikost. Stabilizace se provádí buď elektrostaticky anebo stéricky. Elektrostatická stabilizace pracuje na principu repulzních (odpudivých) sil. Nejčastěji se používají surfaktanty, které interagují s povrchem a na základě jejich náboje je pak určen i náboj celé nanočástice. Tím, že mají výsledné částice všechny stejný náboj, tak nedochází k jejich agregaci, ale navzájem se odpuzují. V případě kladně nabitých částic se nejčastěji používá cetyltrimethylamonium chlorid (CTAC) nebo bromid (CTAB) a u negativně

nabitých se používá dodecylsulfát sodný (SDS). Sterická stabilizace se provádí pomocí polymerů, které se naadsorbují na povrch nanočástic, čímž vytvoří bariéru a částice se tak nemohou agregovat. Příklady syntetických polymerů jsou poly(vinylalkohol) (PVA), poly(vinylpyrrolidon) (PVP), polymléčná kyselina (PLA), polyethylenglykol (PEG), příklady přírodních polymerů jsou chitosan a želatina.³⁹

4.4.3 Využití nanočástic stříbra

AgNP jsou chemicky stabilní, tepelně a elektricky vodivé, čehož se využívá v elektronice a solárních technologiích.⁴⁰ Také mají vysokou antimikrobiální aktivitu, které se využívá především v medicíně, farmacii, kosmetice, textilním průmyslu či ve filtračních zařízeních k desinfekci, jak vody, tak vzduchu.^{39, 41} V dnešní době vysoké antibiotické rezistence, je obzvláště žádáno, aby se našla nová antibiotika nebo jiné látky, které by zabránily šíření bakterií a zároveň by potlačily antibiotickou rezistenci. Antimikrobiální aktivita AgNP se dá rozdělit do více sekcí. První sekcí je antibakteriální a antifungální aktivita. AgNP lépe působí vůči gramnegativním bakteriím než těm grampozitivním. Je to způsobeno tloušťkou jejich buněčné stěny. Gramnegativní bakterie mají tenkou buněčnou stěnu složenou pouze z peptidoglykanu a vrstvy lipopolysacharidu. Naproti tomu grampozitivní bakterie mají tlustou stěnu tvořenou peptidoglykanem, polysacharidy a napříč vrstvami je prostoupena kyselinou teichoovou. I přes to však na některé grampozitivní bakterie působí (např. *S. aureus*). Působí také na některé lidské patogenní houby jako je *Candida albicans* a některé její další druhy, *Malassezia furfur* či druhy rodu *Trichophyton*. Těchto inhibičních účinků je dosaženo vícero mechanismy. Jedním z nich je tvorba volných radikálů Ag či ROS (reaktivní formy kyslíku), které napadnou membránové lipidy bakterií, čímž poškodí jejich funkci a mikrobi zahynou.⁴² Dalším mechanismem je samostatná elektrostatická přitažlivost AgNP k buněčné stěně nebo membráně mikrobů, což způsobí lýzu buněk. Také mohou pronikat do buněk nebo interagovat se samotnými biomolekulami či intracelulárními strukturami. Poruchy permeability membrán způsobí ztrátu obsahu a to jak iontů, tak proteinů nebo samotného ATP, což vede k buněčné smrti. Dalšími mechanismy antimikrobiální aktivity je napadnutí DNA, organel či enzymů, což vede k inhibici tvorby proteinů a tím opět ke smrti buňky.⁴³

Druhou sekcí antimikrobiální aktivity je antivirová aktivita. AgNP, které byly vytvořeny zelenou metodou, kde jako redukční organismus byl použit rod *Panax* (ženšen) vykazovaly aktivitu vůči viru chřipky A (IVA).⁴⁴ Jiné AgNP vykazovaly aktivitu vůči viru lidské imunitní nedostatečnosti (HIV), viru hepatitidy B (HBV), herpes simplex viru (HSV) či lidskému respiračnímu syncytiálnímu viru (RSV).⁴⁵

Poslední sekcí antimikrobiální aktivity je antiprotozoální aktivita. AgNP byly testovány vůči *Leishmania amazonensis* a *Toxoplasma gondii*. U leishmaniózy vykazovaly aktivitu vůči promastigotům (pohyblivé mimobuněčné bičíkaté stádium) i amastigotům (nepohyblivé nitrobuněčné stádium s ukrytým bičíkem) ukrytým v makrofázích. AgNP snížily produkci prozánětlivých markerů tvořených napadnutými makrofágy a zabránily další infekci makrofágů amastigoty.⁴⁶ V případě toxoplasmózy snížily AgNP v koncentraci 3 a 6 μM proliferaci, adherenci i infekci buněk tachyzoidy (forma parazita, ve které se rychle množí a nachází se v akutní fázi onemocnění), ale už nepůsobily na již napadnuté buňky.⁴⁷

Mají také cytotoxickou a apoptickou aktivitu vůči savcím buňkám, což by mohla být jedna z cest k léčbě rakoviny. Byly testovány AgNP bez stabilizátoru na rakovinných buňkách HT-29, kdy bylo zjištěno, že jsou účinné při koncentraci 10^{-4} M a apoptóza je spuštěna po hodinách od aplikace.⁴⁸ Dále byly *in vitro* testovány AgNP proti karcinomu prsu a karcinomu děložního čípku, kdy na AgNP byl navázán rekombinantní IFN γ . Výsledky této studie ukázaly, že kombinace AgNP a IFN γ vedla k indukci apoptózy v rakovinných buňkách.⁴⁹ AgNP vytvářejí ROS, které v nadměrném množství mohou poškozovat i zdravé buňky a tím vytvářet zánět, který může přejít až do formy nekrózy tkání. Aby se zabránilo nekróze, byly AgNP uzavřeny společně s kyselinou askorbovou, která funguje jako antioxidant, do PLGA matrice. Navíc se touto kombinací rozšířil i antimikrobní účinek, který působil i na MRSA.⁵⁰

4.4.4 Toxicita nanočástic stříbra

Aby se toxicita projevila, je nejprve nutná akumulace stříbra či stříbrných iontů v těle. Stříbro se nejvíce kumuluje v játrech, ale nevyhýbá se i jiným orgánům jako je mozek, ledviny, střeva či plíce. Ke snížení toxicity v těle je naopak nutné vyloučení. Vyloučení z těla probíhá cca z 90–99,6 % stolicí (procenta záleží na druhu savce) a zbytek močí.⁵¹ Z těchto čísel lze usoudit, že toxicita stříbra pro lidi a savce je nízká.

Pozorována byla toxicita pouze při požití AgNP ve vysokých dávkách, které činí alespoň 1 600 mg.kg⁻¹ na den stříbra. Tato toxicita se projevovala modrošedým zbarvením kůže (tzv. argyrií).⁵² Nicméně se ukazuje, že tato toxicita nebude zcela zanedbatelná, jak se předpokládalo. Např. *in vitro* studie dělaná na potkanech simulovala orální cestu podání a ukázala, že hlavním vylučovacím orgánem jsou játra. Jaterní buňky tudíž jako první reagovaly na kumulaci AgNP a zjistilo se, že v nízkém množství způsobují oxidační stres, který negativně ovlivňuje mitochondrie a jejich funkci. Pokud nefungují mitochondrie, dojde k poškození či odumření buňky, čímž se AgNP dostávají do krevního řečiště a negativně působí na kmenové buňky. U potkanů, kteří byli delší čas intoxikováni AgNP se vyskytly nekrózy a hyperplazie žlučovodů, což bylo způsobeno stále pokračujícím uvolňováním iontového stříbra.⁵³

AgNP také způsobují neurotoxicitu. Na potkanech bylo pozorováno, že po 28 dnech dojde ke změně koncentrací neurotransmiterů, konkrétně tyto změny byly pozorovány u noradrenalinu, dopaminu a serotoninu.⁵⁴ U člověka byl po velkém množství AgNP pozorován myoklonický status epilepticus.⁵⁵

Dále byla pozorována imunotoxicita, kdy se po vysokých dávkách AgNP u potkanů projevil autoimunitní stav a také došlo ke snížení hmotnosti brzlíku po 28 dnech podávání nanočástic.⁵⁴

Dochází také k reprodukční toxicitě, kdy u samců byl zjištěn přestup AgNP z krve do varlat, kde se kumulují a poškozují vývoj spermíí. U samic docházelo k zánětům, apoptóze a degeneraci folikulů vaječníků, což mělo vliv na vznik oocytů.⁵⁶

Environmentální toxicitu je díky komerčnímu použití AgNP v textilech také důležitá. Bylo zjištěno, že některé druhy ponožek mohou po pouhých čtyřech praních ztratit téměř sto procent stříbra, které poté odchází do odpadních vod a dále do řek, kde ovlivňuje vodní živočichy.⁵⁷ Lubick ve své publikaci píše o tom, že pro sledování toxicity byly sledovány jak samotné ionty stříbra, tak i nanočástice. Jako modelový organismus byla použita řasa *Chlamydomonas reinhardtii*. Bylo zjištěno, že po první hodině ionty stříbra inhibovaly fotosyntézu osmnáctkrát více než nanočástice. Nicméně po dvou hodinách nastal zlom a nanočástice začaly uvolňovat vlastní ionty stříbra, což vedlo k ještě větší toxicitě. Pro neutralizaci toxicity byl použit cystein, přičemž mnohem větší množství muselo být použito na neutralizaci nanočástic než

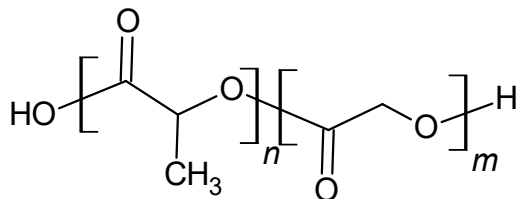
samotných iontů. Z tohoto vyplývá, že k dosažení stejné míry toxicity stačí mnohem menší množství nanočástic, než by byla potřeba iontů. ⁵⁸

U ryb bylo jako modelový příklad vybráno dánío pruhované (*Danio rerio*). Bylo zjištěno, že AgNP vstupují do embryí dánía přes chloridový kanál a tím způsobí vývojové vady. O tom, jaká vada to bude či jestli nastane smrt embrya, rozhodují velikosti nanočástic. ⁵⁹ Jako další modelový zástupce ryb byla použita medaka japonská (*Oryzias latipes*), u které byly také zjištěny různé abnormality ve vývoji (např. abnormality páteře, malformace ploutví, oční vady). ⁶⁰ U dalších druhů ryb AgNP blokují Na⁺/K⁺ – ATPázu, čímž dojde k porušení výměny Na⁺ a Cl⁻ na žábrech, což vyústí v porušení osmoregulace. ^{53, 61}

U hrotnatky velké (*Daphnia magna*) byl použit oligonukleotidový mikročip, který dokázal rozlišit účinky Ag⁺ od AgNP, což dokázalo, že stříbrné ionty mají úplně jiný mechanismus toxicity než AgNP. ⁶² V případě octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*), která se používá jako modelový organismus v genetice, byla testována akutní i chronická expozice AgNP. Při akutní toxicitě nebyl dokončen vývojový cyklus octomilky, neboť se nemohla dostat z předposlední fáze vývoje – kukly. V případě chronické toxicity bylo pozorováno snížení reprodukce, která se po pár generacích díky adaptaci znovu obnovila. ⁶³

4.5 PLGA

Kyselina poly(mléčná-ko-glykolová) (obr. 6) je biokompatibilní a biologicky rozložitelný syntetický kopolymer. Existuje v různých molekulových hmotnostech a různých poměrech kyseliny glykolové (PGA) a mléčné (PLA), což má za následek různou variabilitu vlastností. PLGA s delším řetězcem má pomalejší degradaci než ta s kratším a PLGA s vyšším obsahem monomeru kyseliny glykolové je více hydrofilnější než PLGA s vyšším obsahem kyseliny mléčné. Nanočástice PLGA lze připravit v různých tvarech a velikostech, čímž se velmi dobře reguluje uvolňování léčiv. ⁶⁴



Obr. 6: Molekula PLGA

Připravit lze dvě formy PLGA technikou katalyzované polymerace. Prvním typem je ataktická kopolymerace, kdy se jednotlivé monomery k sobě váží náhodně pomocí esterové vazby a nemají pravidelnou konfiguraci, což má za následek jeho rychlejší degradaci. Druhým typem je syndiotaktická polymerace, kdy se pravidelně střídají monomery, či jejich úseky, čímž je výsledné PLGA pomaleji degradovatelné. Lze jej také polymerovat s jinými kopolymery jako je PEG, BPLP (biologicky rozložitelný fotoluminiscenční polymer) či chitosan, což má za výsledek zlepšení stability, delší dobu setrvání v oběhu a nižší toxicitu, ale také to může ovlivnit kinetiku uvolňování léčiva.⁶⁴

4.6 Příprava PLGA nanočástic

Pro přípravu se používá řada metod. První a nejběžnější metodou je emulgace – odpařování rozpouštědla. Samotná emulgace je založena na nemísivosti dvou kapalin. Podle převažující vnější části se pak může jednat o emulzi olej ve vodě (o/v) či olej v oleji (o/o). Nejběžnější je použití emulze typu o/v, kdy se jako olejová (hydrofobní) část použije organické rozpouštědlo (např. tetrahydrofuran, chloroform, aceton), ve kterém je PLGA rozpustné a jako vodná část se použije vodný roztok povrchově aktivní látky (např. polyvinylalkohol, poloxamer (Pluronic[®])). Organická fáze se emulguje do vodného roztoku za stálého míchání, kdy se nechá organické rozpouštědlo odpařit. Nakonec se vzniklé částice několikrát promyjí, aby se odstranily zbytky povrchově aktivní látky a organického rozpouštědla. V případě, že do PLGA matrice chceme enkapsulovat léčivo je nutné ho nejprve společně s PLGA rozpustit v organické fázi a teprve poté emulgovat do vodné fáze. U typu o/o se jedná o emulgaci organické fáze do rostlinného oleje či tekutého parafínu.⁶⁴ Existuje také metoda dvojité emulgace, kdy se léčivo rozpustí ve vodné fázi, ta se emulguje do organické fáze s PLGA a vzniklá emulze se poté emulguje do vodné (v/o/v) nebo jiné organické

fáze (v/o/o), která má v sobě stabilizátor. V poslední fázi však PLGA nesmí být rozpustné, ale zároveň s první organickou fází musí být mísitelné. Nakonec je organická fáze opět odpařena.⁶⁵

Metoda vysolování je založena na smísení s vodou mísitelného organického rozpouštědla, ve kterém je rozpuštěno léčivo i PLGA, s vodnou fází, která obsahuje vysolovací činidlo a stabilizátor. Dojde k vytvoření emulze, ke které se poté přidává velké množství vody, čímž dojde k promísení organické a vodné fáze a vytvoření částic. Následnou filtrací je odstraněno vysolovací činidlo a částice jsou několikrát promyty, aby došlo k úplnému odstranění přebytečného stabilizátoru.⁶⁶

Metoda emulgace – difúze rozpouštědla byla vyvinuta jako modifikace metody vysolování. Nejprve se ve vodě částečně rozpustné organické rozpouštědlo saturuje vodou. Poté se v této organické fázi rozpustí PLGA a tento roztok je emulgován do vodné fáze, která obsahuje stabilizátor a emulze je následně zhomogenizována. Poté se přidá k emulzi voda, která umožní difúzi rozpouštědla z vnitřní fáze ven, čímž dojde ke srážení PLGA a vytvoření nanočástic. Rozpouštědlo je nakonec odpařeno na vakuové odparce.⁶⁵

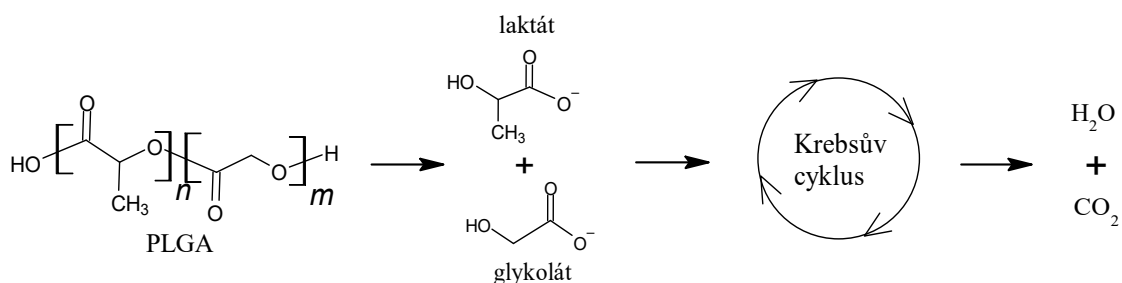
Další metodou je metoda nanoprecipitace. PLGA je rozpuštěno v organickém rozpouštědle mísitelném s vodou (DMSO (dimethylsulfoxid), aceton nebo ethanol). Roztok je poté emulgován do vodné fáze s emulgátorem, což má za následek okamžitou tvorbu nanočástic PLGA. Organická fáze je následně odpařena na vakuové odparce.⁶⁶

Poslední metodou je metoda sprejového sušení. Tato metoda je velice jednoduchá. Jedná se o vytvoření emulze v/o a poté její stříkání do proudu horkého vzduchu v sušárně, kdy se odpaří rozpouštědlo a vytvoří se samotné částice. Její velkou nevýhodou je, že částice ulpívají na stěnách sušárny.⁶⁴

4.7 Biodegradace PLGA

PLGA je v těle degradována hydrolýzou esterových vazeb, kdy vzniknou monomery laktátu a glykolátu, které následně vstupují do Krebsova cyklu (také známý jako citrátový cyklus nebo cyklus kyseliny citronové), kde jsou přeměněny na konečné netoxické produkty v podobě vody a oxidu uhličitého (obr. 7). Délka degradace je určena poměrem jednotek kyseliny mléčné a glykolové a může se tak pohybovat

v rozmezí několika měsíců až několika let.⁶⁴ Dále je délka degradace závislá na velikosti částice PLGA. Částice velké v rozmezí 5–10 μm mají optimální velikost pro fagocytózu. Částice menší než 5 μm jsou moc malé, aby mohly být fagocytovány makrofágy či FBGC (foreign body giant cells). Oproti tomu částice nad 10 μm jsou příliš velké na fagocytózu a je potřeba jejich zmenšení hydrolýzou, aby nakonec mohly být fagocytovány makrofágy nebo FBGC. Fagocytované částice se v makrofágu kompletně rozloží do sedmi dní. Dalším faktorem, který ovlivňuje biodegradaci, jsou inkorporované látky v nanočásticích PLGA. Kyselé či bazické látky ovlivňují rychlost degradace a je třeba na to brát ohled při formulaci. Malé množství bazické látky může degradaci zrychlit, ale větší množství by ji naopak mohlo prodloužit.⁶⁷



Obr. 7: Degradace PLGA

4.8 Využití PLGA nanočástic

Do PLGA je možné zapouzdřit další materiály. Jak organické či anorganické (kovové nanočástice, léčiva, proteiny), tak i hydrofilní nebo hydrofóbní. Také chrání enkapsulované materiály před degradací, což umožní dlouhodobé uvolňování léčiva a tím se stává ideálním nosičem látek na dlouhodobé terapie.⁶⁴

FDA a EMA schválily zhruba 20 formulací pro biomedicínské aplikace PLGA.

Aby však nanočástice PLGA se zapouzdřeným materiálem správně fungovaly je zapotřebí, aby se porozumělo tomu, jakým mechanismem jsou látky z nanočástic uvolňovány. Existuje pět mechanismů. Prvním typem je desorpce materiálu z povrchu nanočástice. Dalším je difúze přes polymerní matici. Třetím typem je difúze přes polymerní stěnu nanokapsle. Předposledním typem je rozpad nanočástice a posledním typem je kombinace difúze a rozpadu nanočástice.⁶⁸

Dalším aspektem nanočástic je jejich vlastní enkapsulační efektivita, která vyjadřuje v procentech, kolik látky bylo zapouzdřeno v nanočásticích k celkovému

množství látky. Aby se tato efektivita určila co nejpřesněji, je nutné od sebe nejprve oddělit nanočástice s enkapsulovaným léčivem od léčiva, které zůstává ve vnější fázi, což se provádí např. pomocí centrifugace. Enkapsulační efektivita je pro každou látku zcela odlišná. Například pro dexamethason byla určena jako 6% a pro paclitaxel 90%. I když budou mít PLGA nanočástice vysokou enkapsulační efektivitu, neznamená to, že budou dostatečně účinné. Mohou uzavřít vysoký podíl z celkového množství látky, což bude ukazovat na vysokou enkapsulační efektivitu, avšak množství enkapsulovaného léčiva ku hmotnosti nanočástic, tzv. drug loading, může být nízký.⁶⁹

Makrofágy jsou buňky imunitního systému, konkrétně jsou součástí nespecifické imunity. Makrofágy vznikají v kostní dřeni jako monocyty, které prostoupí do krve a poté do tkání, kde se přemění na samotné makrofágy. Vykonávají svojí funkci prostřednictvím fagocytózy – pohltní všechno, co neidentifikují jako tělu vlastní – viry, bakterie, nádory a také zbytky vlastních buněk, které prošly nekrózou či apoptózou. Makrofágy putují do místa poškození pomocí chemotaxe – poškozené tkáně a patogeny produkují chemotaxiny, které upozorní makrofágy na místo činu. Také samotné makrofágy produkují chemotaxiny, čímž vytvářejí v daném místě zánět. Pohlcením patogenů či zbytků buněk vzniká fagozom, který se spojí s lysozomem uvnitř makrofágu a tím dojde k destrukci fagocytovaných patogenů či buněk.⁶⁹

V iniciačních fázích vývoje nádoru jsou makrofágy velmi přínosné, neboť inhibují jeho tvorbu. V pozdějších fázích je efekt makrofágů zcela opačný a nádor si vytvoří rezistenci na chemotaxiny produkované makrofágy, čímž nádor progreduje. Pokud se, ale využijí nanočástice či léčiva vpravená do nanočástic, jež by byly fagocytovány makrofágy, učinila by se z nich díky chemotaxi „bomba“, která by měla cílený efekt na nádory v daném místě.⁷⁰

Aby ale mohly být nanočástice fagocytovány, musí být jejich velikost zvětšena nad detekovatelnou hranici, kterou je 100 nm. K tomuto účelu často slouží lipozomy nebo PLGA, které nejen, že zamezí dřívějšímu odbourání, ale taky způsobí kontinuální uvolňování nanočástic a zároveň zvětší molekulu na detekovatelnou úroveň.⁷¹

Jedním z příkladů využití PLGA je její spojení s cytotoxickými látkami. Bowerman a kol. zkoumali spojení PLGA a docetaxelu v léčbě triple negativního karcinomu prsu, který neodpovídá na léčbu taxany. PLGA-docetaxel vyzkoušeli na myších s tímto karcinomem a zjistili, že se prodloužila doba přežití těchto myší oproti

těm, které byly léčeny čistým docetaxelem.⁷⁰ Dalším příkladem je spojení PLGA s amfotericinem B. Tato nanočástice s navíc navázaným fosfatidylserinem, který sloužil jako *eat-me* signál pro makrofágy, měla za následek prodloužení účinku antibiotika a zároveň větší smrtící účinek na prvoka *Leishmania donovani*, který přežívá v makrofázích a způsobuje leishmaniózu.⁷³

PLGA nanočástice se používají i v léčbě dalších onemocnění. Při léčbě Parkinsonovy choroby se používají PLGA nanočástice s enzymem superoxid dismutáza, které sice neprocházejí hemoencefalickou bariérou rovnou do mozku, ale působí neuroprotektivně vůči oxidačnímu stresu.⁷⁴ U nespecifických střevních zánětů (Crohnova choroba a ulcerózní kolitida) se používají PLGA částice s enkapsulovaným takrolimem nebo rolipramem a tyto nanočástice působí na makrofágy, čímž se potlačí zánět, který vyvolává tyto choroby.^{75, 76} Dalším onemocněním, kde léčba nanočásticemi působí na makrofágy je revmatoidní artritida. Zde se použijí nanočástice s bethametonem, které jsou aplikovány intraartikulárně, což sníží například riziko krystalově indukované arthritidy, která může vzniknout při intraartikulární aplikaci samotného bethametonu.⁷⁷ PLGA se také dá použít jako transportní systém pro vakcíny. Do nich se uzavře antigen s adjuvans. Výhodou je jejich biodegradabilita a zároveň i to, že malé množství vyvolá silnou odpověď, což má za následek snížení počtu přeočkování.⁷⁸

5 Experimentální část

5.1 Chemikálie

Pro přípravu koloidního roztoku nanočástic stříbra byly použity následující chemikálie: dusičnan stříbrný (AgNO_3) (Fagron), amoniak (NH_3) (vodný roztok, 28-30%, Sigma-Aldrich), hydroxid sodný (NaOH) (Lach-Ner), D-(+)-maltosa monohydrát (Sigma-Aldrich), tetrahydridoboritan sodný (NaBH_4) (Sigma-Aldrich). Pro ředění roztoků a doplňování do odměrných baněk a kádínek byla použita deionizovaná voda (systém Milli-Q, farmaceutická fakulta UK).

Ke stabilizaci nanočástic byl použit polyvinylalkohol (PVA) ($M = 31\,000$ – $50\,000$, Sigma-Aldrich), polyakrylová kyselina (PAA) ($M = 2\,000$, 50 %, Sigma-Aldrich), želatina (Penta) a polyethylenglykol sorbitan monolaurát (Tween® 20, Sigma-Aldrich).

Pro enkapsulaci nanočástic stříbra byla použita kyselina poly(mléčná-ko-glykolová) (PLGA) (PLA/PGA – 75/25, Corbion), aceton (Penta) a Pluronic® F-127 (Sigma Aldrich).

Pro agregaci nanočástic byl použit chlorid sodný (NaCl) (Penta), tetrahydrát dusičnanu vápenatého ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (P-LAB), cetrimonium bromid (CTAB) (Sigma Aldrich) a poly(diallyldimethylammonium) chlorid (PDDA) (Sigma Aldrich).

Pro měření enkapsulace nanočástic stříbra byly vzorky rozpuštěny v kyselině dusičné (HNO_3) (Penta).

5.2 Použité přístroje a zařízení

Velikost, polydisperzita a ζ -potenciál připravených koloidních disperzí AgNP byly měřeny na přístroji ZetasizerNano ZS (Malvern Panalytical, Malvern, UK), který pracuje na principu dynamického rozptylu světla (DLS). Pomocí spektrofotometru (Analytic Jena, Německo) byla měřena UV/VIS absorbance jednotlivých vzorků. K rozdělení částic byla použita centrifuga s průměrem rotoru 8,3 cm (MPW Medical Instruments, Polsko). Dalšími použitými přístroji a zařízeními k přípravám vzorků byly elektromagnetická míchačka s ohřevem (Heidolph, Německo) a analytické váhy (Ohaus Corporation, Švýcarsko). Koncentrace stříbra byla stanovována pomocí

optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) (Agilent 5900, USA).

5.3 Příprava nanočástic stříbra

AgNP byly připraveny chemickou redukcí amoniakálního komplexu stříbra.

5.3.1 AgNP s maltózou

Pro přípravu 25 ml nestabilizovaných nanočástic stříbra o koncentraci $108 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ bylo, do kádinky o objemu 50 ml a umístěné na elektromagnetické míchače, přidáno automatickou pipetou 5,00 ml roztoku dusičnanu stříbrného o koncentraci $5\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Poté bylo přidáno 12,75 ml vody, 1,25 ml $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztoku amoniaku a směs se nechala 5 minut reagovat. Po uplynutí reakční doby byl k roztoku přidán 1 ml $0,24 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ hydroxidu sodného a $5,00 \text{ ml } 5\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztoku maltózy.

Vzorek vzniklých částic byl naředěn na koncentraci $10 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ a byla u něj změřena absorbance na spektrofotometru. Dále byly nanočástice proměřeny na analyzátoru velikosti částic, kde byla změřena velikost a index polydisperzity pomocí DLS a ζ -potenciál, který byl změřen pomocí elektroforetického rozptylu světla. Pro měření ζ -potenciálu byly použity kapilární kyvety DTS1070.

Tento základní postup byl modifikován, přidával se amoniak v různých objemech 1; 1,1; 1,5; 1,75 a 2 ml.

Bylo také měřeno pH a jeho změny po přidání různého objemu $0,24 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaOH (0,1; 0,3; 0,5; 0,7 a 1 ml). Zároveň se měřily i změny velikosti částic.

Po vyzkoušení a optimalizaci množství amoniaku a hydroxidu sodného byly připraveny stabilizované nanočástic pomocí stabilizátoru (tab. 2). Postup přípravy byl stejný jako v případě nestabilizovaných nanočástic. Jediným rozdílem bylo množství přidané vody a stabilizátor. Množství vody se zmenšilo o množství použitého stabilizátoru. Takto připravené nanočástice byly proměřeny na spektrofotometru.

Tabulka 2: množství a koncentrace stabilizátoru v disperzi AgNP

Stabilizátor				
Výsledná koncentrace v disperzi	Tween 20	3% PVA	5% želatina	3% Pluronic
0,25% (w/v)	0,63 ml	2,08 ml	1,25 ml	
0,50% (w/v)	1,25 ml	4,17 ml	2,50 ml	
0,75% (w/v)	1,88 ml	6,25 ml	3,75 ml	
1,00% (w/v)	2,50 ml	8,33 ml	5,00 ml	8,33 ml

5.3.2 AgNP s tetrahydridoboritanem sodným

Postup přípravy byl podobný postupu v kap. 5.3.1. Připravovaly se nanočástice o koncentraci $108 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, přičemž do kádinky o objemu 50 ml a umístěné na elektromagnetické míchačce bylo přidáno automatickou pipetou 5,00 ml roztoku dusičnanu stříbrného o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Poté bylo přidáno 13,75 ml vody, 1,25 ml $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku amoniaku a 5,00 ml $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku tetrahydridoboritanu sodného. Bylo nutné použít stabilizátor, který se přidával před NaBH_4 . Výsledná koncentrace stabilizátoru v roztoku byla 0,10; 0,25 a 0,50 % (tab. 3).

Tabulka 3: množství přidaného stabilizátoru a výsledná koncentrace v disperzi AgNP

Stabilizátor			
Výsledná koncentrace v disperzi	3% PVA	5% PAA	5% želatina
0,10%	0,83 ml	0,50 ml	0,50 ml
0,25%	2,08 ml		
0,50%	4,16 ml		

Pro přípravu AgNP pomocí tetrahydridoboritanu sodného byla dále použita stejná metoda s úpravou poměru prekurzoru a redukčního činidla. Bylo použito 25,00 ml dusičnanu stříbrného o koncentraci $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 6,25 ml roztoku amoniaku s koncentrací $0,9 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 58,33 ml vody, 10,42 ml 3 % PVA a 25,00 ml tetrahydridoboritanu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Takto připravené AgNP

byly proměřeny na spektrofotometru a dále používány při přípravě PLGA/Ag nanočástic.

5.4 Příprava PLGA nanočástic

Příprava nanočástic PLGA probíhala metodou nanoprecipitace. K této metodě je nutnost dvou mísitelných fází – vodné a organické. Vodná fáze byla tvořena 10 ml 0,1% roztoku Pluronicu® F-127. Organickou fází tvořil 1 ml acetonu a v něm rozpuštěná PLGA. Množství rozpuštěné PLGA bylo 15, 30 a 60 mg. Organická fáze se po rozpuštění PLGA přidala do vodné fáze a směs se nechala odpařovat dvě hodiny. Po odpaření acetonu se doplnila voda, která se částečně také odpařila. U vzniklých nanočástic PLGA se proměřila velikost na analyzátoru velikosti částic.

5.5 Příprava PLGA/Ag nanočástic

Postup přípravy PLGA/Ag nanočástic odpovídal výše zmíněným postupům. Nejprve se připravily AgNP a poté se přešlo k přípravě PLGA nanočástic. Množství a složení vodné fáze zůstalo neměnné. Změnou bylo přidání AgNP k PLGA do organické fáze. Finální koncentrace AgNP v disperzi byla $0,005 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, $0,01 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, $0,05 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $0,1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$. Odpovídající množství AgNP bylo přidáno k 15, 30 a 60 mg PLGA. Disperze se odpařovaly dvě hodiny pro odstranění acetonu a poté se do nich doplnila odpařená voda. Nakonec byl přidán Tween 20 ve výsledné koncentraci 0,25 %.

5.6 Separace PLGA/Ag nanočástic

Nanočástice PLGA byly přepipetovány do 2 ml mikrozkušavek a následně centrifugovány. Centrifugace probíhala při 4 000, 6 000, 8 000, 10 000, 12 000 a 15 000 ot/min. Po centrifugaci byl supernatant odebrán a byla u něj změřena velikost nanočástic na analyzátoru velikosti částic.

Část disperze AgNP se také odebrala do 2 ml mikrozkušavek, které byly následně centrifugovány při stejných rychlostech otáčení jako PLGA. Po každé centrifugaci byl supernatant naředěn a byl charakterizován na spektrofotometru.

Měřily se jak čisté AgNP, tak ty se stabilizátorem. AgNP s maltózou se naředily 10krát a ty připravené pomocí tetrahydridoboritanu sodného se naředily 100krát.

Pomocí centrifugace nanočástic PLGA a AgNP se hledala ideální rychlost otáčení, která by byla vhodná pro separaci PLGA/Ag nanočástic od AgNP, které se do PLGA neenkapsulovaly. Měření bylo provedeno třikrát, výsledky měření byly zprůměrovány.

Další testovanou metodou separace PLGA/Ag od volných AgNP (připravených redukcí maltózou) byla agregace nanočástic PLGA a AgNP pomocí chloridu sodného. Chlorid sodný byl použit v koncentraci $3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a byl po $50 \mu\text{l}$ přidáván ke 2 ml vzorku. AgNP byly naředěny před experimentem na $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Vzorky nanočástic PLGA i AgNP se po testu agregace proměřily na velikost na analyzátoru velikosti částic. Nanočástice PLGA a AgNP byly po nejvyšším přídávku chloridu sodného ($200 \mu\text{l}$) podrobeny centrifugací při 100, 500 a 1000 ot/min. Byl vizuálně hodnocen vznik pelety a supernatant hodnocen pomocí metody DLS.

AgNP připravené redukcí tetrahydridoboritanem sodným a nanočástice PLGA byly titrovány i dalšími agregačními činidly. Těmi byl 1% roztok $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,1% roztok CTAB a 0,05% roztok PDDA. Činidla byla přidávána po $2,5 \mu\text{l}$ k 1 ml vzorku nanočástic PLGA nebo AgNP. Po každém přídávku byl změřen ζ -potenciál.

5.7 Stanovení enkapsulační efektivity a drug loading

Připravené PLGA/Ag nanočástice byly centrifugovány 15 minut při 10 000 ot/min při teplotě $15 \text{ }^\circ\text{C}$. Po centrifugaci bylo odebráno $1\,800 \mu\text{l}$ supernatantu do 10 ml zkumavky a objem byl doplněn 5% kyselinou dusičnou na 10 ml. Takto připravené vzorky byly odeslány do laboratoře státního podniku Povodí Labe. Enkapsulační efektivita byla stanovována nepřímo, měřením koncentrace stříbra v supernatantu, pomocí metody ICP-OES. Vzorky byly připraveny v triplikátu.

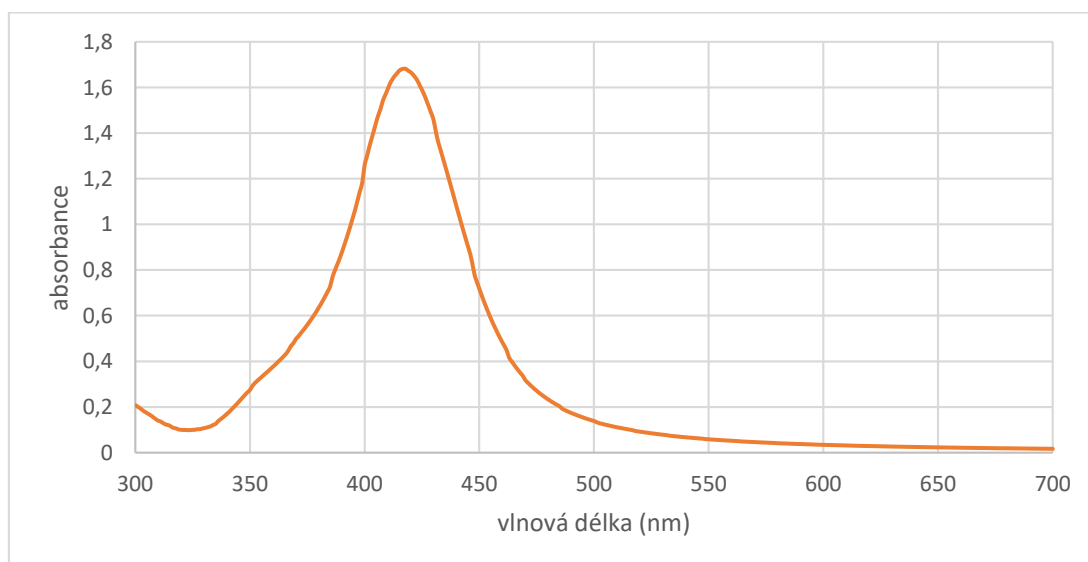
Jak bylo zmíněno výše, enkapsulační efektivita se vyjadřuje v procentech a vyjadřuje, kolik látky bylo zapouzdřeno v nanočásticích k celkovému množství látky. Drug loading se také vyjadřuje v procentech a vyjadřuje poměr množství enkapsulované látky k množství použitého nosiče.

6 Výsledky a diskuze

6.1 Nanočástice stříbra

Nanočástice stříbra připravené pomocí maltózy měnily barvu od světle žluté až po tmavě hnědou. Tyto barevné přechody byly způsobeny pomalou redukcí stříbrných iontů na stříbro. Celý tento proces trval do 5 minut.

Vzniklé nanočástice byly proměřeny na spektrofotometru, kde byla změřena jejich absorpance. Byl zaznamenán absorpční pás povrchového plasmonu (SPR) s maximem při 418 nm (obr. 8). Pás SPR AgNP s vlnovou délkou u 390–420 nm odpovídá velikosti 25–50 nm.⁸⁰



Obr. 8: UV/VIS spektrum AgNP připravených pomocí maltózy

AgNP byly dále charakterizovány pomocí analyzátoru velikosti částic. Byla měřena velikost, index polydisperzity a ζ -potenciál. Velikost AgNP připravených touto metodou byla 50,89 nm, index polydisperzity 0,1 a ζ -potenciál dosahoval hodnoty -38,3 mV. Panáček a kol. ve své práci, pozorovali, že velikost AgNP připravených s maltózou byla kolem 30 nm s indexem polydisperzity do 0,2, a že pro stabilní částice by měl být ζ -potenciál alespoň -30 mV.⁷⁹

Disperze připravená pomocí maltózy byla stabilní pouze několik hodin, což se projevilo i vysokou hodnotu velikosti AgNP po přípravě. Proto se přikročilo k modifikaci, kdy byl přidáván amoniak v různých objemech. Množství amoniaku

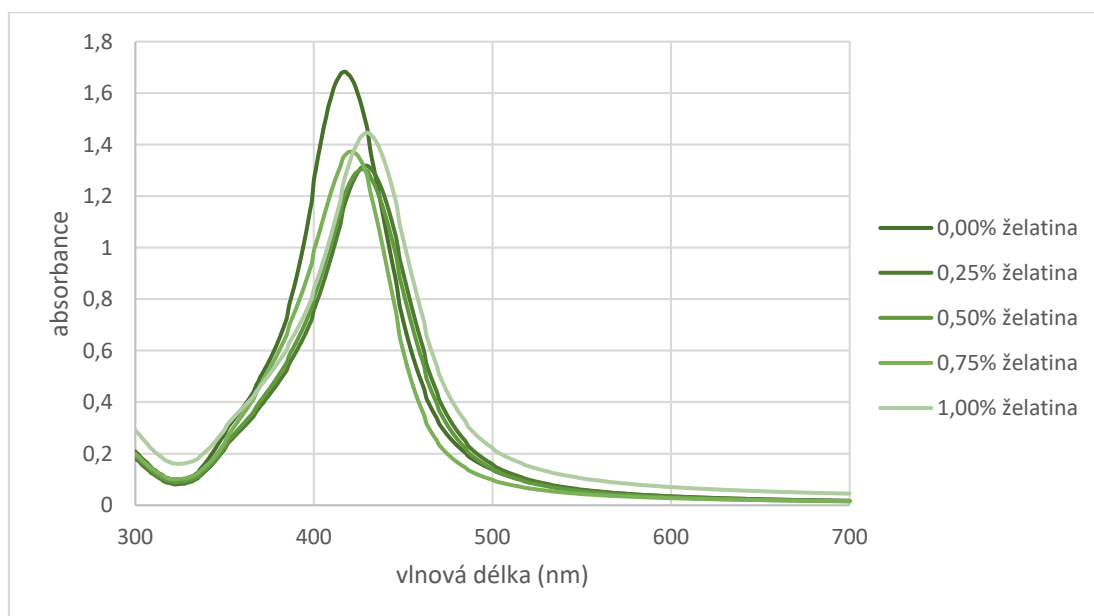
použitého při syntéze AgNP ovlivňuje jejich velikost a stabilitu.⁷⁹ Stabilita se touto modifikací však nezlepšila. Jediným rozdílem byla měnící se rychlost reakce.

Je známo, že velikost, polydisperzita a stabilita nanočástic závisí také na pH.⁷⁹ Postup byl opět modifikován, tentokrát přidávaným objemem NaOH (tab. 4). S přibývajícím množstvím NaOH se stabilita zlepšovala a velikost se zmenšovala.

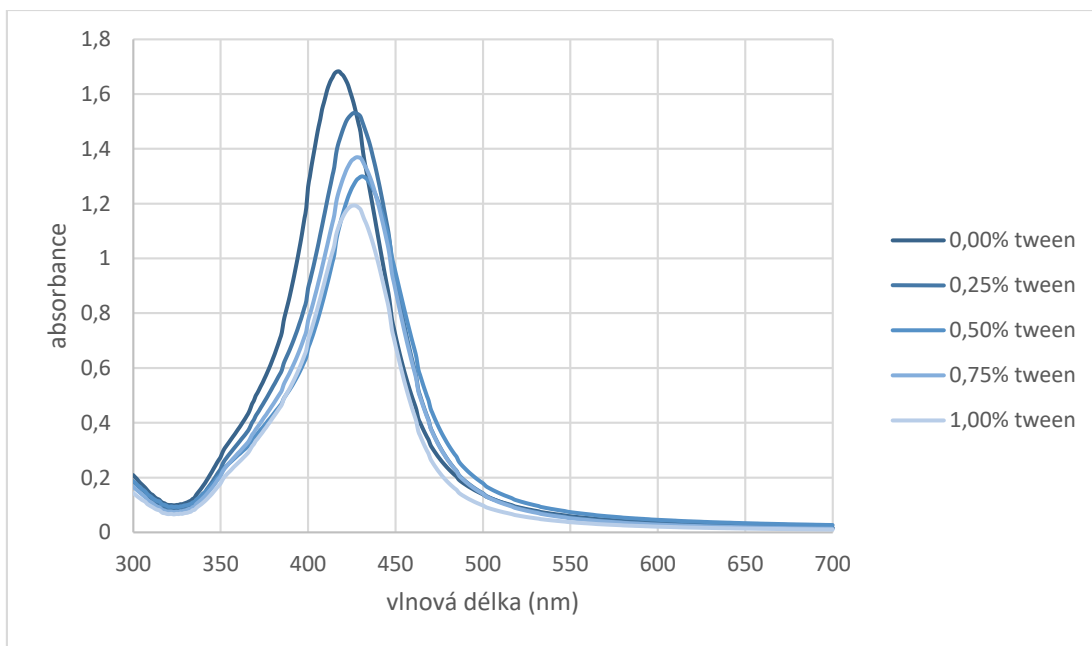
Tabulka 4: množství NaOH při přípravě 25 ml AgNP a změna pH, velikosti částic a ζ -potenciálu

Množství NaOH ml ($c = 0,24 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)	pH	Velikost částic nm	Z-potenciál mV
0,1	10,17	69,81	-33,5
0,3	10,58	63,90	-30,6
0,5	11,15	56,29	-25,2
0,7	11,50	59,33	-32,6
1,0	11,78	47,72	-36,2

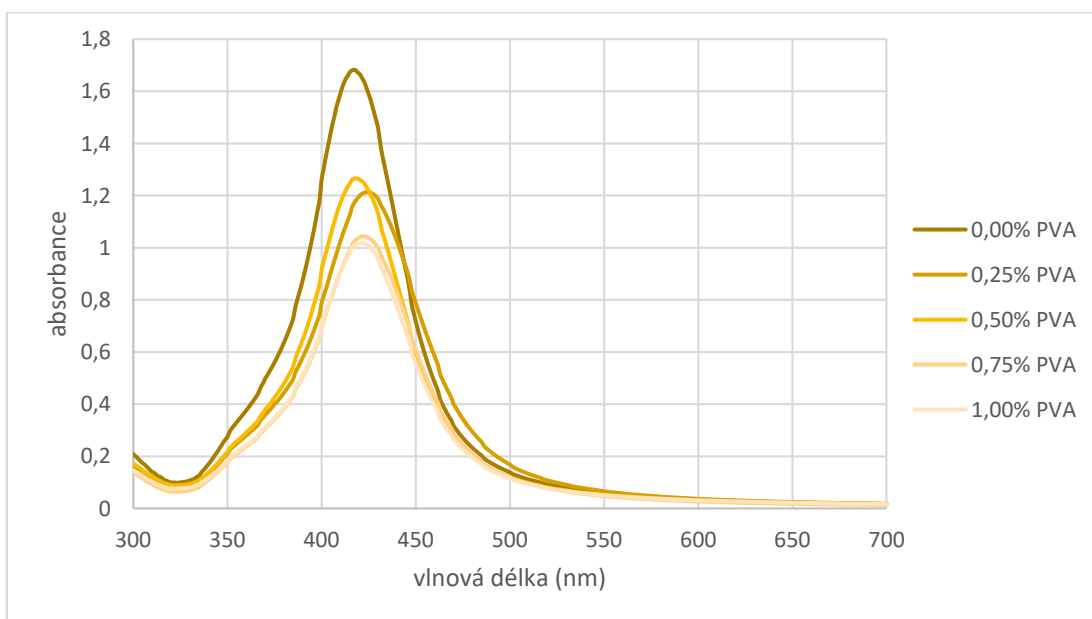
Po optimalizaci se používalo 1,25 ml amoniaku a 1,00 ml hydroxidu sodného. Jak je vidět na obrázcích 9–12, při použití stabilizátorů došlo k mírnému posunu spekter k vyšším vlnovým délkám, což značí nárůst velikosti nanočástic díky adsorbované vrstvě stabilizátoru, jak pozorovali i autoři Soukupová a kol. při stabilizaci AgNP pomocí surfaktantů.⁸⁰



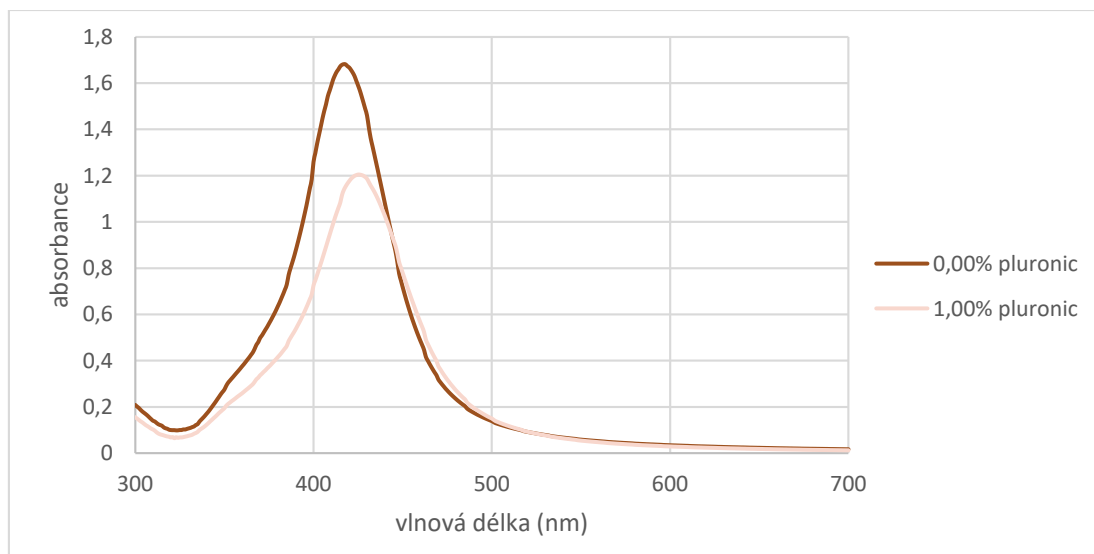
Obr. 9: UV/VIS spektra AgNP připravených pomocí maltózy s želatinou jako stabilizátorem



Obr. 10: UV/VIS spektra AgNP připravených pomocí maltózy s Tweenem 20 jako stabilizátorem



Obr. 11: UV/VIS spektra AgNP připravených pomocí maltózy s PVA jako stabilizátorem



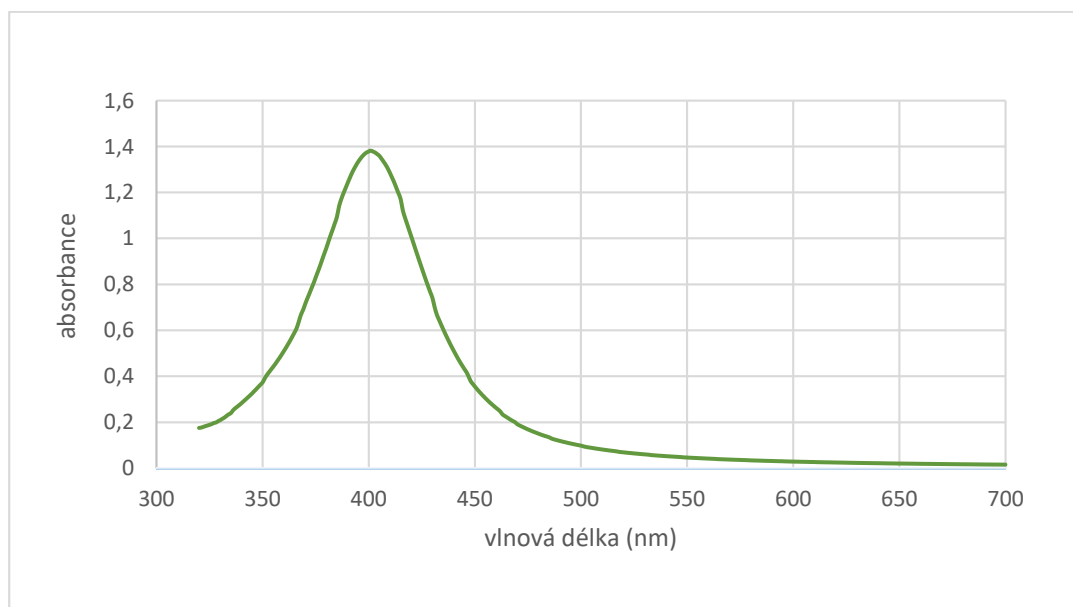
Obr. 12: UV/VIS spektra AgNP připravených pomocí maltózy s Pluronicem F-127 jako stabilizátorem

Pro posouzení vlivu velikosti AgNP na enkapsulační efektivitu byly připraveny také AgNP o menší velikosti. Jako redukční činidlo, byl použit tetrahydridoboritan sodný. Takto připravené částice byly stabilizovány pomocí více druhů stabilizátorů v různých koncentracích, ale ani přes zvyšování koncentrace stabilizátoru v disperzi nebyly částice dostatečně stabilní, což se projevilo okamžitou agregací. Pro přípravu AgNP o menší velikosti byl dále zvýšen poměr redukčního činidla a prekurzoru AgNP. Takto připravená disperze měla okamžitě hnědé zbarvení (obr. 13) po přidání tetrahydridoboritanu sodného, což je dáno tím, že tetrahydridoboritan je silné redukční činidlo oproti maltóze, a byla nejstabilnější ze všech disperzí připravených výše zmíněnými způsoby.



Obr. 13: Připravené AgNP pomocí tetrahydridoboritanu sodného

Takto připravené AgNP byly stejně jako ty připravené s maltózou proměřeny na spektrofotometru. Měly menší velikost, proto vykazují maximum pásu SPR při nižších vlnových délkách, kolem 400 nm (obr. 14).



Obr. 14: UV/VIS spektrum AgNP připravených pomocí tetrahydridoboritanu sodného

6.2. Nanočástice PLGA

Připravené PLGA nanočástice byly mléčně zakalené (obr. 15) a byla u nich proměřena velikost, která činila 224,4 nm. Tato velikost odpovídá rozmezí velikosti, která je potřebná pro cílení do makrofágů.⁸¹



Obrázek 15: Připravené nanočástice PLGA

6.3. Separace PLGA/Ag

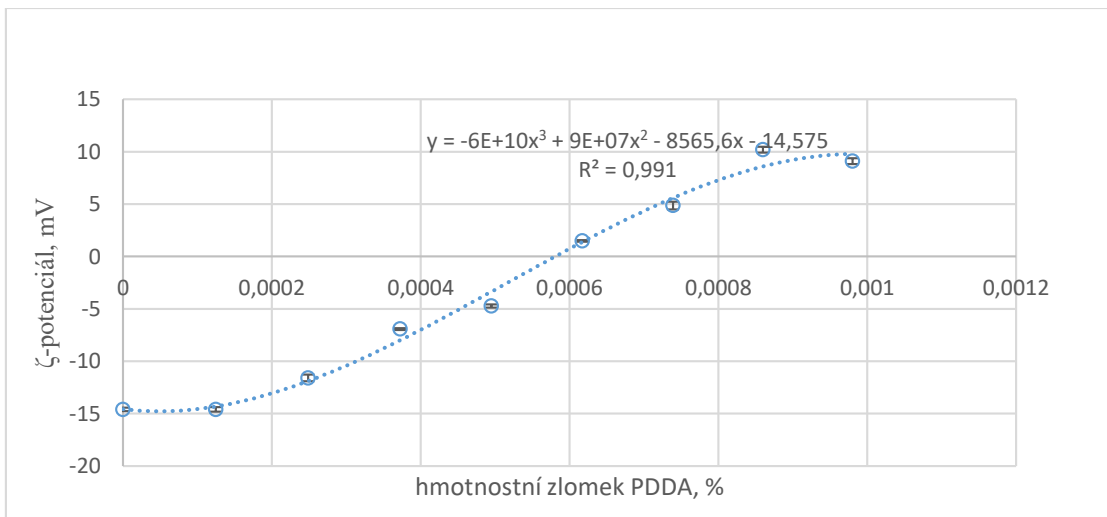
Pro nalezení vhodných podmínek separace PLGA nanočástic a AgNP (s maltózou) bylo provedeno testování agregace pomocí přídavku chloridu sodného, kdy účelem bylo indukovat agregaci AgNP a separovat je centrifugací. Po nejvyšším přídavku (200 μ l) byly nanočástice PLGA i AgNP podrobeny centrifugaci při 100, 500 a 1000 ot/min. AgNP vizuálně zešedivěly a po centrifugaci při 500 a 1 000 ot/min vznikla peleta. Po proměření na analyzátoru velikosti částic se částice z velikosti 32,23 nm zagregovaly na 187,60 nm. PLGA nanočástice proměřené před centrifugací měly velikost 238,5 nm před přídavkem NaCl a 235,70 nm po přídavku, tedy velikost nebyla ovlivněna. PLGA nanočástice ani vizuálně nevykazovala žádnou změnu, ale po centrifugaci byla patrná tenká peleta a po centrifugaci byla velikosti částic v supernatantu postupně menší se zvyšující se rychlostí otáčení (tab. 5).

Tabulka 5: Velikost nanočástic PLGA v supernatantu po centrifugaci

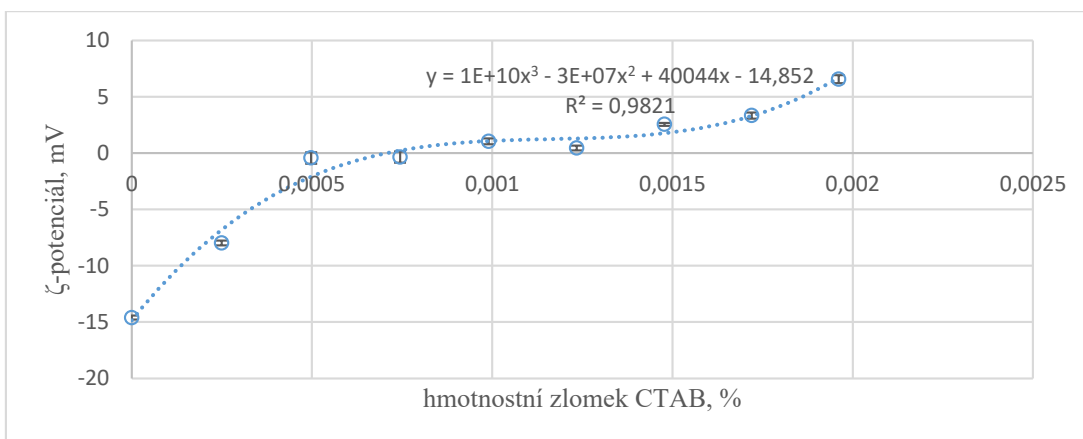
Rychlost, ot/min	100	500	1000
Velikost částic, nm	227,9	215,0	206,2

NaCl se ukázal jako nepříliš úspěšné agregační činidlo pro AgNP vzhledem k částečné sedimentaci také PLGA nanočástic. Pro AgNP připravené redukcí tetrahydridoboritanem sodným, které byly stabilnější než AgNP připravené s maltózou, byla vyzkoušena agregační činidla s větší velikostí molekuly, tvořená i vícemocnými ionty a také polyelektrolyt. Těmito činidly byl CTAB, PDDA a $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a byla použita jak na PLGA, tak na AgNP. Vyhodnocení agregace bylo provedeno vizuálně a poté změřením ζ -potenciálu na analyzátoru velikosti částic (obr. 16–21). ζ -potenciál byl měřen, dokud nenabyl kladných hodnot, přičemž koncentrace, při níž překonal hranici 0 mV, byla považována za ideální pro agregaci.

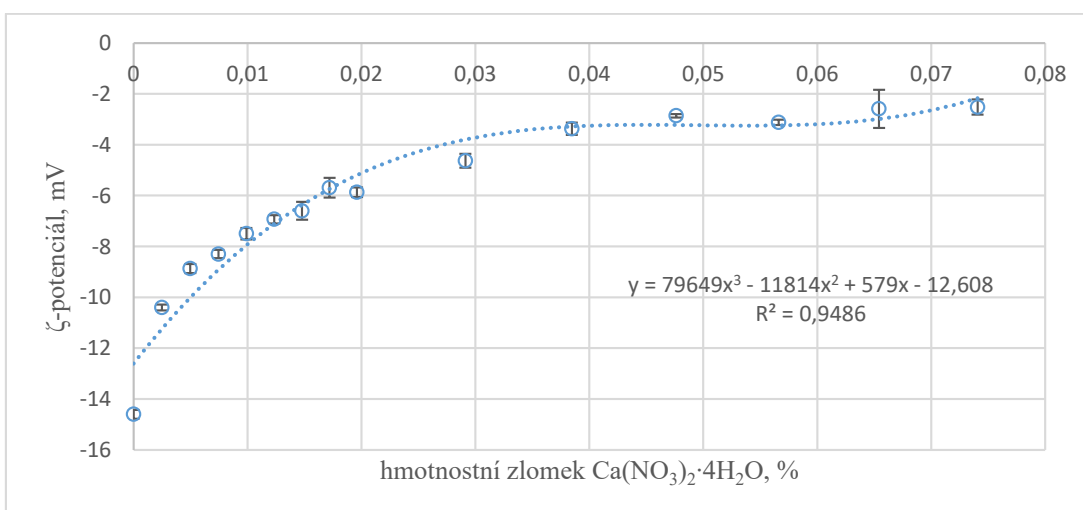
Tato metoda nebyla efektivní, protože v případě PDDA a CTAB se PLGA nanočástice agregovaly při nižších koncentracích než AgNP. U $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ se při nižších koncentracích agregovalo AgNP, ale odpovídající koncentrace již výrazně ovlivnila ζ -potenciál a stabilitu PLGA nanočástic, a proto tato metoda nebyla vhodná pro separaci nanočástic.



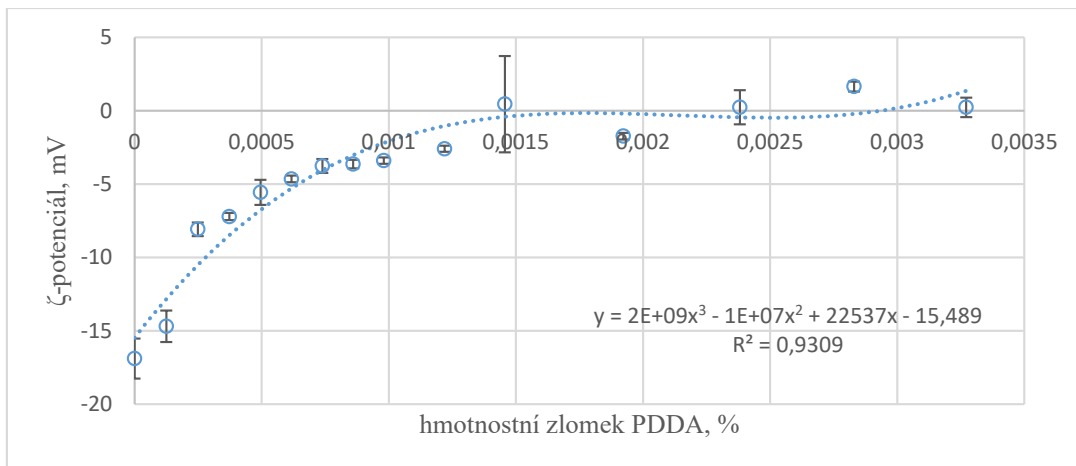
Obr. 16: Agregace PLGA nanočástic pomocí PDDA



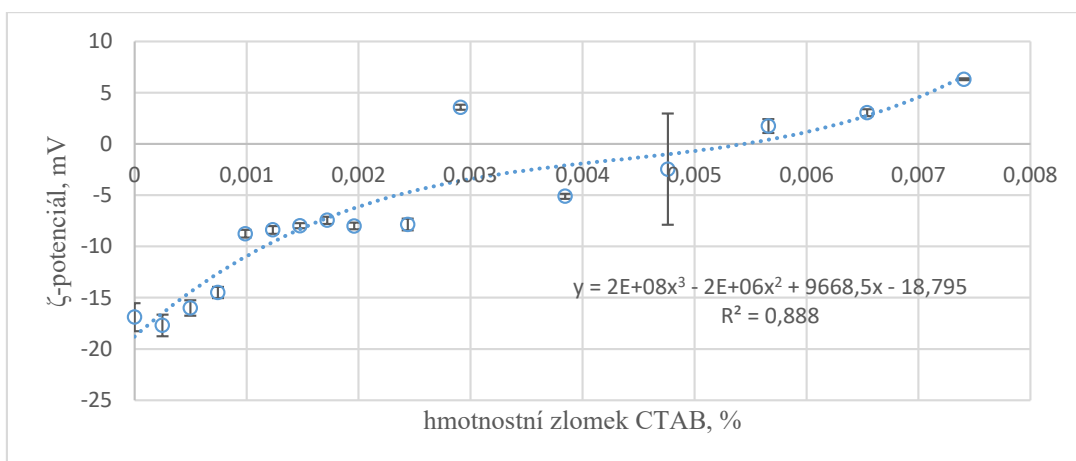
Obr. 17: Agregace PLGA nanočástic pomocí CTAB



Obr. 18: Agregace PLGA nanočástic pomocí Ca(NO₃)₂·4H₂O

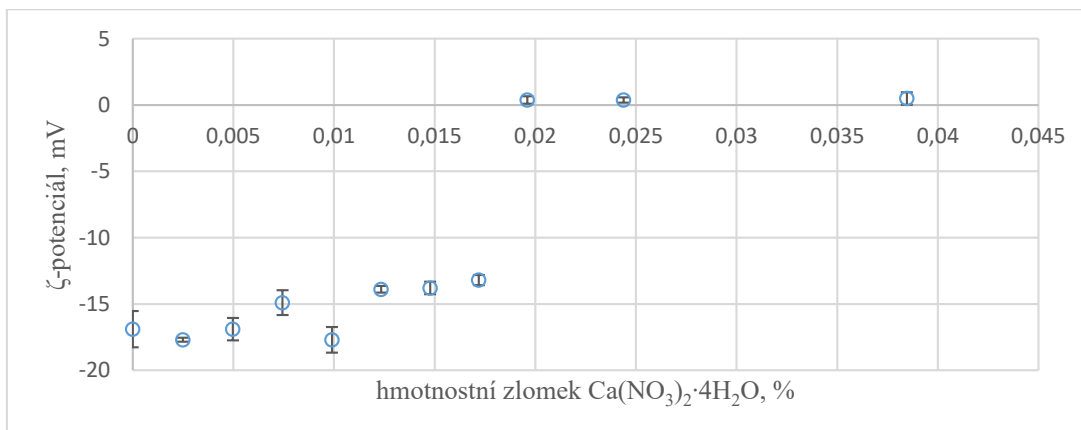


Obr. 19: Agregace AgNP pomocí PDDA



Obr. 20: Agregace AgNP pomocí CTAB

Oproti předchozím obrázkům je vidět, že pomocí $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ proběhla agregace AgNP skokově, jak ukazují hodnoty ζ -potenciálu (obr. 21).



Obr. 21: Agregace AgNP pomocí $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Jako další metoda separace PLGA/Ag a AgNP byla použita centrifugace bez předešlé indukce agregace nanočástic. Opět byla aplikována jak na PLGA, tak AgNP. U PLGA po centrifugaci byla změřena velikost částic, které nesedimentovaly (tab. 6), na analyzátoru velikosti částic a u AgNP bylo u odebraného supernatantu změřeno spektrum na spektrofotometru.

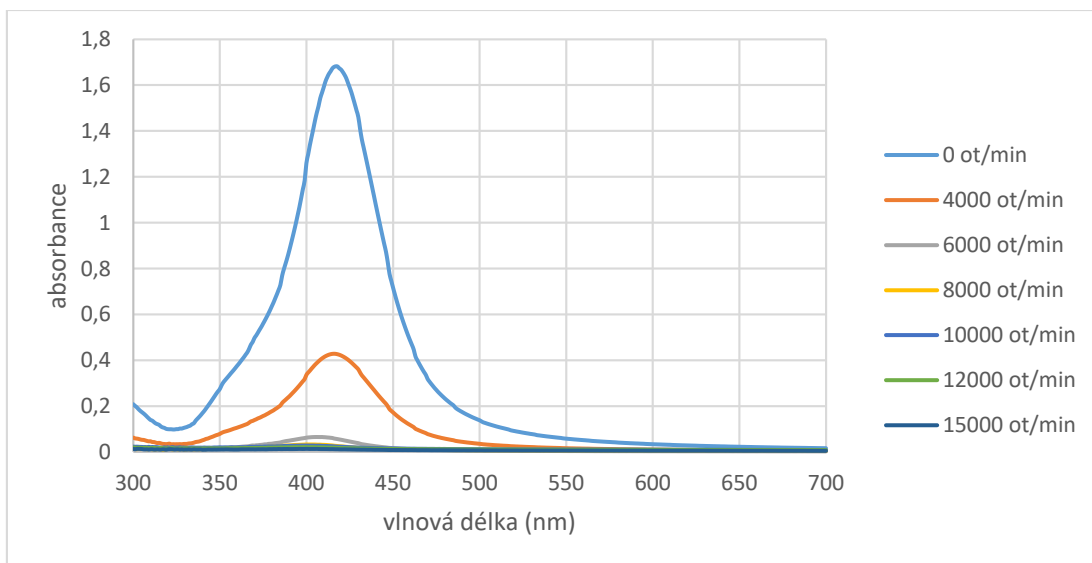
Vztah mezi velikostí PLGA nanočástic, které nesedimentovaly, a rychlostí otáčení při centrifugaci není lineární, jak bylo už dříve také pozorováno.⁸²

AgNP byly centrifugovány jak ty připravené s maltózou, tak ty s tetrahydridoboritanem. AgNP s maltózou podléhaly sedimentaci ve větší míře, a to i přes jejich stabilizaci (obr. 22–34). Při srovnání pásů SPR po centrifugaci AgNP bez a se stabilizátorem se jeví jako nejlepší stabilizátor želatina o obsahu 0,75 %. Maxima absorbance neklesla po centrifugaci tolik, jako u ostatních stabilizátorů a koncentrací. Naopak nejhorším stabilizátorem byl Tween 20 o obsahu 0,25 %.

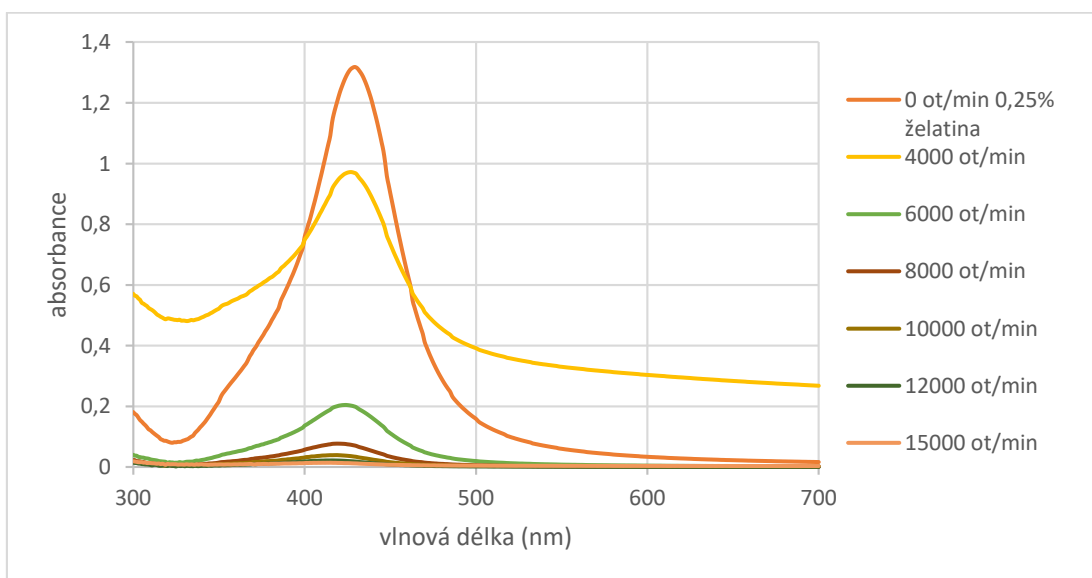
U centrifugace AgNP s želatinou při 4 000 ot/min (obr. 23, 26, 29, 32) vzorky vykazovaly zvýšenou absorbanci v celém rozsahu vlnových délek. Možným vysvětlením může být přítomnost želatiny ve vzorku a její chování při centrifugaci za snížené teploty. Při vyšších teplotách jsou jednotlivé monomery želatiny rozptýleny v disperzi. Při ochlazování mají tendenci přecházet z upořádání náhodného klubka do helikální konformace a propojovat se. Při centrifugaci byl tento jev podpořen nízkou teplotou a zvýšením lokální koncentrace želatiny ve spodní části mikroskopické kumavky. Rychlost otáčení 4 000 ot/min není dostatečná pro sedimentaci těchto shluků, které následně zvyšují pozadí při měření UV/VIS spekter, při vyšších rychlostech však již k jejich sedimentaci dochází.

Tabulka 6: změna velikosti nanočástic PLGA v supernatantu po centrifugaci

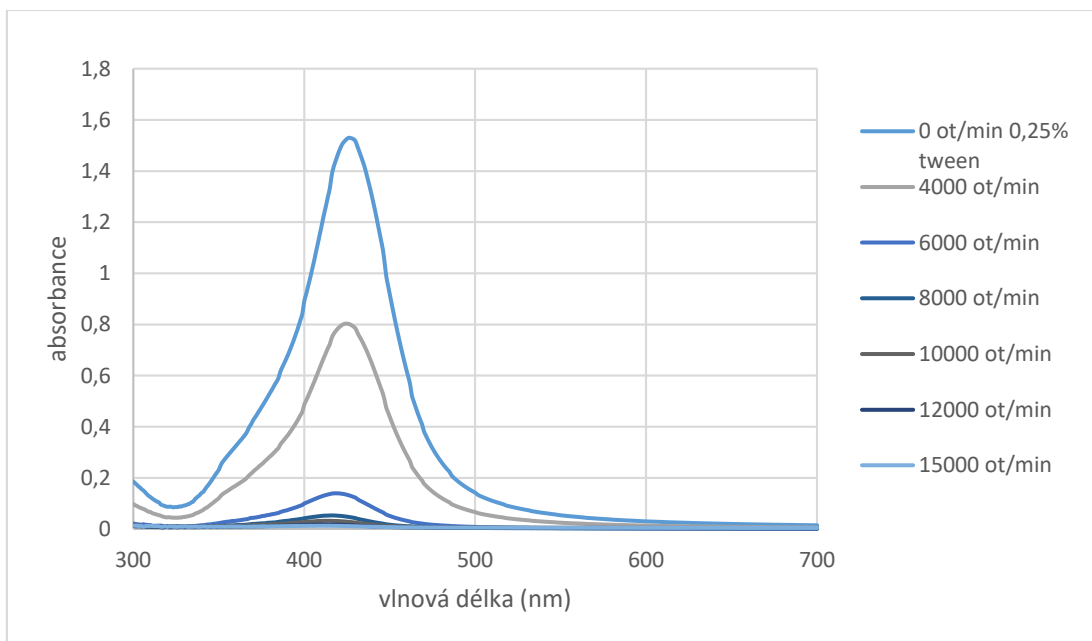
Počet otáček/min	Velikost částic nm
0	196,8
4000	164,5
6000	165,5
8000	139,6
10000	105,6
12000	118,3
15000	86,6



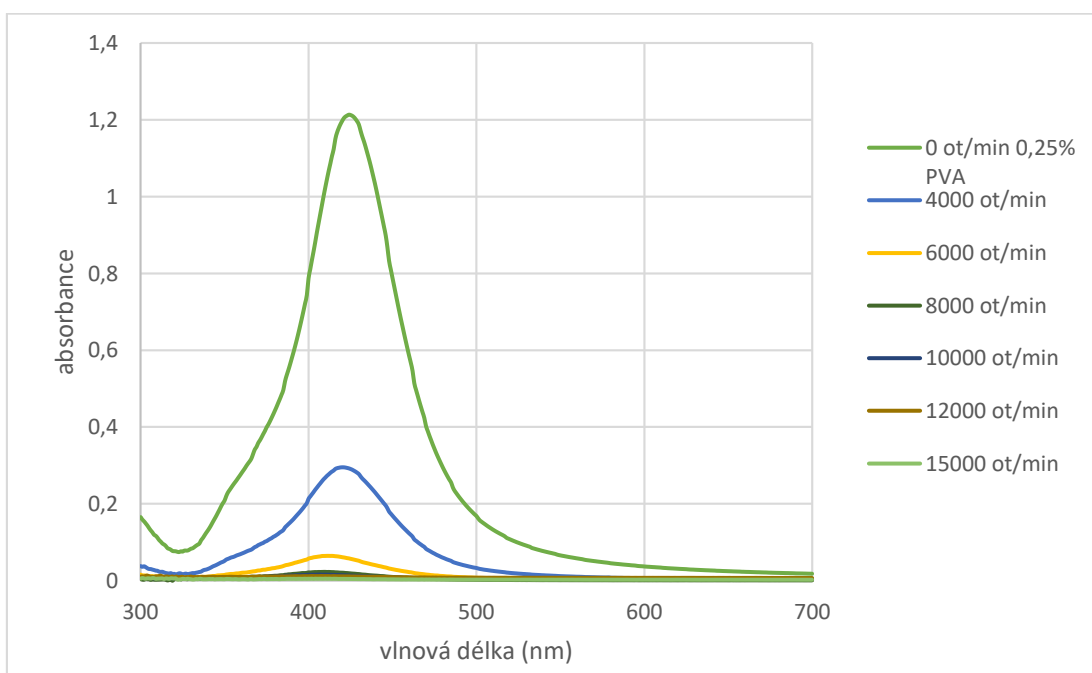
Obr. 22: AgNP připravené pomocí maltózy a centrifugované při různých rychlostech otáčení



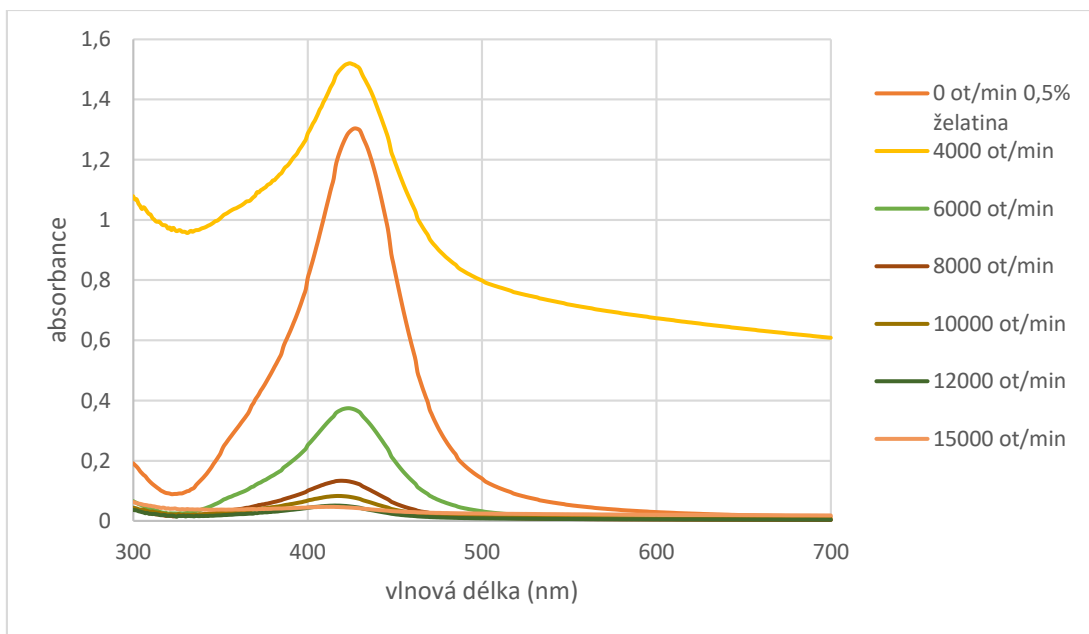
Obr. 23: AgNP připravené pomocí maltózy, stabilizované 0,25% želatinou a centrifugované při různých rychlostech otáčení



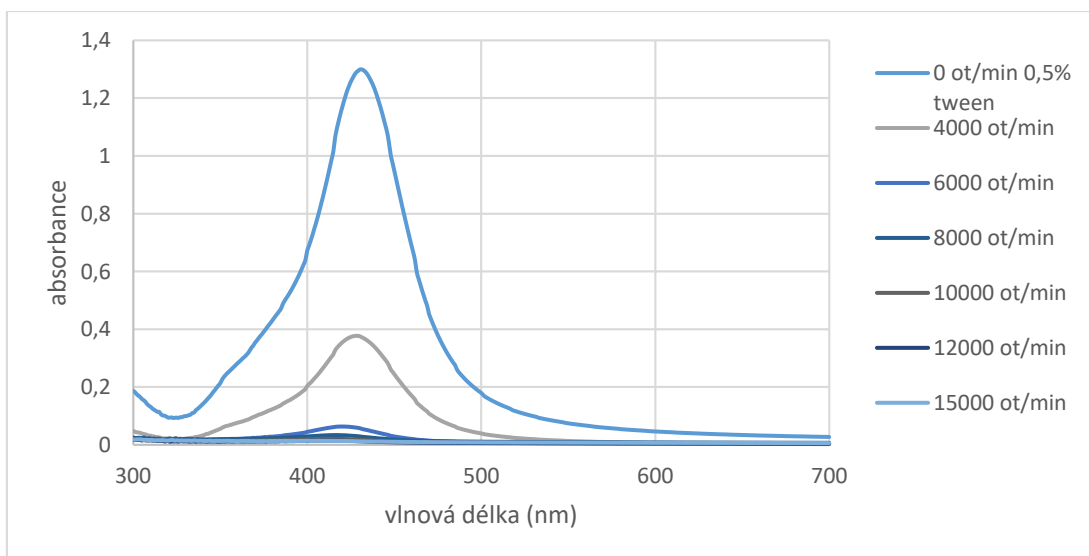
Obr. 24: AgNP připravené pomocí maltózy, stabilizované 0,25% Tweenem 20 a centrifugované při různých rychlostech otáčení



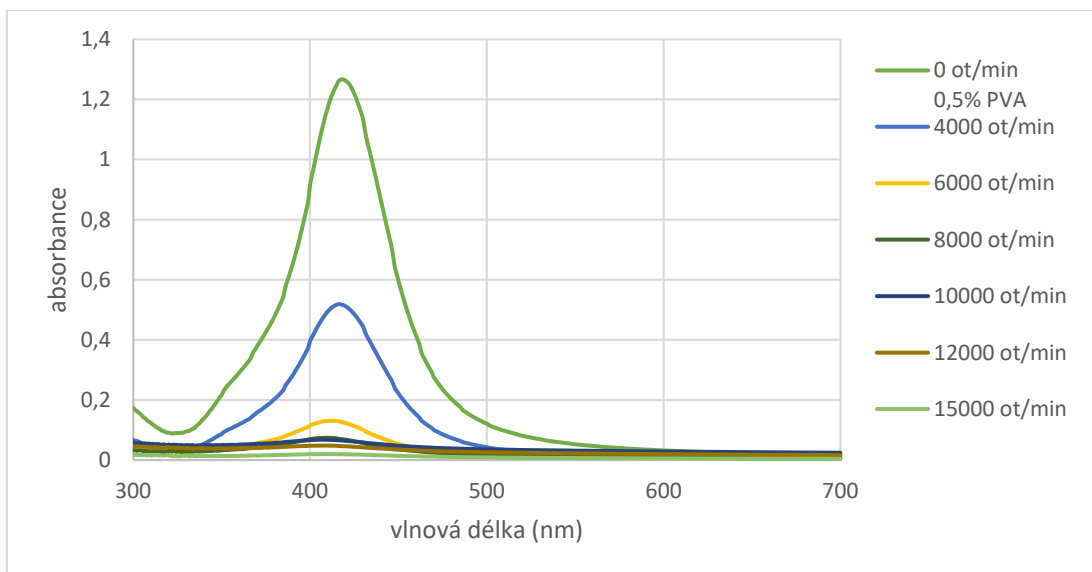
Obr. 25: AgNP připravené pomocí maltózy, stabilizované 0,25% PVA a centrifugované při různých rychlostech otáčení



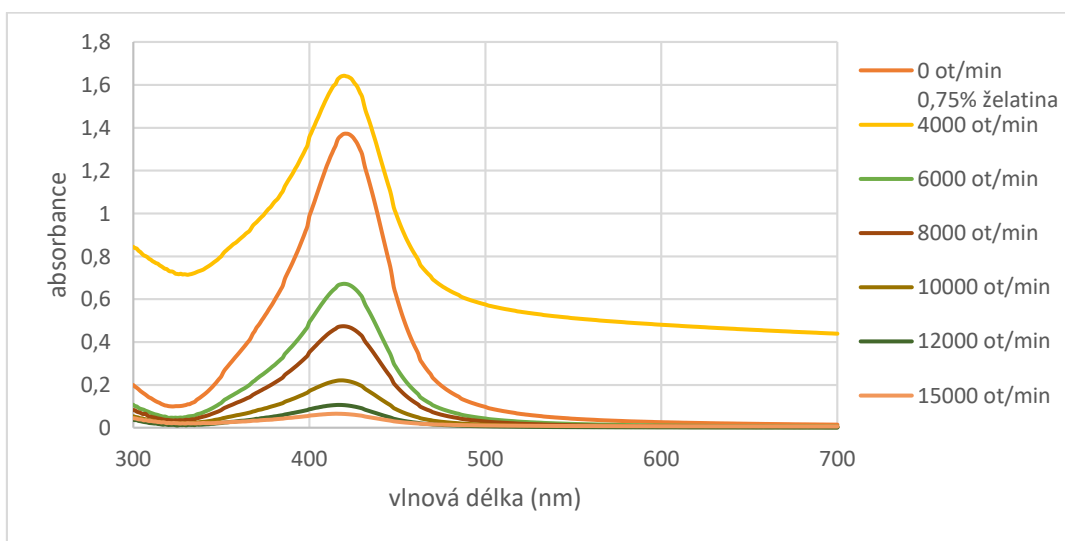
Obr. 26: AgNP připravené pomocí maltózy, stabilizované 0,5% želatinou a centrifugované při různých rychlostech otáčení



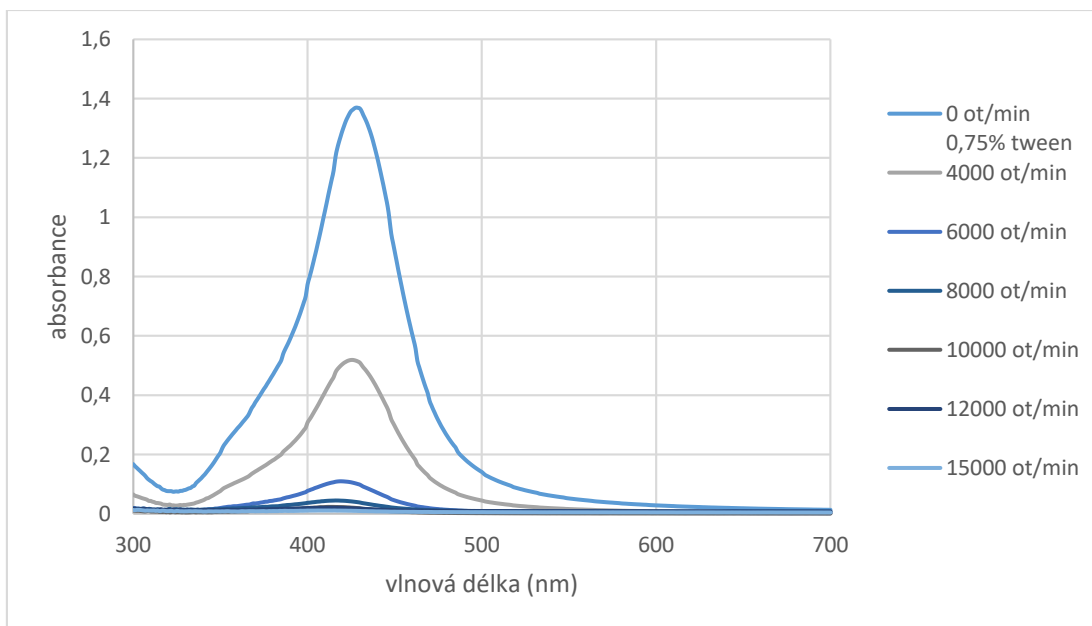
Obr. 27: AgNP připravené pomocí maltózy, stabilizované 0,5% Tweenem 20 a centrifugované při různých rychlostech otáčení



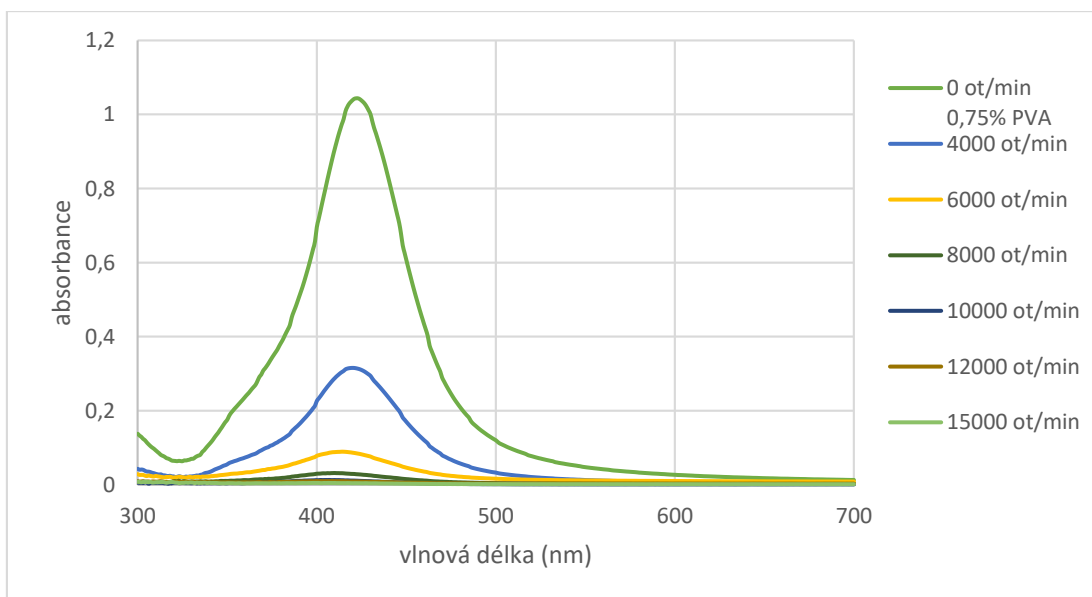
Obr. 28: AgNP připravené pomocí maltózy, stabilizované 0,5% PVA a centrifugované při různých rychlostech otáčení



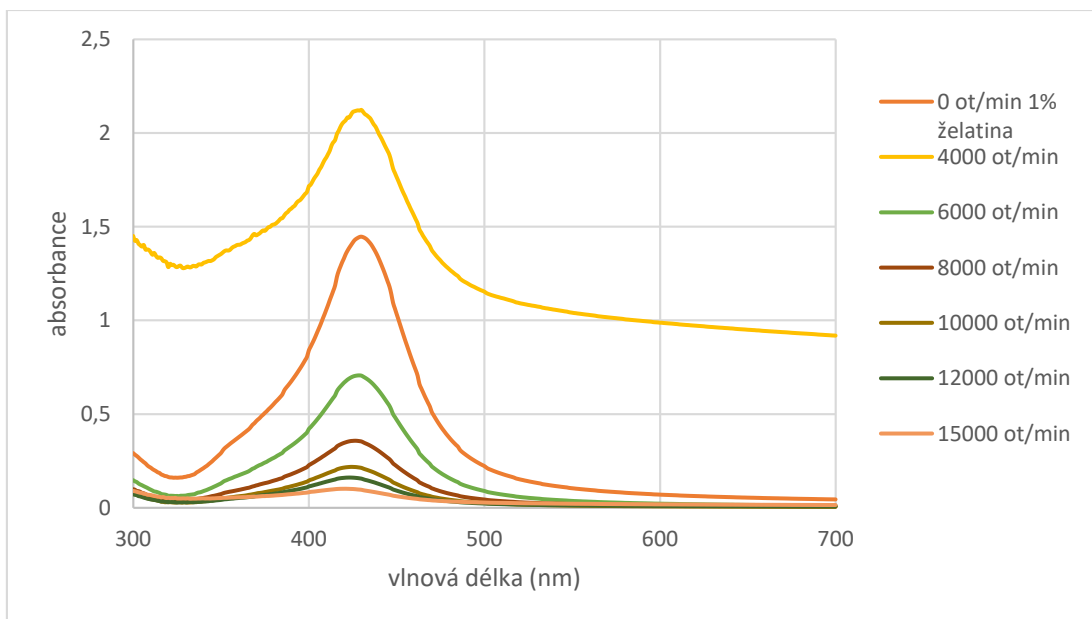
Obr. 29: AgNP připravené pomocí maltózy, stabilizované 0,75% želatinou a centrifugované při různých rychlostech otáčení



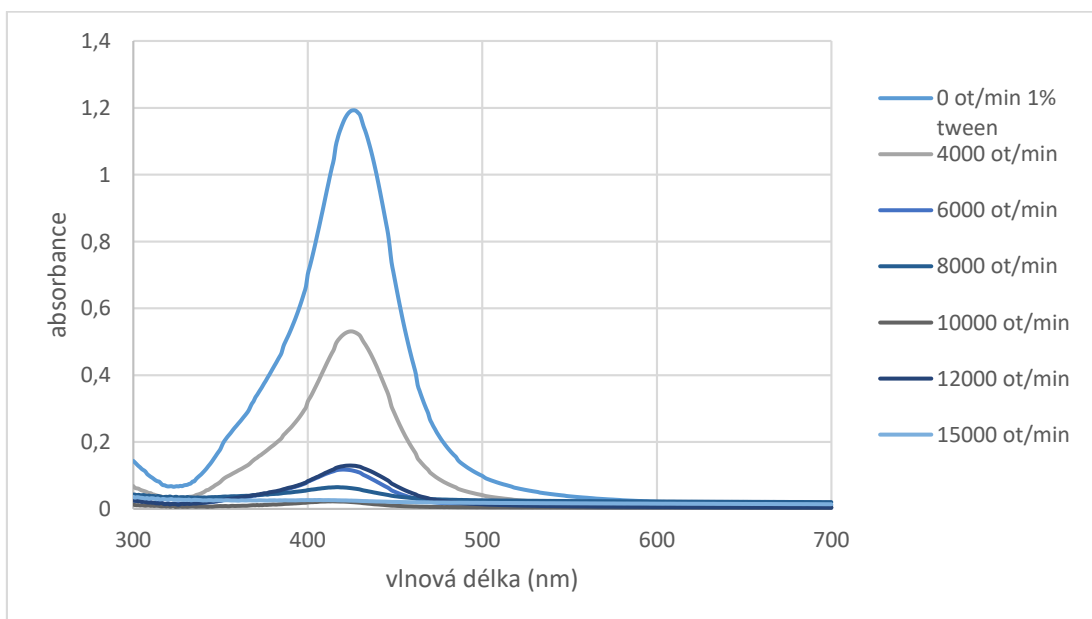
Obr. 30: AgNP připravené pomocí maltózy, stabilizované 0,75% Tweenem 20 a centrifugované při různých rychlostech otáčení



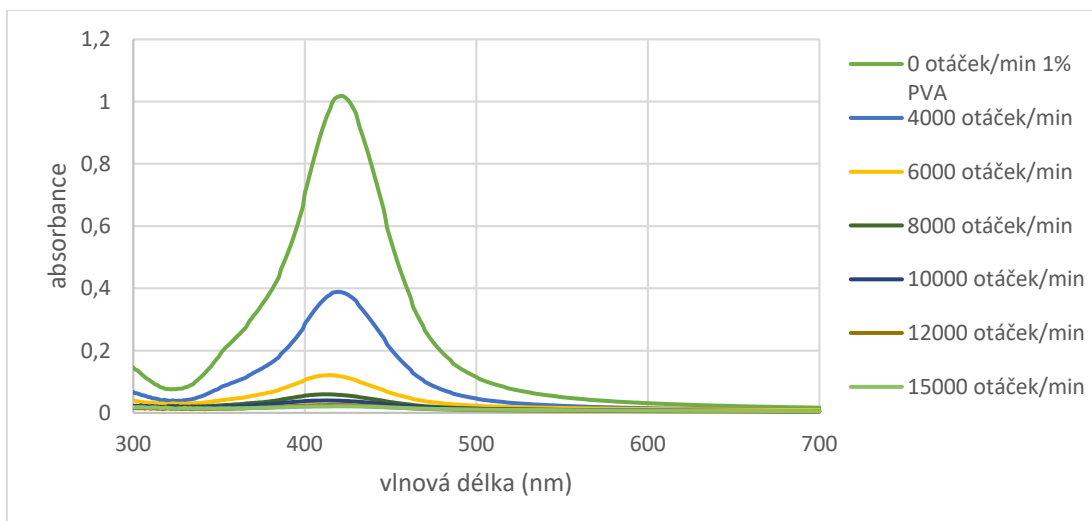
Obr. 31: AgNP připravené pomocí maltózy, stabilizované 0,75% PVA a centrifugované při různých rychlostech otáčení



Obr. 32: AgNP připravené pomocí maltózy, stabilizované 1% želatinou a centrifugované při různých rychlostech otáčení

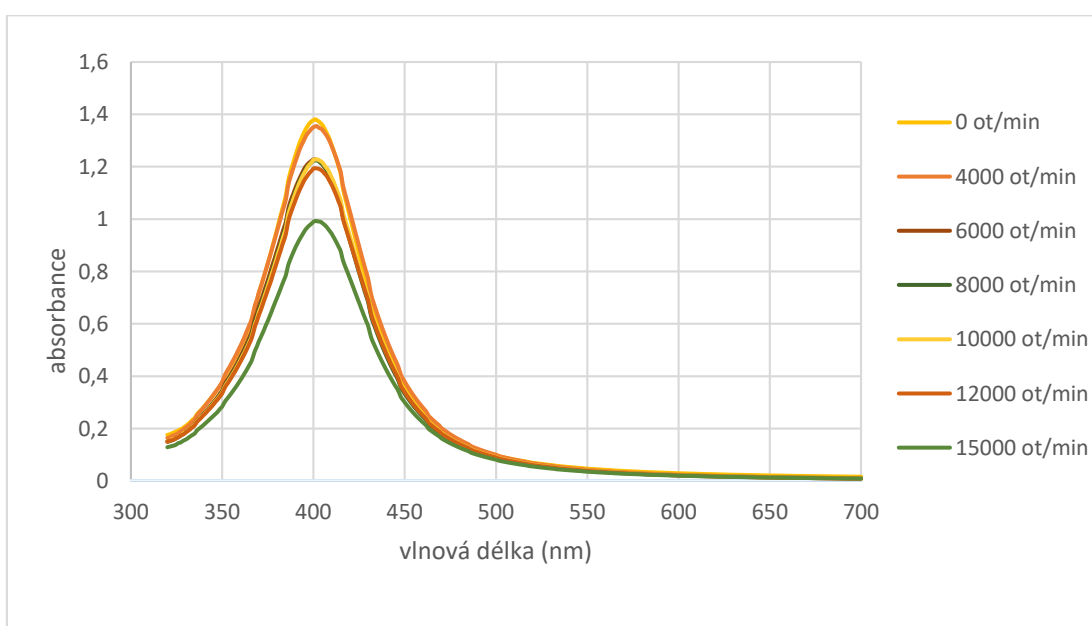


Obr. 33: AgNP připravené pomocí maltózy, stabilizované 1% Tweenem 20 a centrifugované při různých rychlostech otáčení

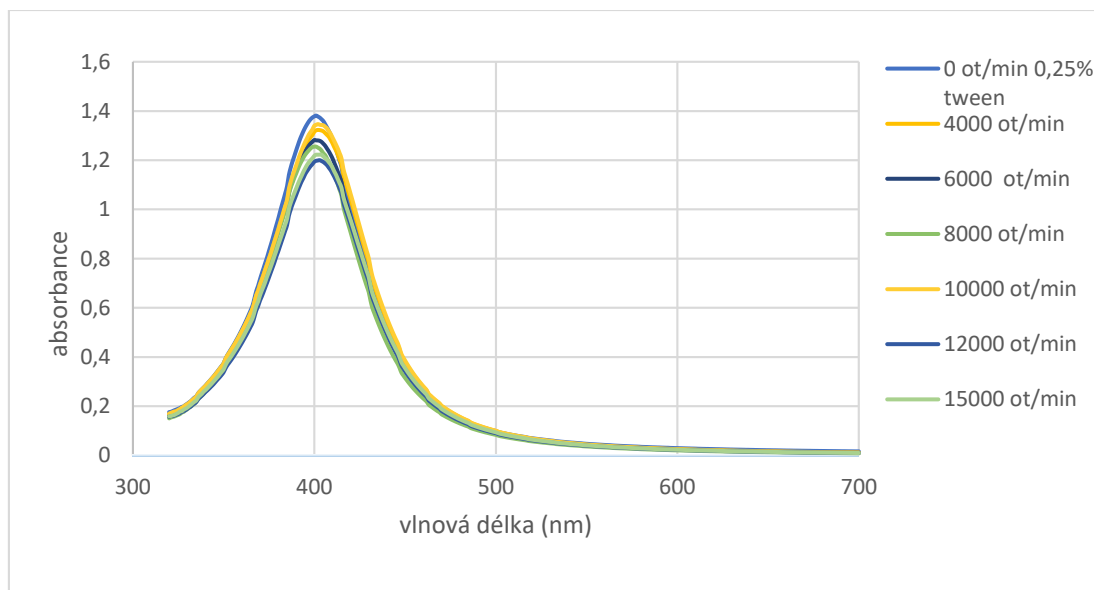


Obr. 34: AgNP připravené pomocí maltózy, stabilizované 1% PVA a centrifugované při různých rychlostech otáčení

Nanočástice připravené s maltózou sedimentovaly i při vysokých koncentracích stabilizátoru. AgNP připravené s tetrahydridoboritanem sodným měly menší částice, tudíž byla předpokládána jejich nižší sedimentace. Toto tvrzení se projevilo jako pravdivé (obr. 35), i přes to však byla nutnost dodatečně po přípravě použít stabilizátor, kterým byl 0,25% Tween 20. Po použití stabilizátoru se nanočástice staly stabilnější a vykazovaly nižší tendenci k sedimentaci (obr. 36).



Obr. 35: AgNP připravené pomocí tetrahydridoboritanu sodného a centrifugované při různých rychlostech otáčení

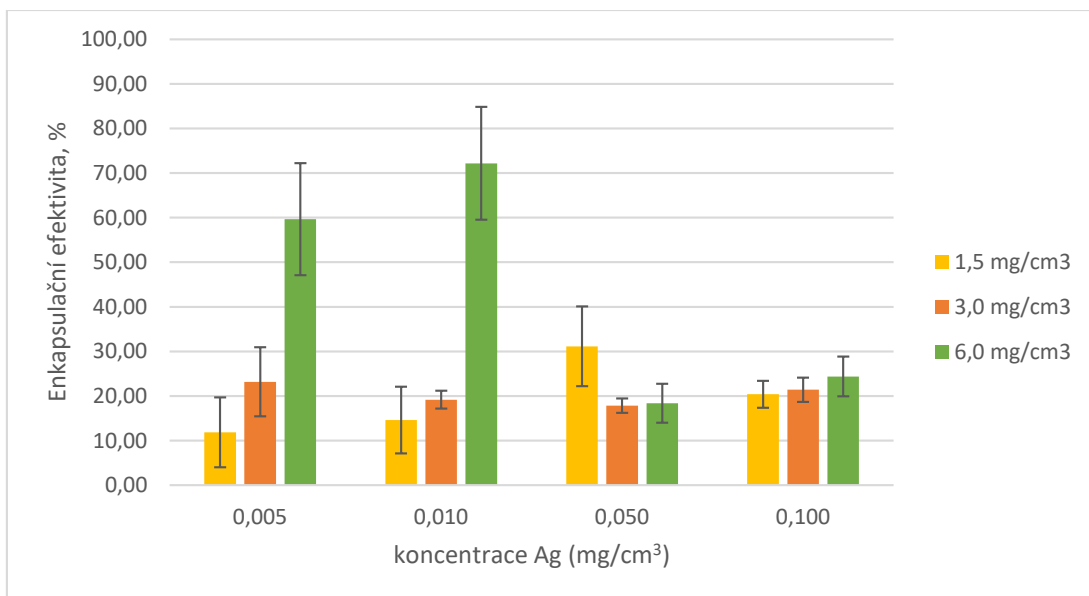


Obr. 36: AgNP připravené pomocí tetrahydridoboritanu sodného dodatečně stabilizované 0,25% Tweenem 20 a centrifugované při různých rychlostech otáčení

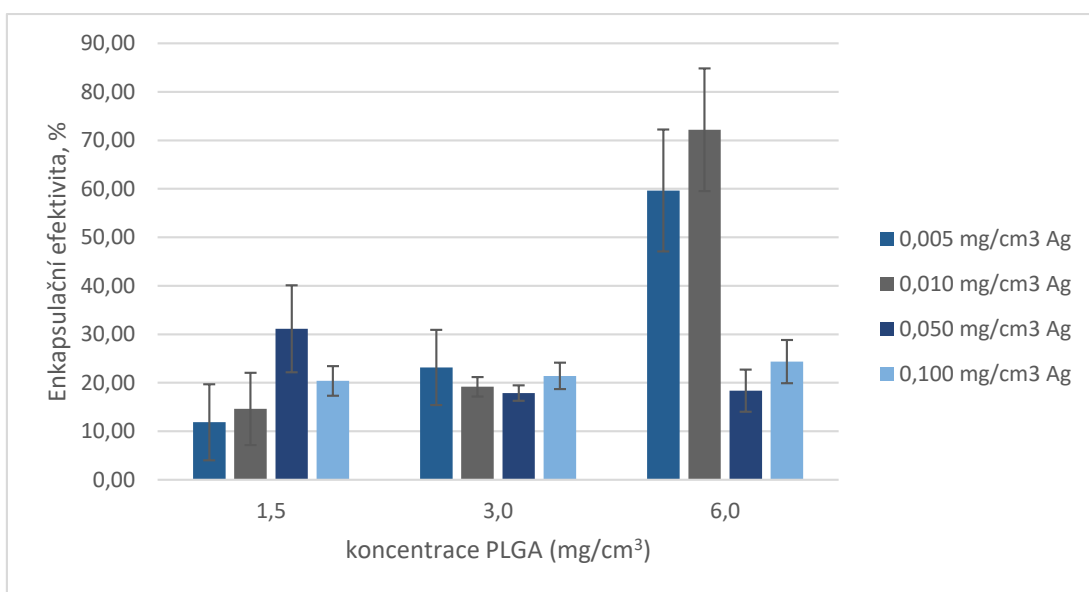
6.4. Enkapsulační efektivita a Drug loading

Na obr. 37 u koncentrace stříbra $0,005 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ lze vidět závislost, kdy s rostoucím množstvím PLGA nanočástic roste i enkapsulační efektivita. Větší množství PLGA do sebe zapouzdří více AgNP. Tento trend lze pozorovat i u koncentrace $0,010 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$. U koncentrace $0,050 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ a $0,1 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ už tato závislost neplatí. Může to být způsobeno velkou koncentrací AgNP, kterou PLGA už není schopna zapouzdřit. Enkapsulační efektivita PLGA/Ag nanočástic byla tedy nejlepší v případě použití $6 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ PLGA a $0,01 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ Ag, kdy dosahovala $72 \% \pm 13 \%$.

Při porovnání enkapsulační efektivy (obr. 38) stříbra v koncentracích $0,005$ a $0,01 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ v závislosti na koncentraci PLGA lze vidět jen mírný nárůst hodnot, při koncentraci PLGA $3,0 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ oproti $1,5 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$, avšak při použití $6 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ PLGA je tento nárůst zhruba pětinasobný. Velikost PLGA nanočástic se zvyšuje s koncentrací PLGA použitého při přípravě nanočástic nanoprecipitací.⁸³ Střední velikost AgNP je jen o jeden řád nižší než střední velikost PLGA nanočástic. PLGA nanočástice jsou tak pravděpodobně schopny pojmou výrazně vyšší množství AgNP až při překročení určité koncentrace.



Obr. 37: Enkapsulační efektivita v závislosti na koncentraci AgNP

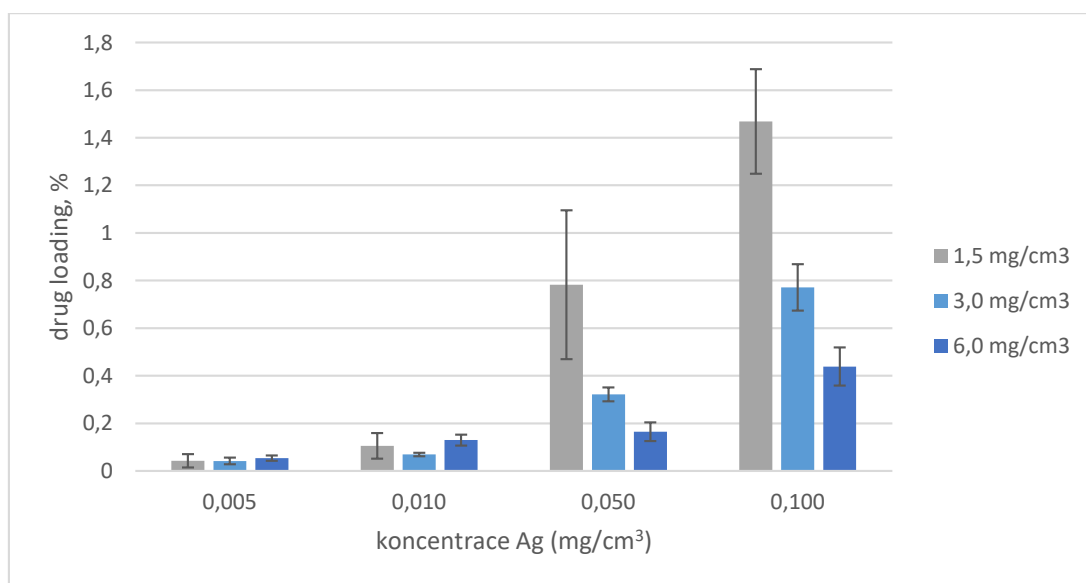


Obr. 38: Enkapsulační efektivita v závislosti na koncentraci AgNP

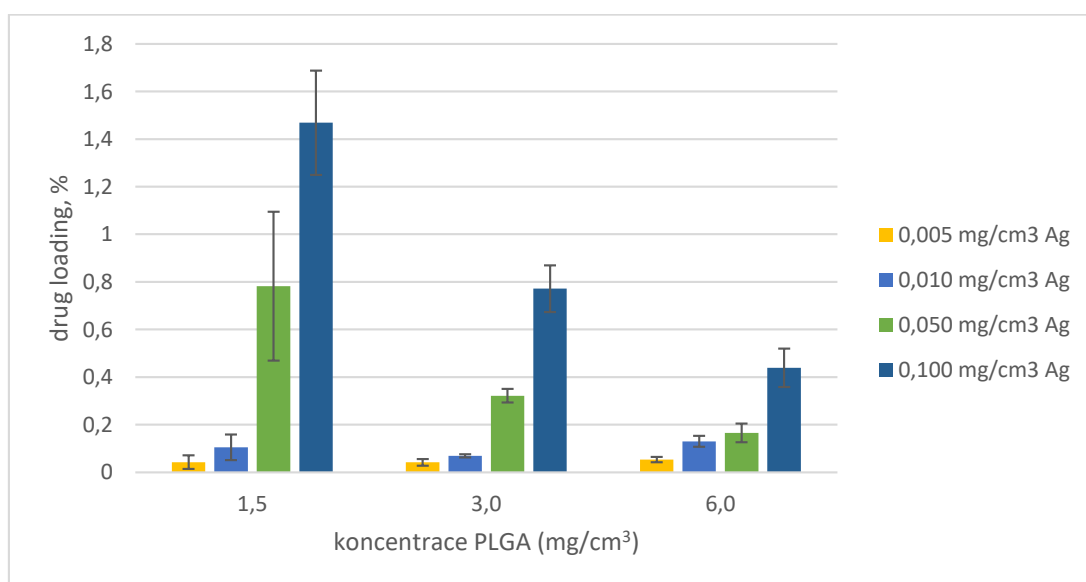
Na obr. 39 je vidět nižší drug loading zejména u koncentrací 0,005 a 0,010 mg·cm⁻³ AgNP. Nízký drug loading je způsoben tím, že AgNP stabilizované hydrofilními látkami při nanoprecipitaci difundují do vodné fáze. Podobné výsledky uvádí i Cheow a Hadinoto, kteří do PLGA zapouzdřili levofloxacin.⁸⁴ U koncentrací 0,05 a 0,10 mg·cm⁻³ je vidět klesající závislost, kdy při menším množství PLGA při stejné koncentraci AgNP vedlo k vyššímu drug loadingu. Vyšší drug loading znamená, že v PLGA je obsaženo více AgNP vzhledem k množství nosiče a může to vést

k efektivnějšímu podávání. Přesto vysoký drug loading není vždy žádoucí a může ovlivnit stabilitu a uvolňování nanočástic z nosiče.⁸⁵

Z obr. 40 je vidět, že drug loading vykazuje rostoucí závislost s přidávaným množstvím AgNP v rámci stejného množství PLGA. Největší byl u 1,5 mg·cm⁻³ PLGA při koncentraci AgNP 0,100 mg·cm⁻³, kdy jeho hodnota je 1,5 % ± 0,2 %.



Obrázek 39: Drug loading enkapsulovaných AgNP do PLGA v závislosti na koncentraci AgNP



Obrázek 40: Drug loading enkapsulovaných AgNP do PLGA v závislosti na koncentraci PLGA

7 Závěr

Nanočástice stříbra byly připraveny z dusičnanu stříbrného chemickou redukcí, kdy jako reductanty byly použity maltóza a tetrahydridoboritan sodný. AgNP vykazovaly typickou barvu a charakteristický pás SPR kolem 400 nm.

PLGA nanočástice byly připraveny v koncentracích 1,5, 3,0 a 6,0 mg·cm⁻³. Při každé koncentraci PLGA byly enkapsulovány různé koncentrace stříbra (0,005, 0,01, 0,05 a 0,100 mg·cm⁻³).

Separace PLGA nanočástic a AgNP byla provedena dvěma metodami – agregací AgNP pomocí agregačních činidel a centrifugací.

Metoda agregace se ukázala jako neefektivní, jelikož PLGA nanočástice agregovaly ochotněji než AgNP nebo byla negativně ovlivněna stabilita obou druhů nanočástic.

AgNP připravené pomocí maltózy nebyly dostatečně stabilní vůči centrifugaci, kdy docházelo k jejich sedimentaci i přes použití stabilizačních činidel. Naproti tomu částice připravené redukcí tetrahydridoboritanem sodným téměř nesedimentovaly, vzhledem k jejich menší velikosti. Dodatečná stabilizace 0,25% Tweenem 20 zajistila ještě lepší odolnost vůči centrifugaci.

Pro formulaci PLGA/Ag byly použity AgNP připravené s tetrahydridoboritanem sodným. Takto připravené nanočástice byly separovány pomocí centrifugace enkapsulované množství bylo stanoveno nepřímou metodou ICP-OES a byla vypočtena enkapsulační efektivita a drug loading.

U koncentrací 0,005 a 0,010 mg·cm⁻³ AgNP lze pozorovat nárůst enkapsulační efektivitivy se zvyšujícím se množstvím PLGA. U koncentrací 0,050 a 0,100 mg·cm⁻³ tato závislost neplatí, což je pravděpodobně způsobeno vysokým množstvím AgNP, které PLGA již není schopna zapoudřit. Drug loading vykazuje rostoucí závislost s přidávaným množstvím AgNP při stejné koncentraci PLGA. Nejvyšší enkapsulační efektivita (72% ± 13 %) byla zaznamenána pro kombinaci PLGA o koncentraci 6,0 mg·cm⁻³ a AgNP o koncentraci 0,01 mg·cm⁻³. Nejvyšší drug loading (1,5 % ± 0,2 %) byl pozorován pro kombinaci PLGA o koncentraci 1,5 mg·cm⁻³ a AgNP o koncentraci 0,1 mg·cm⁻³.

8 Seznam použité literatury

1. BRDIČKA, Prof. Dr. Rudolf. *Základy fyzikální chemie*. Praha: Přírodovědecké vydavatelství, 1952. ISBN DT-541.
2. AULTON, Michael E. a TAYLOR, Kevin M. G. (ed.). *Aulton's Pharmaceutics The Design and Manufacture of Medicines*. 5. Elsevier, 2018. ISBN 978-0-7020-7005-1.
3. KVÍTEK, Libor a PANÁČEK, Aleš. *Základy koloidní chemie*. Skripta. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. ISBN 978-80-244-1669-4.
4. KABÁTKOVÁ, Šárka. *Tvorba studijního materiálu pro předmět fyzikální chemie se zaměřením na disperzní soustavy a optické metody*. Online. Diplomová práce. Brno: Masarykova univerzita, Pedagogická fakulta. 2011.
5. KABÁTKOVÁ, Šárka. *Tvorba studijního materiálu pro předmět fyzikální chemie se zaměřením na disperzní soustavy a optické metody*. Online. Diplomová práce. Brno: Masarykova univerzita, Pedagogická fakulta. 2011.
6. *Optické vlastnosti koloidních soustav*. Online. In: Krystalografická společnost. C2021. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/texty-ulohy-uvod.htm>.
7. *Tyndall Effect*. Online. In: Edureify. C2019. Dostupné z: <https://notes.edureify.com/colloidal-chemistry-introduction-to-colloids/>
8. STEVANOVIĆ, Magdalena; LUKIĆ, Miodrag J.; STANKOVIĆ, Ana; FILIPOVIĆ, Nenad; KUZMANOVIĆ, Maja et al. *Biomedical inorganic nanoparticles: preparation, properties, and perspectives*. Online. In: *Materials for Biomedical Engineering*. Elsevier, 2019, s. 1-46. ISBN 9780081028148.
9. Kumarbarc. *Nanočástice stříbra* [foto]. In: *Wikimedia* [online]. Dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/95/Gold_Colloid_of_varying_size.jpg
10. CLARK, Larry C. *Effects of Selenium Supplementation for Cancer Prevention in Patients With Carcinoma of the Skin*. Online. *JAMA*. 1996, roč. 276, č. 24. ISSN 0098-7484. cit In: STEVANOVIĆ, Magdalena; LUKIĆ, Miodrag J.; STANKOVIĆ, Ana; FILIPOVIĆ, Nenad; KUZMANOVIĆ, Maja et al. *Biomedical inorganic nanoparticles: preparation, properties, and perspectives*.

- Online. In: *Materials for Biomedical Engineering*. Elsevier, 2019, s. 1-46. ISBN 9780081028148.
11. XIA, Yu; YOU, Pengtao; XU, Fangfang; LIU, Jing a XING, Feiyue. *Novel Functionalized Selenium Nanoparticles for Enhanced Anti-Hepatocarcinoma Activity In vitro*. Online. *Nanoscale Research Letters*. 2015, roč. 10, č. 1. ISSN 1556-276X. cit In: STEVANOVIĆ, Magdalena; LUKIĆ, Miodrag J.; STANKOVIĆ, Ana; FILIPOVIĆ, Nenad; KUZMANOVIĆ, Maja et al. *Biomedical inorganic nanoparticles: preparation, properties, and perspectives*. Online. In: *Materials for Biomedical Engineering*. Elsevier, 2019, s. 1-46. ISBN 9780081028148.
 12. ABHINAV K, Venkata; RAO R, Venkata Krishna; KARTHIK, P. S. a SINGH, Surya Prakash. *Copper conductive inks: synthesis and utilization in flexible electronics*. Online. *RSC Advances*. 2015, roč. 5, č. 79, s. 63985-64030. ISSN 2046-2069. cit In: STEVANOVIĆ, Magdalena; LUKIĆ, Miodrag J.; STANKOVIĆ, Ana; FILIPOVIĆ, Nenad; KUZMANOVIĆ, Maja et al. *Biomedical inorganic nanoparticles: preparation, properties, and perspectives*. Online. In: *Materials for Biomedical Engineering*. Elsevier, 2019, s. 1-46. ISBN 9780081028148.
 13. ZHOU, Min; TIAN, Mei a LI, Chun. *Copper-Based Nanomaterials for Cancer Imaging and Therapy*. Online. *Bioconjugate Chemistry*. 2016, roč. 27, č. 5, s. 1188-1199. ISSN 1043-1802. cit In: STEVANOVIĆ, Magdalena; LUKIĆ, Miodrag J.; STANKOVIĆ, Ana; FILIPOVIĆ, Nenad; KUZMANOVIĆ, Maja et al. *Biomedical inorganic nanoparticles: preparation, properties, and perspectives*. Online. In: *Materials for Biomedical Engineering*. Elsevier, 2019, s. 1-46. ISBN 9780081028148
 14. CIOFFI, Nicola; TORSI, Luisa; DITARANTO, Nicoletta; TANTILLO, Giuseppina; GHIBELLI, Lina et al. *Copper Nanoparticle/Polymer Composites with Antifungal and Bacteriostatic Properties*. Online. *Chemistry of Materials*. 2005, roč. 17, č. 21, s. 5255-5262. ISSN 0897-4756. cit In: STEVANOVIĆ, Magdalena; LUKIĆ, Miodrag J.; STANKOVIĆ, Ana; FILIPOVIĆ, Nenad; KUZMANOVIĆ, Maja et al. *Biomedical inorganic nanoparticles: preparation,*

- properties, and perspectives*. Online. In: *Materials for Biomedical Engineering*. Elsevier, 2019, s. 1-46. ISBN 9780081028148.
15. CHEN, Zhen; MENG, Huan; XING, Gengmei; CHEN, Chunying; ZHAO, Yuliang et al. *Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo*. Online. *Toxicology Letters*. 2006, roč. 163, č. 2, s. 109-120. ISSN 03784274. cit In: STEVANOVIĆ, Magdalena; LUKIĆ, Miodrag J.; STANKOVIĆ, Ana; FILIPOVIĆ, Nenad; KUZMANOVIĆ, Maja et al. *Biomedical inorganic nanoparticles: preparation, properties, and perspectives*. Online. In: *Materials for Biomedical Engineering*. Elsevier, 2019, s. 1-46. ISBN 9780081028148.
 16. AHAMED, Maqsood; SIDDIQUI, Maqsood A.; AKHTAR, Mohd J.; AHMAD, Iqbal; PANT, Aditya B. et al. *Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells*. Online. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010, roč. 396, č. 2, s. 578-583. ISSN 0006291X. cit In: STEVANOVIĆ, Magdalena; LUKIĆ, Miodrag J.; STANKOVIĆ, Ana; FILIPOVIĆ, Nenad; KUZMANOVIĆ, Maja et al. *Biomedical inorganic nanoparticles: preparation, properties, and perspectives*. Online. In: *Materials for Biomedical Engineering*. Elsevier, 2019, s. 1-46. ISBN 9780081028148.
 17. BULCKE, Felix; THIEL, Karsten a DRINGEN, Ralf. *Uptake and toxicity of copper oxide nanoparticles in cultured primary brain astrocytes*. Online. *Nanotoxicology*. 2013, s. 1-11. ISSN 1743-5390. cit In: STEVANOVIĆ, Magdalena; LUKIĆ, Miodrag J.; STANKOVIĆ, Ana; FILIPOVIĆ, Nenad; KUZMANOVIĆ, Maja et al. *Biomedical inorganic nanoparticles: preparation, properties, and perspectives*. Online. In: *Materials for Biomedical Engineering*. Elsevier, 2019, s. 1-46. ISBN 9780081028148.
 18. YU, Jing; CHEN, Fan; GAO, Weiliang; JU, Yanmin; CHU, Xin et al. *Iron carbide nanoparticles: an innovative nanoplatfrom for biomedical applications*. Online. *Nanoscale Horizons*. 2017, roč. 2, č. 2, s. 81-88. ISSN 2055-6756. cit In: STEVANOVIĆ, Magdalena; LUKIĆ, Miodrag J.; STANKOVIĆ, Ana; FILIPOVIĆ, Nenad; KUZMANOVIĆ, Maja et al. *Biomedical inorganic nanoparticles: preparation, properties, and perspectives*. Online. In: *Materials for Biomedical Engineering*. Elsevier, 2019, s. 1-46. ISBN 9780081028148.

19. VITTA, Yosmery; PISCITELLI, Vincent; FERNANDEZ, Alberto; GONZALEZ-JIMENEZ, Fernando a CASTILLO, Jimmy. *A-Fe nanoparticles produced by laser ablation: Optical and magnetic properties*. Online. *Chemical Physics Letters*. 2011, roč. 512, č. 1-3, s. 96-98. ISSN 00092614. cit In: STEVANOVIĆ, Magdalena; LUKIĆ, Miodrag J.; STANKOVIĆ, Ana; FILIPOVIĆ, Nenad; KUZMANOVIĆ, Maja et al. *Biomedical inorganic nanoparticles: preparation, properties, and perspectives*. Online. In: *Materials for Biomedical Engineering*. Elsevier, 2019, s. 1-46. ISBN 9780081028148.
20. CHUNG, Ren-Jei a SHIH, Hui-Ting. *Preparation of Multifunctional Fe@Au Core-Shell Nanoparticles with Surface Grafting as a Potential Treatment for Magnetic Hyperthermia*. Online. *Materials*. 2014, roč. 7, č. 2, s. 653-661. ISSN 1996-1944. cit In: STEVANOVIĆ, Magdalena; LUKIĆ, Miodrag J.; STANKOVIĆ, Ana; FILIPOVIĆ, Nenad; KUZMANOVIĆ, Maja et al. *Biomedical inorganic nanoparticles: preparation, properties, and perspectives*. Online. In: *Materials for Biomedical Engineering*. Elsevier, 2019, s. 1-46. ISBN 9780081028148.
21. PANDEY, Parijat & DAHIJA, Mandeep. *A BRIEF REVIEW ON INORGANIC NANOPARTICLES*. *Journal of Critical Reviews*. 3. 18-26, 2016.
22. *Graphite to Graphene... in a Kitchen Blender*. Online. In: *NaturPhilosophie*. 2013. Dostupné z: <https://www.naturphilosophie.co.uk/graphite-graphene-kitchen-blender/>.
23. YADAV, Bal & KUMAR, Ritesh. (2008). *Structure, properties and applications of fullerene*. *International Journal of Nanotechnology and Applications*. 1. 15-24. cit In: PANDEY, Parijat & DAHIJA, Mandeep. *A BRIEF REVIEW ON INORGANIC NANOPARTICLES*. *Journal of Critical Reviews*. 3. 18-26, 2016.
24. CHEN, Chunying; XING, Gengmei; WANG, Jiangxue; ZHAO, Yuliang; LI, Bai et al. *Multihydroxylated [Gd@C 82 (OH) 22] n Nanoparticles: Antineoplastic Activity of High Efficiency and Low Toxicity*. Online. *Nano Letters*. 2005, roč. 5, č. 10, s. 2050-2057. ISSN 1530-6984. cit In: FERNANDES, Neha Benedicta; SHENOY, Raghavendra Udaya Kumar; KAJAMPADY, Mandira Kashi; DCRUZ, Cleona E. M.; SHIRODKAR, Rupesh K. et al. *Fullerenes for the*

- treatment of cancer: an emerging tool*. Online. *Environmental Science and Pollution Research*. 2022, roč. 29, č. 39, s. 58607-58627. ISSN 0944-1344.
25. JAROŠ, Adam a STRAKA, Michal. *Endohedral Fullerenes: From Exotic Chemical Bonding to Molecular Circuits*. Online. *Chemické listy*. 2024, roč. 118, č. 4, s. 190-194. ISSN 1213-7103.
26. HE, Hua; PHAM-HUY, Lien Ai; DRAMOU, Pierre; XIAO, Deli; ZUO, Pengli et al. *Carbon Nanotubes: Applications in Pharmacy and Medicine*. Online. *BioMed Research International*. 2013, roč. 2013, s. 1-12. ISSN 2314-6133.
27. LIU, Jingquan; CUI, Liang a LOSIC, Dusan. *Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications*. Online. *Acta Biomaterialia*. 2013, roč. 9, č. 12, s. 9243-9257. ISSN 17427061.
28. PANÁČEK, David; BELZA, Jan; HOCHVALDOVÁ, Lucie; BAĎURA, Zdeněk; ZOPPELLARO, Giorgio et al. *Single Atom Engineered Antibiotics Overcome Bacterial Resistance*. Online. *Advanced Materials*. ISSN 0935-9648.
29. MEDENBACH, Olaf a SUSSIECK-FORNEFELD, Cornelia. *Minerály. Průvodce přírodou*. Praha: Knižní klub, 1995. ISBN 80-7176-207-5.
30. KUNC, Martin. *Nanostříbro a studium jeho vlivu na bezobratlé živočichy*. Online. Bakalářská práce. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. 2013.
31. GARCÍA-BARRASA, Jorge; LÓPEZ-DE-LUZURIAGA, José a MONGE, Miguel. *Silver nanoparticles: synthesis through chemical methods in solution and biomedical applications*. Online. *Open Chemistry*. 2011, roč. 9, č. 1, s. 7-19. ISSN 2391-5420. cit In: GYBASOVÁ, Soňa. *Syntéza nanočástic stříbra pomocí termálně indukované redukce*. Olomouc, 2013. bakalářská práce (Bc.). UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI. Přírodovědecká fakulta
32. ALEXANDER, J. Wesley. *History of the Medical Use of Silver*. Online. *Surgical Infections*. 2009, roč. 10, č. 3, s. 289-292. ISSN 1096-2964. cit. In: GYBASOVÁ, Soňa. *Syntéza nanočástic stříbra pomocí termálně indukované redukce*. Olomouc, 2013. bakalářská práce (Bc.). UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI. Přírodovědecká fakulta
33. HELMLINGER, Jens; SENGSTOCK, Christina; GROSS-HEITFELD, Christoph; MAYER, Christian; SCHILDHAUER, Thomas A. et al. *Silver nanoparticles with different size and shape: equal cytotoxicity, but different*

- antibacterial effects*. Online. *RSC Advances*. 2016, roč. 6, č. 22, s. 18490-18501. ISSN 2046-2069.
34. HLISTOVÁ, Miroslava. *Studium chronické toxicity nanočástic stříbra vůči organismu Drosophila melanogaster*. Olomouc, 2013. bakalářská práce (Bc.). UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI. Přírodovědecká fakulta
35. KVÍTEK, Libor; PRUCEK, Robert; PANÁČEK, Aleš; SOUKUPOVÁ, Jana. Nanočástice stříbra – příprava, vlastnosti a aplikace. Rožnov pod Radhoštěm: NANOCON 2009, 2009 cit In: HLISTOVÁ, Miroslava. *Studium chronické toxicity nanočástic stříbra vůči organismu Drosophila melanogaster*. Olomouc, 2013. bakalářská práce (Bc.). UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI. Přírodovědecká fakulta
36. LEE P. C., MEISEL D.J, *Phys. Chem.* 86, 3391 (1982) cit. In: GARCÍA-BARRASA, Jorge; LÓPEZ-DE-LUZURIAGA, José a MONGE, Miguel. *Silver nanoparticles: synthesis through chemical methods in solution and biomedical applications*. Online. *Open Chemistry*. 2011, roč. 9, č. 1, s. 7-19. ISSN 2391-5420.
37. CREIGHTON J. Alan, BLATCHFORD Christopher G., ALBRECHT M. Grant., *J. Chem. Soc. Farad. Trans. II* 75, 790 (1979) cit. In: GARCÍA-BARRASA, Jorge; LÓPEZ-DE-LUZURIAGA, José a MONGE, Miguel. *Silver nanoparticles: synthesis through chemical methods in solution and biomedical applications*. Online. *Open Chemistry*. 2011, roč. 9, č. 1, s. 7-19. ISSN 2391-5420.
38. KVÍTEK, Libor. *Studium přípravy a aplikačních možností nanočástic stříbra*, habilitační práce. Olomouc: Univerzita Palackého, 2008. cit In: HLISTOVÁ, Miroslava. *Studium chronické toxicity nanočástic stříbra vůči organismu Drosophila melanogaster*. Olomouc, 2013. bakalářská práce (Bc.). UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI. Přírodovědecká fakulta
39. SIVERA, Martin; KVÍTEK, Libor; SOUKUPOVA, Jana; PANACEK, Ales; PRUCEK, Robert et al. *Silver Nanoparticles Modified by Gelatin with Extraordinary pH Stability and Long-Term Antibacterial Activity*. Online. *PLoS ONE*. 2014, roč. 9, č. 8. ISSN 1932-6203.
40. KHAN, Ibrahim; SAEED, Khalid a KHAN, Idrees. *Nanoparticles: Properties, applications and toxicities*. Online. *Arabian Journal of Chemistry*. 2019, roč. 12, č. 7, s. 908-931. ISSN 18785352.

41. VERMA, Poonam , MAHESHWARI, Sanjiv Kumar. *Applications of Silver nanoparticles in diverse sectors*. Int. J. Nano Dimens., 2019; 10 (1): 18-36.
42. KIM, Jun Sung; KUK, Eunye; YU, Kyeong Nam; KIM, Jong-Ho; PARK, Sung Jin et al. *Antimicrobial effects of silver nanoparticles*. Online. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2007, roč. 3, č. 1, s. 95-101. ISSN 15499634.
43. SALLEH, Atiqah; NAOMI, Ruth; UTAMI, Nike Dewi; MOHAMMAD, Abdul Wahab; MAHMOUDI, Ebrahim et al. *The Potential of Silver Nanoparticles for Antiviral and Antibacterial Applications: A Mechanism of Action*. Online. *Nanomaterials*. 2020, roč. 10, č. 8. ISSN 2079-4991. cit In: RAI, Mahendra; INGLE, Avinash P.; TRZCIŃSKA-WENCEL, Joanna; WYPIJ, Magdalena; BONDE, Shital et al. *Biogenic Silver Nanoparticles: What We Know and What Do We Need to Know?* Online. *Nanomaterials*. 2021, roč. 11, č. 11. ISSN 2079-4991.
44. SREEKANTH, T.V.M.; NAGAJYOTHI, P.C.; MUTHURAMAN, P.; ENKHTAIVAN, G.; VATTIKUTI, S.V.P. et al. *Ultra-sonication-assisted silver nanoparticles using Panax ginseng root extract and their anti-cancer and antiviral activities*. Online. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2018, roč. 188, s. 6-11. ISSN 10111344. cit In: RAI, Mahendra; INGLE, Avinash P.; TRZCIŃSKA-WENCEL, Joanna; WYPIJ, Magdalena; BONDE, Shital et al. *Biogenic Silver Nanoparticles: What We Know and What Do We Need to Know?* Online. *Nanomaterials*. 2021, roč. 11, č. 11. ISSN 2079-4991.
45. GALDIERO, Stefania; FALANGA, Annarita; VITIELLO, Mariateresa; CANTISANI, Marco; MARRA, Veronica et al. *Silver Nanoparticles as Potential Antiviral Agents*. Online. *Molecules*. 2011, roč. 16, č. 10, s. 8894-8918. ISSN 1420-3049. cit In: RAI, Mahendra; INGLE, Avinash P.; TRZCIŃSKA-WENCEL, Joanna; WYPIJ, Magdalena; BONDE, Shital et al. *Biogenic Silver Nanoparticles: What We Know and What Do We Need to Know?* Online. *Nanomaterials*. 2021, roč. 11, č. 11. ISSN 2079-4991.
46. FANTI, Jacqueline Rodrigues; TOMIOTTO-PELLISSIER, Fernanda; MIRANDA-SAPLA, Milena Menegazzo; CATANEO, Allan Henrique Depieri; ANDRADE, Célia Guadalupe Tardeli de Jesus et al. *Biogenic silver nanoparticles*

- inducing Leishmania amazonensis promastigote and amastigote death in vitro*. Online. *Acta Tropica*. 2018, roč. 178, s. 46-54. ISSN 0001706X. cit In: RAI, Mahendra; INGLE, Avinash P.; TRZCIŃSKA-WENCEL, Joanna; WYPIJ, Magdalena; BONDE, Shital et al. *Biogenic Silver Nanoparticles: What We Know and What Do We Need to Know?* Online. *Nanomaterials*. 2021, roč. 11, č. 11. ISSN 2079-4991.
47. MACHADO, Laís Fernanda; SANFELICE, Raquel Arruda; BOSQUI, Larissa Rodrigues; ASSOLINI, João Paulo; SCANDORIEIRO, Sara et al. *Biogenic silver nanoparticles reduce adherence, infection, and proliferation of toxoplasma gondii RH strain in HeLa cells without inflammatory mediators induction*. Online. *Experimental Parasitology*. 2020, roč. 211. ISSN 00144894. cit In: RAI, Mahendra; INGLE, Avinash P.; TRZCIŃSKA-WENCEL, Joanna; WYPIJ, Magdalena; BONDE, Shital et al. *Biogenic Silver Nanoparticles: What We Know and What Do We Need to Know?* Online. *Nanomaterials*. 2021, roč. 11, č. 11. ISSN 2079-4991.
48. GOPINATH, P; GOGOI, Sonit Kumar; CHATTOPADHYAY, Arun a GHOSH, Siddhartha Sankar. *Implications of silver nanoparticle induced cell apoptosis for in vitro gene therapy*. Online. *Nanotechnology*. 2008, roč. 19, č. 7. ISSN 0957-4484.
49. CHAUBEY, Nidhi; SAHOO, Amaresh Kumar; CHATTOPADHYAY, Arun a GHOSH, Siddhartha Sankar. *Silver nanoparticle loaded PLGA composite nanoparticles for improving therapeutic efficacy of recombinant IFN γ by targeting the cell surface*. Online. *Biomaterials Science*. 2014, roč. 2, č. 8. ISSN 2047-4830.
50. STEVANOVIĆ, Magdalena; BRAČKO, Ines; MILENKOVIĆ, Marina; FILIPOVIĆ, Nenad; NUNIĆ, Jana et al. *Multifunctional PLGA particles containing poly(l-glutamic acid)-capped silver nanoparticles and ascorbic acid with simultaneous antioxidative and prolonged antimicrobial activity*. Online. *Acta Biomaterialia*. 2014, roč. 10, č. 1, s. 151-162. ISSN 17427061.
51. FURCHNER, J. E.; RICHMOND, C. R. a DRAKE, G. A. *Comparative Metabolism of Radionuclides in Mammals - IV. Retention of Silver-110m in the Mouse, Rat, Monkey, and Dog*. Online. *Health Physics*. 1968, roč. 15, č. 6, s. 505-

514. ISSN 0017-9078. cit In: HADRUP, Niels a LAM, Henrik R. *Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver – A review*. Online. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2014, roč. 68, č. 1, s. 1-7. ISSN 02732300.
52. NOWACK, Bernd; KRUG, Harald F. a HEIGHT, Murray. *120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers*. Online. *Environmental Science & Technology*. 2011, roč. 45, č. 4, s. 1177-1183. ISSN 0013-936X.
53. PRABHU, Sukumaran a POULOSE, Eldho K. *Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects*. Online. *International Nano Letters*. 2012, roč. 2, č. 1. ISSN 2008-9295. cit In: MATHUR, Prateek, JHA, Swati, RAMTEKE, Suman, & JAIN, N. K. *Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles*. Online. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2017; 46(sup1), 115–126.
54. HADRUP, Niels a LAM, Henrik R. *Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver – A review*. Online. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2014, roč. 68, č. 1, s. 1-7. ISSN 02732300. cit In: MATHUR, Prateek, JHA, Swati, RAMTEKE, Suman, & JAIN, N. K. *Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles*. Online. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2017; 46(sup1), 115–126.
55. MIRSATTARI, Seyed M.; HAMMOND, Robert R.; SHARPE, Michael D.; LEUNG, Fay Y. a YOUNG, G. Bryan *Myoclonic status epilepticus following repeated oral ingestion of colloidal silver*. Online. *Neurology*. 2004, roč. 62, č. 8, s. 1408-1410. ISSN 0028-3878. cit In: MATHUR, Prateek, JHA, Swati, RAMTEKE, Suman, & JAIN, N. K. *Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles*. Online. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2017; 46(sup1), 115–126.
56. EMA, Makoto; OKUDA, Hirokazu; GAMO, Masashi a HONDA, Kazumasa. *A review of reproductive and developmental toxicity of silver nanoparticles in laboratory animals*. Online. *Reproductive Toxicology*. 2017, roč. 67, s. 149-164. ISSN 08906238. cit In: MATHUR, Prateek, JHA, Swati, RAMTEKE, Suman, & JAIN, N. K. *Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles*. Online. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2017; 46(sup1), 115–126.

57. BENN, Troy M. a WESTERHOFF, Paul. *Nanoparticle Silver Released into Water from Commercially Available Sock Fabrics*. Online. *Environmental Science & Technology*. 2008, roč. 42, č. 11, s. 4133-4139. ISSN 0013-936X. cit In: YU, Su-juan; YIN, Yong-guang a LIU, Jing-fu. *Silver nanoparticles in the environment*. Online. *Environ. Sci.: Processes Impacts*. 2013, roč. 15, č. 1, s. 78-92. ISSN 2050-7887.
58. LUBICK, Naomi. *Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles — or both?* Online. *Environmental Science & Technology*. 2008, roč. 42, č. 23, s. 8617-8617. ISSN 0013-936X.
59. LEE, Kerry J.; NALLATHAMBY, Prakash D.; BROWNING, Lauren M.; OSGOOD, Christopher J. a XU, Xiao-Hong Nancy. *In Vivo Imaging of Transport and Biocompatibility of Single Silver Nanoparticles in Early Development of Zebrafish Embryos*. Online. *ACS Nano*. 2007, roč. 1, č. 2, s. 133-143. ISSN 1936-0851. cit In: YU, Su-juan; YIN, Yong-guang a LIU, Jing-fu. *Silver nanoparticles in the environment*. Online. *Environ. Sci.: Processes Impacts*. 2013, roč. 15, č. 1, s. 78-92. ISSN 2050-7887.
60. CHAE, Yun Ju; PHAM, Chi Hoa; LEE, Jinwon; BAE, Eunjoo; YI, Jongheop et al. *Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*)*. Online. *Aquatic Toxicology*. 2009, roč. 94, č. 4, s. 320-327. ISSN 0166445X. cit In: YU, Su-juan; YIN, Yong-guang a LIU, Jing-fu. *Silver nanoparticles in the environment*. Online. *Environ. Sci.: Processes Impacts*. 2013, roč. 15, č. 1, s. 78-92. ISSN 2050-7887.
61. BURY, Nicolas R. a WOOD, Chris M. *Mechanism of branchial apical silver uptake by rainbow trout is via the proton-coupled Na⁺ channel*. Online. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1999, roč. 277, č. 5, s. R1385-R1391. ISSN 0363-6119. cit In: FABREGA, Julia; LUOMA, Samuel N.; TYLER, Charles R.; GALLOWAY, Tamara S. a LEAD, Jamie R. *Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment*. Online. *Environment International*. 2011, roč. 37, č. 2, s. 517-531. ISSN 01604120.
62. POYNTON, Helen C.; LAZORCHAK, James M.; IMPELLITTERI, Christopher A.; BLALOCK, Bonnie J.; ROGERS, Kim et al. *Toxicogenomic Responses of*

- Nanotoxicity in Daphnia magna Exposed to Silver Nitrate and Coated Silver Nanoparticles*. Online. *Environmental Science & Technology*. 2012, roč. 46, č. 11, s. 6288-6296. ISSN 0013-936X. cit In: YU, Su-juan; YIN, Yong-guang a LIU, Jing-fu. *Silver nanoparticles in the environment*. Online. *Environ. Sci.: Processes Impacts*. 2013, roč. 15, č. 1, s. 78-92. ISSN 2050-7887.
63. PANACEK, Ales; PRUCEK, Robert; SAFAROVA, Dana; DITTRICH, Milan; RICHTROVA, Jana et al. *Acute and Chronic Toxicity Effects of Silver Nanoparticles (NPs) on Drosophila melanogaster*. Online. *Environmental Science & Technology*. 2011, roč. 45, č. 11, s. 4974-4979. ISSN 0013-936X. cit In: YU, Su-juan; YIN, Yong-guang a LIU, Jing-fu. *Silver nanoparticles in the environment*. Online. *Environ. Sci.: Processes Impacts*. 2013, roč. 15, č. 1, s. 78-92. ISSN 2050-7887.
64. DING, Dawei a ZHU, Qingdi. *Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics*. Online. *Materials Science and Engineering: C*. 2018, roč. 92, s. 1041-1060. ISSN 09284931. cit. In: ROCHA, Cátia Vieira; GONÇALVES, Victor; DA SILVA, Milene Costa; BAÑOBRE-LÓPEZ, Manuel a GALLO, Juan. *PLGA-Based Composites for Various Biomedical Applications*. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, roč. 23, č. 4. ISSN 1422-0067
65. SAH, Edel; SAH, Hongkee a BOUOUDINA, Mohamed. *Recent Trends in Preparation of Poly(lactide- co -glycolide) Nanoparticles by Mixing Polymeric Organic Solution with Antisolvent*. Online. *Journal of Nanomaterials*. 2015, roč. 2015, č. 1. ISSN 1687-4110. cit. In: ROCHA, Cátia Vieira; GONÇALVES, Victor; DA SILVA, Milene Costa; BAÑOBRE-LÓPEZ, Manuel a GALLO, Juan. *PLGA-Based Composites for Various Biomedical Applications*. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, roč. 23, č. 4. ISSN 1422-0067
66. SHARMA, Shweta; PARMAR, Ankush; KORI, Shivpoojan a SANDHIR, Rajat. *PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications*. Online. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016, roč. 80, s. 30-40. ISSN 01659936. cit. In: ROCHA, Cátia Vieira; GONÇALVES, Victor; DA SILVA, Milene Costa; BAÑOBRE-LÓPEZ, Manuel a GALLO, Juan. *PLGA-Based*

- Composites for Various Biomedical Applications*. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, roč. 23, č. 4. ISSN 1422-0067
67. ANDERSON, James M. a SHIVE, Matthew S. *Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres*. Online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012, roč. 64, s. 72-82. ISSN 0169409X.
68. KUMARI, Avnesh; YADAV, Sudesh Kumar a YADAV, Subhash C. *Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems*. Online. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010, roč. 75, č. 1, s. 1-18. ISSN 09277765. cit. In: DANHIER, Fabienne; ANSORENA, Eduardo; SILVA, Joana M.; COCO, Régis; LE BRETON, Aude et al. *PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications*. Online. *Journal of Controlled Release*. 2012, roč. 161, č. 2, s. 505-522. ISSN 01683659.
69. JÍLEK, Petr. *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*. 4., přeprac a dopl. vyd., V Grada Publishing 1. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-4822-1.
70. XU, Zhili; LIU, Hongmei; TIAN, Hao a YAN, Fei. *Real-Time Imaging Tracking of Engineered Macrophages as Ultrasound-Triggered Cell Bombs for Cancer Treatment*. Online. *Advanced Functional Materials*. 2020, roč. 30, č. 14. ISSN 1616-301X. cit. In: ZHANG, Libo, REN, Zhen, LÜ, Jinhui et al. *Nanoparticles carrying paclitaxel and anti-miR-221 for breast cancer therapy triggered by ultrasound*. *Cell Death Discov.* **9**, 298 (2023).
71. COLINO, Clara I.; LANA O, José M. a GUTIERREZ-MILLAN, Carmen. *Targeting of Hepatic Macrophages by Therapeutic Nanoparticles*. Online. *Frontiers in Immunology*. 2020, roč. 11. ISSN 1664-3224
72. BOWERMAN, Charles J.; BYRNE, James D.; CHU, Kevin S.; SCHORZMAN, Allison N.; KEELER, Amanda W. et al. *Docetaxel-Loaded PLGA Nanoparticles Improve Efficacy in Taxane-Resistant Triple-Negative Breast Cancer*. Online. *Nano Letters*. 2017, roč. 17, č. 1, s. 242-248. ISSN 1530-6984
73. SINGH, PK, JAISWAL, AK, PAWAR, VK. et al. *Fabrication of 3-O-sn-Phosphatidyl-L-serine Anchored PLGA Nanoparticle Bearing Amphotericin B for Macrophage Targeting*. *Pharm Res* **35**, 60 (2018).
74. REDDY, Maram K. a LABHASETWAR, Vinod. *Nanoparticle-mediated delivery of superoxide dismutase to the brain: an effective strategy to reduce ischemia-*

- reperfusion injury*. Online. *The FASEB Journal*. 2009, roč. 23, č. 5, s. 1384-1395. ISSN 0892-6638. cit In: DANHIER, Fabienne; ANSORENA, Eduardo; SILVA, Joana M.; COCO, Régis; LE BRETON, Aude et al. *PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications*. Online. *Journal of Controlled Release*. 2012, roč. 161, č. 2, s. 505-522. ISSN 01683659
75. LAMPRECHT, Alf; UBRICH, Nathalie; YAMAMOTO, Hiromitsu; SCHÄFER, Ulrich; TAKEUCHI, Hirofumi et al. *Biodegradable Nanoparticles for Targeted Drug Delivery in Treatment of Inflammatory Bowel Disease*. Online. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001, roč. 299, č. 2, s. 775-781. ISSN 00223565. cit In: DANHIER, Fabienne; ANSORENA, Eduardo; SILVA, Joana M.; COCO, Régis; LE BRETON, Aude et al. *PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications*. Online. *Journal of Controlled Release*. 2012, roč. 161, č. 2, s. 505-522. ISSN 01683659.
76. LAMPRECHT, Alf; YAMAMOTO, Hiromitsu; TAKEUCHI, Hirofumi a KAWASHIMA, Yoshiaki. *Nanoparticles Enhance Therapeutic Efficiency by Selectively Increased Local Drug Dose in Experimental Colitis in Rats*. Online. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005, roč. 315, č. 1, s. 196-202. ISSN 00223565 cit In: DANHIER, Fabienne; ANSORENA, Eduardo; SILVA, Joana M.; COCO, Régis; LE BRETON, Aude et al. *PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications*. Online. *Journal of Controlled Release*. 2012, roč. 161, č. 2, s. 505-522. ISSN 01683659.
77. HORISAWA, Eijiro; HIROTA, Tsuyoshi; KAWAZOE, Satoko; YAMADA, Jun; YAMAMOTO, Hiromitsu et al. Online. *Pharmaceutical Research*. Roč. 19, č. 4, s. 403-410. ISSN 07248741. cit In: DANHIER, Fabienne; ANSORENA, Eduardo; SILVA, Joana M.; COCO, Régis; LE BRETON, Aude et al. *PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications*. Online. *Journal of Controlled Release*. 2012, roč. 161, č. 2, s. 505-522. ISSN 01683659.
78. BRUNNER, Richard; JENSEN-JAROLIM, Erika a PALI-SCHÖLL, Isabella. *The ABC of clinical and experimental adjuvants — A brief overview*. Online. *Immunology Letters*. 2010, roč. 128, č. 1, s. 29-35. ISSN 01652478. cit In: DANHIER, Fabienne; ANSORENA, Eduardo; SILVA, Joana M.; COCO, Régis; LE BRETON, Aude et al. *PLGA-based nanoparticles: An overview of*

- biomedical applications*. Online. *Journal of Controlled Release*. 2012, roč. 161, č. 2, s. 505-522. ISSN 01683659.
79. PANÁČEK, Aleš; KVÍTEK, Libor; PRUCEK, Robert; KOLÁŘ, Milan; VEČEŘOVÁ, Renata et al. *Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity*. Online. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006, roč. 110, č. 33, s. 16248-16253. ISSN 1520-6106.
80. SOUKUPOVÁ, Jana; KVÍTEK, Libor; PANÁČEK, Aleš; NEVĚČNÁ, Taťjana a ZBOŘIL, Radek. *Comprehensive study on surfactant role on silver nanoparticles (NPs) prepared via modified Tollens process*. Online. *Materials Chemistry and Physics*. 2008, roč. 111, č. 1, s. 77-81. ISSN 02540584.
81. GRABOWSKI, Nadège; HILLAIREAU, Hervé; VERGNAUD, Juliette; TSAPIS, Nicolas; PALLARDY, Marc et al. *Surface coating mediates the toxicity of polymeric nanoparticles towards human-like macrophages*. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015, roč. 482, č. 1-2, s. 75-83. ISSN 03785173. Cit IN: BOLTNAŘOVA, Barbora; KUBACKOVA, Jana; SKODA, Josef; STEFELA, Alzbeta; SMEKALOVA, Monika et al. *PLGA Based Nanospheres as a Potent Macrophage-Specific Drug Delivery System*. Online. *Nanomaterials*. 2021, roč. 11, č. 3. ISSN 2079-4991
82. PASWAN, Suresh K. a SAINI, T. R. *Purification of Drug Loaded PLGA Nanoparticles Prepared by Emulsification Solvent Evaporation Using Stirred Cell Ultrafiltration Technique*. Online. *Pharmaceutical Research*. 2017, roč. 34, č. 12, s. 2779-2786. ISSN 0724-8741.
83. HUANG, Wei a ZHANG, Chenming. *Tuning the Size of Poly(lactic-co-glycolic Acid) (PLGA) Nanoparticles Fabricated by Nanoprecipitation*. Online. *Biotechnology Journal*. 2018, roč. 13, č. 1. ISSN 1860-6768.
84. CHEOW, Wean Sin a HADINOTO, Kunn. *Enhancing encapsulation efficiency of highly water-soluble antibiotic in poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: Modifications of standard nanoparticle preparation methods*. Online. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2010, roč. 370, č. 1-3, s. 79-86. ISSN 09277757.
85. CAO, Cheng; ZHAO, Jiacheng; LU, Mingxia; GARVEY, Christopher J. a STENZEL, Martina H. *Correlation between Drug Loading Content and*

Biological Activity: The Complexity Demonstrated in Paclitaxel-Loaded Glycopolymer Micelle System. Online. *Biomacromolecules*. 2019, roč. 20, č. 4, s. 1545-1554. ISSN 1525-7797.