

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie



Disertační práce

Medikované polymerní systémy založené na větvených derivátech PLGA

Medicated polymer systems based on branched PLGA derivatives

Mgr. Juraj Martiška

Vedoucí disertační práce: doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

Konzultant disertační práce: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

Hradec Králové, 2020

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně (pod vedením svého školitele a konzultantky). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Datum:

Podpis:

Poděkování

V první řadě bych chtěl poděkovat doc. RNDr. Milanu Dittrichovi, CSc. a PharmDr. Evě Šnejdrové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost a cenné rady v průběhu mého studia.

Dále bych chtěl poděkovat Ing. Martinu Drastíkovi, Ph.D. za pomoc v oblasti analytických metod, prof. Ing. Štěpánu Podzimekovi, CSc. za jeho odbornost a rady v oblasti polymerní chemie, Assoc. prof. Gézovi Regdonovi, Ph.D. za vedení a cenné zkušenosti v průběhu zahraniční stáže, PharmDr. Petru Jílkovi, CSc. za pomoc s testováním antimikrobiální účinnosti a Mgr. Janu Loskotovi, Ph.D. za zasvěcení do oblasti skenovací elektronové mikroskopie.

Neméně důležitá byla také podpora a pomoc ze strany kolegů z katedry i fakulty, ale také morální podpora ze strany rodiny a přátel.

Práce vznikla za podpory Specifického vysokoškolského výzkumu SVV 260 547 a programu rozvoje vědních oblastí na Univerzitě Karlově Progres Q42.

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutická technologie

Kandidát: Mgr. Juraj Martiška

Školitel: doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

Konzultant: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

Název disertační práce: Medikované polymerní systémy založené na větvených derivátech PLGA

Tato práce je zaměřena na využití originálně syntetizovaných derivátů kopolymeru kyseliny DL-mléčné a glykolové (PLGA) s relativně nízkou molární hmotností a lineární, hvězdicovou, nebo hřebenovou architekturou, perspektivních biodegradovatelných nosičů pro prodlouženou či cílenou distribuci léčiv. Termické vlastnosti těchto polyesterů byly hodnoceny termogravimetrickou analýzou a diferenční skenovací kalorimetrií. Polyesterly byly využity k formulaci nanočástic nanoprecipitační metodou, která byla optimalizována s důrazem na výběr organického rozpouštědla, koncentraci polyesteru, rychlost mísení fází a výběru stabilizátoru. Po optimalizaci metody byly připraveny nanočástice s enkapsulovaným terbinafinem, typickým zástupcem druhé třídy klasifikace BCS. Byly sledovány parametry jako velikost nanočástic, index polydisperzity, zeta potenciál, enkapsulační efektivita, kapacita polymeru pro léčivo a morfologie částic. Pomocí skenovací elektronové mikroskopie byl pozorován sférický tvar nanočástic. Hydrofobicita a koncentrace polyesteru se ukázala jako klíčová ve vztahu k velikosti nanočástic, která se pohybovala v rozmezí od 100 do 600 nm. Stabilita nanosuspenzí byla demonstrována zeta potenciálem vyšším než 25 mV a indexem polydisperzity nižším než 0,2. Stabilizátor, kationický tenzid didodecyldimethylamonium bromid, poskytl nanočásticím kladný náboj s pravděpodobným posílením schopnosti mukoadheze. Všechny formulace se vyznačovaly prodlouženou liberací terbinafinu po dobu několika dní, s pozorovatelnými rozdíly v závislosti na typu použitého polyesteru. Antimikrobiální potenciál byl potvrzen jamkovou difuzní metodou. Testované polyesterly jsou perspektivní, originální a vhodné k enkapsulaci léčiv.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Pharmaceutical technology

Candidate: Mgr. Juraj Martiška

Supervisor: doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

Consultant: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis: Medicated polymer systems based on branched PLGA derivatives

This work is focused on the use of originally synthesized poly(DL-lactic-*co*-glycolic acid) (PLGA) derivatives with relatively low molar mass, and linear, star, or comb architecture as promising biodegradable carriers for prolonged or targeted drug release systems. Thermal properties of these polyesters were evaluated by thermogravimetric analysis and differential scanning calorimetry. Polyesters were used for nanoparticles formulation by nanoprecipitation method, which has been optimized with emphasis on organic solvent selection, polyester concentration, phase mixing speed, and stabilizer selection. After method optimization, nanoparticles with encapsulated terbinafine, a typical drug of the BCS class II, were prepared. Multiple parameters such as particles size, polydispersity index, zeta potential, encapsulation efficiency, loading capacity, and morphology were monitored. Spherical morphology was observed using scanning electron microscopy. The hydrophobicity and the polyester concentration revealed the main impact on the nanoparticles size ranging from 100 to 600 nm. The stability of the nanosuspensions were demonstrated by zeta potential higher than 25 mV, and polydispersity index values lower than 0.2. Cationic surfactant didodecyldimethylammonium bromide as stabilizer gave the nanoparticles high positive surface charge with probability of enhancing the adhesion to the mucosal surfaces. All formulations provided sustained release of terbinafine for several days, with observable differences depending on the type of polyester used. Antimicrobial potential has been proven by agar-well diffusion method. Examined polyesters are perspective, original, and suitable for drug encapsulation.

Obsah

1	Seznam zkratek	10
2	Cíle práce	14
3	Úvod	15
4	Teoretická část	16
4.1	Polymery v medicíně	16
4.1.1	Biodegradovatelné polymery	16
4.2	PLGA	18
4.2.1	Struktura PLGA	18
4.2.2	Syntéza PLGA	19
4.2.3	Vlastnosti PLGA	21
4.2.4	Větvené deriváty PLGA	22
4.3	Nanonosiče	24
4.3.1	Polymerní nanočástice	25
4.4	Charakterizace polymerních nanočástic	28
4.4.1	Velikost a tvar	28
4.4.2	Distribuce velikostí	29
4.4.3	Zeta potenciál a stabilizace nanočástic	30
4.5	Metody charakterizace nanočástic	32
4.5.1	Měření velikosti a disperzity	32
4.5.2	Metoda dynamického rozptylu světla	34
4.5.3	Měření zeta potenciálu	37
4.5.4	Skenovací elektronová mikroskopie	40
4.6	Termická analýza	41
4.6.1	Diferenční skenovací kalorimetrie	41
4.6.2	Termogravimetrická analýza	44

4.6.3	Přechodové stavy polymerů	45
4.7	Viskozimetrie	46
4.7.1	Viskozita vnitřní fáze při nanoprecipitaci	47
4.8	Liberace léčiv z PLGA.....	47
4.9	Testování antimikrobiální účinnosti nanočástic	51
4.10	Terbinafin	52
4.11	Didodecyldimethylamonium bromid	55
4.12	Dimethylsulfoxid.....	55
5	Experimentální část.....	57
5.1	Použité suroviny	57
5.2	Použité přístroje.....	57
5.3	Pomůcky.....	58
5.4	Charakterizace použitých polyesterů	59
5.4.1	Termická analýza.....	60
5.5	Optimalizace metody přípravy nanočástic	61
5.5.1	Příprava vnitřní fáze.....	61
5.5.2	Výběr rozpouštědla.....	61
5.5.3	Příprava vnější fáze a výběr stabilizátoru	62
5.5.4	Množství polyesteru.....	62
5.5.5	Rychlost mísení fází.....	62
5.5.6	Stabilita nanosuspenze	63
5.6	Nanočástice s terbinafinem	63
5.6.1	Příprava volné baze terbinafinu.....	63
5.6.2	Viskozita vnitřní fáze.....	63
5.6.3	Formulace nanosuspenze	64
5.7	Charakterizace nanočástic s terbinafinem.....	65
5.7.1	Skenovací elektronová mikroskopie.....	65

5.7.2	Velikost, disperzita a zeta potenciál	65
5.8	HPLC analýza nanočástic s terbinafinem	66
5.8.1	Centrifugace a příprava vzorků k HPLC analýze.....	67
5.8.2	HPLC instrumentace a průběh analýzy.....	67
5.8.3	Sestrojení kalibrační přímky	67
5.8.4	Stanovení množství enkapsulovaného terbinafinu	68
5.9	Testování liberace.....	68
5.10	<i>In vitro</i> testování antimikrobiální účinnosti.....	69
6	Výsledky a diskuze	70
6.1	Struktura použitých derivátů PLGA	70
6.2	Termická analýza.....	71
6.3	Optimalizace nanoprecipitační metody.....	75
6.3.1	Výběr rozpouštědla.....	75
6.3.2	Výběr stabilizátoru.....	76
6.3.3	Množství polyesteru.....	78
6.3.4	Rychlost mísení fází.....	80
6.3.5	Stabilita nanosuspence.....	81
6.4	Nanočástice s terbinafinem	81
6.4.1	Viskozita vnitřní fáze.....	81
6.4.2	Tvar, velikost, disperzita.....	83
6.4.3	Zeta potenciál	87
6.4.4	Sestrojení kalibrační přímky	88
6.4.5	Enkapsulační efektivita a kapacita polymeru pro léčivo	89
6.5	Testování liberace.....	91
6.6	<i>In vitro</i> testování antimikrobiální účinnosti	93
7	Závěry.....	95
8	Publikační činnost.....	98

8.1	Příspěvky v recenzovaných časopisech	98
8.2	Publikované abstrakty	99
8.3	Odborné přednášky	100
8.4	Postery	101
10	Literatura	102

1 Seznam zkratek

Zkratka	Význam
ACN	acetonitril
AFM	mikroskopie atomárních sil
API	aktivní farmaceutická substance
Bak [®]	polyamidy vyvinuté firmou Bayer
BCS	biofarmaceutický klasifikační systém léčiv
Biomax [®]	kopolymery ethylenu vyvinuté firmou DuPont
BSE	zpětně rozptýlené elektrony
CA	acetát celulosy
CFM	mikroskopie chemických sil
CFU	jednotky mikroorganismů tvořící kolonie
CTAB	cetrimonium-bromid (Cetrimid)
CTAC	cetrimonium-chlorid
DDAB	didodecyldimethylamonium bromid
DLS	dynamický rozptyl světla
DMK	dimethylketon (aceton)
DMSO	dimethylsulfoxid
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
DTA	diferenční termická analýza
EE	enkapsulační efektivita
EFM	mikroskopie elektrostatických sil
EMA	Evropská léková agentura

Zkratka	Význam
EtOH	ethanol
FDA	Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GA	kyselina glykolová
HA	kyselina hyaluronová
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
K	Kelvin, jednotka Termodynamické teploty dle Mezinárodního systému
KFPM	mikroskopie povrchového potenciálu
LA	kyselina mléčná
LC	kapacita polymeru pro léčivo (hmotnostní podíl léčiva v nanočásticích)
LDE	Laserová dopplerovská elektroforéza
M3	technika měření zeta potenciálu ve smíšeném režimu obracení pole
MALS	víceúhlová detekce rozptylu světla
MeOH	methanol
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MFC	regulátor hmotnostního průtoku plynu
MFM	mikroskopie magnetických sil
NP	nanočástice
NTA	analýza trajektorie nanočástic
PAA	kyselina polyakrylová
PALS	fázová analýza rozptylu světla
PBAT	polybutylen adipát tereftalát
PBCA	polybutylkyanoakrylát

Zkratka	Význam
PCL	polykaprolakton
PCS	fotonová korelační spektroskopie
PdI	index polydisperzity
PDLGA	poly(D-laktid- <i>co</i> -glykolid), kopolymer kyseliny D-mléčné a glykolové
PGA	kyselina polyglykolová
PHA	polyhydroxyalkanoát
PHB	polyhydroxybutyrát
PLA	kyselina polymléčná
PLGA	poly(DL-laktid- <i>co</i> -glykolid), kopolymer kyseliny DL-mléčné a glykolové
PLGA/A	poly(DL-laktid- <i>co</i> -glykolid) větvený na kyselině polyakrylové
PLGA/D	poly(DL-laktid- <i>co</i> -glykolid) větvený na dipentaerythritolu
PLGA/T	poly(DL-laktid- <i>co</i> -glykolid) větvený na tripentaerythritolu
PLLGA	poly(L-laktid- <i>co</i> -glykolid), kopolymer kyseliny L-mléčné a glykolové
PMMA	polymethylmethakrylát
PP	polypropylen
PRINT [®]	litografická technika produkce částic na nesmáčivé matrici
PVA	polyvinylalkohol
PVP	polyvinylpyrrolidon (Povidon)
QELS	metoda kvazielastického rozptylu světla
rpm	otáčky za minutu
sCMOS	doplňkový polovodič na bázi kovu a oxidu pro vědecké účely
SD	směrodatná odchylka
SDS	dodecylsírán sodný

Zkratka	Význam
SE	sekundární elektrony
SEC	rozměrově-vylučovací chromatografie
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SLN	pevné lipidové nanočástice
SLS	laserová difrakce (statický rozptyl světla)
SPM	sondová mikroskopie
STM	rastrovací tunelová mikroskopie
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TER	terbinafin
T_f	teplota viskózního toku
T_g	teplota skelného přechodu
TG	termogravimetrie
TGA	termogravimetrická analýza
T_m	teplota tání
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast světla
VS	větvící složka
XRD	rentgenová difrakční analýza
ZP	zeta potenciál

2 Cíle práce

Cílem teoretické části bude zpracovat informace o biodegradovatelných polymerech využitelných v medicíně, zejména pak o kopolymeru kyseliny DL-mléčné a glykolové (PLGA), s důrazem na jeho využití jako nosiče léčiv. Teoretická část se bude věnovat medikovaným polymerním nanočásticím, jejich vlastnostem a metodám jejich charakterizace.

Experimentální část práce bude založená na využití čtveřice předem syntetizovaných derivátů PLGA s různou architekturou a vlastnostmi. Hlavním cílem bude využít tyto polyestery k formulaci medikovaných nanočástic.

Konkrétní cíle budou především:

- Zjištění termické stability a teplot skelného přechodu jednotlivých polyesterů.
- Výběr vhodné metody přípravy polymerních nanočástic a její optimalizace.
- Formulace kladně nabitých polymerních nanočástic s enkapsulovaným terbinafinem.
- Charakterizace nanočástic z hlediska velikosti, disperzity, zeta potenciálu, stability a morfologie.
- Sledování vlivu formulačních faktorů na vlastnosti nanočástic a porovnání výhodnosti testovaných polyesterů.
- Zjištění enkapsulační efektivity a kapacity polymeru pro léčivo.
- Studium liberace terbinafinu z polymerních nanočástic s cílem dosažení prolongovaného uvolňování.
- Ověření antimikrobiální efektivity nanočástic s terbinafinem.

3 Úvod

Jedním ze současných trendů v oblasti moderní terapie je požadavek na bezpečná léčiva, cíleně působící v místě potřeby a nepodléhající rychlé eliminaci. Farmakokinetika samotných léčiv jim obvykle nedovoluje přiblížit se k těmto požadavkům. V případě, že v současnosti běžné lékové formy neposkytují výrazné zlepšení, je zajímavým technologickým řešením využití polymerů jako nosičů těchto léčiv. Polymery jsou schopné propůjčit svoje unikátní vlastnosti navázanému léčivu a výrazně tak ovlivnit výslednou farmakokinetiku. K těmto účelům se používají zejména biodegradovatelné polymery, které poskytují široké aplikační možnosti na základě variability jejich vlastností, zejména doby degradace.

Mezi nepoužívanější biodegradovatelné polymery v medicíně řadíme kopolymery kyseliny mléčné a glykolové (PLGA), které jsou obecně považované za bezpečné a jejich použití v humánní medicíně je schváleno příslušnými mezinárodními autoritami. Jejich využití v chirurgii ve formě šicího materiálu nebo implantátů je dnes již běžnou praxí. Probíhají však intenzivní studie s cílem širšího využití PLGA v oblasti farmakoterapie. K nejdiskutovanějším možnostem patří formulace medikovaných nanočástic. Pro účely formulace nanočástic však mají komerčně dostupné PLGA často příliš vysokou hydrofobicitu či vykazují nevhodný profil liberace enkapsulovaného léčiva. Jednou z cest, jak vylepšit vlastnosti PLGA pro účely distribuce léčiv, může být modifikace její architektury pomocí větvení v průběhu syntézy, nebo syntéza PLGA s nižší molární hmotností.

4 Teoretická část

4.1 Polymery v medicíně

Přírodní polymery se pro účely léčení cíleně používají již od nepaměti. Použití rostlinných polysacharidů k urychlení hojení ran a léčby celé řady nemocí, či sofistikované využití hedvábí jako šicího materiálu, datující se do období starověku, nacházejí své místo i v dnešní moderní terapii [1-4]. Po nástupu oboru polymerní chemie počátkem 20. století bylo brzo zřejmé, že nově produkované syntetické polymery najdou široké uplatnění v různých odvětvích, medicínu nevyjímaje [5].

Prvním zdokumentovaným případem použití syntetického polymeru v terapii je výroba intraokulární čočky z polymethylmethakrylátu (PMMA) [6]. V současnosti se polymery pro biomedicínskou aplikaci vybírají hlavně na základě jejich biostability a biodegradovatelnosti. Mezi nejpoužívanější řadíme homopolymery a kopolymery polyamidů, polyesterů, polyanhydridů, polyorthoesterů, polyamidoaminů a poly(β -aminoesterů) [7]. Tyto polymery se rovněž označují jako tzv. chytré polymery (smart polymers). Jsou schopny reagovat na vnější stimuly, což se projeví změnou fyzikálně-chemických vlastností. Stimulem může být teplo, pH, světlo různých vlnových délek, magnetické nebo elektrické pole, a nebo přítomnost specifických biologických molekul [8]. Chytré polymery našly uplatnění v oblasti tkáňového inženýrství, v chirurgii, v diagnostice, jako nanonosiče pro cílenou distribuci léčiv a při bioseparaci a dalších biotechnologických operacích [9, 10].

4.1.1 Biodegradovatelné polymery

Biodegradovatelnými polymery se rozumí polymery, které jsou schopné degradovat na sloučeniny o nižší molární hmotnosti působením biologických vlivů, například enzymů či mikroorganismů [11, 12]. Můžeme je rozdělit do několika skupin [13], které jsou uvedeny v Tabulce 1. Degradace probíhá rozštěpením řetězců, uvolnění řetězce následně formují oligomery a finálně monomery. Postupné odštěpování těchto oligomerů a monomerů znamená ztrátu hmoty. Tento průvodní jev degradace se nazývá eroze [12, 14]. Oba tyto procesy jsou extrémně závislé na vlastnostech polymeru, hlavně molární hmotnosti a architektuře, a jejich rychlost se může markantně lišit. Například degradace

ligninu může trvat roky, kdežto mnoho polysacharidů kompletně degraduje v rozmezí hodin [11]. V případě proteinů může být degradace i mnohem rychlejší [15].

Pokud uvažujeme nad využitím biodegradovatelného polymeru v terapii, je zřejmé, že proces degradace bude probíhat *in vivo*. Polymer proto musí být v aplikované dávce biokompatibilní, všechny jeho degradační produkty musí vykazovat netoxický charakter a schopnost eliminace klasickými metabolickými cestami [16]. Je však potřeba uvést, že biokompatibilita není pouze vlastností konkrétního materiálu, ale závisí i na stavu biologického prostředí a jeho schopnosti tolerovat specifické interakce mezi polymerním nosičem, léčivem a tkání [17]. Mezi polymery, které tyto požadavky splňují nejlépe, patří například přírodní polymery kyselina hyaluronová a chitosan. V oblasti syntetických polymerů dominuje skupina polyesterů strukturně odvozená od α -hydroxykyselin, ve které mají nenahraditelné místo kyselina polylactonová (PLA) a také kopolymer kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) a jejich deriváty [16, 18].

Tabulka 1 Přehled biodegradovatelných polymerů a příklady významných zástupců.

Polymery z ropných zdrojů	Hydrolyzovatelný hlavní řetězec	Alifatické polyestery PLA, PLGA, PCL	
		Aromatické kopolyestery PBAT, Biomax®	
		Polyamidy a polyesteramidy Bak®	
		Polyuretany	
		Polyanhydridy	
	Uhlíkový hlavní řetězec	Vinylové polymery PVA, Polyakryláty	
S aditivy	Polyolefiny		
Polymery z obnovitelných zdrojů	Přírodní	Proteiny	Zvířecí Kolagen, Želatina
			Rostlinné Gluten
		Polysacharidy	Z mořských zdrojů Chitin, Chitosan
	Rostlinné mod. škrob, Alginát, CA		
	Bakteriální	Semisyntetické PLA	
Mikrobiální Xanthan, HA		Polyestery PHA, PHB	
Směsi polymerů	Škrobové mod. škrob+PCL/PVA/PLA		
	Ostatní PLA+PCL, PCL+Chitosan		

mod.: modifikovaný

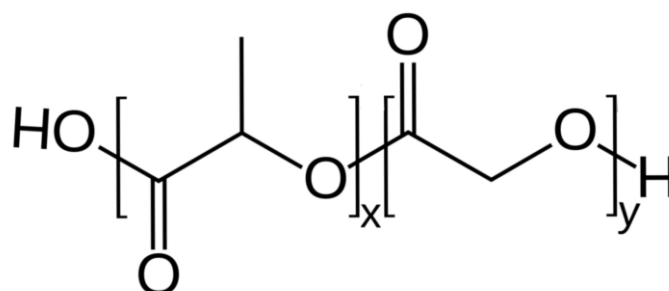
4.2 PLGA

Kopolymery kyseliny mléčné a glykolové, obecně značené jako PLGA, zaujaly přední místo mezi výchozími materiály pro biomedicínské využití, a to na základě výborné biokompatibility, biodegradability a absorpce i metabolizace přirozenými cestami [19]. Tyto vlastnosti předurčují PLGA k použití v terapii, což je podtrženo schválením jeho použití pro humánní aplikaci mezinárodními autoritami EMA a FDA [19-21]. Použití PLGA se v posledních letech výrazně rozšířilo nejen v oblastech chirurgie a ortopedie, kde se využívá již od šedesátých let 20. století [22], ale také v novějších odvětvích tkáňového inženýrství a hlavně v oblasti systémů s řízenou a/nebo cílenou distribucí léčiv, kde se již PLGA považuje za „zlatý standard“ [16, 23]. Možnosti využití PLGA v této oblasti zahrnují formulaci tuhých disperzí, tenkých filmů, *in situ* formovatelných implantátů či mikro- a nanočástic [24]. Možnost úpravy molární hmotnosti a její distribuce, architektury polymeru, ale také poměru monomerů, tedy mléčné a glykolové kyseliny, činí z PLGA velmi univerzální polymery s modifikovatelnými vlastnostmi [25].

4.2.1 Struktura PLGA

PLGA strukturně řadíme mezi lineární kopolymery, skládající se z náhodně uspořádaných monomerů kyseliny mléčné (2-hydroxypropanové) a kyseliny glykolové (2-hydroxyethanové), dvou chemicky nejjednodušších α -hydroxykyselin, přirozeně se vyskytujících v lidském organismu [26, 27]. Poměr těchto monomerů může být různý. Značení se pak odvíjí podle jejich množství v průběhu polymerizace a uvádí se jako jejich poměr, přičemž jako první se píše kyselina mléčná. Například, značení PLGA 75:25 značí kopolymer složený ze 75 % kyseliny mléčné a 25 % kyseliny glykolové [19, 26]. V názvosloví hraje roli také fakt, že kyselina mléčná patří mezi chirální látky obsahující asymetrický α -uhlík, vyskytuje se tedy ve formě dvou různých enantiomerů. Její značení je běžnější pomocí D, L systému vycházejícího z Fischerovy projekce, lze se však setkat i se značením stereodeskriptory R a S. Levotočivý enantiomer proto značí L-(+)-mléčnou, resp. (S)-mléčnou kyselinu a pravotočivý enantiomer D-(-)-mléčnou, resp. (R)-mléčnou kyselinu. V případě použití zkratky PLGA jsou proto oba optické antipody kyseliny mléčné zastoupené ekvimolárně, lze se však setkat i se zkratkami PLLGA a PDLGA, znamenajícími výskyt příslušných izomerů [28].

Z hlediska struktury PLGA je nepochybně důležitá také koncová skupina. Molekula může být zakončená esterovou nebo karboxylovou skupinou. Tyto volné koncové skupiny lze využít například pro chemickou modifikaci PLGA, modifikaci degradace či vazbu léčiva. Zakončení esterovou skupinou se projeví vyšší hydrofobicitou, molekula je proto ve vodném prostředí odolnější vůči degradaci [26, 29]. Volné karboxyly lze s výhodou využít pro vytvoření kovalentní amidové vazby s léčivem obsahujícím aminovou skupinu a zabezpečit tak delší dobu uvolňování léčiva a vyšší míru korelace s lineárním modelem liberace [30].



Obrázek 1 Schematické znázornění struktury PLGA.
 x značí počet jednotek kyseliny mléčné, y značí počet jednotek kyseliny glykolové.

4.2.2 Syntéza PLGA

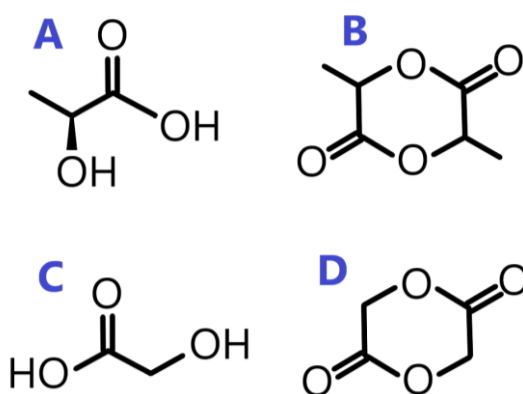
Existují různé postupy syntézy PLGA, přičemž jejich procesní parametry i poměr reaktantů výrazně ovlivňují fyzikálně-chemické vlastnosti výsledného produktu [31]. Jednou z možností je polymerizace za otevření kruhu při vyšší teplotě (130 °C až 220 °C). V tomto případě jsou reaktanty laktid a glykolid, cyklické diestery kyseliny mléčné, resp. glykolové. Reakce probíhá za katalýzy kovovým katalyzátorem. Používají se například alkoxidy cínu, isopropoxid hlininý a hlavně 2-ethylhexanoát cínatý, který je vysoce efektivní, dobře dostupný a v některých zemích dokonce schválený jako nepřímé potravinářské aditivum. Nevýhodou však může být poměrně vysoká molární hmotnost produktu a potenciální riziko toxických reziduí z katalyzátorů [32-35].

Přidruženou metodou je polymerizace enzymatickým otevřením kruhu pomocí lipasy. Využití enzymu je z toxikologického hlediska mnohem přijatelnější než katalyzace sloučeninou těžkého kovu, obzvláště pokud uvažujeme o biomedicíně

aplikaci. Reakce je rovněž bezpečná, jelikož probíhá za mírných reakčních podmínek. Charakteristikou této syntézy je produkce PLGA o relativně nízké molární hmotnosti, což může být výhodné, pokud uvažujeme o cílené a řízené distribuci léčiv. Nevýhodou tohoto typu syntézy je její dlouhý průběh, způsobený výrazně limitovanou rychlostí otevírání kruhu lipasou [19, 36].

Další možností je tzv. roztoková polykondenzační reakce, při které se smísí roztoky monomerů. Rozpouštědlem je v tomto případě voda, při které odpadá riziko toxicity a je lehce odstranitelná. Reakce probíhá při teplotě vyšší než 120 °C a za nízkého tlaku, aby se postupně docílilo potřebného bezvodého prostředí. Touto metodou lze připravit PLGA o relativně nízké molární hmotnosti, nižší než 10 000 g/mol [37, 38].

V případě potřeby PLGA s vyšší molární hmotností lze použít přímou polykondenzační reakci, při které reagují kyseliny mléčná a glykolová v azeotropním prostředí difenyletheru za přítomnosti katalyzátoru. Problémem je však nutnost zdlohavého přečišťování precipitovaného polymeru, zahrnující použití dalších organických rozpouštědel jako chloroform a methanol v průběhu procesu. Syntéza je proto drahá, s rizikem nebezpečných reziduí [39, 40]. Tyto limitace částečně odstraňuje tzv. přímá polykondenzace tavením, při které již není nutné používat difenylether, pro dosažení vyšších molárních hmotností je však nutný kovový katalyzátor [28, 41].



Obrázek 2 Možné reaktanty při syntéze PLGA. Kyselina mléčná – 2-hydroxypropanová (A), Laktid – cyklický diester kyseliny mléčné (B), Kyselina glykolová – 2-hydroxyethanová (C), Glykolid – cyklický diester kyseliny glykolové (D)

4.2.3 Vlastnosti PLGA

Důležitou vlastností PLGA z hlediska zpracovatelnosti je její dobrá rozpustnost v široké škále organických rozpouštědel. Rozpustit ji lze například v acetonu, ethylacetátu, tetrahydrofuranu, chlorovaných uhlovodících či dimethylsulfoxidu [16, 42]. Ve vodném prostředí degraduje hydrolyzou esterových vazeb [43]. Molární hmotnost dosahuje v případě PLGA velmi variabilních hodnot. Rozmezí molárních hmotností (M_w) komerčně dostupných PLGA je v současnosti od 7 000 g/mol až po 240 000 g/mol [44].

Kromě molární hmotnosti má na fyzikálně-chemické vlastnosti výrazný vliv také zastoupení monomerů. Přítomnost methylové skupiny v molekule kyseliny mléčné se projeví vyšší hydrofobicitou v porovnání s kyselinou glykolovou. Zvyšování podílu kyseliny mléčné v molekule PLGA se proto projeví vyšší celkovou hydrofobicitou, nižší schopnost absorbovat vodu pak způsobí pomalejší degradaci. Tento efekt však platí pouze při koncentraci kyseliny mléčné v rozmezí 50 % až 100 % (čistá PLA). Zvýšení obsahu kyseliny glykolové v PLGA nad 50 % způsobí nárůst krystalinity polymeru, což převýší nad efektem nižší hydrofobicity ve vztahu k degradaci, která se zpomalí. Nejrychleji proto bude probíhat degradace v případě PLGA 50:50, tedy při ekvimolárním zastoupení obou monomerů [45, 46].

PLGA může být v kompletně amorfnní formě, ale také ve vysoce krystalické formě. Krystalinita přímo ovlivňuje mechanické vlastnosti, bobtnání i schopnost hydrolyzy, která je základem degradace [47]. Výše uvedený obsah kyseliny glykolové patří mezi rozhodující faktory krystalinity. Podle původních studií lze amorfnní stav PLGA dosáhnout již při obsahu kyseliny glykolové nižší než 70 % [46, 48], někteří autoři však uvádějí jiné hodnoty [13], případně parafrázují původní studie chybně [21]. K přehlednosti této problematiky nepřispívá ani to, že stupeň krystalinity a také bod tání PLGA je přímo závislý na molární hmotnosti. Výslednou krystalinitu PLA i PLGA ovlivňuje také optická aktivita kyseliny mléčné. Použití jejího L-enantiomeru se projeví vysokou pravidelností polymerního řetězce a semikrystalickým stavem. Naopak, použití racemátu zvyšuje šanci dosažení amorfnního stavu [47]. Amorfnní stav je pro inkorporaci léčiv vhodnější, jelikož zajistí rovnoměrnější dispergaci léčiva v polymeru [29, 46].

Důležitá je rovněž teplota skelného přechodu (T_g). Ta i v případě lineární PLGA o relativně nízké molární hmotnosti dosahuje hodnot vyšších než 37 °C. To znamená, že za běžných podmínek se jedná o pevné látky. T_g klesá s klesajícím obsahem kyseliny mléčné a roste se zvyšující se molární hmotností [49, 50].

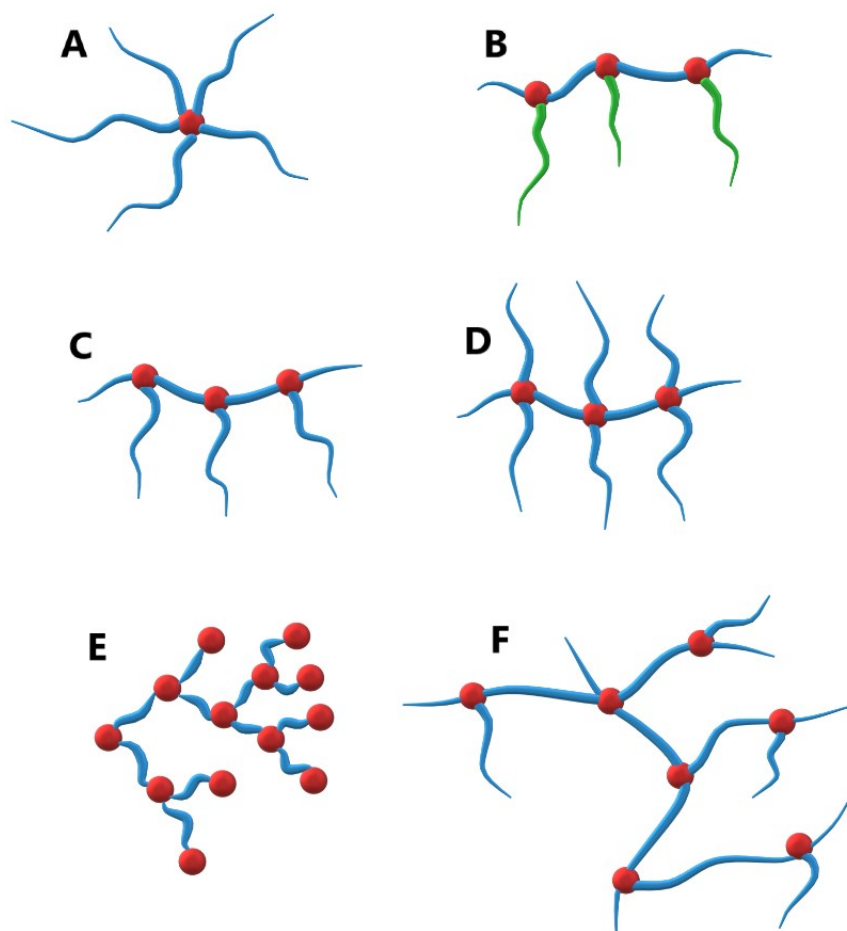
4.2.4 Větvené deriváty PLGA

Možnosti biomedicínského využití PLGA jsou široké a výrazně se liší v závislosti na molární hmotnosti. Vysokomolekulární PLGA s několikaměsíční dobou degradace se dají s výhodou využít například v ortopedii [51]. Naopak, pro formulaci systémů s cílenou a řízenou distribucí jsou vhodné zejména PLGA s nižší molární hmotností, kvůli jejich rychlejší degradaci pohybující se v rozmezí hodin až dní [19]. Samotný proces degradace je z terapeutického hlediska zajímavý, jelikož vede k pozvolnému uvolňování kyselých monomerů, které mohou znatelně ovlivnit pH mikroprostředí. Tato redukce pH může například zvýšit rozpustnost léčiv, které jsou rozpustnější v kyselějším prostředí, nebo podpořit proces hojení při topické aplikaci [52, 53].

Další možností jak potenciálně zlepšit vlastnosti PLGA pro použití jako nosiče léčiv je větvení jejich polymerního řetězce použitím větvicích monomerů v průběhu syntézy. Výběrem větvicího monomeru a jeho koncentrací lze změnit architekturu PLGA, což se projeví i změnou fyzikálně-chemických vlastností. Možných typů větvených polymerů je hned několik. Tzv. hvězdicový polymer je charakterizovaný jediným bodem větvení, kterým je samotná molekula větvicího monomeru, ze kterého vycházejí lineární řetězce. Roubovaný (graftový) polymer má hlavní řetězec, na který jsou navázané postranní řetězce jiného chemického složení. Jedná se o typ segmentovaného kopolymeru, PLGA zde proto může zastávat pouze funkci hlavního řetězce nebo postranních řetězců. Dalšími typy větvených polymerů jsou hřebenové a kartáčové, které jsou si vzájemně podobné. Oba typy mají na hlavním řetězci několik větvicích bodů, pravidelně nebo nepravidelně vzdálené, ze kterých vycházejí postranní řetězce. V případě hřebenového větvení tyto postranní řetězce směřují pouze jedním směrem. Mezi vysoce větvené polymery řadíme dendritické a hypervětvené polymery. V obou případech nelze rozlišit hlavní řetězec od postranních, větvicí body jsou vnořené v celé struktuře. Odlišností je pravidelný, kaskádovitý charakter v případě dendritických polymerů oproti náhodnému větvení hypervětvených polymerů [54-56]. Struktury jsou graficky znázorněny na Obrázku 3.

Větvené deriváty PLGA mohou být výhodné z několika důvodů. Větvením se násobí počet koncových skupin, které mohou výrazně ovlivňovat fyzikálně-chemické vlastnosti nosiče a vázat některá léčiva (viz kapitola 4.2.3). Výrazně vyšší počet hydrofilních koncových karboxylů či hydroxylů zároveň sníží celkovou hydrofobicitu polymeru, což vede ke zrychlení degradace a také zvýšení biomimetiky finální lékové formy, obzvláště v případě částicových systémů [57]. Zlepšit lze také třífázový disoluční profil léčiva, typický pro lineární nemodifikovanou PLGA. Větvením lze docílit pozvolnější liberaci inkorporovaného léčiva a méně výrazný „burst“ efekt [58]. Rozvětvená struktura a nižší hydrofobicita větvených PLGA je také předpokladem výborných mukoadhezivních vlastností [59].

Větvením lze také dosáhnout nižších hodnot vnitřní viskozity. Pravděpodobnost vzájemného proplétání makromolekul je nepřímo úměrná stupni jejich větvení. Při vysoké hustotě větvících bodů mají polymerní klubka kompaktnější charakter. Větvený polymer má proto vždy nižší vnitřní viskozitu než jeho lineární analog, což lze s výhodou využít při formulaci polymerních nosičů a jejich aplikaci [54].



Obrázek 3 Typy větvených polymerů. Hvězdicový (A), roubovaný (B), hřebenový (C), kartáčový (D), dendritický (E), hypervětvený (F). Červené kuličky reprezentují větvicí body, modré a zelené křivky znázorňují polymerní řetězce.

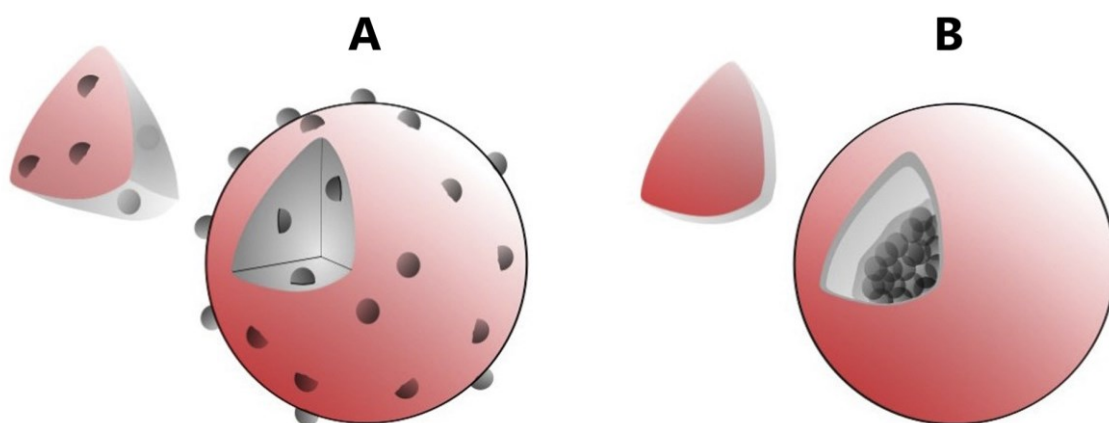
4.3 Nanonosiče

Nanomedicína, jedna z nových a rychle se rozvíjejících oborů, využívá nanotechnologie pro zlepšení zdravotní péče a inovaci v oblasti léčivých přípravků. Hlavním nástrojem nanomedicíny k dosažení tohoto cíle jsou nanonosiče. Ty jsou vyrobeny z biokompatibilních materiálů s nízkou toxicitou. Často také vykazují vysokou selektivitu vůči nemocným tkáním a prodlouženou dobu cirkulace v organismu. Základní dělení nanonosičů je na základě jejich tvaru a struktury a mezi hlavní typy patří micely, nanokrystaly, dendrimery, uhlíkové nanotrubičky, nanovlákná, kvantové tečky a nanočástice, kterým se budeme věnovat blíže [60, 61].

Nanočástice jsou obvykle definovány jako pevné kolidní částice s průměrem v rozmezí 10 až 1000 nanometrů. Právě jejich velikost a s tím spojený obrovský povrch jim umožňují dosahovat jejich unikátních fyzikálně-chemických vlastností. Díky tomu nacházejí uplatnění v široké škále odvětví včetně medicíny [62, 63]. Můžeme je dále rozdělit na základě jejich struktury, specifických vlastností, tvaru a velikosti na tři hlavní skupiny. Anorganické nanočástice, ke kterým řadíme například kovové nanočástice a příbuznou skupinu magnetických nanočástic, nebo nanočástice mezoporézního oxidu křemičitého. Skupina lipidových nanočástic zahrnuje lipozomy, niozomy a pevné lipidové nanočástice (SLN). A konečně, polymerní nanočástice [60, 64, 65].

4.3.1 Polymerní nanočástice

Termín polymerní nanočástice lze obecně použít pro všechny typy nanočásticích strukturně založených na polymerech, nejčastěji pro nanokapsule a nanosféry. Nanokapsule mají vezikulární strukturu, obvykle s kapalným jádrem, které je uzavřené v polymeru. Nanosféry jsou tvořeny homogenní polymerní maticí, ve které mohou být jiné molekuly zachyceny, případně adsorbovány na jejich povrchu. V současnosti jsou polymerní nanočástice využívány jako nosiče léčiv hlavně pro jejich relativně jednoduchý design, dobrou biokompatibilitu a vysokou variabilitu. Tyto vlastnosti z nich dělají ideální kandidáty pro moderní distribuci vakcín, specifickou protinádorovou terapii a řízenou distribuci léčiv různého charakteru, v souladu s výběrem typu polymeru a schopností upravit liberaci [61, 65].



Obrázek 4 Znáznornění dvou typů polymerních nanočástic. Nanosféra s léčivem adsorbovaným na povrchu i zachyceným v matici (A); Nanokapsule obsahující léčivo v jádře (B). *Obrázek upraven dle El-Saye et al. [61].*

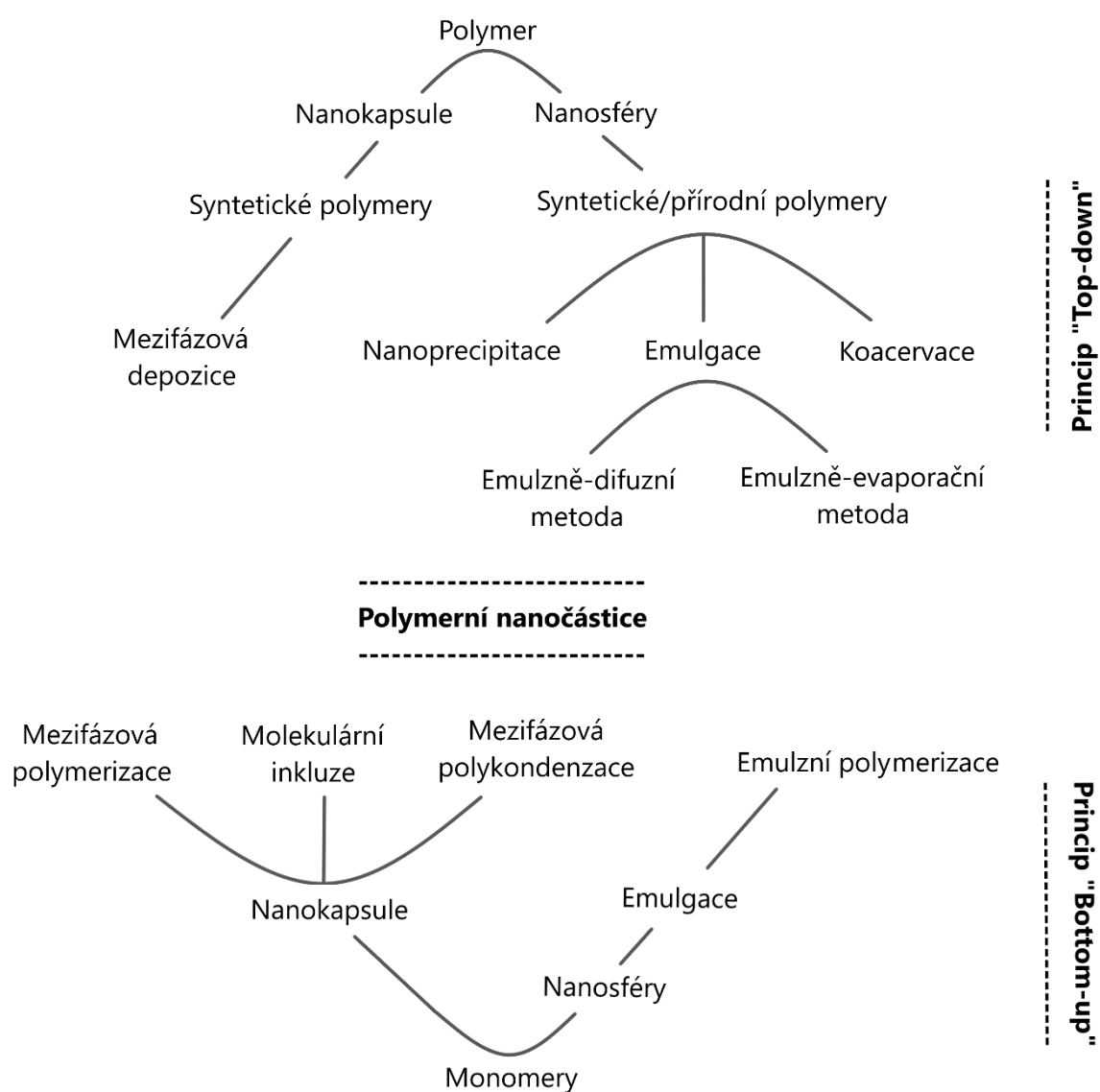
Pro formulaci nanočástic se využívají dva základní principy. Prvním je „top-down“, čili shora dolů, při které jsou nanočástice formovány z disperze polymerů. Princip „bottom-up“, zdola nahoru, značí formulaci nanočástic v průběhu polymerizace monomerů [66-69]. S výrazy „top-down“ a „bottom-up“ se však lze neméně často setkat i v jiné souvislosti. Termín „top-down“ se může také vztahovat na jakýkoliv proces nebo technologickou operaci, při které dochází k redukci velikosti částic, a na druhou stranu „bottom-up“ značí postupný nárůst velikosti částic vlivem jejich formování z individuálních molekul [65, 70-72]. Na obou těchto základních principech je založeno několik konkrétních metod přípravy, které shrnuje Obrázek 5. Výběr konkrétní metody závisí především na požadovaných parametrech výsledných nanočástic, hlavně velikosti a povrchovém náboji, ale také typu rozpouštědla, polymeru a v neposlední řadě i zamýšlené metodě aplikace [66, 67].

Blíže bude popsána metoda nanoprecipitační, známá také jako metoda přemístění rozpouštědla [73]. Kvůli nejednotnosti v terminologii, vysvětlené v předchozím odstavci, bývá řazená jak mezi „top-down“ metody [66, 68], tak i mezi „bottom-up“ metody [74, 75]. Jedná se o relativně jednoduchou metodu, umožňující rychlou formulaci nanočástic schopných enkapsulovat hydrofobní i hydrofilní molekuly, což z ní dělá vhodnou metodu k tvorbě medikovaných nanočástic se širokou možností výběru léčiva. Při této metodě se z důvodu vyšší čistoty a lepší reprodukovatelnosti preferují syntetické polymery, je však možné využít i přírodní polymery.

Mezi nimi mají dominantní postavení biodegradovatelné polymery jako PCL, PLA a hlavně PLGA. Za zmínku stojí také PHB a PBCA, které se v posledních letech v literatuře objevují poměrně často. Z nebiodegradovatelných zástupců se používají hlavně polymery s obchodním názvem Eudragit[®], zahrnující širokou škálu kopolymerů na bázi polymethakrylátu [63, 76, 77].

Nanoprecipitace je založená na principu depozice polymeru na mezipovrchovém rozhraní při přechodu rozpouštědla z vnitřní (organické) fáze do fáze vnější (vodné). Polymer je rozpuštěný v organickém rozpouštědle, které je mísitelné s vodou. Nejčastěji se používá aceton, ethanol, hexan, dichlormethan, dioxan, acetonitril a dimethylsulfoxid. V rozpouštědle lze rozpustit i léčivo. Takto vzniklá fáze se nazývá vnitřní, neboli organická, která se najednou (one-pot) nebo po kapkách (dropwise) smísí s tzv. vnější, neboli vodnou fází. Vnější fáze je tvořena rozpouštědlem, ve které není polymer

rozpustný, často s přidavkem povrchově aktivní látky nebo polymerního stabilizátoru, které mají za úkol stabilizovat nově vzniklou nanosuspenzi. Ta vznikne na principu rychlé difuze organického rozpouštědla do vnější fáze, vedoucí ke snížení mezifázového napětí, zvětšení povrchu a formulaci nanočástic z polymeru, který je schopný v průběhu precipitace enkapsulovat léčivo [63, 73, 78]. Změny mezifázového napětí mezi organickým rozpouštědlem a vnější fází, umožňující tento proces, popisuje dlouho známý Marangoniho efekt [79].



Obrázek 5 Metody přípravy polymerních nanočástic.
 Obrázek vytvořen dle předlohy od Krishnaswamy et al. [66].

4.4 Charakterizace polymerních nanočástic

Polymerní nanočástice lze charakterizovat různými parametry. Kromě typu použitého polymeru patří mezi nejdůležitější charakteristiky velikost nanočástic, jejich tvar, polydisperzita, povrchový náboj obvykle vyjádřený jako hodnota zeta potenciálu, ale také parametry související s inkorporovaným léčivem jako například enkapsulační efektivita či kapacita polymeru pro léčivo [80, 81].

4.4.1 Velikost a tvar

Mezi klíčové vlastnosti polymerních nanočástic patří kromě biodegradability také účinné cílení na specifické tkáně a buňky a zamezení rychlé clearance, aby byla zachována dostatečná doba setrvání v místě účinku. Doba cirkulace, možnost cíleného působení a schopnost překonávat biologické bariéry může do značné míry záviset na velikosti a tvaru nanočástic. Velikost a tvar ovlivňují transport nanočástic v organismu, například průchod kapilárami, ale také proces endocytózy. Tvar nanočástic určuje i poměr plochy a objemu, což může ovlivnit degradaci nanočástic. Tvarem i poměrem stran lze také přímo ovlivnit jejich dynamiku marginalizace, neboli boční posun částic směrem ke stěně cév, ale i jejich interakci s buňčnými strukturami. Z toho vyplývá, že tvar hraje u nanočástic důležitou roli a může značně ovlivňovat distribuci léčiva a kinetiku jeho uvolňování. Relativně nové, zejména litografické techniky jako například PRINT[®], umožňují tvorbu částic velice různorodých tvarů se značně rozdílnou farmakokinetikou. Zajímavým příkladem jsou částice tyčovitého nebo filamentárního tvaru, mající vysoké hodnoty poměru jednotlivých stran, což jim umožňuje výrazné prodloužení doby cirkulace v krevním řečišti a tím zvyšuje jejich atraktivitu pro potenciální systémovou aplikaci [81-83].

Při formulaci polymerních nanočástic s využitím technik na principu postupného formování z jednotlivých molekul (např. nanoprecipitace), kde se uplatňují hydrofobně-hydrofilní interakce, Van der Waalsovy síly, vodíkové vazby nebo iontové interakce, se na základě termodynamiky preferenčně tvoří struktury s co nejnižší povrchovou energií, tedy sférického tvaru. Problémem však může být vyšší polydisperzita. Nanočástice sférického tvaru jsou v současnosti nejpoužívanější, hlavně díky jejich jednoduchosti a univerzálnosti [65, 83, 84].

Velikost polymerních nanočástic je esenciální a závisí na požadovaném cílovém místě působení. Je také nutné si uvědomit, že velikost nanočástic nemusí být konstantní. Může docházet k bobtnání polymerní matrice ve vodném prostředí, nebo k tvorbě shluků nanočástic. Změna velikosti vlivem agregace může být závislá i na hodnotě pH prostředí [81, 85]. Velikost nanočástic ovlivňuje nejenom distribuci nanočástic v organismu, schopnost průniku bariérami nebo dobu degradace, ale také samotnou dobu cirkulace. Obvykle se renální clearance zvyšuje se zmenšující se velikostí nanočástic, přičemž minimální velikost pro zamezení téměř okamžité renální exkreci je 10 nm [86-88]. Nanočástice v rozmezí 10-100 nm, někdy se uvádí horní limit 200 nm, jsou ideální z hlediska prodloužené cirkulace a průniku biologickými bariérami. Nanočástice s průměrem větším než 200 nm jsou efektivně fagocytovány a distribuovány zejména do jater a sleziny, což lze využít pro cílenou distribuci právě do těchto orgánů [83, 84, 89, 90].

4.4.2 Distribuce velikosti

Předchozí kapitola ukázala, že velikost patří mezi klíčové parametry nanočástic a výrazně ovlivňuje jejich vlastnosti. S ohledem na množství jednotlivých nanočástic v jedné terapeutické dávce a složitosti procesu jejich formulace však nelze zabezpečit dokonale monodisperzní vzorek. S přihlédnutím na tento fakt a potřebu kvantifikovat distribuci velikosti částic se v praxi používá tzv. index polydisperzity (PdI). Polydisperzita, resp. dle doporučení IUPAC disperzita, se používá k popisu stupně nejednotnosti distribuce velikosti částic. PdI je pak jejím číselným vyjádřením. Jedná se o bezrozměrnou veličinu stanovenou na základě kumulativní četnosti, dosahující hodnot od 0 do 1, přičemž hodnota 0 značí výskyt pouze jedné velikostní frakce, čili dokonale monodisperzní vzorek. Výpočet PdI znázorňuje Rovnice 1.

$$PdI = \left(\frac{\sigma}{\bar{x}}\right)^2 \quad (1)$$

kde σ je směrodatná odchylka střední velikosti částic (vyjádřené jako průměr) a \bar{x} je střední velikost částic [91, 92].

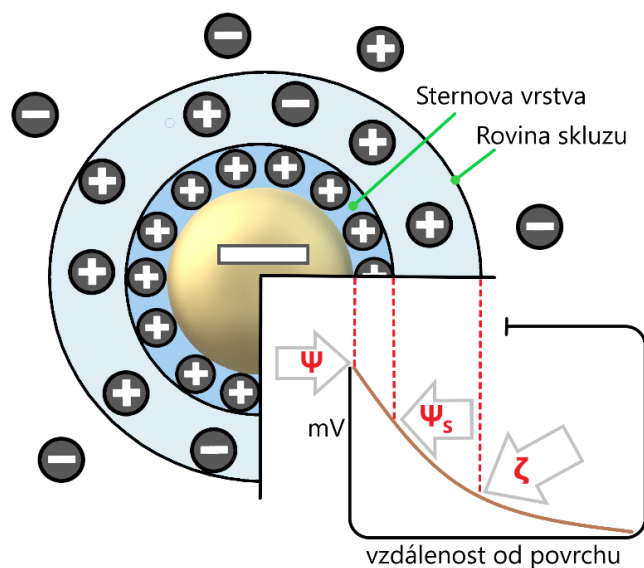
V praxi lze nalézt hodnoty PdI nižší než 0,05 většinou pouze u monodisperzních standardů, hodnoty vyšší než 0,7 indikují vysoce polydisperzní vzorek a pro běžné metody měření představují výzvu. V případě částicových systému na bázi polymerů se za kvalitní vzorek obvykle považuje soustava částic s hodnotou PdI nižší než 0,2. U lipidových systémů, například liposomů, je akceptovaná hodnota 0,3.

V oboru polymerní chemie se rovněž, a poměrně často, vyskytuje hodnota PdI. Představuje distribuci molární hmotnosti vyjádřenou jako poměr hmotnostně střední (M_w) a číselně střední (M_n) molární hmotnosti [93].

4.4.3 Zeta potenciál a stabilizace nanočástic

Zeta potenciál (ZP) je jedním z důležitých parametrů charakterizace nanočástic, resp. nanosuspenze. Určení ZP je nejdůležitější technikou pro odhad povrchového náboje nanočástic a také určení fyzikální stability nanosuspenze. Nanočástice s povrchovým nábojem pevně přitahují ionty opačně nabitě, které kolem nich vytvářejí tzv. Sternovu vrstvu. Ve vnější, tzv. difúzní oblasti za Sternovou vrstvou, převládají ionty se stejným nábojem. Uvnitř této vrstvy se nachází také pomyslná rovina skluzu, oblast ohraničující všechny ionty trvale putující s částicí. Elektrický potenciál na jejím rozhraní se označuje jako ZP. Obrázek 6 tento jev znázorňuje.

Vyšší absolutní hodnoty ZP indikují vyšší stabilitu na základě vzájemného elektrostatického odpuzování jednotlivých částic. Konkrétní hodnoty ZP znamenající stabilitu se mohou výrazně lišit podle použitého materiálu, viskozity suspenze, přítomnosti stabilizátorů a pod. V případě polymerních nanočástic je obvykle dosaženo dobré koloidní stability při absolutních hodnotách vyšších než 25 mV. Nízké absolutní hodnoty ZP však často způsobují agregaci, případně flokulaci částic zejména kvůli přitažlivým Van der Waalsovým silám, vodíkovým vazbám a hydrofobním interakcím, které převýší nad silami repulzními [94-96].



Obrázek 6 Schematické znázornění ZP. Ψ : elektrostatický potenciál na povrchu částice, Ψ_s : elektrostatický potenciál na Sternově vrstvě, ζ : ZP.

Relativně vysokými absolutními hodnotami ZP tedy lze generovat elektrostatickou stabilitu nanočástic. PLGA má kvůli přítomnosti karboxylových skupin záporný náboj, obvykle však není dostačující k repulzi nanočástic a je nutné využít stabilizátor. K elektrostatické stabilizaci lze využít ionické surfaktanty, například kvarterní amoniové soli jako CTAB, CTAC či DDAB. Z anionických surfaktantů se využívá například SDS. Výhodou této metody stabilizace je modifikace celkového náboje nanočástic, který může hrát důležitou roli při distribuci nanočástic v organismu [97, 98].

Další možností jak stabilizovat nanočástice je využití stérické stabilizace. Stérická stabilizace funguje na principu dalšího polymeru, který se adsorbuje na povrch nanočástic. Využívají se neionické amfifilní polymery rozpustné ve vodě, které se svou hydrofobní částí navážou na povrch nanočástic a jejich dlouhé hydrofilní řetězce brání vzájemné agregaci. Mezi nejznámější zástupce, které se využívají pro stabilizaci nanočástic, patří PVA a PVP [98, 99].

Iontové a stérické stabilizátory není vhodné kombinovat, jelikož by pak probíhala kompetice o povrch nanočástic. V případě použití polyelektrolytů však lze dosáhnout obou efektů současně, stabilizace elektrostatické i stérické. Polární hlavičky v makromolekule jsou schopny generovat elektrickou dvouvrstvu, zatímco postranní řetězce poskytují stérickou bariéru [98, 100].

4.5 Metody charakterizace nanočástic

4.5.1 Měření velikosti a disperzity

K určení velikosti nanočástic lze využít různých technik. Mezi nejdůležitější patří mikroskopické metody, zejména elektronová mikroskopie transmisní (TEM) a skenovací, neboli rastrovací (SEM). Neméně důležité jsou metody světelné, založené na difrakci a rozptylu laserového paprsku. Do této skupiny řadíme laserovou difrakci (SLS) a fotonovou korelační spektroskopii, známou také jako metoda dynamického rozptylu světla (PCS/DLS) [101, 102].

Mikroskopické metody jsou v oblasti charakterizace nanonosičů široce využívány. Jejich největší předností je bezkonkurenční schopnost určení geometrie částic. Problémem však může být poměrně složitá příprava vzorků, zdlouhavý proces měření a zpracování výsledků a hlavně absence možnosti zjištění disperzity. Právě z těchto důvodů má dominantní postavení metoda DLS, která umožňuje prakticky okamžité měření obrovského počtu nanočástic dispergovaných v kapalném prostředí s možností výpočtu distribuce jejich velikosti. Metoda má také výbornou rozlišovací schopnost, měřicí rozsah nejnovějších přístrojů začíná již na 0,3 nanometrech. Robustnost metody umožňuje rutinní měření, které je neinvazivního charakteru, takže změřené částice lze následně podrobit dalšímu testování. Nespornou výhodou je také fakt, že metodu DLS lze zkombinovat přímo v jednom přístroji s laserovou dopplerovou mikroeletroforézou pracující na principu fázové analýzy rozptylu světla (PALS), která umožňuje měření dalšího klíčového parametru nanočástic, zeta potenciálu. I když to může vypadat, že metoda DLS je pro měření distribuce velikosti částic nanonosičů nejvhodnější, nemusí to platit vždy. Mezi hlavní úskalí této metody patří nemožnost potvrzení morfologie a tvaru částic, a také problém s rozlišením aglomerátů, které jsou detekovány jako jedna částice [65, 91, 102]. Metodě DLS se bude detailněji věnovat následující kapitola.

K mikroskopickým technikám řadíme také poměrně moderní skupinu metod sondové mikroskopie (SPM), která se od jiných používaných mikroskopických metod (SEM, TEM) značně liší principem měření. Základem je sonda, která trojrozměrně mapuje povrch v nanometrickém měřítku postupným zaznamenáváním repulzních a přitažlivých interakcí mezi špičkou sondy a testovaným povrchem. Podle typu zaznamenávaných interakcí pak rozlišujeme mezi jednotlivými metodami.

Konkrétně to může být mikroskopie atomárních sil (AFM), rastrovací tunelová mikroskopie (STM), mikroskopie magnetických sil (MFM), mikroskopie elektrostatických sil (EFM), mikroskopie chemických sil (CFM) a mikroskopie povrchového potenciálu, známá také jako Kelvinova silová mikroskopie (KPFM). Některé přístroje umožňují i kombinaci těchto metod. Na rozdíl od většiny jiných mikroskopických metod, vyžadujících manipulaci se vzorkem jako jeho barvení, značení, fixaci nebo vakuum, SPM techniky nevyžadují zvláštní zacházení nebo podmínky, které by mohly potenciálně ohrozit kvalitu vzorku [65, 91, 103].

Je potřeba uvést také rentgenovou difrakční analýzu (XRD), která umožňuje odhad velikosti nanočástic pomocí výpočtu z Debye-Scherrerova vztahu. U relativně menších nanočástic však může být měření značně nepřesné. Nicméně, XRD lze využít ke komplexnější analýze, hlavně k určení krystalinity nanočástic [65, 104].

Jednou z nejnovějších metod určování velikosti nanočástic je analýza trajektorie nanočástic (NTA). Metoda NTA umí díky vysoce citlivé sCMOS kameře zaznamenat, vizualizovat a následně analyzovat trajektorii nanočástic v kapalném médiu a podle rychlosti Brownova pohybu s vysokou přesností odhadnout jejich velikost. Samozřejmostí je i vyhodnocení disperzity. Vzorek vstříknutý do speciální cely je osvětlený laserem, v místech kde jsou přítomny částice dochází k refrakci paprsku, která je po zvětšení zaznamenávána kamerou. Software je pak schopný vyhodnotit trajektorii částic a s využitím difuzního koeficientu vypočítat hydrodynamický průměr podobně jako u metody DLS. Touto metodou lze analyzovat nanočástice téměř všech rozměrů, v současnosti od 10 do 1000 nanometrů, i menší mikročástice. Nevýhodou může být složitější obsluha přístroje a nutnost správně zvolit koncentraci.

Je zřejmé, že žádná metoda není dokonalá a je víc než vhodné metody kombinovat. Dobrých výsledků lze obvykle dosáhnout kombinací nepřímé metody, hlavně DLS nebo NTA, s metodou přímého pozorování (mikroskopické metody) [65, 91, 105, 106].

4.5.2 Metoda dynamického rozptylu světla

Techniky založené na detekci rozptylu světla se k určování různých vlastností hmoty využívají již od 19. století, kdy byl popsán známý Tyndallův jev [107]. Dominantní postavení má hlavně metoda dynamického rozptylu světla, známá také jako fotonová korelační spektroskopie nebo jako metoda kvazielastického rozptylu světla (QELS), krátce uvedena v předchozí kapitole. Masově se rozšířila koncem minulého století díky novým možnostem určování difuzních koeficientů molekul, sestavení digitálního autokorelátoru a pokroku v oblasti laserů. Popularitu získala nejen v oblasti určování distribuce velikosti částicových systémů, ale také při determinaci hydrodynamických vlastností makromolekul, detekci agregace proteinů, studiu vzájemných interakcí makromolekul, nebo také jako komplementární metoda určení molární hmotnosti [108, 109].

Základním principem je interakce monochromatického paprsku světla produkovaného laserem s disperzí makromolekul nebo částic v kapalném médiu. V případě metody statického rozptylu světla je intenzita rozptýleného světla analyzována jako průměrná hodnota v čase, kterou lze využít k získání informací o molární hmotnosti a poloměru gyrace makromolekul. Pokud však budeme zaznamenávat a analyzovat fluktuační intenzity rozptýleného světla, způsobené Brownovým pohybem makromolekul, lze získat tzv. difuzní koeficient (D), který je úměrný hydrodynamickému průměru makromolekul, resp. dispergovaných částic. Dosazením difuzního koeficientu do Stokes-Einsteinovy rovnice popisující vztah mezi velikostí částice a její rychlostí v důsledku Brownova pohybu lze vypočítat hodnotu hydrodynamického průměru částice. Brownův pohyb je kromě velikosti částic závislý také na teplotě a viskozitě disperzního prostředí.

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (2)$$

kde $d(H)$ je hydrodynamický průměr částice, D je translační difuzní koeficient, k je Boltzmannova konstanta, T je absolutní teplota a η je viskozita disperzního prostředí [108, 110-112].

Z rovnice vyplývá, že měření musí probíhat při konstantní a známé teplotě a v médiu o známé viskozitě. Laserový paprsek se po střetu s částicemi rozptýlí do všech směrů,

detekovatelná část je pomocí směrovací čočky vedena do detektoru. Detektor následně převede signál do digitálního autokorelátoru, který monitoruje fluktuace intenzity signálu s ohledem na čas, což umožní zjištění rychlosti fluktuace signálu. Částice malých rozměrů difundují prostředím rychle, frekvence fluktuace signálu je proto vysoká. Naopak větší částice se pohybují prostředím pomalu, což má za následek jejich podobnou pozici v různých časových intervalech, prezentující se jako nízká frekvence fluktuace signálu. Určení difuzního koeficientu na základě fluktuace signálu, který je nutný pro výpočet hydrodynamického průměru částic ze Stokes-Einsteinovy rovnice, závisí hlavně na disperzitě zkoumaného vzorku. V případě monodisperzních systémů lze využít tzv. autokorelační funkci $g(\tau)$, popisující okamžitou hodnotu fluktuace intenzity signálu v čase τ .

$$g(\tau) = \exp\left[\frac{-\tau}{\tau_c}\right] \quad (3)$$

kde τ_c značí relaxační čas, neboli dobu návratu fluktuace k průměrné hodnotě intenzity rozptýleného světla.

Relaxační čas τ_c je pak úměrný difuznímu koeficientu D .

$$\tau_c = \frac{1}{Dq^2} \quad (4)$$

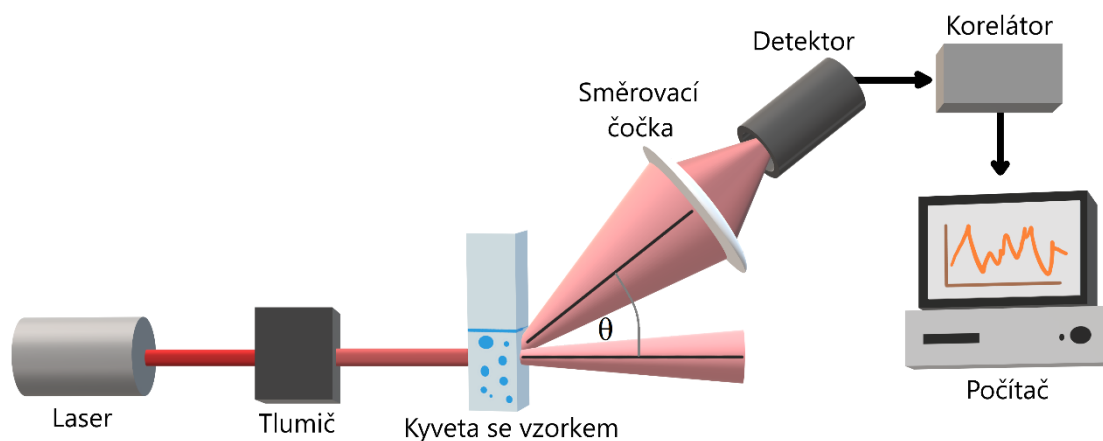
q označuje hodnotu vlnového vektoru určeného vlnovou délkou primárního světelného paprsku λ a úhlem θ , pod nímž je měřena intenzita rozptýleného světla a n značí refrakční index disperzního prostředí [108, 113].

$$q = \left(\frac{4\pi n}{\lambda}\right) \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (5)$$

V případě polydisperzních vzorků však nelze autokorelační funkci $g(\tau)$, resp. fluktuaci intenzity, vyjádřit relativně jednoduchou exponenciální závislostí, nýbrž jako vážený integrál řady relaxačních časů, odpovídajících různým difuzním koeficientům, které reprezentují pohyb různě velkých částic. Matematické řešení je proto v těchto případech složitější a software využívá místo kumulativní analýzy non-monomodální distribuční metodu [108, 110].

Úhel θ , pod nímž je měřena intenzita rozptýleného světla, se může u konkrétního přístroje lišit. Na trhu se lze setkat s přístroji pracujícími s úhlem 90° , případně se systémem detekce zpětného rozptylu při 173° nebo 158° , tedy hodnotách blízkých dopadajícímu paprsku. Konfigurace s využitím detekce zpětného rozptylu mají oproti použití uhlu 90° několik nesporných výhod a jsou proto v současnosti preferovány. Mezi hlavní výhody patří možnost zanedbání jevu rotační difúze, díky čemu lze dosáhnout přesnějšího měření. Další výhodou je, že vzorek může být koncentrovanější, jelikož paprsek nemusí procházet vrstvou celé kyvety. V opačném případě se zvyšuje riziko průvodních fenoménů při rozptylu světla, hlavně rozptylu fotonu více než jednou částicí ve vzorku. Detekce zpětného rozptylu rovněž značně omezí riziko detekce ojediněle se vyskytujících velkých nečistot či prachových částic, které rozptylují více světla v přímém směru, na rozdíl od částic menších, jejichž rozptyl je závislý na vlnové délce dopadajícího světla [108, 110, 111].

Metoda DLS poskytuje rychlé, přesné, reprodukovatelné výsledky a nevyžaduje velký objem vzorku. Výhodou je i to, že vzorek po měření není znehodnocen. Žádná metoda však není ideální a ani DLS není výjimkou. Mezi hlavní nevýhody DLS patří nutnost přesně znát viskozitu disperzní kapaliny, citlivost viskozity na změny teploty, nižší rozlišení a potřeba zachování optimální koncentrace vzorku [108, 109].



Obrázek 7 Zjednodušené schematické znázornění přístroje využívajícího metodu dynamického rozptylu světla.

4.5.3 Měření zeta potenciálu

Jak již bylo krátce nastíněno v předchozích kapitolách, ZP patří mezi hlavní parametry charakterizující částicové systémy. Současné moderní přístroje, jako například řada Zetasizer Nano (Malvern Panalytical) či řada Nanobrook (Brookhaven Instruments), využívají kombinaci metody DLS s metodou Laserové dopplerovské elektroforézy (LDE) [110, 114].

LDE kombinuje metodu elektroforézy s metodou Laserové dopplerovské velocimetrie (LDV). Vzorek umístěný v kyvetě, která představuje mikroelektroforetickou celu, je vystavený elektrickému poli. Nabitě částice, dispergované v kapalném médiu, jsou přitahovány k opačně nabitě elektrodě. Pomocí přidružené metody LDV se rychlost těchto pohybujících se částic změří a následně vyjádří v jednotkách intenzity elektrického pole jako elektroforetická pohyblivost. Konkrétně přístroj zaznamenává drobné změny frekvence rozptýleného světla v čase, vznikající v důsledku pohybujících se částic v aplikovaném elektrickém poli. Vyšší rychlost pohybujících se částic znamená výraznější fluktuaci frekvence rozptýleného světla. Při ustálené rychlosti částic pak lze změnu frekvence Δf vyjádřit vztahem:

$$\Delta f = \frac{2v \sin(\theta/2)}{\lambda} \quad (6)$$

kde v je rychlost částic, λ vlnová délka laserového paprsku a θ úhel rozptylu [114-116].

V typické konfiguraci zaznamenává detektor světlo rozptýlené pod předním úhlem 13° . Důležitá je také koncentrace vzorku, jelikož při vysokých koncentracích může docházet k tlumení laserového paprsku, tedy redukci detekovaného rozptýleného světla. Horní limit měřitelné koncentrace závisí na řadě faktorů, hlavně na velikosti částic, jejich disperzitě a optických vlastnostech materiálu [116].

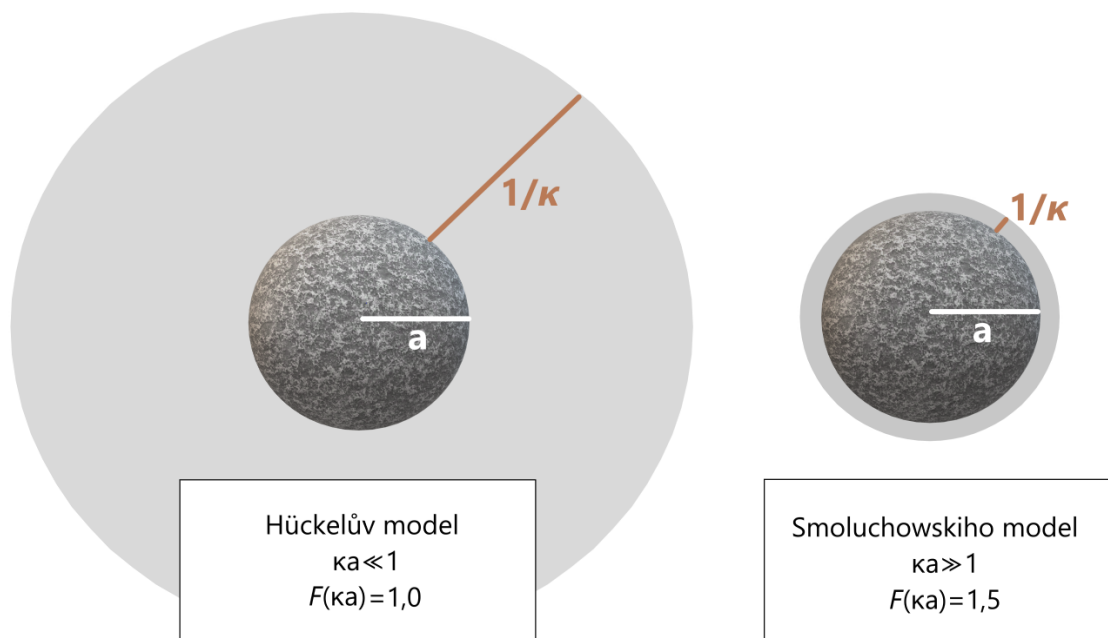
Rychlost částic, vyjádřená jako elektroforetická pohyblivost, závisí kromě síly elektrického pole, neboli gradientu napětí, také na viskozitě disperzního prostředí a její dielektrické konstantě. V neposlední řadě závisí také na jejich hodnotě ZP.

Vzájemnou závislost elektroforetické pohyblivosti částic a jejich ZP řeší Henryho rovnice:

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta F(\kappa a)}{3\eta} \quad (7)$$

kde U_E je elektroforetická mobilita, ε dielektrická konstanta, ζ zeta potenciál, η viskozita disperzního média, $F(\kappa a)$ tzv. Henryho funkce a κ inverzní hodnota Debyeovy délky (vzdálenost od částice, při které dochází k signifikantní redukci elektrostatické síly) [114, 116, 117].

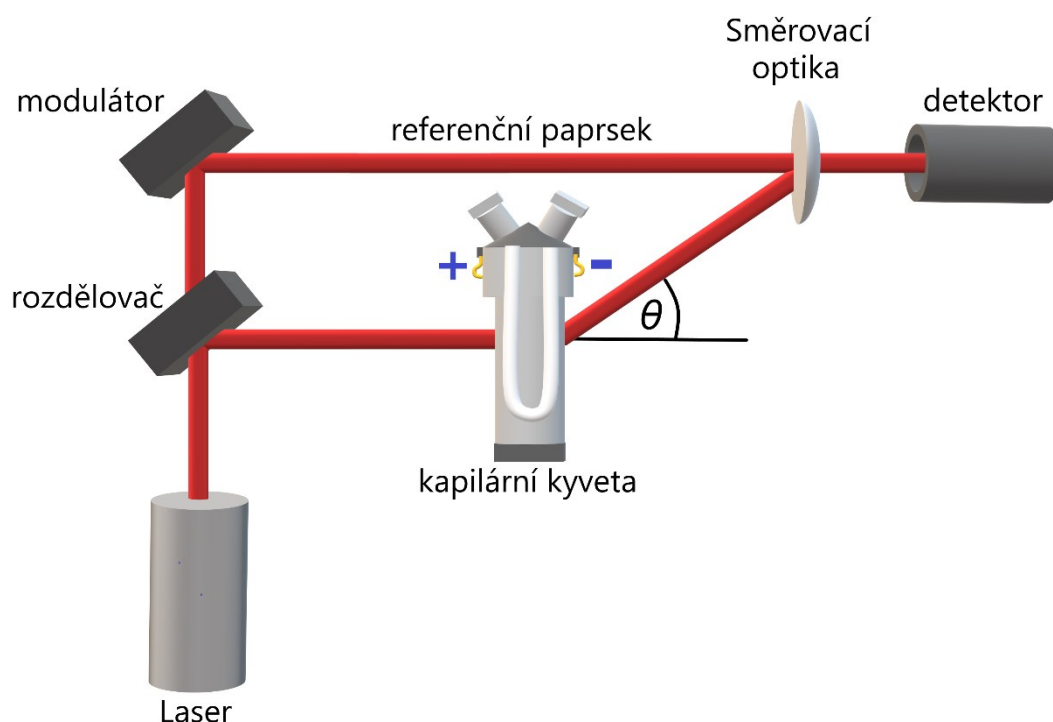
Pro determinaci Henryho funkce se obecně volí dvě hodnoty na základě aproximace k modelu Smoluchowskiho (hodnota 1,5) nebo Hückela (hodnota 1,0). Volba probíhá hlavně na základě charakteru elektrolytu, kdy se obvykle v případě polárního disperzního média volí Smoluchowskiho model. Pro nepolární disperzní média s nízkou hodnotou dielektrické konstanty je naopak standardem Hückelův model, který předpokládá výraznou elektrickou dvovrstvu kolem částice v porovnání s jejím poloměrem [114, 116]. Další korekce a modely, například podle Ohshima, Millera, O'Brien a White-a nebo Dukhina a Semenikhina jsou využívány výrazně méně [118-120].



Obrázek 8 Smoluchowskiho a Hückelův model. Světle šedá část představuje elektrickou dvovrstvu, koule uprostřed znázorňují částice. κ : inverzní hodnota Debyeovy délky, a : průměr částice, $F(\kappa a)$: Henryho funkce.

Metoda LDE se poměrně rychlým tempem neustále zdokonaluje. Jedno z posledních výrazných vylepšení představuje implementace měřicí technologie uvedené pod zkratkou M3-PALS, patentované společností Malvern Panalytical. Jedná se vlastně o kombinaci dvou technologií. Technologie M3 značí měření ve smíšeném režimu obracení elektrického pole. V průběhu měření je nutné elektrické pole obracet, aby se stabilizoval tok kapaliny. Při použití technologie M3 se hodnota ZP určí ze dvou měření. V průběhu prvního se obrací aplikované elektrické pole pomalu, v průběhu druhého rychle. Kombinací je umožněno přesně určit průměrné hodnoty, ale také informace o distribuci ZP.

PALS představuje techniku, při které se pro výpočet změny frekvence využívá fázová analýza rozptýleného světla pomocí jiné metody zpracování signálu. Fázový posun rozptýleného světla je přímo úměrný změně pozice částic. Využitím této techniky se výrazně zlepšuje rozlišovací schopnost měření a je také mnohem citlivější na změny pohyblivosti částic [121].



Obrázek 9 Schematické znázornění metody Laserové dopplerovské elektroforézy. Symbol θ představuje úhel rozptylu světla, které zaznamenává detektor (obvykle 13°).

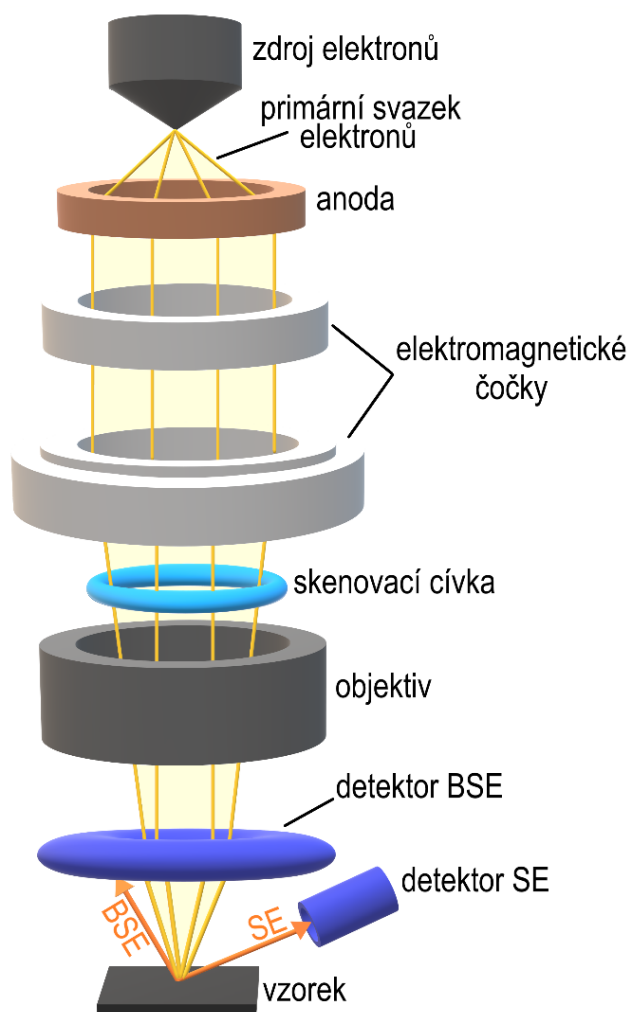
4.5.4 Skenovací elektronová mikroskopie

Předchozí kapitoly nastínily důležitost skenovací elektronové mikroskopie (SEM) v kontextu charakterizace nanočástic. Metoda SEM se používá ke studiu a zobrazování pevných látek a jejich povrchů na mikroskopické úrovni, přičemž rozlišení se v současnosti rychlým tempem zvyšuje. Rozlišovací schopnost moderních přístrojů se již pohybuje pod hodnotou 1 nanometru. Není divu, že SEM se řadí mezi nejpopulárnější zobrazovací techniky a je široce využívána v celé řadě vědních oborů [122, 123].

Vzorek neinteraguje s fotony, jako je tomu v případě světelného mikroskopu, ale s elektrony. Obraz vzorku se vytváří skenováním jeho povrchu zaostřeným paprskem elektronů o vysoké energii. Elektrony interagují s atomy postupně v různých pozicích a hloubkách a následně jsou, dle zvoleného režimu snímání, zachycovány dvěma typy detektorů. Konkrétně se jedná o detektor zachytávající proud sekundárních elektronů (SE), vyražených z atomů na povrchu vzorku, nebo o detektor zachytávající zpětně rozptýlené (odražené) elektrony (BSE). Vysokého rozlišení v porovnání se světelným mikroskopem lze dosáhnout díky krátkým vlnovým délkám elektronů, které jsou v přímém vztahu k difrakčnímu limitu určujícímu maximální rozlišovací schopnost. Vlnovou délku elektronů lze upravovat pomocí změny urychlovacího napětí produkovaného elektromagnetickými čočkami [123-125].

V běžných případech musí být vzorky elektricky vodivé, alespoň na povrchu, a rovněž elektricky uzemněné, aby se zabránilo akumulaci elektrostatického náboje, který by znemožnil měření. Nevodivé vzorky lze obvykle pokovovat, čili opatřit tenkou povrchovou vrstvou vodivého kovu. Práškové vzorky lze měřit na oboustranně lepící pásce, uhlíkové nebo kovové, která se následně uchytí na držák. Měření probíhá ve vakuu [124, 126, 127].

V oblasti charakterizace nanočástic se metoda SEM využívá hlavně pro detailní určení jejich morfologie. Mezi hlavní nevýhody SEM patří absence výpočtu průměrné velikosti a disperzity [124].



Obrázek 10 Schematické znázornění skenovacího elektronového mikroskopu. BSE: zpětně rozptýlené elektrony, SE: sekundární elektrony.

4.6 Termická analýza

Termická analýza, patřící do oblasti materiálových věd, studuje fyzikálně-chemické a kinetické vlastnosti materiálů ve vztahu k teplotě. V oblasti polymerů se využívá hlavně k určení termické stability a přechodových stavů. V rámci značného počtu metod termické analýzy dominují metody DSC, DTA a TGA [128].

4.6.1 Diferenční skenovací kalorimetrie

Kalorimetrické techniky umožňují měření termických charakteristik materiálů pomocí určení závislosti mezi teplotou a specifickými fyzikálními vlastnostmi látek.

Kalorimetry jsou široce využívány v oblasti biochemie, biotechnologie a polymerní chemie, ale také v nanomedicině k měření termodynamických vlastností biomolekul a nanomateriálů. Z různých typů kalorimetrických technik mají v současnosti nejvýznamnější postavení tzv. diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) a diferenční termická analýza (DTA), protože jsou schopny poskytnout detailní informace o fyzikálních i energetických vlastnostech zkoumané látky, a to relativně rychle a přesně [129-131].

Metody jsou si velice podobné. DSC a DTA kalorimetry poskytují v závislosti na teplotě a čase kvantitativní informace o exotermních a endotermních změnách, jako i změnách tepelné kapacity, souvisejícími s přechodovými stavy materiálu. V případě DTA se měří teplotní rozdíly mezi zkoumaným a referenčním vzorkem při udržování konstantního tepelného toku, tedy množství tepla dodaného za určitý čas. DSC měří energetické rozdíly mezi zkoumaným a referenčním vzorkem, přičemž teplota je přesně kontrolována a obvykle roste lineárně s časem [130, 131].

Na základě principu fungování se DSC kalorimetry dělí na dva základní typy, jmenovitě DSC s tepelným tokem a DSC s kompenzací příkonu. DSC s kompenzací příkonu obsahuje vlastní ohřívač i měřící (kalorimetrickou) celu pro zkoumaný i referenční vzorek. Fyzikální nebo chemická změna zkoumaného vzorku se projeví jako teplotní rozdíl vůči referenčnímu vzorku a je kompenzována změnou příkonu ohřívače s cílem udržet izotermní stav. DSC s tepelným tokem obsahuje pouze jednu kalorimetrickou celu, ve které se nachází jak zkoumaný, tak referenční vzorek (obvykle prázdný kelímek). Oba vzorky jsou umístěné na tzv. termoelektrickém disku, který je zahříván lineární rychlostí. Díky tepelné kapacitě zkoumaného materiálu je teplota vzorků rozdílná. Výsledný tepelný tok lze určit termickým ekvivalentem Ohmova zákona:

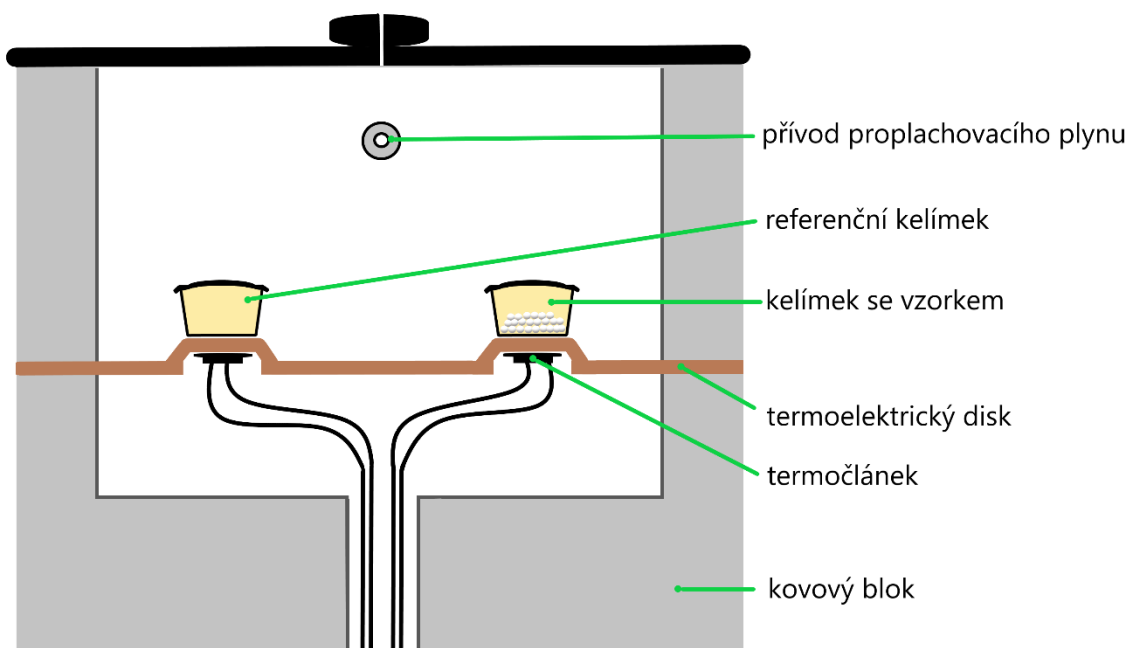
$$q = \frac{\Delta T}{R} \quad (8)$$

kde q představuje tepelný tok zkoumaného vzorku, ΔT teplotní rozdíl mezi zkoumaným a referenčním vzorkem a R tepelný odpor termoelektrického disku [130-132].

Vzorky pro DSC bývají měřeny v malých kovových kelímcích, navržených s důrazem pro optimální tepelnou vodivost. Důležitá je také jejich nulová nebo zanedbatelná interakce se vzorkem. Vhodnými materiály jsou proto například slitiny hliníku, nerezová ocel, platina či stříbro. Podle charakteru a potřeb měření i samotného vzorku, mohou být kelímky v průběhu měření uzavřené, otevřené, nebo s malým otvorem umožňujícím únik případných vznikajících plynů, způsobených například dekompozicí materiálu. Referenční kelímek by měl být identický s kelímkem pro vzorek a bývá naplněn inertním materiálem, v nejjednodušším případě vzduchem. Výhodou DSC je nenáročnost na množství vzorku. Při analýze farmaceutických materiálů je obvyklé množství vzorku v rozmezí 3 až 5 miligramů, lze pracovat i s množstvím menším než 1 miligram [131, 133].

Správně zvolený teplotní režim, zahrnující počáteční teplotu, cílovou teplotu, rychlost ohřevu, ale také rychlost skenování, je pro měření esenciální. Limitní rychlost ohřevu, event. chlazení, je při zachování dostatečné přesnosti u většiny dnešních DSC přístrojů na úrovni 30 až 40 K za minutu. Důležitým faktorem je také výběr proplachovacího plynu a jeho rychlosti průtoku. Proplachovací plyn pomáhá odstraňovat případnou vlhkost, umožňuje rovnoměrnější ohřev, výrazně urychluje chlazení a poskytuje efektivnější převod tepla mezi termoelektrickým diskem a kelímkem, díky čemu se zvyšuje citlivost a zrychluje měření. Mezi nejběžnější proplachovací plyny patří dusík, hélium, argon a vzduch. V konfiguraci přístroje s regulátorem hmotnostního průtoku plynu (MFC) lze měnit plyn v průběhu experimentu [130, 131, 134-136].

Za výsledek analýzy se považuje termická křivka, grafické znázornění závislosti tepelného toku (resp. příkonu v případě DSC s kompenzací příkonu) na teplotě. Plocha píků v průběhu křivky je přímo úměrná spotřebovanému či uvolněnému teplu a jejich směřování značí exo nebo endotermní charakter procesu. Výška píku pak reprezentuje rychlost sledovaného děje [137, 138].



Obrázek 11 Schematické znázornění diferenčního skenovacího kalorimetru s tepelným tokem.

4.6.2 Termogravimetrická analýza

Termogravimetrická analýza (TGA) je metoda, při které je s vysokou přesností měřena hmotnost vzorku v závislosti na teplotě nebo čase, přičemž je přesně zvolen teplotní režim a atmosféra, udržována proplachovacím plynem [139].

Základní komponentou všech termogravimetrických přístrojů jsou termováhy umístěné v elektrické peci a propojené s termočlánekem snímajícím teplotu. Princip měření je založený na kompenzaci změny hmotnosti vzorku termováhami, aby se zabezpečil rovnoměrný ohřev. Vzorky jsou měřeny v kovových kelímcích jako v případě DSC analýzy [139, 140].

Hmotnost měřeného vzorku může v průběhu analýzy růst nebo klesat. Nárůst hmotnosti může být způsoben například vlivem adsorpce, hydratace či chemické reakce. Úbytek hmotnosti je nejčastěji způsoben dehydratací, dehydroxylací, vypařováním, desorpcí, pyrolýzou či dekompozicí. V případě polymerů se lze s nárůstem hmotnosti setkat jen výjimečně, například při pomalém zahřívání a oxidující atmosféře. Mnohem častější je úbytek hmotnosti. Při teplotách od 200 °C do 800 °C, v závislosti na polymeru,

lze obvykle pozorovat štěpení řetězců a vznik těkavých degradačních produktů [139-141].

Výsledkem analýzy je termogravimetrická křivka, vyjadřující změnu hmotnosti vzorku v závislosti na teplotě a čase. V praxi se lze často setkat s kombinací TGA s metodou DSC, případně DTA. DSC, resp. DTA senzor je připojený k termogravimetrickým vahám, takže analýza probíhá současně pro jeden konkrétní vzorek. Souběžná analýza umožňuje propojit termické jevy ve vzorku s jeho změnou hmotnosti a poskytnout tak detailnější charakterizaci materiálu. Nevýhodou může být nižší citlivost měření v porovnání se samostatným využitím jednotlivých metod [140, 142].

4.6.3 Přejíchodové stavy polymerů

Reaktoplasty, vyznačující se zesíťovanou strukturou a značnou mechanickou odolností, jsou netavitelné a nemohou se proto vyskytovat v kapalném stavu [143]. Jinak je to však v případě polymerů, které strukturně nevytváří prostorovou trojrozměrnou síť. V závislosti na teplotě se mohou vyskytovat v tuhém nebo kapalném stavu. Plynný stav je kvůli vysokým molárním hmotnostem pro polymery nedosažitelný, jelikož hypotetický bod varu se nachází daleko za hodnotami teploty dekompozice. Mechanické vlastnosti polymerů se však obecně s teplotou nemění kontinuálně, ale často dochází ke skokovým změnám. Oblasti teplot, při kterých dochází k těmto změnám, patří mezi důležité identifikátory vlastností a zpracovatelnosti polymerů.

Z hlediska termomechanických vlastností sehrává důležitou roli krystalinita polymeru, tedy podíl krystalické fáze. U krystalických polymerů, kterých makromolekuly jsou pravidelně uspořádané, lze pozorovat teplotu tání (T_m), při které polymer přechází z tuhého stavu přímo do stavu kapalného z důvodu rozpadu krystalické struktury. Amorfni polymery, mající náhodně uspořádané makromolekuly, se mohou vyskytovat v tzv. kaučukovitém stavu, kdy nejsou tuhé, ale ani nevykazují tokové vlastnosti. Skokový přechod z tuhého stavu ke kaučukovitému je popisován teplotou skelného přechodu (T_g). Teplota viskózního toku (T_f) pak představuje přechod z kaučukovitého stavu do kapalného. V případě semikrystalických polymerů lze pozorovat T_g i T_m [144-147].

4.7 Viskozimetrie

Viskozita je jednou ze základních fyzikálních charakteristik kapalin, reprezentující jejich rezistivitu k toku vyvolánému působením vnějších sil. K zachování toku kapalin je nutné kontinuální dodávání energie. Viskozita je závislá na teplotě a tlaku, v případě newtonovských kapalin také na působící síle (namáhání). Viskozita newtonovských kapalin je nejčastěji popsána viskozitní křivkou, tedy grafickou závislostí dynamické viskozity na rychlostním spádu, resp. tečném napětí. Nejběžnější techniky měření viskozity a dalších reologických veličin lze podle principu měření rozdělit do tří kategorií:

- Pádová (tělísková) technika je principem nejjednodušší. Tělísko o známém tvaru (nejčastěji kulička), hustotě a rozměru se nechá volně padat, případně pohybovat, testovanou kapalinou. Viskozita je pak úměrná času potřebnému k překonání přesně definované vzdálenosti.
- Kapilární techniky, při kterých se viskozita stanovuje na základě doby průtoku kapaliny definovanou kapilárou a poklesu hydrostatického tlaku.
- Rotační techniky, při kterých se viskozita počítá z točivého momentu a rychlosti rotoru [148, 149, 150].

Rotační techniky dnes patří mezi nejvyužívanější, dominují mezi nimi absolutní rotační reometry. Díky své univerzálnosti a širokým možnostem použití patří rotační reometry k nejcennějším reometrickým přístrojům. Umožňují komplexní reologickou charakterizaci širokého spektra látek od nízkoviskózních roztoků polymerů až po extrémně viskózní látky, například asfalt.

Vzorek je při měření na rotačním reometru umístěn mezi dvě plochy (geometrie). Mezi nejběžnější typy geometrického uspořádání patří válec-válec, deska-deska a kužel-deska. Alespoň jedna z těchto geometrií je přes rotor spojená s motorem, díky kterému vykonává rotační, případně oscilační pohyb. Podle brzdného efektu vzorku je pak software schopný vypočítat, kromě jiného, viskozitu. Aby se zamezilo tření, které by snižovalo přesnost měření, je rotor moderních přístrojů vybavený vzduchovým nebo elektromagnetickým ložiskem.

Z konstrukčního hlediska dělíme rotační reometry na typ CS (“controlled stress”), u kterého se za kontrolovaných hodnot posuvného napětí měří rychlostní spád a typ CR (“controlled rate”), měřící posuvné napětí za regulace rychlostního spádu. U nových přístrojů se lze setkat i s kombinací obou těchto módů [151-153].

4.7.1 Viskozita vnitřní fáze při nanoprecipitaci

Viskozita má důležitou roli také při procesu formulace nanočástic nanoprecipitační metodou. Viskozita vnitřní fáze může ovlivnit velikost nanočástic i proces enkapsulace léčiva. Podle hypotézy některých autorů vede zvyšování viskozity vnitřní fáze, způsobené zvýšením koncentrace polymeru, ke zvýšení difuzního odporu v průběhu procesu nanoprecipitace. Molekuly léčiva pak mají ztíženou případnou difuzi z vnitřní fáze do fáze vnější, což se projeví efektivnější enkapsulací léčiva polymerem, a tudíž zvýšením enkapsulační efektivity.

Na podobném principu je popisován rovněž možný vliv viskozity na velikost výsledných částic. Vyšší viskozita vnitřní fáze znesnadňuje difuzi organického rozpouštědla do vodní fáze, což se projeví celkovým zpomalením precipitace polymeru a formulací větších částic [77, 154].

Viskozita vnitřní fáze musí být dostatečně nízká, aby mohl proces nanoprecipitace probíhat bez vzniku nežádoucích polymerních aglomerátů a byla zachována potřebná rychlost difuze organického rozpouštědla do vnější fáze [155].

4.8 Liberace léčiv z PLGA

Rychlost a průběh liberace léčivých látek, enkapsulovaných nebo inkorporovaných v polymerních nosičích, jsou závislé hlavně na degradaci polymeru a následné erozi polymerního nosiče. K využití biodegradovatelného polymeru jako nosiče léčiv je proto nevyhnutné pochopení jeho mechanismu degradace. Degradace polymerů je popisována jako štěpení řetězců za postupného snižování molární hmotnosti [156, 157].

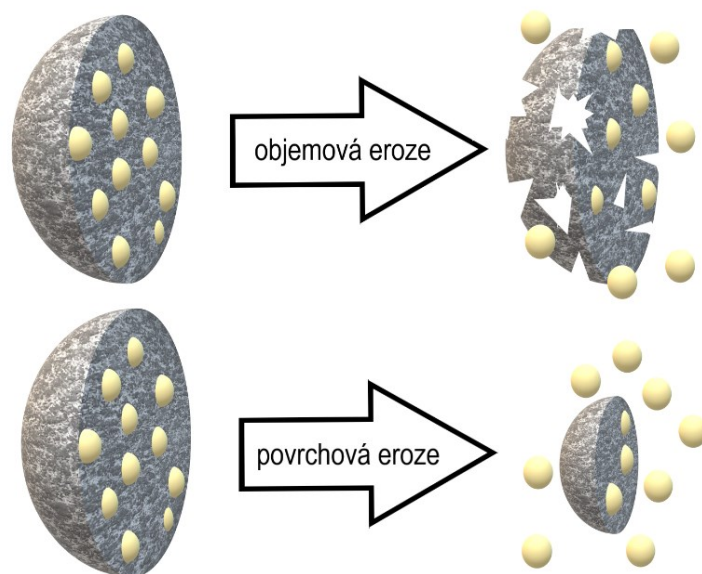
Degradace PLGA ve vodném prostředí probíhá náhodným hydrolytickým štěpením esterových vazeb hlavního řetězce. Polymer se postupně fragmentuje na oligomery a finálně monomery, tedy mléčnou a glykolovou kyselinu, které vstupují do citrátového

cyklu, ve kterém jsou metabolizovány na vodu a oxid uhličitý. V některých pracích se objevuje i hypotéza o možné enzymatické degradaci, souběžně k degradaci hydrolytické, závěry jsou však nejednoznačné [156, 158, 159].

Jelikož existuje celá řada faktorů, které ovlivňují degradaci PLGA, jsou výsledná rychlost a průběh degradace jen obtížně předvídatelné. Mezi faktory, které mají na degradaci nejvýraznější vliv, patří hlavně poměr mléčné a glykolové kyseliny, molární hmotnost, krystalinita a pH prostředí. Poměr mléčné a glykolové kyseliny a jeho vliv na krystalinitu a degradaci PLGA je detailně popsán v kapitole 4.2.3. Efekt molární hmotnosti je jednoznačný, s jejím nárůstem se degradace zpomaluje. Známy je také její přímý vztah s délkou polymerního řetězce, kdy PLGA s větší molární hmotností mají delší řetězce, které se hydrolyzují pomaleji [16]. Rychlost degradace může být do značné míry ovlivněna také hodnotou pH prostředí. V silně alkalickém i kyselém prostředí je degradace urychlena. Degradace PLGA může být i autokatalyzována kyselými karboxylovými skupinami a vznikajícími kyselými produkty [16, 160].

Na degradaci polymeru je přímo závislá eroze polymerního nosiče, která je charakterizována jako úbytek jeho hmotnosti. Ve vodném prostředí rozlišujeme dva základní typy eroze, v závislosti na poměru rychlosti difuze vody do matrice nosiče a rychlosti degradace samotného polymeru. Když je degradace polymeru rychlejší než difuze vody do nosiče, eroze polymerního nosiče bude povrchovým jevem. V takovém případě mluvíme o povrchové erozi. V případě, že je difuze vody rychlejší než degradace polymeru, bude eroze polymerního nosiče probíhat v celém jeho objemu. PLGA nosiče se obecně řadí k objemově erodujícím [158, 159].

Také poměr povrchu polymerního nosiče k jeho objemu může signifikantně ovlivnit rychlost eroze. Tento poměr se ukazuje jako obzvlášť důležitý v případě větších nosičů, například implantátů, kdy se větší plocha v poměru k objemu projeví urychlením eroze [16].



Obrázek 12 Znárodnění objemové a povrchové eroze polymerních nanočástic. Šedou barvou je znázorněný průřez nanočástic, žluté kuličky představují léčivo.

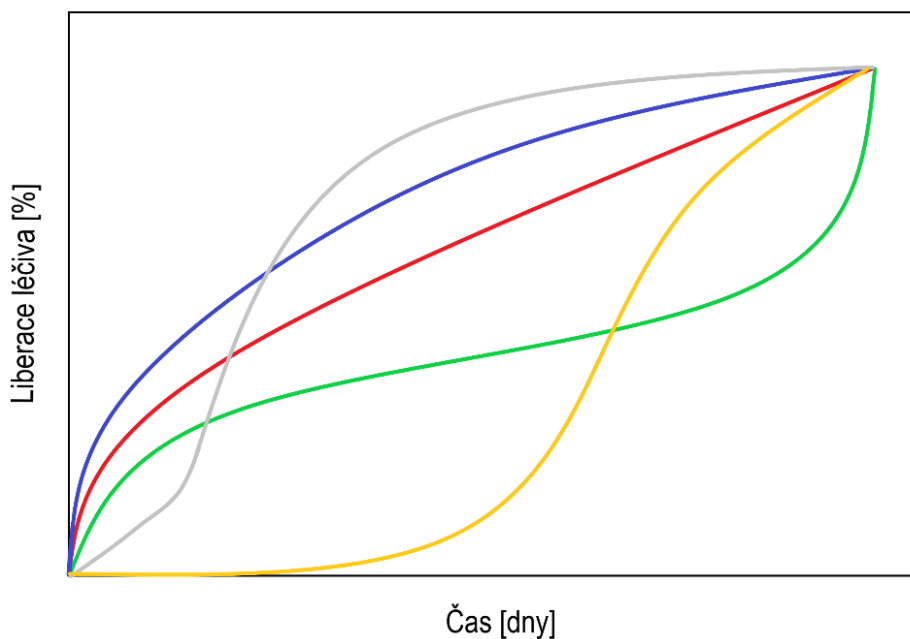
Liberace léčiva z PLGA systémů je tedy závislá hlavně na rychlosti eroze polymerního nosiče a může trvat dny až měsíce v závislosti na jeho vlastnostech [161]. I typ a množství enkapsulovaného, případně inkorporovaného léčiva, však může do značné míry ovlivnit rychlost i mechanismus eroze polymerního nosiče a tím i vlastní liberaci. Nalezení konkrétních závislostí mezi fyzikálně-chemickými vlastnostmi léčiva a jeho liberací z PLGA je však velice obtížné [16].

V případě medikovaných PLGA systémů se můžeme setkat s různými profily liberace. Obecně preferovaný jednofázový profil, tedy liberace nultého řádu, je u PLGA systémů raritní. Nejběžnější jsou dvoufázový a třífázový profil [159].

Liberace léčiv z polymerních nanočástic je velmi často prezentována jako dvoufázový proces, složený z počátečního tzv. „burst“ efektu, tedy rychlého uvolnění části léčiva po styku s disolučním médiem, obvykle následovaného prodlouženým uvolňováním. „Burst“ efekt je dán disolucí molekul léčiva adsorbovaných na povrchu nanočástic nebo jeho těsné blízkosti. Následný pokles rychlosti uvolňování reflektuje disoluci léčiva zachyceného v polymeru. Předpokládá se, že rychlost uvolňování léčiva v této fázi může být kontrolováno rychlostí jeho difuze napříč strukturou polymeru [162]. Mezi nejpoužívanější matematické modely kinetiky uvolňování léčiva z nanonosičů

řadíme Higuchiho model a Korsmeyer-Peppas model [163]. Ne všechny disoluční profily prezentované v literatuře jako doufázové se za ně dají z praktického hlediska i považovat. Často se vyskytuje příliš výrazný „burst“ efekt, kdy se nárazově uvolní víc než 50 % přítomného léčiva, následovaný pouze relativně malým množstvím uvolněného léčiva ve druhé fázi [164]. Mnohdy však lze nežádoucí „burst“ efekt redukovat, případně kontrolovat [165].

Třífázový profil je běžnější hlavně u implantátů a částicových systémů větších rozměrů, které se vyznačují heterogenní degradací. První fází je „burst“ efekt, obdobný jako v případě dvoufázového profilu. Druhá fáze, vyznačující se prodlouženým uvolňováním, je popisována jako postupná hydratace, bobtnání a degradace polymerní matrice, přes kterou difunduje léčivo. Finální třetí fáze, někdy označována jako druhý „burst“, bývá výrazně rychlejší a je spojována s rozvojem eroze polymerní matrice. Lze se však setkat i s případy, kdy je druhá fáze rychlejší a prodloužené uvolňování lze pozorovat spíše ve fázi třetí [159]. Zajímavým přístupem je kombinace částic různých rozměrů s cílem modifikovat liberační profil [166].



Obrázek 13 Znárodnění možného průběhu liberace léčiv z PLGA systémů. Modře: dvoufázová liberace, červeně: dvoufázová liberace s lineární druhou fází, zeleně: třífázová liberace, šedě: třífázová liberace s rychlejší druhou fází, žlutě: třífázová liberace bez přítomného „burst“ efektu (přítomný tzv. „lag-time“).

4.9 Testování antimikrobiální účinnosti nanočástic

Při formulaci medikovaných nanočástic s obsahem antimikrobiálních látek je potřeba efektivně ověřit jejich antimikrobiální účinnost. Samotné stanovení obsahu účinné látky v nanočásticích nelze považovat za dostatečné, jelikož klíčové vlastnosti výsledné formulace, jako například liberace léčiva, mohou být do značné míry ovlivněny parametry nanočástic [167].

Mezi nejběžnější *in vitro* metody ověření antimikrobiální účinnosti nanočástic patří plotnová metoda, průtoková cytometrie, bujonová diluční mikrometoda, disková difuzní metoda a jamková difuzní metoda [168].

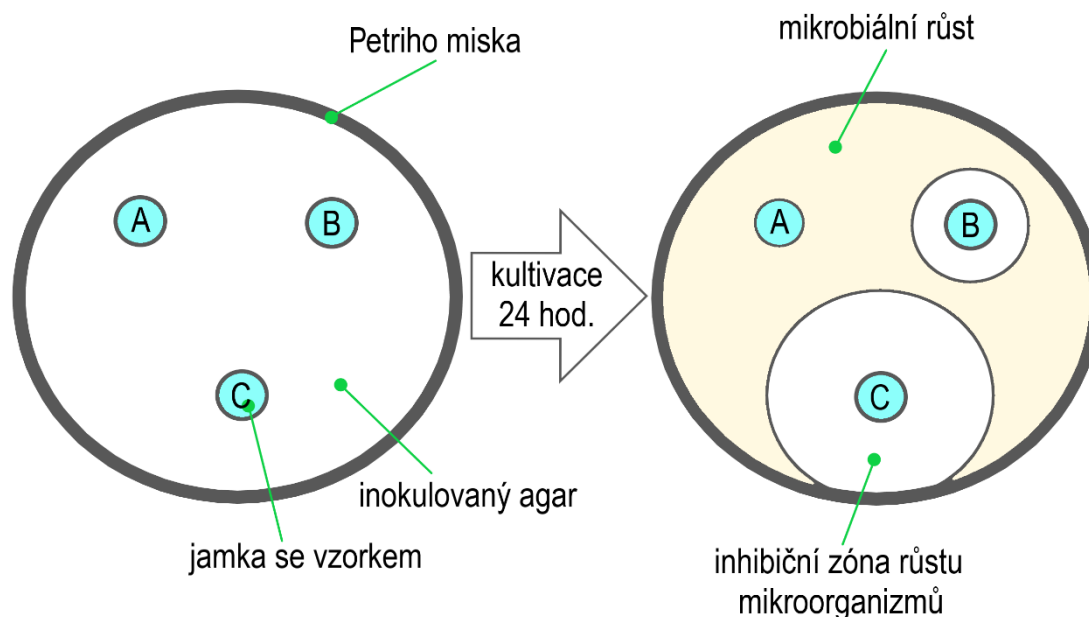
Plotnová metoda, patřící mezi kultivační nepřímé metody, je založená na stanovení viability mikroorganismů po vystavení nanočásticemi na základě počtu mikroorganismů, které po kultivaci vytvoří kolonie (CFU). Nanosuspenze se v požadovaných koncentracích nanese na inokulovanou agarovou plotnu a po kultivaci se porovnává jejich hodnota CFU s kontrolním vzorkem [168, 169].

Zajímavou metodou v oblasti testování antimikrobiální efektivity nanočástic je také průtoková cytometrie, která umožňuje rozlišit počet živých a mrtvých buněk pomocí fluorescenčních barviv přidaných k testované buňčné suspenzi. Tato metoda umožňuje také kvantifikovat vychytávání nanočástic buňkami [169-171].

V případě bujonové diluční metody se využívá Mueller-Hintonův bujon s inokulovanými mikroorganismy, který se dává do jamkové mikrotitrační destičky, do které se následně přidávají i testované nanočástice ve formě suspenze v sériovém ředění. Přidáním barviva resazurinu, které se v přítomnosti nepoškozených buněk redukuje a mění barvu z modré na růžovou, lze stanovit rozmezí minimální inhibiční koncentrace (MIC) testovaných nanočástic. Koncentrace přidané nanosuspenze, u které nedojde ke změně zbarvení, se označí jako koncentrace nad MIC [167, 168].

Disková difuzní metoda je založena na aplikaci disku z filtračního papíru s obsahem nanosuspenze na povrch mikroorganismy inokulované agarové plotny. Antimikrobiální látka difundující do agaru vytvoří v okolí disku inhibiční zónu růstu, které plocha odpovídá antimikrobiální aktivitě testovaného vzorku [168].

Jamková difuzní metoda se vyhodnocením podobá metodě diskové, umožňuje však pohodlnější aplikaci vzorků na agarovou plotnu. Provedení je poměrně jednoduché a rychlé. Do zvoleného agaru, inokulovaného mikroorganismy, se vykrojí jamky standardních rozměrů. Do připravených jamek se pak dávkuje testovaná nanosuspenze, resp. kontrolní vzorky. Doba kultivace je obvykle 24 hodin. Testování se běžně provádí duplicitně nebo triplicitně a výsledné inhibiční zóny se porovnávají vizuálně, případně se stanoví jejich průměr [168, 172, 173].



Obrázek 14 Znázornění jamkové difuzní metody testování antimikrobiální efektivity

4.10 Terbinafin

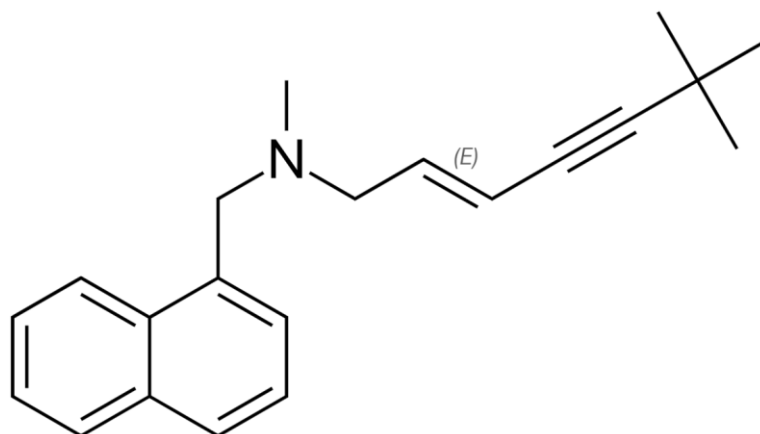
Terbinafin, chemickým názvem (2E)-N,6,6-trimethyl-N-(naftalen-1-ylmethyl)hept-2-en-4-yn-1-amin, je syntetický derivát allylaminu, strukturně vycházející z naftifinu. Kromě volné baze se často vyskytuje ve formě hydrochloridu. Terbinafin blokuje mechanismem inhibice skvalen-epoxidázy biosyntézu ergosterolu, hlavního sterolu buněčné membrány mikromycet [174, 175].

Vzhledově se jedná o bílý nebo téměř bílý prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, rozpustný například v bezvodém ethanolu nebo v DMSO. Převedením na formu hydrochloridu lze rozpustnost ve vodě mírně zvýšit (těžce až velmi těžce rozpustný), teplota tání se zvýší poměrně výrazně na hodnotu přibližně 200 °C [176-178].

Podle biofarmaceutického klasifikačního systému (BCS) řadíme terbinafin do druhé třídy, tedy k léčivům špatně rozpustným ve vodném prostředí s vysokou permeabilitou. Jakožto slabá base vykazuje terbinafin rozpustnost závislou na pH s maximem v kyselé oblasti. Absorpce po perorálním podání proto probíhá ze žaludku lineární kinetikou [175, 179].

Vysoce lipofilní molekula terbinafinu má vysokou míru biodistribuce a tendenci ke kumulaci v kůži, nehtech a tukové tkáni, čehož se s výhodou využívá při terapii široké škály dermatomykóz. Mezi nejčastější aplikační formy patří topické a perorální preparáty. Eradikace mykotických původců je obtížná a obvykle trvá řádově týdny až měsíce, a je proto spjatá s relativně vysokým výskytem širokého spektra nežádoucích účinků, obzvláště při perorálním podávání. Jedná se hlavně o gastrointestinální, neurologické, hepatické, imunitní, kožní ale i psychologické a senzorické projevy [175, 177, 180]. Významný je také jeho značný interakční potenciál se substráty jaterní oxidázy CYP2D6, kterou silně inhibuje [175].

Právě vysoký výskyt nežádoucích účinků, nutnost zdlouhavé terapie i fyzikálně-chemické vlastnosti terbinafinu podnítily výzkum a vývoj nových lékových forem s modifikovaným uvolňováním a cílenou distribucí [174]. Například flexibilní lipozomy (transferosomy) ve formě filmů a laků pro lepší permeabilitu terbinafinu do nehtů při léčbě onychomykózy [181, 182], lipidické nanočástice s výrazně prodlouženým uvolňováním a cílenou distribucí do kůže pro efektivnější terapii dermatomykóz [183] nebo polymerní nanočástice s kladným nábojem ve formě očních kapek pro léčbu mykotických keratitid [184].



Obrázek 15 Zjednodušený racionální konstituční vzorec terbinafinu

Tabulka 2 Charakteristika terbinafinu [175, 176, 185, 186]

FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI	
molekulová hmotnost	291,4 g/mol
teplota tání	44-48 °C
logP	5,9
ROZPUSTNOST	
H ₂ O	~7.38e-04 mg/mL
MeOH, EtOH	~50 mg/mL
DMSO	~100 mg/mL
FARMAKOKINETIKA	
biodostupnost	70-90 %
vazba na plazmatické bíl.	>99 %
biologický poločas	variabilní, ~36 h
clearance	~100 hod.
zdánlivý distribuční objem	~20 L/Kg
metabolizace	játra (CYP3A4)
exkrece	ledviny (80 %), GIT (20 %)

logP: logaritmus rozdělovacího koeficientu *n*-oktanol/voda, GIT: gastrointestinální trakt.

4.11 Didodecyldimethylamonium bromid

Didodecyldimethylamónium bromid (DDAB) je kationický tenzid s dvojitým alkylovým řetězcem. Strukturně jej řadíme mezi kvarterní amoniové soli [187]. Je to pevná látka, bílý krystalický prášek, s teplotou tání v rozmezí 157-162 °C a molární hmotností 462,6 g/mol. Je rozpustný ve vodě v koncentracích do 5 % [188]. Výhodou je jeho dostupnost, nízká toxicita a antiseptické vlastnosti. DDAB je schválený FDA i EMA a široce používán také v oblasti nanoterapeutik, hlavně pro přípravu pozitivně nabitých polymerních nanočástic [189-191].



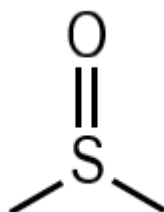
Obrázek 16 Zjednodušený racionální konstituční vzorec dimethyldidodecylamónium bromidu.

4.12 Dimethylsulfoxid

Dimethylsulfoxid (DMSO) řadíme strukturně k organosírovým sloučeninám. Jedná se o vysoce účinné polární aprotické rozpuštědlo s molární hmotností 78,13 g/mol, rozpouštějící celou řadu polárních i nepolárních látek. Může se vyskytovat v krystalické formě, nebo častěji jako bezbarvá až lehce nažloutlá hygroskopická kapalina s hustotou 1,10 g/mL, neomezeně mísitelná s vodou. Vyznačuje se poměrně vysokou hodnotou bodu varu (189 °C) a naopak nízkou hodnotou teploty tání (19 °C) [192-194].

Obecně řadíme DMSO mezi netoxická rozpouštědla, s průměrnou letální dávkou po perorálním podání přibližně dvakrát vyšší než ethanol [195, 196]. S výhodou lze využít jeho schopnost urychlovat transdermální průnik hydrofilních i lipofilních látek, objevuje se proto jako pomocná látka v řadě přípravků určených k topické aplikaci [194, 197, 198]. V koncentracích vyšších než 5 % vykazuje antimikrobiální aktivitu [193].

DMSO patří díky svým vlastnostem, dostupnosti a bezpečnosti mezi frekventovaně vyhledávaná organická rozpuštědla v oblasti chemie, biologie a medicíny [199]. Široké uplatnění našel také při přípravě nanočástic, mimo jiné i jako rozpuštědlo polymerů při nanoprecipitační metodě [77, 192, 200, 201].



Obrázek 17 Zjednodušený racionální konstituční vzorec dimethylsulfoxidu.

5 Experimentální část

5.1 Použité suroviny

Aceton, HPLC kvalita, Sigma-Aldrich, CAS: 67-64-1

Acetonitril, bezvodý, Sigma-Aldrich, CAS: 75-05-8

Amoniak, 10%, Sigma-Aldrich, CAS: 7664-41-7

Aqua purificata, FaF UK HK, CAS 7732-18-5

Cetrimid; 99,5%; Sigma-Aldrich; CAS: 8044-71-1

Didodecyldimethylammonium bromid, 98%, Sigma-Aldrich, CAS: 3282-73-3

Dihydrogenfosforečnan draselný, čistý, Penta, CAS: 7778-77-0

hydrogenfosforečnan disodný, bezvodý čistý, Sigma-Aldrich, CAS: 7558-79-4

Kyselina citronová, bezvodá čistá, Penta, CAS: 77-92-9

Dimethylsulfoxid, bezvodý, Sigma-Aldrich, CAS: 67-68-5

Terbinafin-hydrochlorid, 98%, Zentiva, CAS: 91161-71-6

5.2 Použité přístroje

Analytické váhy CAHN 26 (CAHN Instruments, USA)

Analytické váhy Discovery Vitrum, max. 210g, min. 0,001g (Ohaus, Německo)

Analytické váhy, max 220 g, d = 0,0001 g (Kern, Německo)

Automatické pipety Research plus (Eppendorf, Německo)

Centrifuga Biofuge Stratos (Heraeus, Německo)

Centrifuga Micro Z (Thermo Fischer Scientific, USA)

DSC F3 Maia (Netzsch, Německo)

Horkovzdušná sušárna (Mettler, Německo)

HPLC systém (Shimadzu, Japonsko)

Magnetická míchačka s ohřevem, 100 – 1000 ot./min. (IKA – WERKE, Německo)

Mettler Toledo TGA/DSC1 (Mettler-Toledo Ltd., USA)

pH meter HI22I (Hanna Instruments, USA)

Rotační reometer Kinexus pro⁺ (Malvern Panalytical, Velká Británie)
Ruční lis pro víčkování kelímků (Netzsch, Německo)
Skenovací elektronový mikroskop FlexSEM 1000 (Hitachi, Japonsko)
Třepací vodní lázeň Julabo SW (ILABO, Česká republika)
Ultrazvuková čistička Sonorex super 10 P (Bandelin, Německo)
Váhy 440 – 35N, max 400 g, d = 0,01 g (Kern, Německo)
Váhy FKB, max 8100 g, d= 0,05 g (Kern, Německo)
Váhy PLE, max. 420 g, d = 0,01 g, (Kern, Německo)
Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Panalytical, Velká Británie)

5.3 Pomůcky

Dialyzační membrána 23 mm, MWCO 6 000 – 8 000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
Hliníkový kelímek 100 µl (Mettler, USA)
Hliníkový kelímek 100 µl (Netzsch, Německo)
HPLC kolona Express ES-CN; 15 cm × 4,6 mm; 2,7 µm (Ascentis, Velká Británie)
HPLC předkolona Express ES-CN; 0,5 cm × 4,6 mm; 2,7 µm (Ascentis, Velká Británie)
Membránový filtr PP stříkačkový, velikost pórů 0,45 µm, (VWR International s.r.o., Česká republika)
Membránový nylonový filtr stříkačkový, velikost pórů 0,22 µm, (VWR International s.r.o., Česká republika)
Polykarbonátová kapilární kyveta DTS1060 (Malvern panalytical, Velká Británie)
Polystyrenová jednorázová kyveta DTS0012 (Malvern panalytical, Velká Británie)

5.4 Charakterizace použitých polyesterů

Použity byly čtyři polyesteru, jeden lineární (PLGA) a tři větvené (PLGA/A, PLGA/T, PLGA/D). Všechny tyto polyesteru byly syntetizovány na katedře Farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty UK roztokovou polykondenzační reakcí bez využití katalyzátoru a bez nutnosti finálního přečišťování [202].

Reaktanty byly monomery kyseliny DL-mléčné a glykolové v ekvimolárním poměru. Při syntéze větvených polyesterů obsahovala reakční směs také větvicí komponenty v různých koncentracích. Konkrétně se jednalo o kyselinu polyakrylovou o molární hmotnosti 2 000 g/mol (PAA) v koncentraci 2 %, která byla použita na větvení polyesteru značeného PLGA/A, dále pak o tripentaerythritol v případě polyesteru PLGA/T, resp. dipentaerythritol v případě PLGA/D. Procentuální zastoupení větvicích komponentů a základní charakterizaci použitých polyesterů sumarizuje Tabulka 3.

Distribuce molární hmotnosti a stupeň větvení polyesterů byly změřeny na pracovišti SYNPO a.s. s využitím kombinace metod rozměrově-vylučovací chromatografie (SEC) s víceuhlovou detekcí rozptylu světla (MALS) a on-line viskozimetrií.

Tabulka 3 Použité polyesteru a jejich základní charakteristiky

pracovní označení nosiče	poměr LA/GA/VS [%]	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	$(\eta)_w$ [mL/g]	g'
PLGA	50/50/-	5 400	7 500	12,2	1
PLGA/A	49/49/2	8 600	14 400	8,9	0,54
PLGA/T	48,5/48,5/3,0	5 300	17 400	7,7	0,43
PLGA/D	46/46/8	1 600	1 700	2,9	0,45

LA: kyselina mléčná, GA: kyselina glykolová, VS: větvicí složka, M_n : číselně střední molární hmotnost, M_w : hmotnostně střední molární hmotnost, $(\eta)_w$: vnitřní viskozita, g' : stupeň větvení.

5.4.1 Termická analýza

Termické chování testovaných polyesterů bylo stanoveno pomocí termogravimetrické analýzy (TGA) a diferenční skenovací kalorimetrie (DSC). TGA a DSC testování bylo provedeno pomocí souběžného analyzátoru Mettler Toledo TGA/DSC1 (Mettler-Toledo Ltd., USA) v teplotním rozsahu 25 °C až 500 °C za konstantní rychlosti ohřevu 10 K/min., s využitím dusíku jako proplachovacího plynu.

Polyestery se na analytických vahách navažovaly v hmotnosti 10 ± 1 mg do uzavíratelných hliníkových kelímků o celkovém objemu 100 μ L. Z důvodu maximální teploty 500 °C byla pomocí jehly horní část kelímků před jejich uzavřením opatřena malým otvorem, umožňujícím únik případných plynů vznikajících při dekompozici polyesterů.

Analýza každého vzorku proběhla triplicitně, výsledné termogravimetrické a DSC křivky byly vyhodnocovány softwarem STARe v. 9.30 (Mettler-Toledo Ltd., USA). Výsledky byly normalizovány s ohledem na přesné navážky vzorků a teploty referenčního kelímku, aby bylo možné vzájemné porovnání polyesterů.

Pomocí přístroje DSC 200 F3 Maia[®], který umožňuje chlazení vzorku, byla provedena termická analýza při nižších teplotách, z důvodu zjištění teplot skelného přechodu polyesterů.

K analýze se používalo množství vzorku 10 ± 1 mg, umístěné v hliníkovém kelímku, podobně jako při souběžné TG/DSC analýze. Termické vlastnosti byly zkoumány pod konstantním proudem dusíku 50 mL/min při rychlosti ohřevu 10 K/min. Analýza probíhala v teplotním rozmezí -40 °C až 90 °C. Vzorky byly nejprve zahřáty na 90 °C, pak zchlazeny na -40 °C a následně opakovaně zahřáty na 90 °C. Teplotní rozsah byl zvolen na základě předpokládaných hodnot T_g polyesterů s teplotní rezervou, aby bylo spolehlivě dosaženo ustálení základní linie (baseline). Hodnoty T_g byly odečteny v průběhu cyklu druhého ohřevu v inflexním bodu. Analýza proběhla triplicitně a výsledky byly zprůměrovány.

5.5 Optimalizace metody přípravy nanočástic

Z důvodu nízké rozpustnosti terbinafinu ve vodě byla zvolena nanoprecipitační metoda přípravy nanosuspenze [73]. Postup byl nejdříve optimalizován. V návaznosti na preliminární experimenty byly některé formulační faktory standardizovány. Konkrétně se jednalo o teplotu, rychlost míchání, velikost a tvar míchadla, objem a průměr kádinky a objemy vnitřní a vnější fáze.

Z důvodu přehlednosti a postupné optimalizace metody je postup formulace nanosuspenzí a průběh měření metodami DLS a LDE detailně popsán v podkapitolách 5.6.3, resp. 5.7.2.

5.5.1 Příprava vnitřní fáze

Použité polyestery byly nejprve vyjmuty z exsikátoru. Za laboratorní teploty se jedná o materiály tuhé a křehké s extrémně vysokou hodnotou viskozity. Mechanickými postupy za použití třecí misky s tloučkem se dosáhlo požadovaného stupně rozdrobnění. Následně se jednotlivé polyestery navažovaly na analytických vahách do uzavíratelných skleněných vialek.

Ke zvolenému množství polyesteru se přidalo potřebné množství rozpouštědla. Kádinky s přidaným magnetickým míchadlem se pak umístily na magnetickou míchačku s ohřevem. Za stálého míchání a konstantní teploty 50 °C se polyestery nechaly rozpustit.

5.5.2 Výběr rozpouštědla

V případě výběru organického rozpouštědla, vhodného pro nanoprecipitační metodu, byly hlavními požadavky neomezená mísitelnost s vnější (vodnou) fází a dobrá schopnost rozpouštět polymer i léčivo.

Hlavními kandidáty byly aceton, acetonitril a dimethylsulfoxid. Tato tři rozpouštědla se použila pro přípravu jinak identických nanosuspenzí, jejichž kvalita byla následně hodnocena metodou DLS. Použitým polyesterem pro toto testování byl PLGA/A.

5.5.3 Příprava vnější fáze a výběr stabilizátoru

Zvolenou vnější fází byl roztok stabilizátoru v čištěné vodě. Byla testována účinnost cetrimidu a didodecyldimethylamonium bromidu (DDAB) jako stabilizátorů nanosuspenzí. Stabilizátory ve formě prášků se nejprve dokonale rozpustily v čištěné vodě na koncentraci 0,5 %; která se v preliminárních experimentech ukázala jako účinná a sloužila jako koncentrace referenční. Tyto 0,5% zásobní roztoky se dále ředily čištěnou vodou na roztoky o nižších koncentracích, ke kterým byl za stálého míchání přikapáván roztok PLGA/A za vizuální kontroly vzniku aglomerátů. Nejnižší koncentrace stabilizátorů, při které vznikala nanosuspenze bez jasně viditelné aglomerace, byla 0,005 %, proto byla zvolena jako druhá testovací koncentrace. Jako třetí byla zvolena koncentrace o řád vyšší, tedy 0,05 %.

Následně byl metodou LDE změřen ZP připravených nanosuspenzí a porovnána efektivita stabilizátorů a vliv jejich koncentrace.

5.5.4 Množství polyesteru

S cílem optimalizovat množství polyesteru byly postupně připraveny vzorky s jeho narůstající koncentrací ve vnitřní fázi. Jako počáteční byla na základě předchozích zkušeností zvolena 1% koncentrace, která se v koncentrační řadě vzorků zvyšovala vždy o dvě procenta.

Každý vzorek byl ihned po přípravě vizuálně hodnocen, přičemž se sledovala přítomná opalescence, naznačující tvorbu nanočástic a také přítomnost nežádoucích sedimentujících aglomerátů. Kvalita vzorků, které splňovaly vizuální požadavky, byla následně hodnocena metodou DLS. Vzorky byly připraveny triplicitně, zvoleným polyesterem pro toto testování byl PLGA/A. Na základě výsledků předchozích experimentů byly nanosuspenze stabilizovány DDAB v koncentraci 0,05 %.

5.5.5 Rychlost mísení fází

Experimentem byl sledován vliv rychlosti mísení fází při nanoprecipitační metodě. Vnitřní fáze byla přidávána do fáze vnější buď najednou (one-pot), nebo po kapkách (dropwise). Pro testování byl náhodně zvolen polyester PLGA/T ve dvou různých koncentracích, konkrétně 3 % a 5 %. Vzorky byly připraveny triplicitně a hodnoceny metodou DLS.

5.5.6 Stabilita nanosuspenze

Vzorky, u kterých byl předchozím experimentem sledován vliv rychlosti mísení jednotlivých fází na distribuci velikosti částic, byly skladovány v uzavřených skleněných vialkách při konstantní teplotě 1 °C. Metodou DLS byla opakovaně měřena distribuce velikosti částic v časových intervalech 24 a 48 hodin po přípravě. Teplota vzorků na teplotu 25 °C probíhala přímo v přístroji.

5.6 Nanočástice s terbinafinem

Bylo připraveno 48 formulací s terbinafinem, které se lišily složením vnitřní fáze. Každý ze čtyř použitých polyesterů byl naředěn na čtyři koncentrace (1 %, 3 %, 5 %, 7 %) za použití DMSO jako rozpouštědla. V takto připravených roztocích se následně rozpustila navážka terbinafinu o hmotnosti 5 mg, 15 mg nebo 25 mg.

5.6.1 Příprava volné baze terbinafinu

K dispozici byl terbinafin-hydrochlorid, který byl za pomoci ultrazvukové lázně rozpuštěn v čištěné vodě o teplotě 80 °C a následně zfiltrován. Poté byl přikapáván 10% vodný roztok amoniaku do dosažení hodnoty pH 7,0. Hodnota pH byla kontinuálně měřena digitálním pH metrem. Po dekantaci roztoku byl terbinafin důkladně vysušen ve vakuové sušárně.

5.6.2 Viskozita vnitřní fáze

Dynamická viskozita roztoků jednotlivých polyesterů a terbinafinu v DMSO byla změřena na absolutním rotačním reometru Kinexus pro⁺ a následně analyzována softwarem r-Space v. 1.75. Spodní geometrií byla deska. Vzhledem k faktu, že roztoky polyesterů byly v kapalném stavu, byla zvolena horní geometrie s průměrem 60 mm tvaru kužele a s úhlem 1° (CP 1/60). Testované roztoky byly dávkovány automatickou pipetou v přesném objemu (0,98 mL) s ohledem na zvolenou konfiguraci geometrií.

Vzorky byly temperovány na teplotu 25 °C a měření probíhalo v režimu kontrovaného rychlostního spádu v rozmezí 0,1 až 100,0 s⁻¹. Vzorky byly změřeny třikrát a výsledné viskozitní křivky byly analyzovány matematickým modelem „Newtonian model fit for viscometry“.

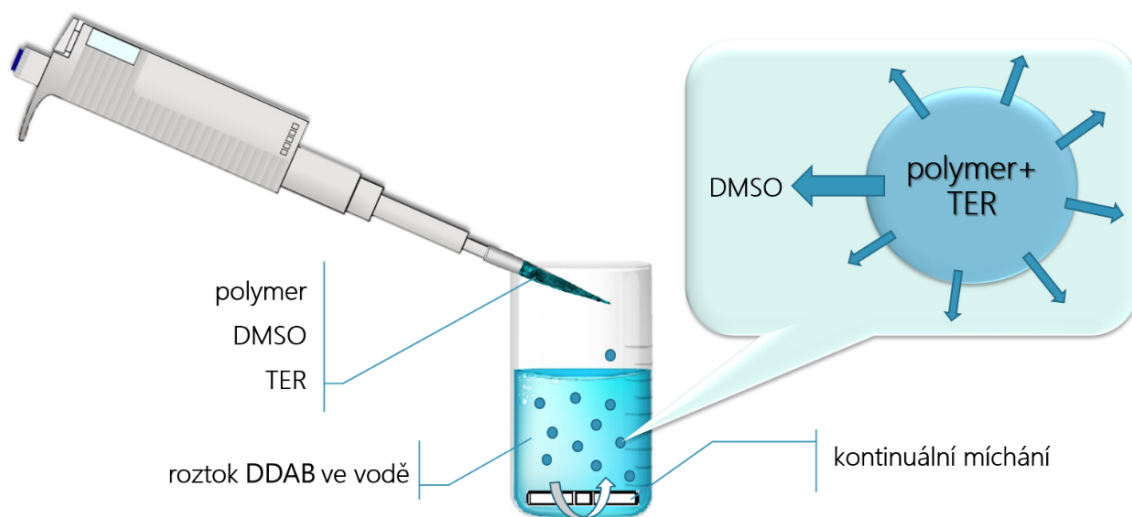
5.6.3 Formulace nanosuspenze

Formulace nanosuspenze vycházela z nanoprecipitační metody. Terbinafin byl navážen na analytických vahách do skleněných kádinek o objemu 10 mL. Pro jednotlivé série vzorků byly zvoleny tři návážky, konkrétně 5 mg, 15 mg a 25 mg.

Navážený terbinafin byl dokonale rozpuštěn v 1 mL roztoku polyesteru dané koncentrace. Roztok terbinafinu a polyesteru ve vybraném organickém rozpouštědle bude dále označován jako vnitřní (organická) fáze.

Vnější (vodná) fáze, roztok DDAB v čištěné vodě o koncentraci 0,05 % a objemu 10 mL, byla ve skleněné kádince o objemu 25 mL s určeným průměrem umístěna na magnetickou míchačku.

Za stálého míchání byla k vnější fázi po kapkách (dropwise) přidávána fáze vnitřní. Po přidání celého objemu vnitřní fáze byla vzniklá nanosuspenze ponechána na magnetické míchačce po dobu 30 minut.



Obrázek 18 Ilustrativní znázornění nanoprecipitační metody. TER: terbinafin, DMSO: dimethylsulfoxid, DDAB: didodecyldimethylamonium bromid

5.7 Charakterizace nanočástic s terbinafinem

5.7.1 Skenovací elektronová mikroskopie

Tvar a morfologie nanočástic byly sledovány s využitím skenovacího elektronového mikroskopu FlexSEM 1000 (Hitachi, Japonsko) v režimu sekundárních elektronů. Mikroskop pracoval v urychlovacím napětí 20 kV. Vzorčky ve formě přečištěné nanosuspenze byly před měřením umístěny na uhlíkovou adhezivní pásku a vysušeny při laboratorní teplotě.

5.7.2 Velikost, disperzita a zeta potenciál

Základními sledovanými parametry připravených nanosuspenzí byla velikost částic, index polydisperzity a ZP.

Velikost částic a index polydisperzity byly stanoveny metodou dynamického rozptylu světla na přístroji Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Panalytical, UK) v konfiguraci s červeným helium-neonovým laserem pracujícím při vlnové délce 632,8 nm. Fluktuační intenzitě rozptylovaného světla byly detekovány pod úhlem zpětného rozptylu o velikosti 173°. Pro měření byly zvoleny jednorázové polystyrénové kyvety DTS0012, do kterých se připravená nanosuspenze v objemu 1 mL dávkovala pomocí tuberkulinové stříkačky bez jehly. Vysoce koncentrované vzorky, které nebyly transparentní, se před měřením ředily 0,05% roztokem DDAB v čištěné vodě. Pozice tlumiče byla nastavována automaticky.

Samotné měření se provádělo triplicitně podle vytvořeného standardního operačního protokolu s nastavenými klíčovými parametry uvedenými níže:

- refrakční index materiálu: 1,50
- absorpce materiálu: 0,010
- refrakční index disperzního prostředí: 1,330
- dynamická viskozita: 0,8872 mP·s
- dielektrická konstanta disperzního prostředí: 78,5
- pozice při měření: 0,85 mm
- teplota: 25,0 °C

Měření ZP probíhalo ve stejném přístroji metodou LDE. Nanosuspenze se dávkovala tuberkulinovou stříkačkou bez jehly do kapilární kyvety DTS1060, která se plnila potřebným objemem (cca 0,75 mL).

Pro měření ZP byl rovněž vytvořen standardní operační protokol, a to s následujícími klíčovými parametry:

- refrakční index disperzního prostředí: 1,330
- dynamická viskozita: 0,8872 mP·s
- dielektrická konstanta disperzního prostředí: 78,5
- pozice při měření: 2,0 mm
- teplota: 25,0 °C

Průběh obou typů měření byl řízený a vyhodnocovaný softwarem DTS verze 7.11, později 7.12.



Obrázek 19 Jednorázová polystyrenová kyveta DTS 0012 pro měření distribuce velikosti částic metodou DLS – vlevo. Polykarbonátová kyveta DTS1060 pro měření ZP metodou LDE – vpravo.

5.8 HPLC analýza nanočástic s terbinafinem

Stanovení terbinafinu v nanočásticích probíhalo na HPLC přístroji Shimadzu s UV-VIS detekcí při vlnové délce 226 nm.

5.8.1 Centrifugace a příprava vzorků k HPLC analýze

Z jednotlivých nanosuspenzí s terbinafinem byl do mikrozkušavek pipetovaný objem 2 mL. Mikrozkušavky se vzorky byly následně centrifugovány po dobu 20 minut při 10 000 otáčkách za minutu, což při použité centrifuze odpovídalo tíhovému zrychlení 7200 G. Centrifugace probíhala ve dvou cyklech. Po prvním cyklu byl supernatant nahrazen čištěnou vodou, ve které byly nanočástice resuspendovány. Po ukončení druhého cyklu byl supernatant odstraněn a sediment rozpuštěn ve 2 mL acetonitrilu (ACN).

Roztok byl zfiltrován přes 0,22 μm nylonový filtr do HPLC vialek a připraven k analýze.

5.8.2 HPLC instrumentace a průběh analýzy

Pro kvantifikaci terbinafinu byl použit HPLC systém Shimadzu vybavený UV-VIS detektorem SPD-20A. K nástřiku vzorku o objemu 1 μL byl využit Autosampler SIL-20A HT. K separaci byla zvolena částicová kolona s taveným jádrem Ascentis Express ES-CN (15 cm \times 4,6 mm; 2,7 μm), funkci předkolony plnil indentický typ kolony v délce 0,5 cm.

Mobilní fáze byla tvořena směsí fosfát-citrátového pufru a acetonitrilu v poměru 60:40 v/v. Samotný pufr se připravoval čerstvý jako směs 0,2M roztoku hydrogenfosforečnanu disodného (1,4 g v 500 mL čištěné vody) a 0,1M roztoku kyseliny citronové (0,96 g v 500 mL čištěné vody) v poměru 10:13. Hodnota pH byla upravena na 4,5 a poté byl pufr zfiltrován přes 0,22 μm nylonový filtr.

Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,9 mL/min a samotná separace probíhala při teplotě 60 °C. Retenční čas terbinafinu činil 9,3 min při detekci při vlnové délce 226 nm. Celkový čas analýzy byl 10 min.

5.8.3 Sestrojení kalibrační přímky

Na analytických vahách byl do odměrné baňky o objemu 100 mL navážen terbinafin v množství 7,50 mg. Odměrná baňka byla doplněna mobilní fází (viz předchozí podkapitola 5.8.2), uzavřena a míchána do úplného rozpuštění terbinafinu. Z připraveného zásobního roztoku se pipetováním připravila série pěti vzorků o různé

koncentraci (2,5; 10; 25; 50 a 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$), které se následně filtrovaly přes PP filtr o velikosti pórů 0,45 μm do HPLC vialek. Z těchto vzorků byla vyhotovena kalibrační přímka. Koncentrace roztoků byly zvoleny na základě předpokládaného množství terbinafinu v nanočásticích a přesnosti vážení.

5.8.4 Stanovení množství enkapsulovaného terbinafinu

Enkapsulační efektivita byla počítána s využitím přímé metody podle Rovnice 9. Pro výpočet kapacity polymeru pro léčivo sloužila Rovnice 10.

$$EE = \frac{m_e}{m_0} \times 100 \quad (9)$$

$$LC = \frac{m_e}{m_n} \times 100 \quad (10)$$

EE enkapsulační efektivita [%]

LC kapacita polymeru pro léčivo – podíl léčiva v nanočásticích [%]

m_e množství terbinafinu stanoveného v nanočásticích [mg]

m_0 množství terbinafinu použitého při přípravě [mg]

m_n hmotnost nanočástic [mg]

5.9 Testování liberace

Jako disoluční médium byl zvolen a připraven fosfátový pufr s pH 5,5. Nejprve se připravil Roztok A. Bylo rozpuštěno 13,61 g dihydrogenfosforečnanu draselného v čištěné vodě, kterou byl roztok doplněn do celkového objemu 1 000 mL. Roztok B byl připraven rozpuštěním 35,81 g hydrogenfosforečnanu disodného v čištěné vodě. Celkový objem Roztoku B byl rovněž upraven na 1 000 mL. Po smíchání 96,4 mL Roztoku A s 3,6 mL Roztoku B byla hodnota pH výsledného fosfátového pufru ověřena pomocí pH metru HI221 (Hanna Instruments, USA) s kombinovanou skleněnou elektrodou.

Nanosuspenze byly centrifugovány a supernatant byl nahrazený 0,05% roztokem DDAB v čištěné vodě, aby se odstranil volný neenkapsulovaný terbinafin. Vzniklá nanosuspenze byla v objemu 5 mL napipetována do dialyzační celulosové membrány tvaru trubice, která byla umístěna do skleněné vialky s 15 mL disolučního média, fosfátového pufru s pH 5,5. Vialka byla poté umístěna do vodní lázně s integrovanou třepačkou a nastavenou amplitudou třepání 15 mm při frekvenci 50 rpm, temperovanou na 37 °C. V předvolených intervalech proběhla výměna disolučního média. Terbinafin byl následně analyzován pomocí HPLC. Experiment byl prováděn triplicitně.

Pro disoluční testy byly na základě vysoké stability a nejnižší polydisperzity zvolené formulace s jednotnou koncentrací polyesteru ve vnitřní fázi (5 %) a jednotným počátečním množstvím terbinafinu (5 mg), lišící se pouze typem použitého polyesteru.

5.10 *In vitro* testování antimikrobiální účinnosti

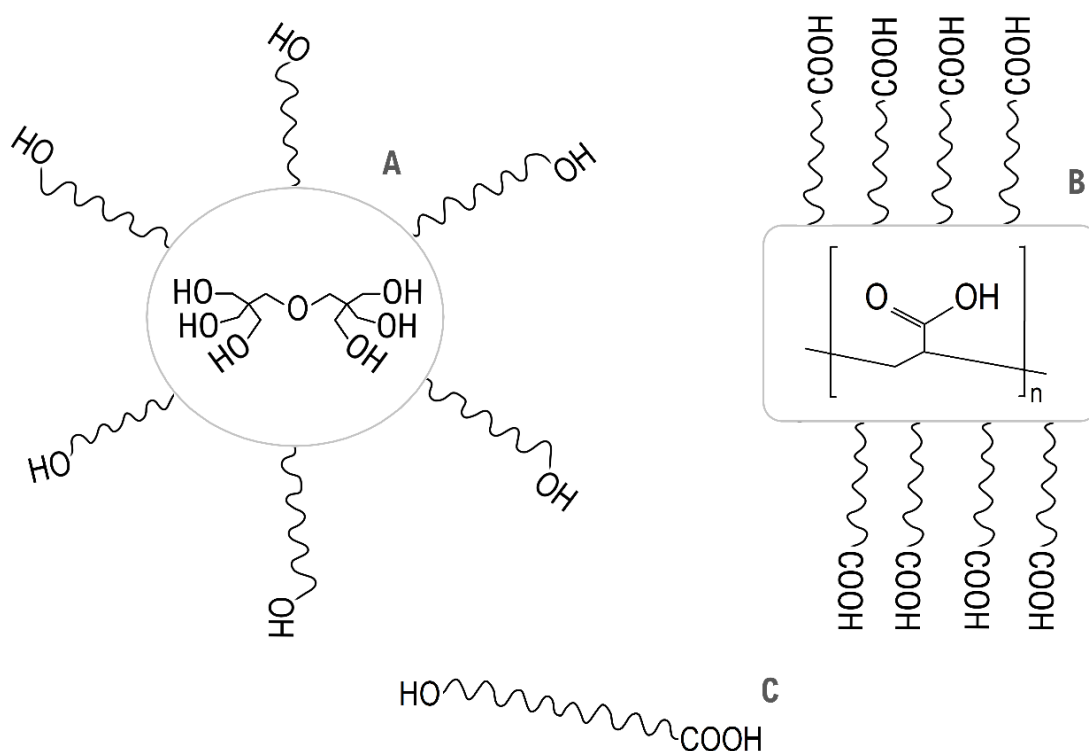
Pro testování antimikrobiální efektivity nanočástic s terbinafinem byla zvolena difúzní jamková metoda popsaná v literatuře [173]. Testována byla formulace s nejvyšší enkapsulační efektivitou, konkrétně PLGA/A s počáteční dávkou terbinafinu 5 mg. Koncentrace polyesteru ve vnitřní fázi byla 7 %. Tato formulace byla zvolena také z důvodu vysoké stability dané vysokou hodnotou ZP a nízkou hodnotou PdI.

Jako kultivační médium byl zvolen Sabouraudův agar a mikrobiální kulturou byl zástupce kmene kvasinek *Candida albicans*. Po 24 hodinách kultivace byla připravena suspenze s finální velikostí inokula 5106 CFU/mL. Testování proběhlo na Petriho miskách o průměru 90 mm. Na testovací agar bylo naočkováno 0,5 mL mikrobiální suspenze, která byla asepticky rozptýlena na jeho povrchu. Následně byly do agaru vykrojeny jamky standardní velikosti, které byly poté zcela naplněny suspenzí terbinafinu (standard) a nanočásticemi bez terbinafinu (negativní kontrola), resp. nanočásticemi s enkapsulovaným terbinafinem (testovaný vzorek) ve formě nanosuspenze. Koncentrace terbinafinu ve standardu byla identická jako koncentrace terbinafinu v nanočásticích. Inhibiční zóna byla hodnocena po 24 hodinové kultivaci při teplotě 37 °C za aerobních podmínek a vlhké atmosféře. Výsledkem byla fotografická dokumentace. Test byl proveden dvakrát s identickým výsledkem.

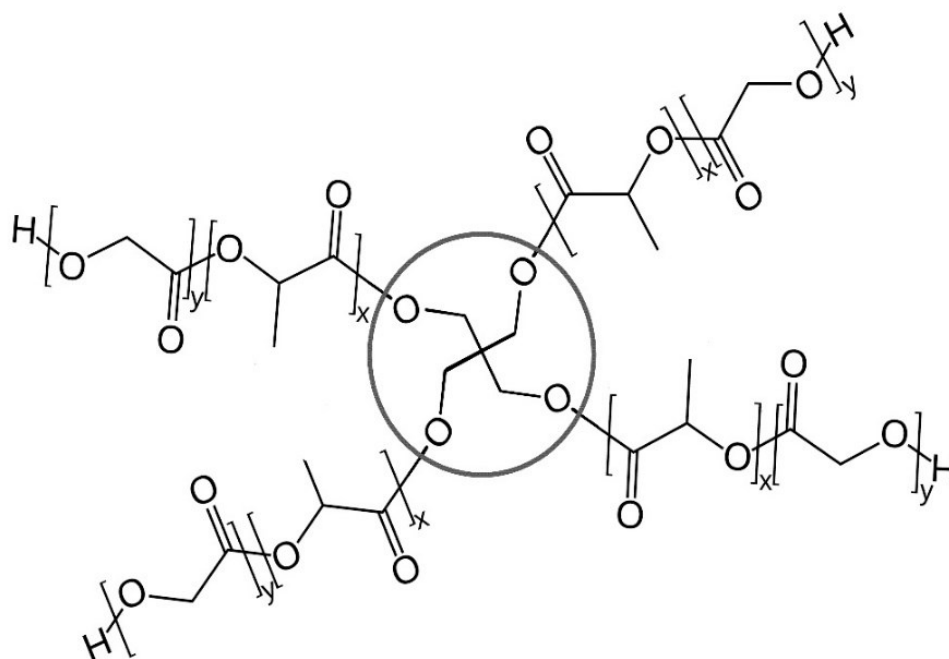
6 Výsledky a diskuze

6.1 Struktura použitých derivátů PLGA

Polykondenzační reakcí kyseliny glykolové, kyseliny D, L-mléčné a větvičího monomeru byly syntetizovány větvené terpolymery, resp. lineární polymer v případě absence větvičí složky (Obrázek 20, Obrázek 21). Syntéza je snadno kontrolovatelná a škálovatelná. Výsledné produkty jsou sterilní a jelikož nebyly použity katalyzátory, nebylo nutné čištění rozpouštěním, precipitací a sušením. V porovnání s lineárními PLA/PLGA využívanými v mnoha dalších studiích [204-206], mají prezentované polyestery nižší molární hmotnost a možnost modifikace architektury dle použitého větvičího monomeru. Díky vyššímu poměru koncových hydroxylových a karboxylových skupin mají větvené deriváty vyšší hydrofilitu než deriváty lineární.



Obrázek 20 Schéma polyesterů: hvězdicový typ větvený na dipentaerythritolu (A), kartáčový typ větvený na kyselině polyakrylové (B) a lineární (C). Vlnité křivky představují řetězce PLGA.



Obrázek 21 Konstituční vzorec větveného polyesteru na bázi PLGA. Na větvící monomer pentaerythritol (v kruhu) jsou prostřednictvím O-glykosidových vazeb vázány jednotlivé řetězce PLGA.

6.2 Termická analýza

S využitím souběžné TG/DSC analýzy bylo sledováno termické chování polyesterů. Přístroj Mettler Toledo TGA/DSC1 nebyl vybaven kryostatem umožňujícím chlazení, nastavený teplotní rozsah byl proto od 25 °C do 500 °C. Na Obrázku 22 jsou TG a DSC křivky jednotlivých polyesterů.

DSC křivky všech polyesterů se ve sledovaném teplotním rozmezí vyznačovaly pouze jedním výrazným píkem, charakterizujícím endotermní děj. Je zřejmé, že se nejedná o tání polyesterů, jelikož ve stejném rozmezí teplot lze na TG křivkách pozorovat jasný úbytek hmotnosti. Lze proto usuzovat, že zaznamenaným endotermním dějem bude dekompozice polymerů.

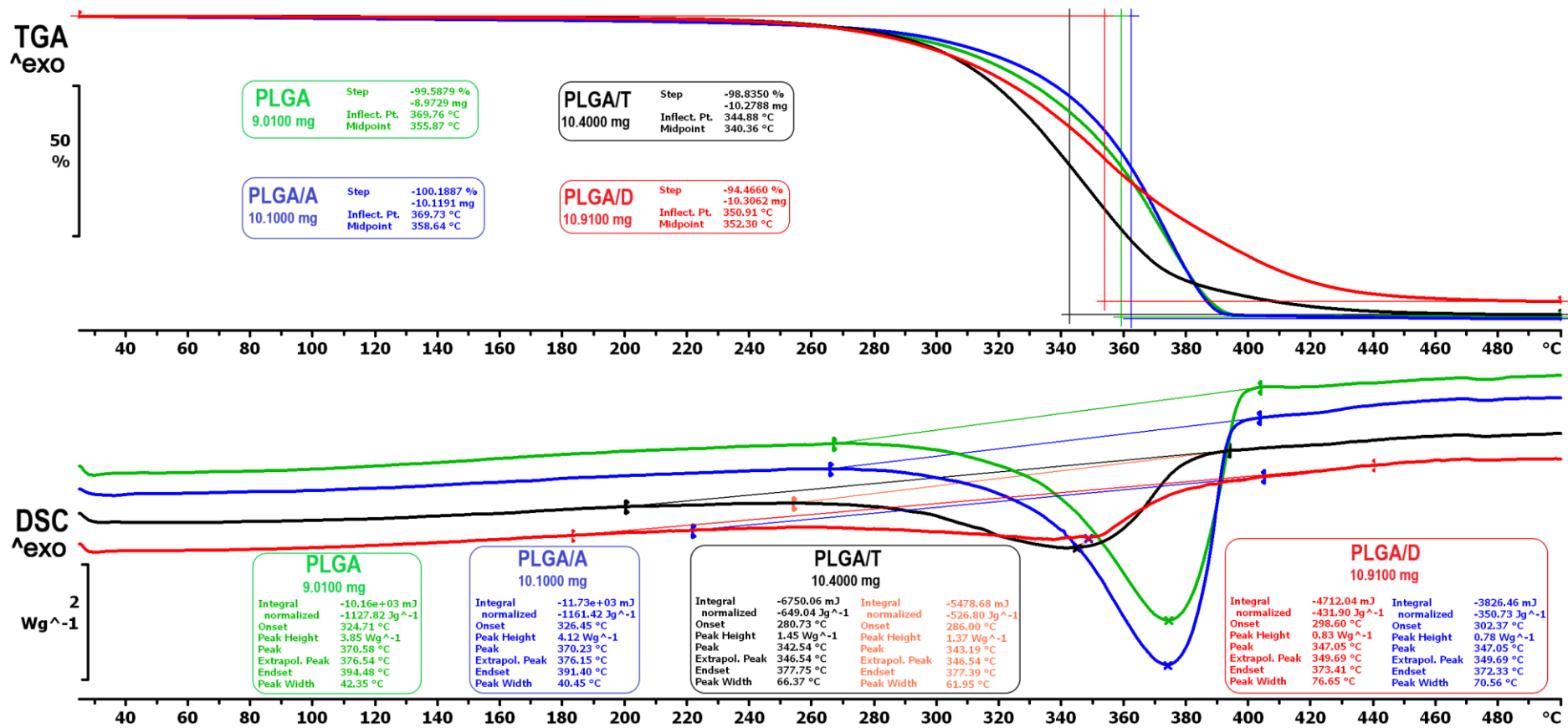
Na TG křivkách lze také pozorovat konstantní hmotnost všech polyesterů až do teploty přibližně 200 °C, značící dobrou termickou stabilitu. V rozmezí teplot od 200 °C do 300 °C je viditelný pozvolný úbytek hmotnosti, menší než 10 %. Při teplotě 300 °C nastal prudký úbytek, který u polyesterů PLGA a PLGA/A dosáhl hodnot téměř 100 %

při teplotě 390 °C. Relativně podobný průběh dekompozice PLGA popisuje řada autorů [207-210].

V případě PLGA/T a PLGA/D byl úbytek hmotnosti na úroveň 50 % rychlejší, avšak v další fázi došlo ke zpomalení. Maximální úbytek byl zaznamenán při teplotě 450 °C u PLGA/T, resp. 470 °C u PLGA/D. Tento jev lze vysvětlit rozdílnou architekturou těchto polyesterů, ale také použitými větvíciemi složkami, konkrétně tripentaerythritolem a dipentaerythritolem v signifikantních koncentracích, které se vyznačují poměrně vysokou termickou stabilitou [211]. Právě tyto deriváty pentaerythritolu, přítomné v polyesterech PLGA/T a PLGA/D, resp. jejich vznikající rozkladné produkty, jsou pravděpodobně zodpovědné za mírnější úbytek hmotnosti v pozdějších fázích dekompozice. Ani při ukončení analýzy při finální teplotě 500 °C nebyl pozorován totální úbytek hmotnosti, kdy zaznamenaná hmotnost reziduí PLGA/T byla nad jedním procentem a v případě polyesteru PLGA/D, který obsahuje až 8 % dipentaerythritolu, byla hmotnost reziduí téměř 6 % z původní navážky.

Plochy píků DSC křivek, reprezentující změnu entalpie spojenou s dekompozicí polyesterů, jsou u PLGA a PLGA/A téměř identické a přibližně dvojnásobné v porovnání s PLGA/T. V porovnání s PLGA/D je rozdíl ještě markantnější. Začátek dekompozice polymerů je často popisován jako náhodné stěpení řetězců [139, 207], které může vysvětlit nižší energii potřebnou k dekompozici vysoce větvených PLGA/T a PLGA/D s hvězdicovou architekturou. Vliv molární hmotnosti na parametry dekompozice nebyl jednoznačně pozorován.

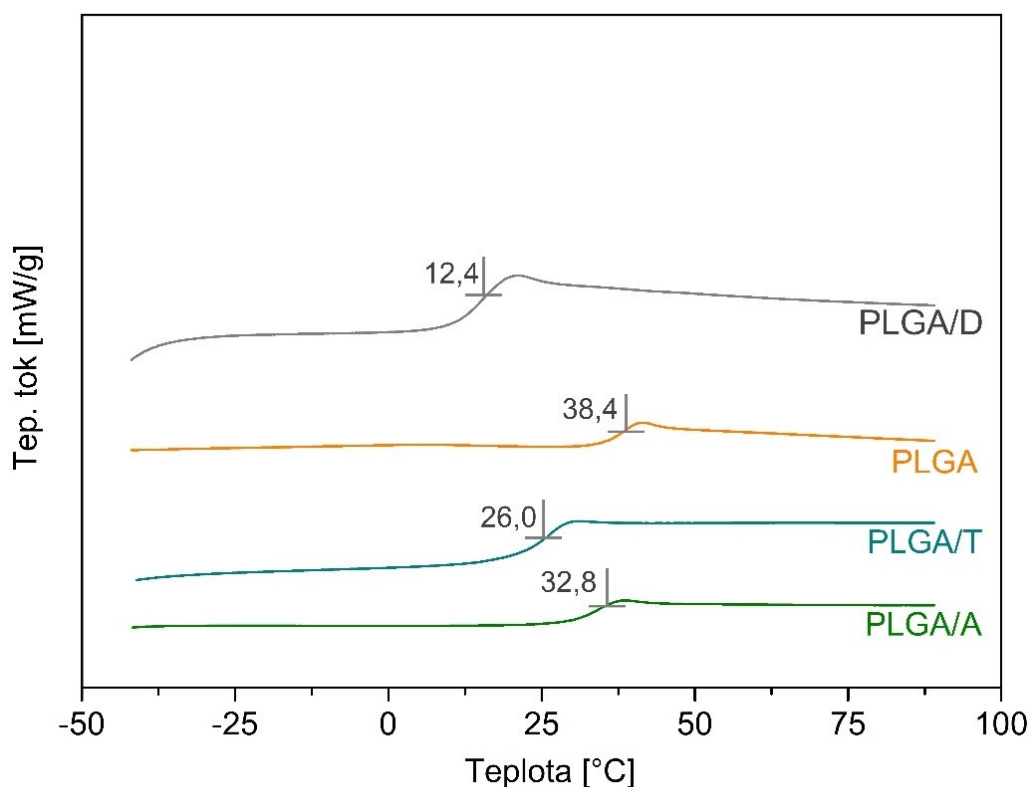
Jiný endotermní pík, který by mohl představovat tání polyesterů, nebyl ve sledovaném teplotním rozsahu zaznamenán. Lze proto usuzovat, že testované polyestery nevykazují krystalinitu a tudíž se nacházejí v amorfním stavu [212]. Absence možnosti chlazení vzorků, umožňující snížení startovací teploty analýzy, zamezila detekci píků reprezentujících teplotu skelného přechodu.



Obrázek 22 Výsledky souběžné TG/DSC analýzy polyesterů.

Jelikož souběžná TG/DSC analýza nebyla schopná stanovit teplotu skelného přechodu (T_g), byla provedena samotná DSC analýza na přístroji umožňujícím chlazení, ve zvoleném teplotním rozsahu $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nejprve proběhlo zahřátí vzorků na $90\text{ }^{\circ}\text{C}$, pak zchlazení na $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně druhý cyklus zahřátí. První ohřev a chlazení umožňuje vymazat tepelnou historii materiálu, chlazení je vhodné také k vyvolání případné krystalizace. Druhý ohřev následoval ihned po zchlazení, aby se zamezilo entalpické relaxaci polyesterů.

Zjištěná teplota skelného přechodu jednotlivých polyesterů se pohybovala od $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ zejména v závislosti na jejich molární hmotnosti. Patrný je rovněž efekt stupně větvení, jeho přesný mechanismus ovlivnění hodnoty T_g však není jasný. Kratší větve se projevují jako segmenty plastifikující, tedy redukující hodnotu T_g , což je potvrzeno nejnižší T_g v případě nejvíce větveného terpolymeru. U lineárních molekul by to bylo z pohledu vlivu molární hmotnosti v rozporu se vztahem Floryho a Foxe [213]. Prezentované polyestery jsou amorfní a na DSC skenech (viz Obrázek 23) není viditelný pík krystalické fáze.



Obrázek 23 DSC skeny jednotlivých polyesterů se znázorněním teploty skelného přechodu (T_g). Osa Y je posunutá z důvodu přehlednosti.

6.3 Optimalizace nanoprecipitační metody

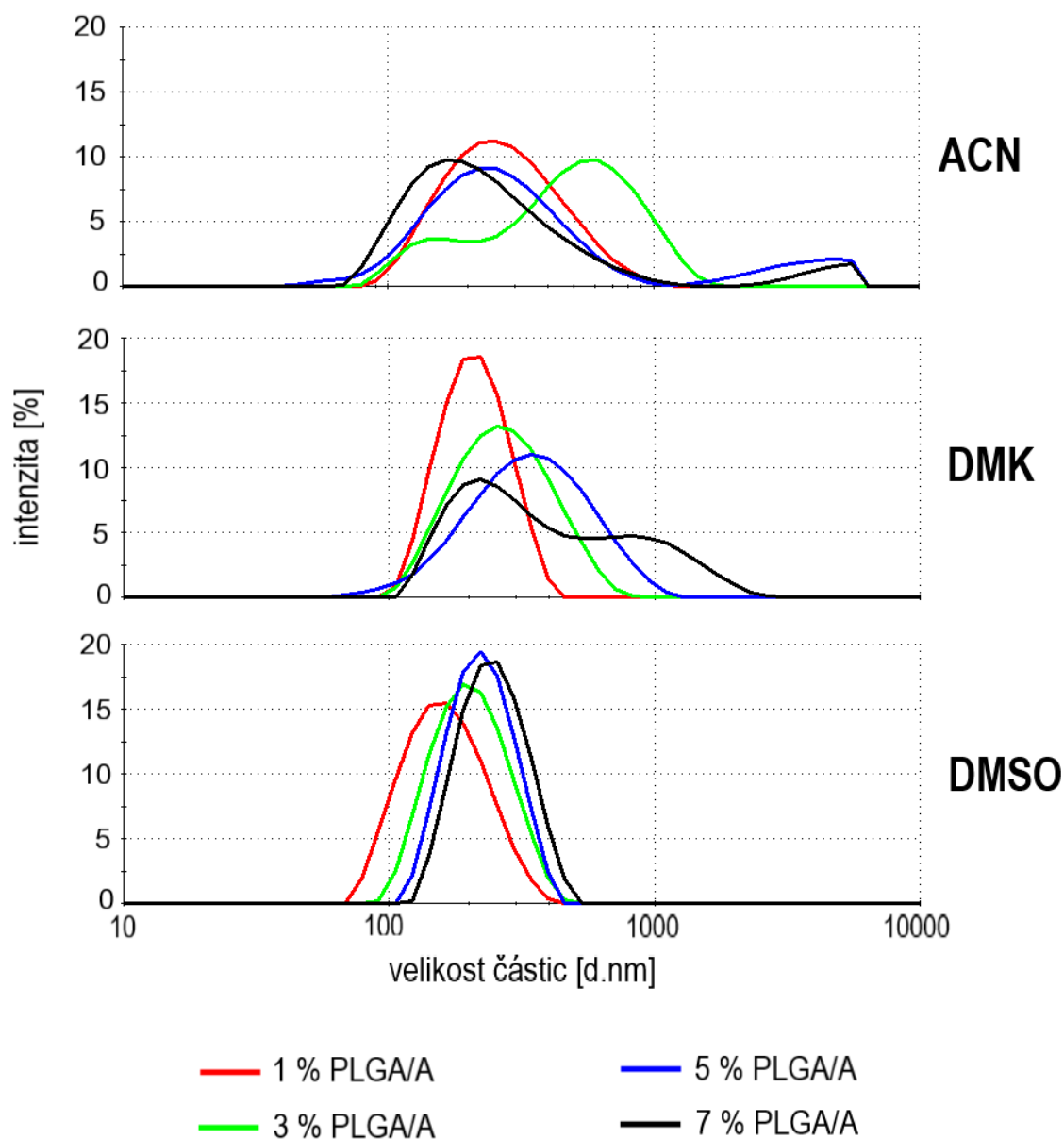
6.3.1 Výběr rozpouštědla

Byly připraveny série nanosuspenzí se čtyřmi různými koncentracemi polyesteru PLGA/A (1 %, 3 %, 5 %, 7 %), lišící se pouze použitým rozpouštědlem vnitřní fáze. K dispozici byly tři potenciálně vhodná rozpouštědla, konkrétně acetonitril (ACN), aceton (DMK) a dimethylsulfoxid (DMSO). Základní požadavek, dobrá schopnost rozpouštět testované polyestery i terbinafin, byl ověřen u všech kandidátů.

Obrázek 24 sumarizuje výsledky měření průměrné distribuce velikosti částic ve formě frekvenčních křivek. V případě série vzorků s ACN bylo dosaženo požadované úrovně disperzity ($PdI < 0,2$) pouze v případě 1% koncentrace polyesteru, kde byla průměrná hodnota $PdI\ 0,176 \pm 0,014$. Při 3% koncentraci polyesteru je na obrázku viditelný dvojitý pík, který již zasahuje do mikrorozměrů. V případě koncentrací 3 % a 5 % se již viditelně objevují sekundární píky, představující aglomeráty o průměru několika mikrometrů.

DMK v porovnání s ACN poskytoval viditelně stabilnější nanosuspence s výrazně užšími píky, reprezentující nižší disperzitu. Ta se zhoršovala s narůstající koncentrací polyesteru, přijatelné hodnoty byly dosaženy při 1% a 3% koncentraci. V případě 1% koncentrace byl PdI dokonce pod hodnotou 0,1. Vzorek s 5% koncentrací polyesteru s PdI mírně nad hodnotou 0,2 se také vyznačoval jedním souměrným píkem, který znamená jednu populaci částic. V případě 7% koncentrace polyesteru již však lze pozorovat dvojitý pík obsahující i částice velikostí přesahující hodnotu 1 000 nanometrů.

Použití DMSO jako rozpouštědla vnitřní fáze se ukázalo jako nejefektivnější volba. V případě všech testovaných koncentrací polyesteru byl výsledkem ostrý souměrný pík lokalizovaný v nanooblasti, představující jednu populaci nanočástic s nízkou disperzitou. Z Obrázku 24 je viditelný také posun na ose x, což znamená nárůst průměrné velikosti částic s rostoucí koncentrací polyesteru. Naopak polydisperzita se s narůstající koncentrací polyesteru prakticky neměnila a průměrná hodnota byla $0,079 \pm 0,026$.

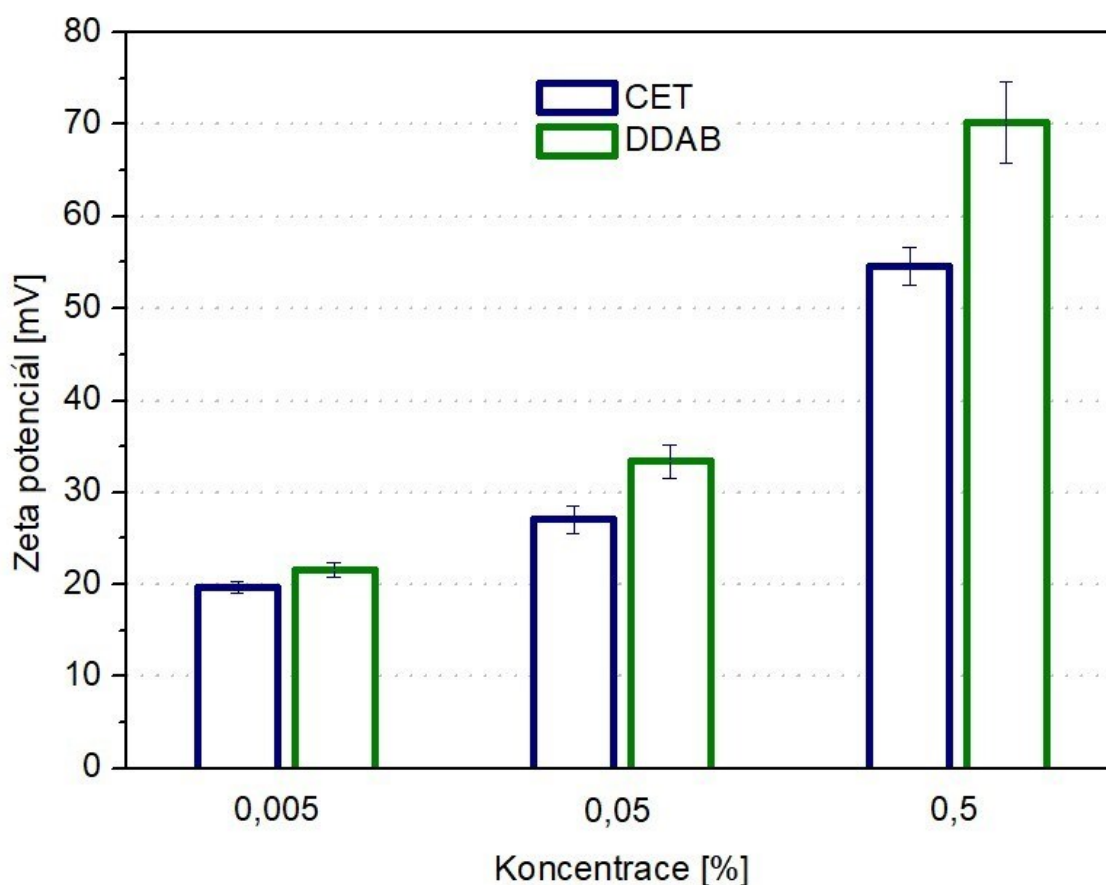


Obrázek 24 Porovnání rozpouštědel vnitřní fáze na základě výsledků měření průměrné distribuce velikosti částic ve formě frekvenčních křivek metodou DLS. ACN: acetonitril, DMK: aceton, DMSO: dimethylsulfoxid.

6.3.2 Výběr stabilizátoru

S cílem dosažení efektivní elektrostatické stabilizace nanosuspenzí byl vzájemně porovnán vliv cetrimidu (CET) a didodecyldimethylamonium bromidu (DDAB) na hodnoty ZP. Byly připraveny vzorky, lišící se pouze koncentrací stabilizátoru ve vnější

fázi. První testovaná koncentrace stabilizátorů byla zvolena na základě preliminárních experimentů, při kterých se nanosuspenze hodnotily vizuálně na nepřítomnost aglomerátů a následně metodou DLS. Touto hranicí byla koncentrace 0,005 %, při které vznikaly nanočástice zprvu bez výrazné aglomerace, které však po chvíli aglomerovaly. Koncentrace o dva řády vyšší znamenala v případě použití DDAB hodnoty ZP pravidelně nad úrovní 61 mV, což je v literatuře popisováno jako hodnota reprezentující excelentní koloidní stabilitu [95]. Zbytečně vysoká koncentrace tenzidu však může solubilizovat hydrofobní léčivo a zvýšit tak jeho únik do vnější fáze při procesu nanoprecipitace [214]. Optimální se proto jevila koncentrace DDAB 0,05 %, při které se spolehlivě dosahovalo hodnot ZP vyšších než 30 mV a nebyla pozorována žádná aglomerace. Výsledky sumarizuje Obrázek 25.



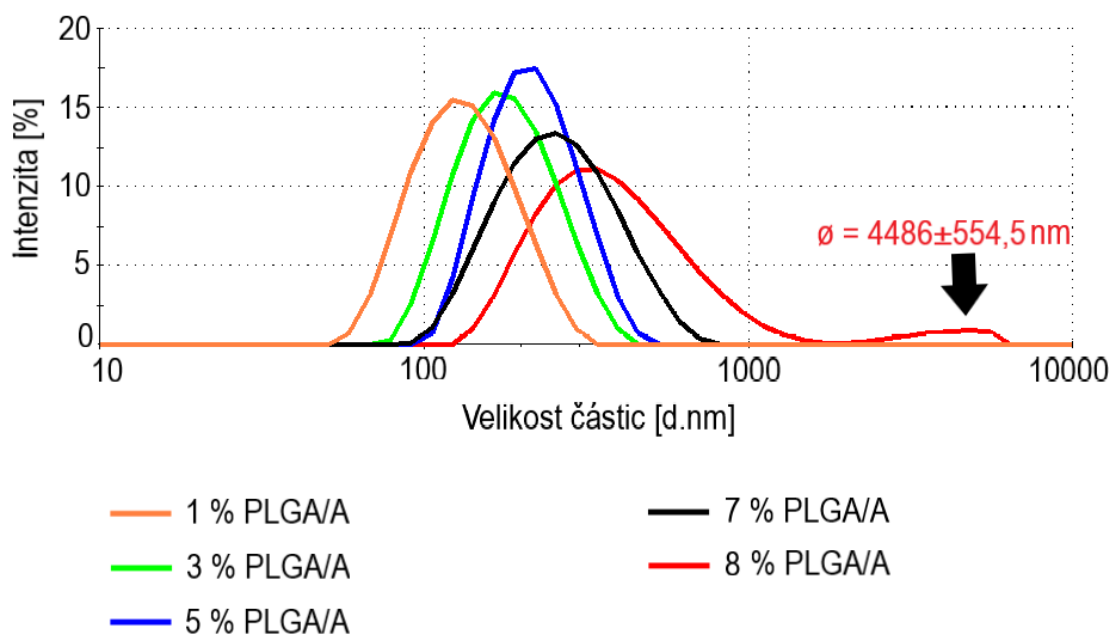
Obrázek 25 Porovnání efektivity cetrimidu (CET) a didodecyldimethylamonium bromidu (DDAB) na základě zvýšení hodnoty zeta potenciálu.

6.3.3 Množství polyesteru

Byla připravena série vzorků lišících se pouze koncentrací polyesteru ve vnitřní fázi, s cílem optimalizovat jeho množství. Pro toto testování byl zvolen polyester PLGA/A. První vzorek obsahoval 1 % PLGA/A ve vnitřní fázi a koncentrace rostla v řadě vzorků vždy o dvě procenta. Pátý vzorek v pořadí, obsahující 9 % polyesteru, byl na základě zřetelně přítomné aglomerace vyhodnocen jako nedostatečně kvalitní a koncentrovanější vzorek v řadě se proto již nepřipravoval. Z důvodu přesnějšího určení limitní koncentrace polyesteru se jako poslední připravil 8% vzorek, u kterého nebyla přítomnost aglomerace vizuálně pozorována.

Kvalita vzorků, které prošly vizuální kontrolou, byla následně hodnocena pomocí metody DLS. Z Obrázku 26, představujícího závislost intenzity rozptýleného světla na distribuci velikosti, je jasně viditelné, že sledované vzorky až do 7% koncentrace polyesteru obsahují pouze jednu populaci (pík) částic a neobsahují aglomeráty.

Jinak je tomu v případě koncentrace 8 %. Z obrázku je patrný sekundární pík s průměrnou velikostí částic přesahující 4 mikrometry, značící aglomeraci a tudíž nestabilitu suspenze [215].



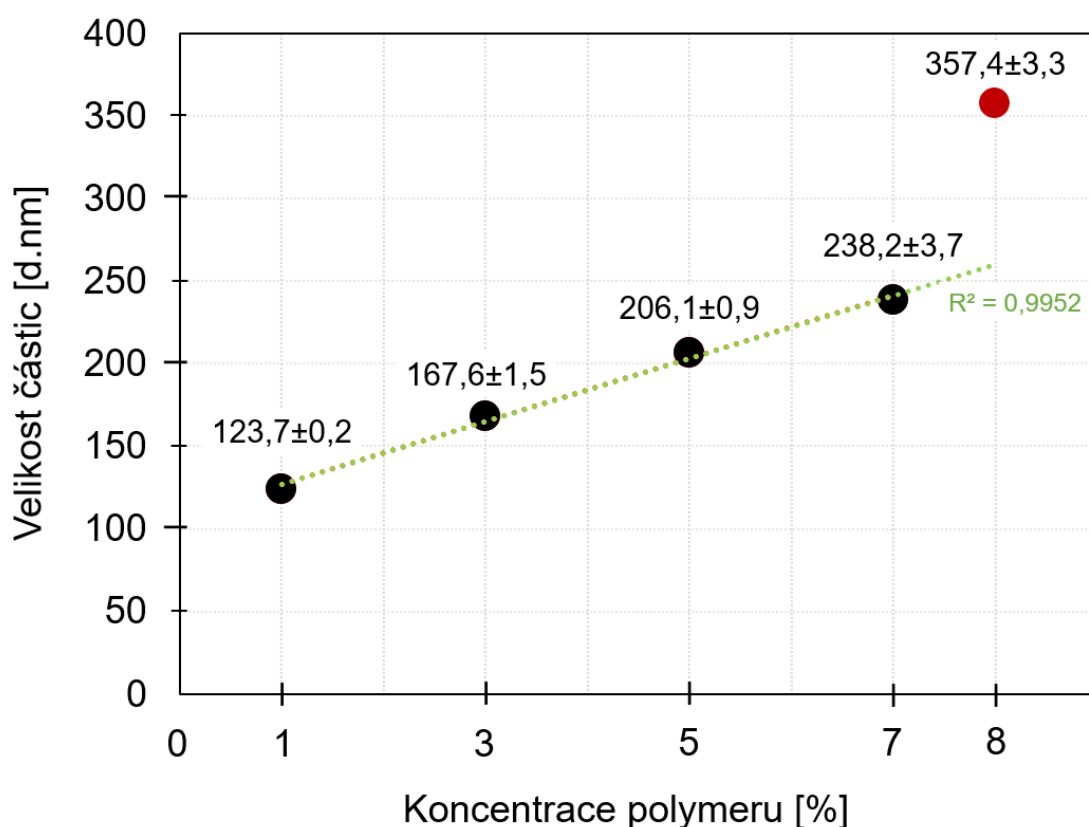
Obrázek 26 Distribuce velikosti částic při narůstající koncentraci polyesteru PLGA/A. Testování bylo provedeno triplicitně, pro přehlednost jsou uvedeny průměrné hodnoty.

Z Obrázku 26 je patrný také vliv koncentrace polyesteru na velikost částic, kdy s narůstající koncentrací průměrná velikost částic roste.

Vliv koncentrace polyesteru na velikost částic detailně prezentuje Obrázek 27. V případě stabilních vzorků, kde nebyla zaznamenána aglomerace, vykazuje závislost průměrné velikosti částic na koncentraci polyesteru vysokou korelaci s lineárním trendem, naznačující možnost relativně jednoduché optimalizace velikosti. Podobný efekt byl pozorován i týmem Huang et al [216].

Při koncentraci 8 % je vidět výraznou odchylku od lineárního trendu, způsobenou nadlimitní koncentrací polyesteru, která se projevuje vznikem aglomerátů, výrazně zvětšujících průměrné hodnoty velikosti [217].

Podle výsledků tohoto testování lze zvolenou metodou připravit stabilní populaci nanočástic při koncentraci polyesteru ve vnitřní fázi 7 % a menší, tedy 70 mg/mL při zachování poměru vnitřní a vnější fáze 1:10.

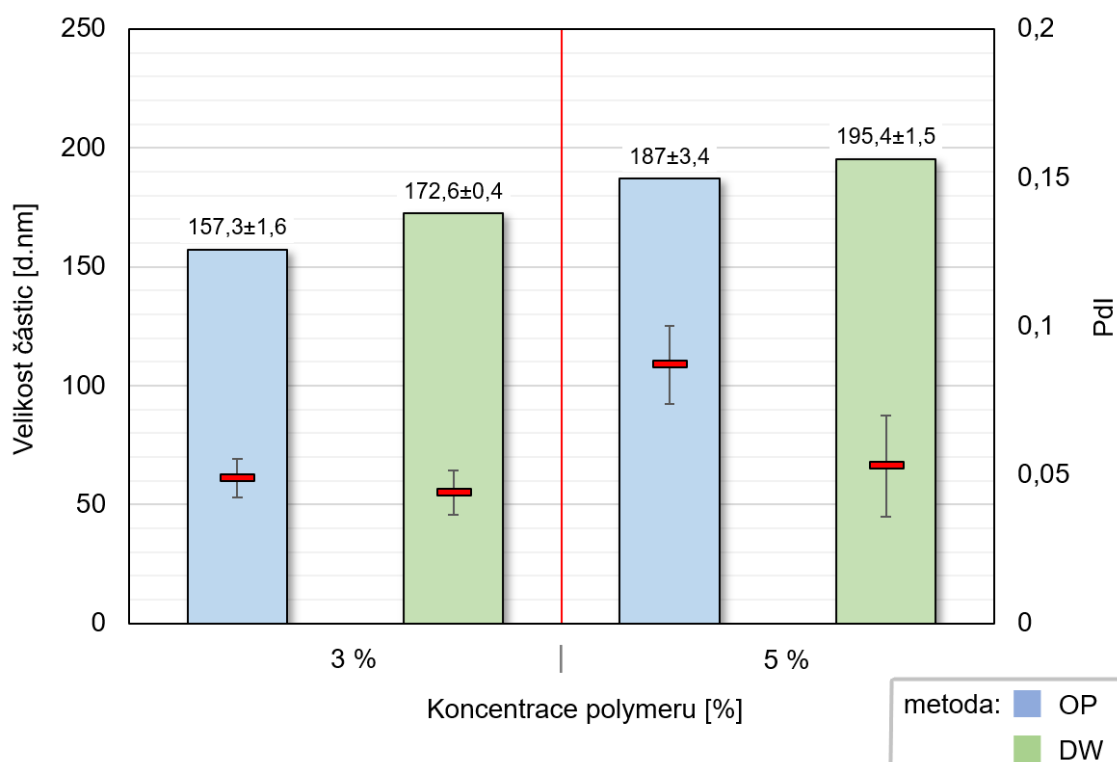


Obrázek 27 Závislost velikosti částic na koncentraci PLGA/A. Červeně je znázorněný aglomerovaný vzorek.

6.3.4 Rychlost mísení fází

Byl porovnán vliv rychlosti mísení fází při nanoprecipitaci na velikost a disperzitu částic. Obě hodnocené metody mísení fází, rychlá (one-pot) i pomalá (dropwise), se ukázaly jako efektivní a reprodukovatelné a v obou případech byla u všech vzorků detekována jedna populace částic, značící kvalitu suspenze. Metoda přidávání vnitřní fáze po kapkách poskytovala v porovnání s metodou rychlého přidání částice s větší průměrnou velikostí. Rozdíl ve velikosti byl zřejmý, nebyl však markantní, jak lze vidět na Obrázku 28. V případě vzorků s koncentrací polyesteru 3 % byl nárůst necelých 10 %, v případě koncentrovanější vnitřní fáze (5 % polyesteru) pouze 5 %.

Hodnoty indexu polydisperzity byly rovněž ve všech případech nízké, signifikantně nižších hodnot však bylo dosaženo v případě pomalého mísení fází.

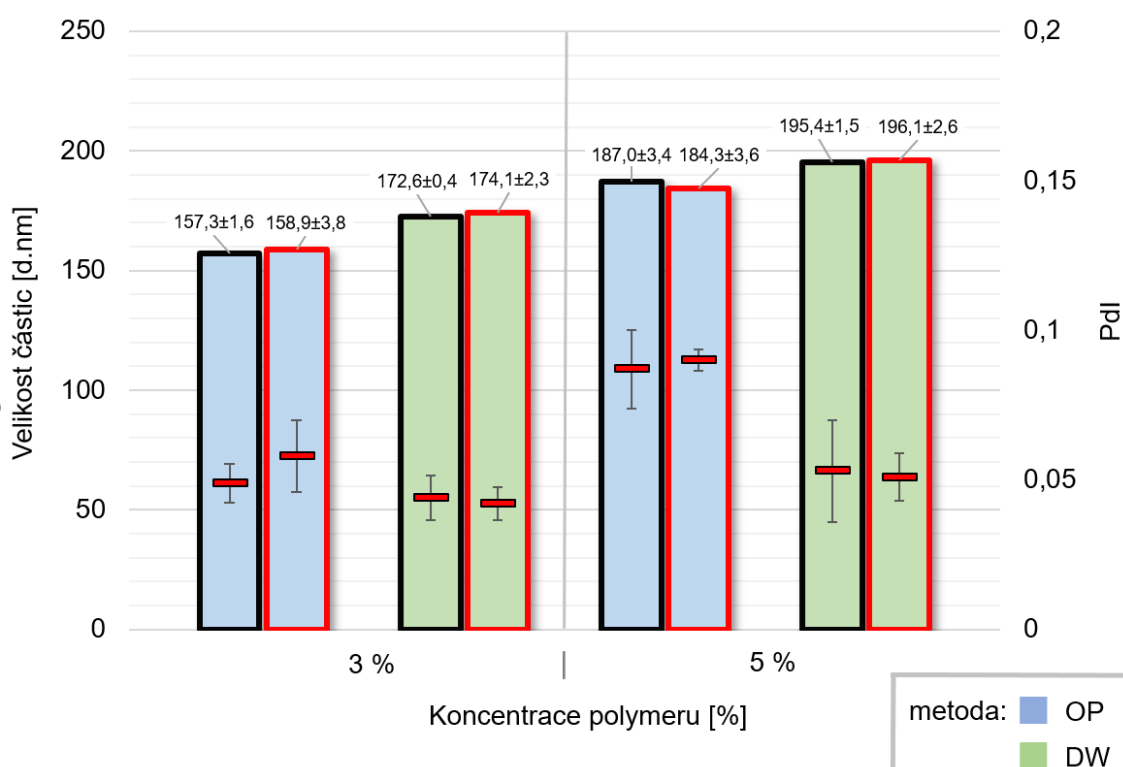


Obrázek 28 Vliv rychlosti mísení fází při nanoprecipitační metodě na průměrnou velikost částic a index polydisperzity (PDI).
OP: metoda rychlého mísení (one-pot), DW: metoda pomalého mísení (dropwise).

6.3.5 Stabilita nanosuspenzí

Nanosuspenze byly pro účely testování připravovány vždy v případě potřeby. Z důvodu ověření jejich fyzikální stability však byla u série vzorků opakovaně měřena distribuce velikosti v časových intervalech 24 a 48 hodin po přípravě.

Z Obrázku 29 je patrné, že vzorky zůstaly stabilní i po 48 hodinách po přípravě, jelikož nenastala signifikantní změna velikosti ani PDI. Z hlediska ovlivnění stability nebyl pozorován vliv koncentrace polyesteru ani rychlosti mísení fází.



Obrázek 29 Porovnání průměrné velikosti částic a indexu polydisperzity (PDI) těsně po přípravě (sloupce ohraničené černě) a po 48 hodinách (sloupce ohraničené červeně). OP: metoda rychlého mísení (one-pot), DW: metoda pomalého mísení (dropwise).

6.4 Nanočástice s terbinafinem

6.4.1 Viskozita vnitřní fáze

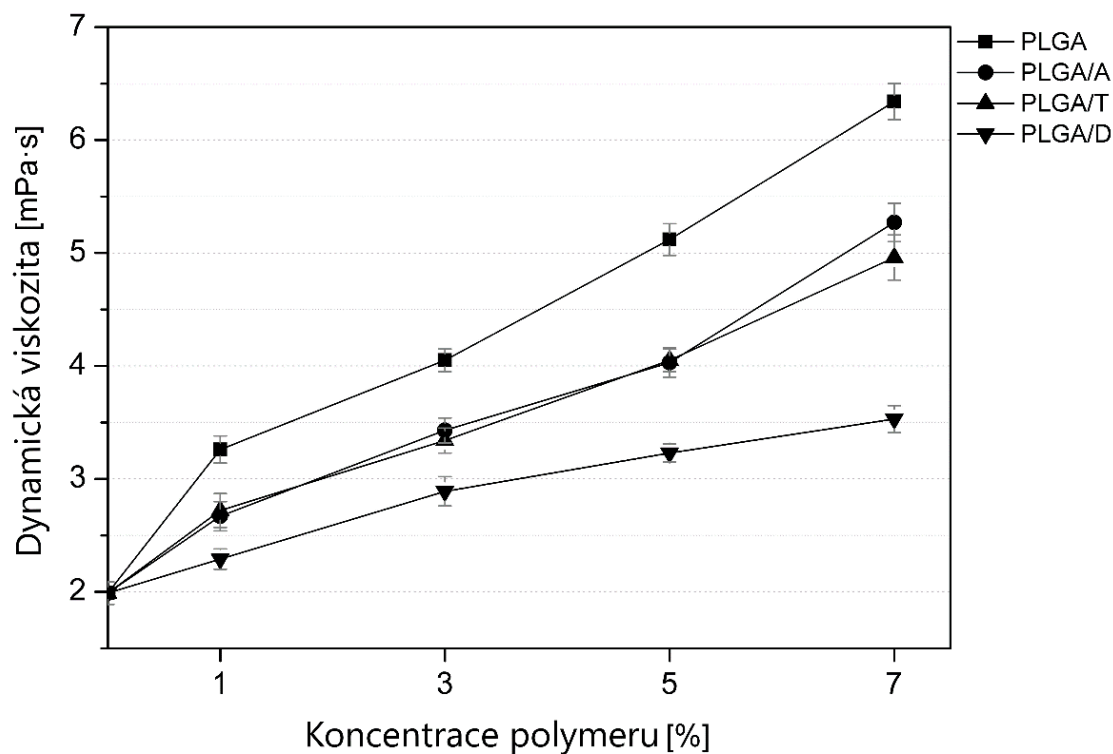
Nanoprecipitační metoda je založena na principu mezifázové depozice polymeru po vytěsnění semipolárního rozpouštědla, mísitelného s vodou, z vnitřní fáze [73]. Pro

přípravu vnitřní fáze se používají různá organická rozpouštědla. Mezi nejběžnější patří aceton, dimethylsulfoxid, tetrahydrofuran, dimethylformamid a jejich vzájemné směsi [218, 219]. Dobrá schopnost rozpouštět polymer a léčivo, společně se vzájemnou mísitelností s vnější fází, jsou základní požadavky při výběru rozpouštědla. Viskozita výsledné vnitřní fáze může významně ovlivnit velikost formulovaných částic. Musí být také dostatečně nízká, aby mohlo rozpouštědlo rychle difundovat a umožnit tak precipitaci polymeru [155].

Obrázek 30 ukazuje hodnoty dynamické viskozity roztoků jednotlivých polyesterů rozpuštěných v dimethylsulfoxidu při zvyšování jejich koncentrace. Dynamická viskozita vnitřní fáze byla ve všech případech dostatečně nízká, umožňující využití nanoprecipitační metody. U všech polyesterů se s jejich zvyšující se koncentrací prokázal očekávaný nárůst dynamické viskozity. Při průběhu nanoprecipitace by se teoreticky měla vyšší viskozita vnitřní fáze projevit zpomalením procesu difuze DMSO do fáze vnější a způsobit formulaci větších částic s vyšší enkapsulační efektivitou [77]. Další experimenty ukázaly, že v případě jednotlivých polyesterů skutečně s jejich rostoucí koncentrací, tedy i dynamickou viskozitou vnitřní fáze, rostla jak průměrná velikost tak i enkapsulační efektivita.

Při vzájemném porovnání polyesterů však vliv dynamické viskozity není tak zřejmý. Nejvyšší dynamická viskozita byla naměřena v případě lineárního polyesteru PLGA. Polyester PLGA se v rámci testovaných polyesterů skutečně vyznačoval vysokými hodnotami enkapsulační efektivity, avšak ne vyššími než PLGA/A. Nanočástice z PLGA byly v průměru větší než nanočástice z PLGA/A i PLGA/T, avšak největší velikost částic byla zaznamenána při použití PLGA/D, jehož dynamická viskozita byla paradoxně nejnižší. Roztoky připravené z větvených polyesterů PLGA/A a PLGA/T vykazovaly téměř stejné hodnoty viskozity, což není překvapivé vzhledem k jejich relativně obdobným hodnotám hmotnostně střední molární hmotnosti a stupně větvení. Velikost nanočástic připravených z těchto dvou polyesterů byla podobná, avšak enkapsulační efektivita výrazně odlišná.

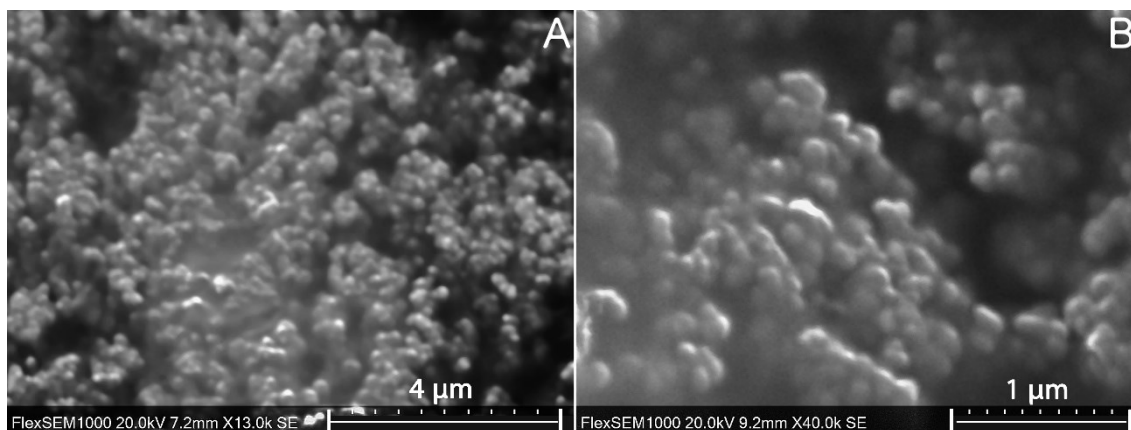
Celkově jednotlivé roztoky polyesterů vykazovaly pouze malé vzájemné rozdíly viskozity. Rozpuštění 5 mg, 15 mg ani 25 mg terbinafinu nemělo měřitelný dopad na viskozitu. Lze proto předpokládat, že efekt typu polyesteru na výsledné parametry nanočástic převyšoval nad efektem dynamické viskozity vnitřní fáze.



Obrázek 30 Hodnoty dynamické viskozity roztoků polyesterů v DMSO. Data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty \pm SD ze tří měření.

6.4.2 Tvar, velikost, disperzita

S pomocí skenovací elektronové mikroskopie v režimu sekundárních elektronů byla ověřena morfologie studovaných nanočástic. Snímání v režimu sekundárních elektronů (SE) je jevilo vhodnější než v režimu zpětně odražených elektronů (BSE). Vysoká energie paprsku při vyšších hodnotách urychlovacího napětí způsobovala po určitém čase destrukci vzorků, muselo se proto postupovat opatrně. Snímky (Obrázek 31) prokázaly sférický tvar. Pomocí softwarového vyhodnocení byla rovněž ověřena velikost konkrétních jednotlivých nanočástic, která do značné míry korelovala s výsledky zjištěnými metodou dynamického rozptylu světla.

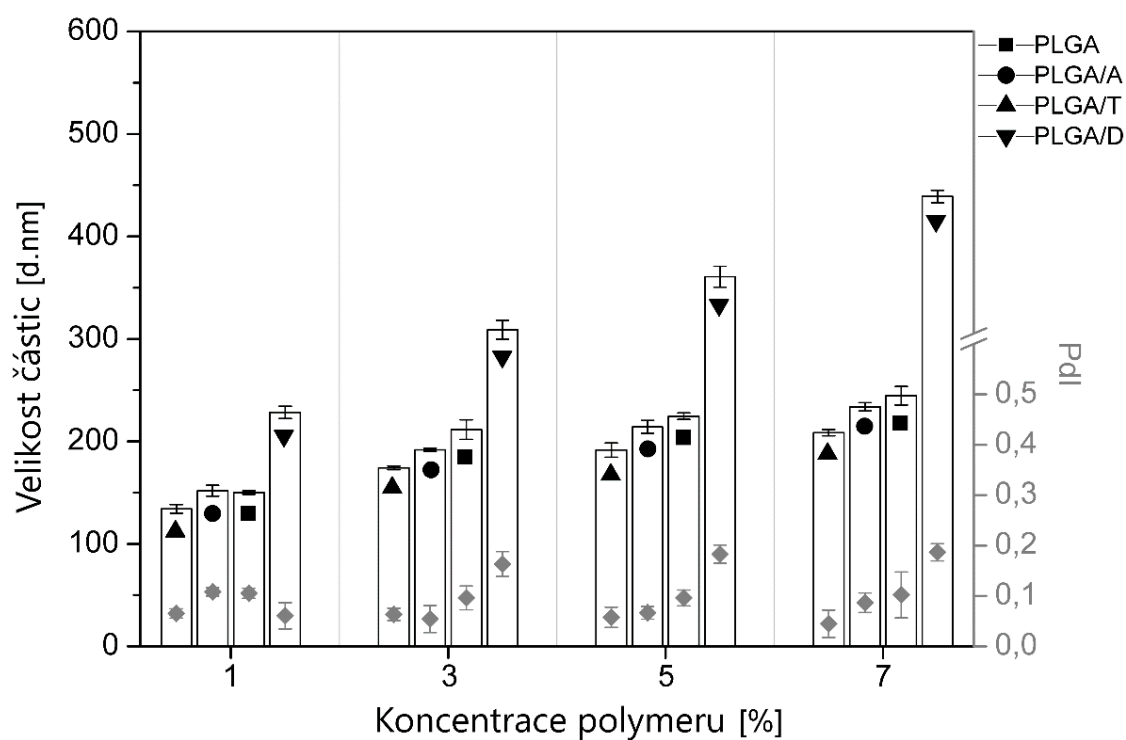


Obrázek 31 Snímky PLGA/A nanočástic ze skenovacího elektronového mikroskopu. Zvětšení 13000× (A) a 40000× (B).

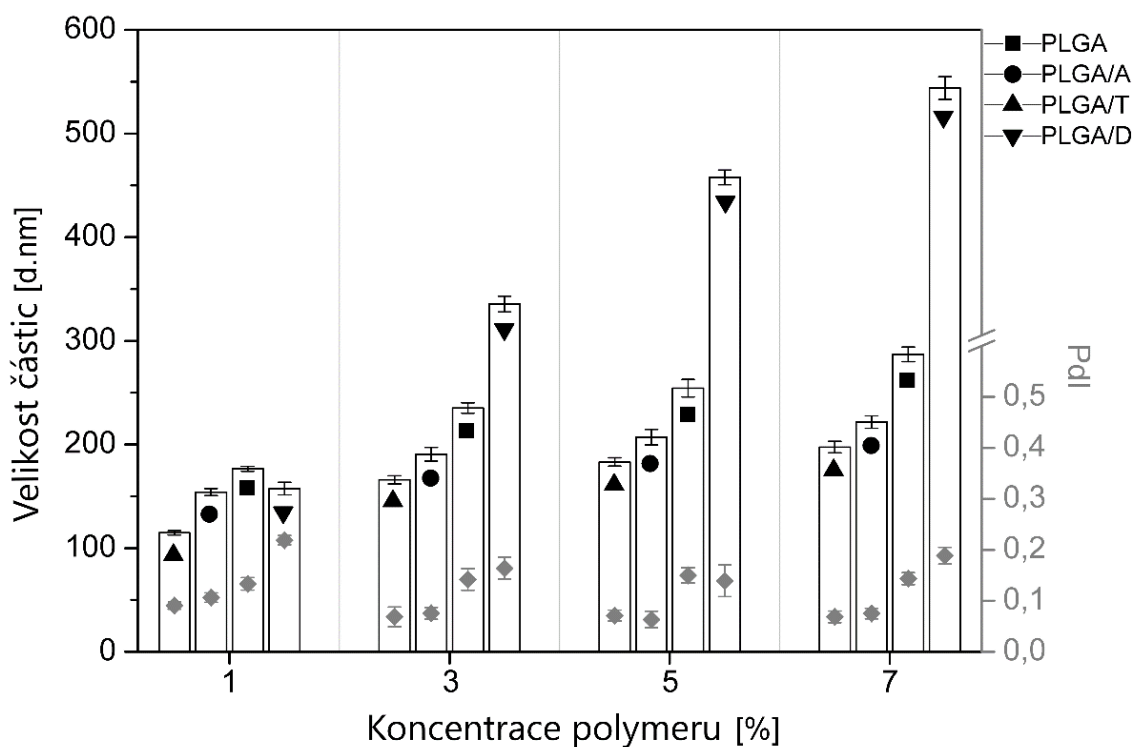
Pro měření distribuce velikosti částic a indexu polydisperzity nanosuspenzí byla využita metoda dynamického rozptylu světla. Všechny zkoumané vzorky se pohybovaly v rozmezí 100 až 600 nanometrů. Výsledky ukazují, že nejvýraznější vliv na velikost částic měl typ použitého polyesteru a jeho koncentrace ve vnitřní fázi. Jak lze vidět (Obrázek 32, Obrázek 33, Obrázek 34), velikost částic stoupala s klesající molární hmotností polymerů při všech koncentracích terbinafinu a dosahovala maximálních hodnot v případě polyesteru PLGA/D, který má výrazně nižší molární hmotnost než ostatní používané polyesteru. U lineárního polyesteru (PLGA) by se daly očekávat výrazně větší částice v porovnání s větveným PLGA/A, který má signifikantně větší molární hmotnost, avšak rozdíly byly relativně malé, průměrně 11 %. To může být vysvětleno podobnou hydrofobicitou těchto polyesterů, která není ovlivněna pouze jejich molární hmotností, s jejíž nárůstem stoupá, ale rovněž stupněm větvení, který naopak hydrofobicitu polyesterů snižuje. Výsledky proto ukazují, že hydrofobicita polyesteru je klíčovým parametrem ve vztahu k velikosti částic. Jak naznačují některé studie, její snižování vede k formování větších částic [220, 221].

Jasně viditelný je i efekt koncentrace polyesteru. Nárůst velikosti částic se stoupající koncentrací polyesteru je evidentní v případě všech polyesterů, ve všech testovaných koncentracích. Zvětšování částic bylo pozorováno i po zvýšení množství terbinafinu ve vnitřní fázi, konkrétně při změně z 5 mg na 15 mg. Další zvyšování množství terbinafinu však nevedlo k dalšímu jednoznačnému nárůstu velikosti.

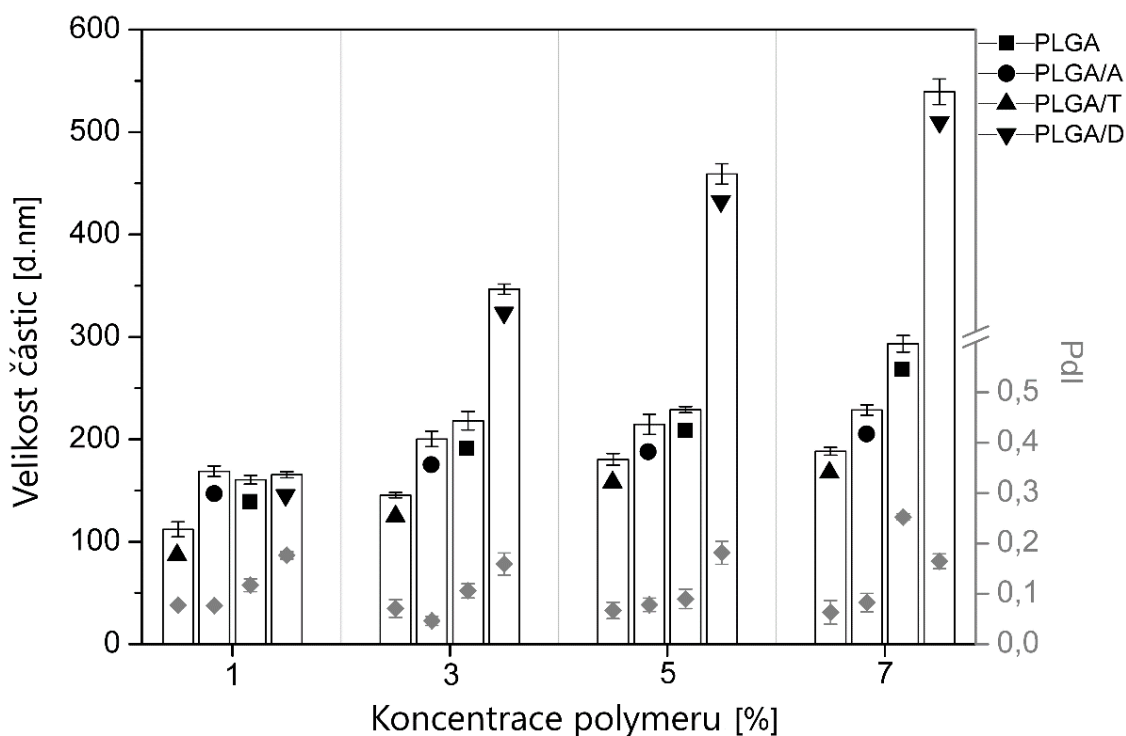
Index polydisperzity všech prezentovaných formulací dosahoval hodnot nižších než 0,2. V případě větvených polyesterů PLGA/T a PLGA/A se pohyboval v rozmezí 0,05 až 0,1; což z praktického hlediska znamená monodisperzní vzorek [92, 222].



Obrázek 32 Efekt typu použitého polyesteru a jeho koncentrace na velikost nanočástic a index polydisperzity (PDI). Jednotlivé formulace obsahují 5 mg terbinafinu. Data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty \pm SD ze tří měření.



Obrázek 33 Efekt typu použitého polyesteru a jeho koncentrace na velikost nanočástic a index polydisperzity (PDI). Jednotlivé formulace obsahují 15 mg terbinafinu. Data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty \pm SD ze tří měření.



Obrázek 34 Efekt typu použitého polyesteru a jeho koncentrace na velikost nanočástic a index polydisperzity (PdI). Jednotlivé formulace obsahují 25 mg terbinafinu. Data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty \pm SD ze tří měření.

6.4.3 Zeta potenciál

Tabulka 4 ukazuje hodnoty ZP nanočástic. Naměřené hodnoty všech formulací jsou v rozmezí 30 až 56 mV, které indikuje stabilní koloidní systém. Kladný náboj lze vysvětlit přítomností aminoskupin v molekule DDAB, jehož koncentrace byla zvolena na základě pilotních experimentů, při kterých bylo dosaženo vysoké stability při hodnotách vyšších než 25 mV. Tyto hodnoty byly spolehlivě dosahovány, pokud byla koncentrace DDAB ve vnější fázi alespoň 0,05 %. Tyto hodnoty ZP korespondují s obecně uznávaným tvrzením, že absolutní hodnoty ZP větší než 25 mV obvykle značí dobrou koloidní stabilitu systémů [223, 224].

Efekt koncentrace polyesteru ani efekt množství terbinafinu ve vnitřní fázi v souvislosti s ovlivněním zeta potenciálu nebyl jednoznačně pozorován. Jejich potenciální vliv mohl být maskován výrazným vlivem DDAB.

Tabulka 4 Hodnoty ZP testovaných nanosuspenzí s terbinafinem

	c [%]	Množství Terbinafinu		
		5 mg	15 mg	25 mg
PLGA/T	1	31,3 ± 0,4	34,1 ± 0,1	38,5 ± 0,8
	3	39,7 ± 2,3	42,3 ± 0,5	38,4 ± 0,2
	5	46,3 ± 2,1	42,6 ± 2,5	43,3 ± 0,9
	7	45,7 ± 1,8	43,0 ± 0,9	40,1 ± 1,5
PLGA/D	1	30,1 ± 2,7	30,8 ± 1,9	38,4 ± 0,9
	3	42,9 ± 0,6	39,5 ± 0,8	37,9 ± 1,3
	5	42,2 ± 0,8	35,8 ± 1,2	40,9 ± 1,0
	7	40,0 ± 0,8	36,4 ± 0,7	35,2 ± 1,5
PLGA	1	43,2 ± 0,9	38,7 ± 0,8	47,2 ± 0,6
	3	48,5 ± 0,4	48,2 ± 0,9	50,3 ± 0,5
	5	51,2 ± 1,4	49,8 ± 1,4	55,6 ± 0,7
	7	52,6 ± 1,7	51,8 ± 0,8	47,9 ± 0,1
PLGA/A	1	45,8 ± 1,9	39,9 ± 0,3	56,2 ± 1,8
	3	49,4 ± 0,7	49,2 ± 2,1	53,2 ± 0,9
	5	46,7 ± 0,9	51,1 ± 2,1	53,6 ± 1,1
	7	50,6 ± 1,9	49,1 ± 1,7	50,1 ± 1,2

c: koncentrace polyesteru ve vnitřní fázi

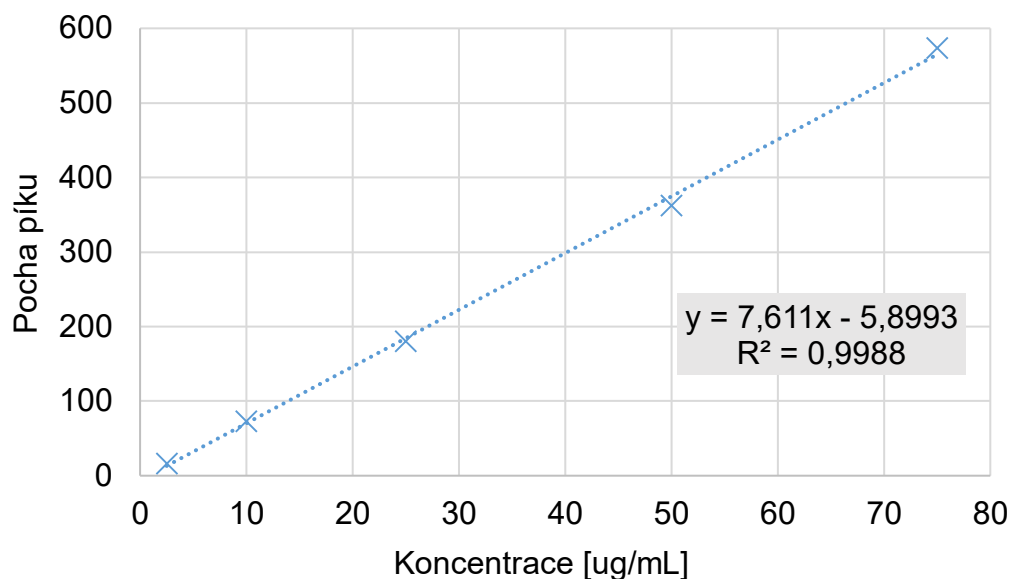
6.4.4 Sestrojení kalibrační přímky

Byla připravena série pěti různě koncentrovaných roztoků terbinafinu v ACN, které byly následně analyzovány pomocí HPLC. Tabulka 5 shrnuje výsledky analýzy ve formě obsahů ploch detegovaných píků, z průměrných hodnot pak byla sestrojena kalibrační přímka (Obrázek 35).

Tabulka 5 Výsledky HPLC analýzy koncentrační řady terbinafinu

c [µg/mL]	Ar 1	Ar 2	Ar 3	Ar Ø	σ	δ _r [%]
75,000	573,454	573,298	574,130	573,627	0,36	0,06
50,000	361,124	362,596	363,802	362,507	1,10	0,30
25,000	179,818	181,899	181,055	180,924	0,85	0,47
10,000	74,178	72,86	73,197	73,412	0,56	0,76
2,500	16,432	17,17	16,883	16,828	0,30	1,81
						Ø = 0,68

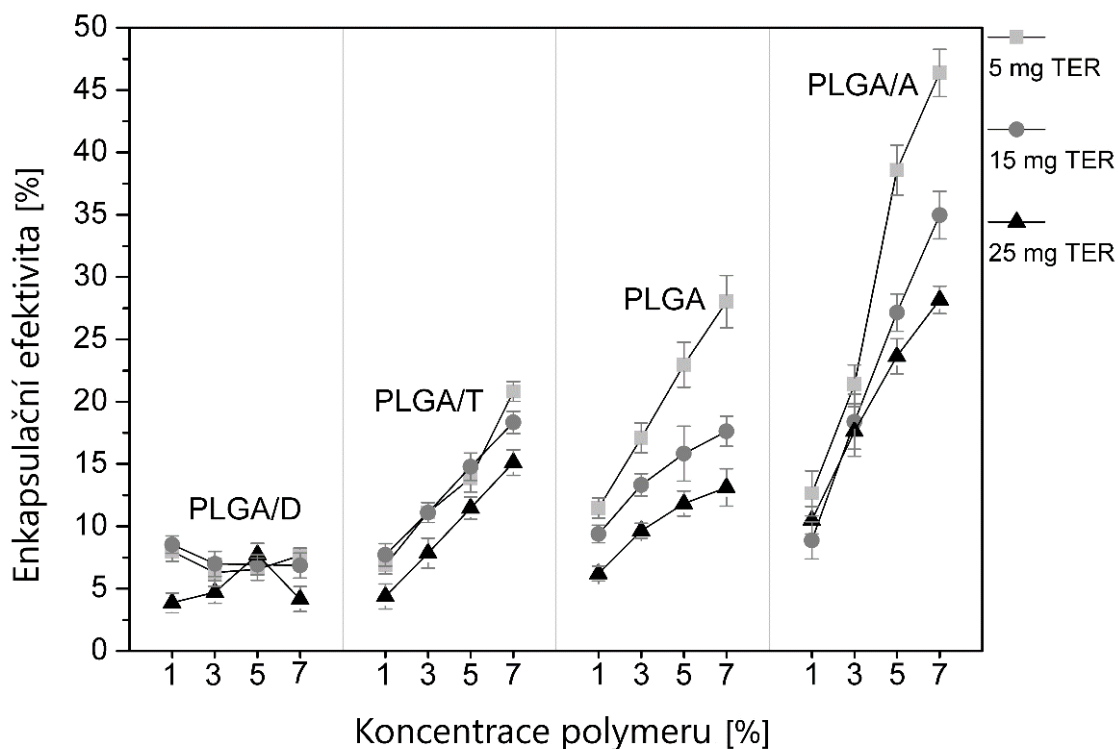
Ar: plocha detegovaného píku terbinafinu, **Ø:** průměr, **σ:** směrodatná odchylka, **δ_r:** relativní chyba měření.



Obrázek 35 Kalibrační přímka pro analýzu terbinafinu. R^2 : korelační koeficient.

6.4.5 Enkapsulační efektivita a kapacita polymeru pro léčivo

Enkapsulační efektivita byla stanovena pomocí Rovnice 9 po rozpuštění purifikovaných nanočástic v acetonitrilu. Poměr množství léčivé látky k polymeru se jevil jako klíčový faktor v procesu enkapsulace, jak uvádí mnoho autorů [225, 226]. Podle Obrázku 36 je patrné, že snižování množství terbinafinu a/nebo zvyšování koncentrace polymeru vede k efektivnějšímu procesu enkapsulace [221, 227]. Tento jev je jednoznačně viditelný u třech ze čtyř testovaných polyesterů. V případě PLGA/D, větveného polyesteru s nejnižší molární hmotností i hydrofobicitou, byla enkapsulační efektivita konzistentně nízká bez náznaku závislosti na množství terbinafinu či polyesteru.



Obrázek 36 Závislost enkapsulační efektivity na typu a koncentraci použitého polyesteru a množství terbinafinu (TER). Data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty \pm SD ze tří měření.

Hodnocení nanočástic z hlediska kapacity polymeru pro léčivo (LC) je nutné pro určení konkrétního množství enkapsulovaného léčiva a pro následné stanovení terapeutické dávky. LC, jakožto ukazovatel procentuálního zastoupení léčiva v kompozici nanočástic, může mít výrazný efekt na liberaci léčiva a celkový farmakokinetický profil formulace [228]. Tabulka 6 ukazuje průměrné hodnoty LC jednotlivých formulací. Její nárůst se objevoval hlavně při zvýšení počáteční dávky terbinafinu, což je protichůdné v porovnání s enkapsulační efektivitou, podobně jako v dalších studiích [203, 229].

Viditelné to bylo zejména při prvním zvýšení počátečního množství terbinafinu, tedy z 5 mg na 15 mg. Další zvýšení na 25 mg znamenalo výraznější nárůst pouze v případě polyesteru PLGA/A, u kterého byla dosažena maximální LC blízka 20 %. Podle Panyam et al. [230] je LC hydrofobních léčiv závislá na rozpustnosti daného léčiva v polymeru a stoupá s jeho klesající molární hmotností. V případě použití polyesteru PLGA/D mající nejvyšší molární hmotnost však byla dosažena také nejvyšší LC, což je v rozporu

s předchozím tvrzením. Dá se však předpokládat, že nízká molární hmotnost (2 500 g/mol) společně s krátkými alifatickými řetězci a nízkou hydrofobicitou brání dosažení efektivního záchytu vysoce hydrofobního léčiva jakým je terbinafin.

Tabulka 6 Hodnoty LC jednotlivých formulací

	c [%]	Množství Terbinafinu		
		5 mg	15 mg	25 mg
PLGA/T	1	3,03 ± 0,33	9,52 ± 1,27	9,04 ± 2,14
	3	1,66 ± 0,25	4,80 ± 0,89	5,61 ± 1,17
	5	1,24 ± 0,38	3,88 ± 0,48	4,95 ± 0,50
	7	1,33 ± 0,21	3,45 ± 0,65	4,68 ± 0,62
PLGA/D	1	3,51 ± 0,83	10,43 ± 1,85	8,06 ± 3,10
	3	0,94 ± 0,18	3,08 ± 0,46	3,45 ± 0,72
	5	0,59 ± 0,11	1,85 ± 0,41	3,39 ± 0,55
	7	0,50 ± 0,20	1,32 ± 0,22	1,33 ± 0,32
PLGA	1	4,95 ± 1,24	11,34 ± 1,98	12,37 ± 3,24
	3	2,52 ± 0,75	5,71 ± 0,83	6,81 ± 2,10
	5	2,05 ± 0,16	4,14 ± 0,38	5,10 ± 1,31
	7	1,79 ± 0,61	3,32 ± 0,45	4,09 ± 0,47
PLGA/A	1	5,44 ± 1,03	10,79 ± 2,22	19,26 ± 1,86
	3	3,14 ± 0,38	7,72 ± 0,92	11,78 ± 1,62
	5	3,39 ± 0,62	6,89 ± 1,27	9,70 ± 1,40
	7	2,92 ± 0,28	6,38 ± 1,11	8,38 ± 2,24

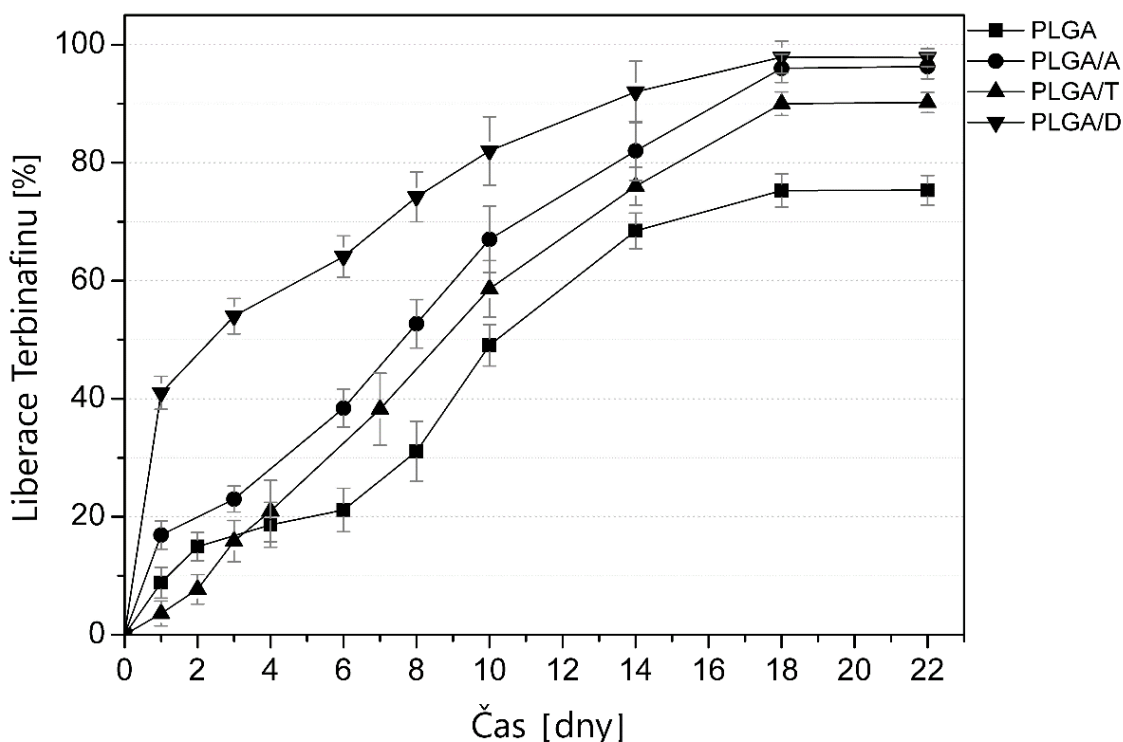
c: koncentrace polyesteru ve vnitřní fázi.

6.5 Testování liberace

Byly porovnány disoluční profily terbinafinu inkorporovaného v nanočásticích složených z derivátů PLGA různé architektury a molární hmotnosti. Všechny testované formulace vykazovaly prodloužené uvolňování terbinafinu. V případě lineárního PLGA byl pozorován třífázový profil (Obrázek 37 – symbol ■), považovaný za typický pro PLGA mikro- a nanosystémy [159]. Malý počáteční „burst“ efekt, daný disolucí terbinafinu zachyceného blízko povrchu částic, je následován pomalejší liberací řízenou rychlostí difuze léčiva z bobtnalým polymerem. Ve finální fázi nastává akcelerace liberace léčiva vlivem progredující degradace polymeru a eroze nanočástic. Předpokládá se, že výše popsany liberací profil, vyznačující se pomalejším průběhem, je způsobený lineárními řetězci polymeru bobtnajícími ve vodném prostředí a rovněž vnitřní viskozitou

i teplotou skelného přechodu lineárního polyesteru, které jsou nejvyšší v porovnání s ostatními testovanými nosiči [231].

Dvoufázový průběh liberace byl zaznamenán v případě použití větveného polyesteru značeného jako PLGA/D (Obrázek 37 – symbol ▼). Hlavní charakteristikou je rychlá počáteční fáze, kdy se po prvních 24 hodinách uvolnilo 40 % terbinafinu. Tato fáze je následována fází prodlouženého uvolňování. Tento průběh může být vysvětlen kombinací několika faktorů; (a) fyzikálně-chemické vlastnosti polyesteru, konkrétně nejnížší molární hmotnost, vnitřní viskozita, hydrofobicita a teplota skelného přechodu ze všech testovaných; (b) relativně velké částice o velikosti přibližně 350 nm; (c) nejnížší enkapsulace terbinafinu z testovaných formulací [232]. Použití nanočástic připravených z tohoto relativně málo hydrofobního polyesteru s nízkým enkapsulačním potenciálem a výrazným „burst“ efektem se z hlediska kontrolovaného uvolňování a v porovnání s dalšími testovanými formulacemi nejeví perspektivně.



Obrázek 37 Vliv typu polyesteru na průběh disolučních křivek nanočástic s inkorporovaným terbinafinem. Data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty \pm SD ze tří měření.

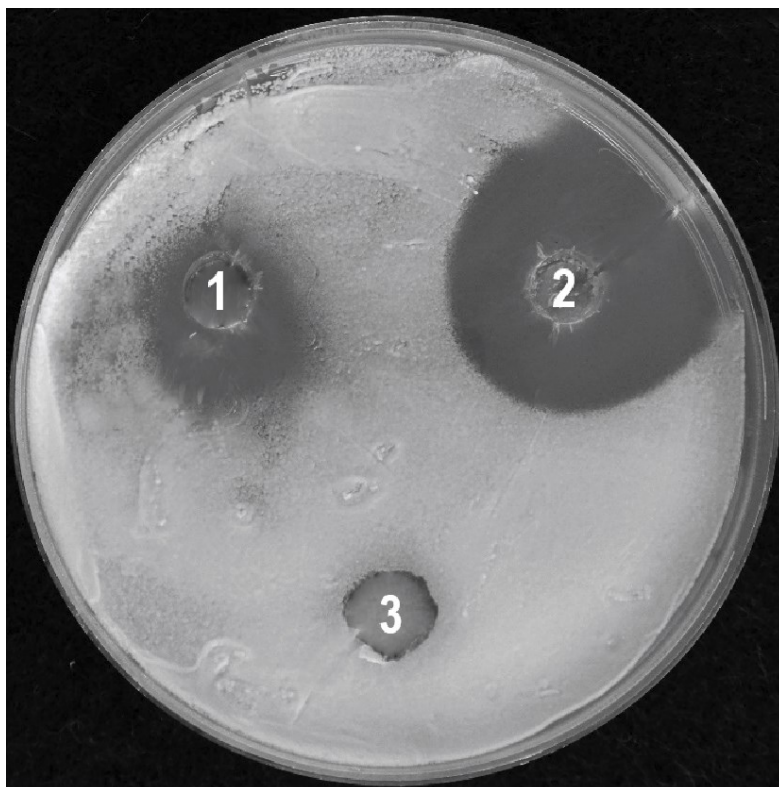
V případě polyesterů větvených na kyselině polyakrylové (PLGA/A), resp. tripentaerythritolu (PLGA/T), byla situace odlišná. Nanočástice formulované z polyesteru PLGA/T (Obrázek 37 – symbol ▲) zajistily prodloužené uvolňování terbinafinu prakticky lineární kinetikou. Disoluční profil PLGA/A (Obrázek 37 – symbol ●) nanočástic se odlišoval pouze přítomností relativně malého „burst“ efektu na úrovni 18 % po 24 hodinách, pravděpodobně na základě nižší hydrofobicity dané přítomností terminálních karboxylových skupin. Při srovnatelném stupni větvení jako má polyester PLGA/D, mají tyto polyestery výrazně vyšší molární hmotnost, schopnost bobtnání je proto nižší a proces degradace pomalejší [233].

Liberace terbinafinu ze všech testovaných formulací je také ovlivněna jeho konverzí z méně rozpustné formy baze na rozpustnější hydrochlorid [234] při postupném snižování pH v průběhu degradace polyesteru [52].

6.6 *In vitro* testování antimikrobiální účinnosti

Výsledky disolučních testů potvrzující liberaci terbinafinu z nanočástic lze považovat za předpoklad jejich antifungální účinnosti. Pro potvrzení však byla provedena relativně jednoduchá a robustní difuzní jamková metoda testování antimikrobiální účinnosti. Tato metoda, oficiální v mnoha mikrobiologických laboratořích, nabízí řadu výhod oproti konkurenčním metodám. Kromě relativní jednoduchosti provedení je také levná, umožňuje testovat širokou škálu látek a nabízí jednoduchost interpretace výsledků [172]. Tento test byl již v několika studiích použit k ověření antimikrobiální efektivity právě látek inkorporovaných v nanonosičích [173, 235].

Obrázek 38 jasně demonstruje antimikrobiální potenciál testovaných nanočástic s terbinafinem. V případě negativní kontroly, tedy nanočástic bez terbinafinu, nebyla pozorována inhibiční zóna *Candida albicans*, nelze proto předpokládat antimikrobiální potenciál. Jak v případě standardu, tak i v případě nanočástic s terbinafinem je však vidět značnou inhibici růstu potvrzující antimikrobiální efektivitu.



Obrázek 38 Difuzní jamková metoda na potvrzení antimikrobiální aktivity nanočástic s inkorporovanou bází terbinafinu. Tmavá místa v okolí jamek představují inhibiční zóny růstu *C. albicans*. Suspenze terbinafinu – standard (1), nanočástice s terbinafinem (2), nanočástice bez terbinafinu – negativní kontrola (3).

7 Závěry

V předložené disertační práci byly studovány originálně syntetizované polyestery PLGA, jeden lineární a tři větvené, s cílem využít je jako nosiče léčiv. Polyestery byly charakterizovány diferenční skenovací kalorimetrií a termogravimetrickou analýzou. Optimalizovanou nanoprecipitační metodou byly z těchto polymerů úspěšně připraveny stabilní polymerní nanočástice s enkapsulovaným terbinafinem, které byly charakterizovány pomocí velikosti, morfologie a zeta potenciálu. S využitím HPLC analýzy byla u jednotlivých formulací zjištěna enkapsulační efektivita a kapacita polymeru pro léčivo. Byla sledována liberace terbinafinu z nanočástic a jejich antimikrobiální efektivita.

Na základě experimentálních výsledků je možné učinit následující závěry:

- Kontrolovanou polykondenzační reakcí kyseliny glykolové, kyseliny D, L-mléčné a větvičího monomeru lze syntetizovat větvené terpolymery na bázi PLGA i bez použití katalyzátoru a bez nutnosti finálního přečištění.
- Termogravimetrická analýza prokázala dobrou termickou stabilitu sledovaných polyesterů do hodnoty přibližně 200 °C, výraznější dekompozice probíhala při teplotách vyšších než 300 °C.
- Diferenční skenovací kalorimetrie neprokázala přítomnost krystalické fáze ve zkoumaných polyesterech a lze předpokládat amorfní stav. Teplota skelného přechodu jednotlivých polyesterů se pohybuje v rozmezí 12 °C až 39 °C zejména v závislosti na molární hmotnosti.
- Roztoky větvených polyesterů v dimethylsulfoxidu v koncentracích do 7 % měly nižší hodnoty dynamické viskozity než v případě lineární PLGA, signifikantní rozdíly však nebyly pozorovány. Ve sledovaném rozmezí se přídavek terbinafinu neprojevil měřitelnou změnou viskozity.
- Dimethylsulfoxid je efektivním rozpouštědlem testovaných polymerů i terbinafinu a jeho použití se projevilo vznikem stabilnější nanosuspenze s nižším stupněm disperzity v porovnání s acetonem a acetonitrilem.

- Kationické tenzidy cetrimid i didodecyldimethylamonium bromid jsou efektivními stabilizátory prezentovaných nanosuspenzí. Vyššího efektu bylo dosaženo při použití didodecyldimethylamonium bromidu.
- Využitím nanoprecipitační metody lze připravit nanosuspenzi s jednou populací částic až do koncentrace polymeru ve vnitřní fázi 70 mg/mL, při poměru vnitřní a vnější fáze 1:10. Kromě typu použitého polyesteru, je jeho množství ve vnitřní fázi klíčovým parametrem ovlivňujícím výslednou velikost nanočástic. Závislost velikosti částic na koncentraci polyesteru je prakticky lineární.
- Rychlost mísení jednotlivých fází při nanoprecipitační metodě přípravy nanočástic ovlivňuje jejich výslednou velikost i disperzitu. Využitím postupu rychlého mísení (one-pot) lze dosáhnout menší průměrnou velikost částic v porovnání s postupem pomalého mísení fází (dropwise), avšak za cenu vyšší disperzity.
- Testované nanosuspenze, skladované při teplotě 1 °C, nevykazovaly po 48 hodinách signifikantní změny distribuce velikosti ani zeta potenciálu.
- Skenovací elektronová mikroskopie prokázala sférický tvar nanočástic s terbinafinem a zjištěná velikost korelovala s výsledky získanými metodou dynamického rozptylu světla.
- Dalším klíčovým parametrem ve vztahu k velikosti částic je hydrofobicita polyesteru. Její snižování vede k formování větších částic.
- Zvýšení množství terbinafinu ve vnitřní fázi z 5 mg na 15 mg se projevilo nárůstem velikosti částic. Další zvyšování množství terbinafinu však nevedlo k dalšímu jednoznačnému nárůstu.
- Index polydisperzity všech prezentovaných formulací s terbinafinem dosahoval hodnot nižších než 0,2. V případě větvených polyesterů PLGA/T a PLGA/A se dokonce pohyboval v rozmezí 0,05 až 0,1; značící monodisperzní vzorek.
- 0,05% koncentrace didodecyldimethylamonium bromidu ve vnější fázi se ukázala jako dostatečná pro stabilizaci nanosuspenzí. Hodnota zeta potenciálu se pohybovala v rozmezí 30 mV až 56 mV. Nebyl prokázán jednoznačný efekt terbinafinu ani typu polyesteru na hodnotu zeta potenciálu.

- Zvyšování poměru polymer:léčivo vede ke zvyšování enkapsulační efektivity.
- Nejvyšší enkapsulační efektivita byla dosažena při použití polyesteru PLGA/A, naopak nejnižších hodnot dosahoval nejméně hydrofobní PLGA/D.
- Kapacita polymeru pro léčivo byla nejvyšší v případě PLGA/A, s maximem na úrovni 20 %. Nejvýrazněji se projevil vliv množství terbinafinu, s jeho nárůstem kapacita polymeru rostla. Ve většině vzorků byl poměrně výrazný i vliv koncentrace polymeru. S jejím růstem kapacita klesala.
- Všechny připravené formulace zabezpečily prodlouženou liberaci terbinafinu. Nanočástice formulované z polyesteru PLGA/T uvolňovaly terbinafin prakticky lineární kinetikou. Disoluční profil PLGA/A nanočástic byl podobný, odlišoval se pouze přítomností relativně malého „burst“ efektu. Lineární PLGA se vyznačoval třífázovým profilem liberace a v případě PLGA/D bylo dosaženo dvoufázového profilu s poměrně výrazným „burst“ efektem na úrovni 40 %.
- Difuzní jamková metoda prokázala antimikrobiální efektivitu nanočástic s enkapsulovaným terbinafinem.
- Presentovanou optimalizovanou nanoprecipitační metodou lze připravit funkční nanočástice s enkapsulovaným terbinafinem, s modifikovatelnou velikostí v rozsahu 100 nm až 600 nm a s nízkým indexem polydisperzity.

8 Publikační činnost

8.1 Příspěvky v recenzovaných časopisech

- ŠNEJDROVÁ, E., PODZIMEK, Š., MARTIŠKA, J., HOLAS, O., DITTRICH, M., Branched PLGA derivatives with tailored properties for drug delivery, *Acta Pharmaceutica*, 2020, 70:1, s. 63-75, doi: 10.2478/acph-2020-0011, ISSN (online): 1846-9558, IF₂₀₁₈ = 1,405

Práce prezentuje a charakterizuje originálně syntetizované deriváty PLGA větvené na mannitolu, kyselině polyakrylové, pentaerythritolu, dipentaerythritolu, nebo tripentaerythritolu. Distribuce molární hmotnosti a stupeň větvení byly určeny pomocí kombinace rozměrově-vylučovací chromatografie (SEC), víceúhlového detektoru rozptylu světla (MALS) a on-line viskozimetrie. Reologické chování bylo testováno s využitím rotační reometrie, testované polyestery měly při teplotě 80 °C charakter viskózních tavenin vyznačujících se Newtonským tokem. Termické vlastnosti byly zjištěny diferenční skenovací kalorimetrií (DSC), která prokázala teploty skelného přechodu nezávislé na stupni větvení a amorfni stav polyesterů.

Přínos autora disertační práce na této publikaci spočíval v podílu na syntéze polyesterů větvených na kyselině polyakrylové, akvizici části experimentálních dat v rámci testování reologických a termických vlastností, jejich vyhodnocení a zpracování do grafické podoby. Rovněž figuroval jako korespondující autor.

- MARTIŠKA, J., ŠNEJDROVÁ, E., DRASTÍK, M., MATYSOVÁ, L., DITTRICH, M., LOSKOT, J., JILEK, P., Terbinafine-loaded branched PLGA-based cationic nanoparticles with modifiable properties, *Pharmaceutical Development and Technology*, 2019, 24:10, s. 1308-1316, doi: 10.1080/10837450.2019.1667387, ISSN (online): 1097-9867, IF₂₀₁₈ = 2,347

Práce se zaměřuje na detailní charakterizaci biodegradovatelných nanočástic s enkapsulovaným terbinafinem, formulovaných z větvených derivátů PLGA a představuje základ prezentované disertační práce.

Přínos autora disertační práce na této publikaci spočíval ve vypracování konceptu a designu studie, zpracování většiny teoretického podkladu, akvizici majoritní části experimentálních dat včetně jejich vyhodnocení a zpracování do požadované podoby a sepsání majoritní části manuscriptu.

- ŠIŠKA, B., ŠNEJDROVÁ, E., MACHÁČ, I., DOLEČEK, P., MARTIŠKA, J., Contribution to the rheological testing of pharmaceutical semisolids, *Pharmaceutical Development and Technology*, 2019, 24:1, s. 80-88, doi: 10.1080/10837450.2019.1667387, ISSN (online): 1097-9867, IF₂₀₁₈ = 2,347

Práce poskytuje komplexní pohled na možnosti využití reometrie v charakterizaci farmaceuticky významných polotuhých základů. Byly provedeny a porovnány penetrometrické, rotační, oscilační, kríповé a adhezivní testy. Studie poskytuje přehled moderních metod testování reologických vlastností polotuhých farmaceutických základů, s možným praktickým využitím při kontrole kvality, studiích bioekvivalence a sledování vlivu fyzikálně-chemických vlastností na reologické chování.

Přínos autora disertační práce na této publikaci spočíval ve vyhledání části potřebných teoretických podkladů, softwarové optimalizaci měřících sekvencí, akvizici části experimentálních dat a jejich zpracování do grafické podoby, korekci a formální úpravy manuscriptu.

8.2 Publikované abstrakty

- MARTIŠKA, J., ŠNEJDROVÁ, E., PODZIMEK, Š., DITTRICH, M., LOSKOT, J., Branched PLGA derivatives as prospective drug carriers, *Farm. Obzor*, 2019, 88, s. 134 -147, ISSN (online): 0014-8172
- ŠNEJDROVÁ, E., MARTIŠKA, J., Design of mucoadhesive PLGA based thin films for topical drug administration, *Farm. Obzor*, 2019, 88, s. 134 -147, ISSN (online): 0014-8172
- MARTIŠKA, J., ŠNEJDROVÁ, E., DRASTÍK, M., DITTRICH, M. Formulace biodegradabilních nanočástic s terbinafinem, *Čes. slov. Farm.*, 2017, 66, s. 247-262, ISSN (online): 1210-7816

- ŠNEJDROVÁ, E., MARTIŠKA, J., DITTRICH, M. Testování adhezivních vlastností na rotačním reometru, *Čes. slov. Farm.*, 2017, 66, s. 247-262, ISSN (online): 1210-7816.

8.3 Odborné přednášky

- MARTIŠKA, J., ŠNEJDROVÁ, E., DITTRICH, M. Formulation of medicated nanoparticles based on branched PLGA, II. Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, 23-24th of January 2020, Szeged, Hungary
- COSTA, P., ŠNEJDROVÁ, E., MARTIŠKA, J., DITTRICH, M. Optimization of Rifampicin-loaded nanoparticles preparation, 10. Postgraduální a 8. Postdoktorandská vědecká konference, 22. – 23. 1. 2020, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova
- ŠNEJDROVÁ, E., MARTIŠKA, J. Design of mucoadhesive PLGA based thin films for topical drug administration, X. Zjazd Slovenskej Farmaceutickej Spoločnosti, 37. Technologické dni, 5. – 6. 9. 2019, Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Slovenská Republika
- MARTIŠKA, J., ŠNEJDROVÁ, E. DRASTÍK, M., DITTRICH, M. Biodegradable polymeric nanoparticles for medical applications, 9. Postgraduální a 7. Postdoktorandská vědecká konference, 23. – 24. 1. 2019, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova
- MARTIŠKA, J., ŠNEJDROVÁ, E. DRASTÍK, M., DITTRICH, M. Starlike polymeric nanoparticulate drug carriers, 8. Postgraduální a 6. Postdoktorandská vědecká konference, 24. – 25. 1. 2018, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova
- ŠNEJDROVÁ, E., MARTIŠKA, J., DITTRICH, M. Testování adhezivních vlastností na rotačním reometru, 36. Technologické dni - Nové trendy v oblasti výskumu a vývoja liekov. Inovácie v oblasti zdravotníckych pomôcok, 25. – 27. 10. 2017, Štrbské Pleso, Slovenská Republika

- MARTIŠKA, J., E. ŠNEJDROVÁ, M. DRASTÍK, M. DITTRICH. Formulace biodegradabilních nanočástic s terbinafinem, 36. Technologické dni - Nové trendy v oblasti výskumu a vývoja liekov. Inovácie v oblasti zdravotníckych pomôcok, 25. – 27. 10. 2017, Štrbské Pleso, Slovenská Republika
- MARTIŠKA, J., ŠNEJDROVÁ, E., DITTRICH, M., TOMSOVÁ, M. Branched Polyesters as a Prospective Drug Carriers, 7. Postgraduální a 5. Postdoktorandská vědecká konference, 7. – 8. 2. 2017, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

8.4 Postery

- MARTIŠKA, J., ŠNEJDROVÁ, E., PODZIMEK, Š., DITTRICH, M. Branched PLGA derivatives as prospective drug carriers, The 83rd Prague Meeting on Macromolecules - Polymers in Medicine 2019, 23-27th of June 2019, Prague, Czech Republic

10 Literatura

1. Teplicki, E., et al., *The Effects of Aloe vera on Wound Healing in Cell Proliferation, Migration, and Viability*. *Wounds*, 2018. **30**(9): s. 263-268, PMID: 30256753, ISSN (online): 1044-7946.
2. Kuijjer, P.J., [*History of healing; wound suturing*]. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 1998. **142**(9): s. 473-479. PMID: 9562762, ISSN (online): 0028-2162.
3. Selvi, F., et al., *Effects of different suture materials on tissue healing*. *Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry*, 2016. **50**(1): s. 35-42. doi: 10.17096/jiufd.79438, ISSN (online): 2149-2352.
4. Dam, J., L. Broek, and C.G. Boeriu, *Polysaccharides in human health care*. *Natural Product Communications*, 2017. **12**: s. 821-830. doi: 10.1177/1934578X1701200604, ISSN (online): 1555-9475.
5. Feldman, D., *Polymer History*. *Designed Monomers and Polymers*, 2008. **11**(1): s. 1-15. doi: 10.1163/156855508X292383, ISSN (online): 15685551
6. Damodaran, V., J. Joslin, and M. Reynolds, *Preparing biocompatible materials for non-permanent medical devices*. *European Pharmaceutical Review*, 2012. **17**: s. 71-77. ISSN (online): 13608606.
7. Carmali, S. and S. Brocchini, *Polyacetals*. In: S.G. Kumbar, C.T. Laurencin, and M. Deng. *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*. Oxford: Elsevier, 2014, s. 219-233. doi: 10.1016/C2011-0-07330-1, ISBN: 978-0-12-396983-5.
8. Aguilar, M.R. and J. San Román, *Introduction to smart polymers and their applications*. In: *Smart Polymers and their Applications*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2014, s. 1-11. doi: 10.1533/9780857097026.1, ISBN: 978-0-85709-695-1.
9. Zhang, J., et al., *Bio-responsive smart polymers and biomedical applications*. *Journal of Physics: Materials*, 2019. **2**(3): 032004. doi: 10.1088/2515-7639/ab1af5, ISSN (online): 2515-7639.

10. Savina, I.N., I.Y. Galaev, and S.V. Mikhailovsky, *Smart polymers for bioseparation and other biotechnological applications*. In: M.R. Aguilar and J. San Román. *Smart Polymers and their Applications*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2014, s. 408-436. doi: 10.1533/9780857097026.2.408, ISBN: 978-0-85709-695-1.
11. Karlsson, S. and A.C. Albertsson, *Biodegradable polymers and environmental interaction*. *Polymer Engineering & Science*, 1998. **38**(8): s. 1251-1253. doi: 10.1002/pen.10294. ISSN (online): 0032-3888.
12. Tamada, J.A. and R. Langer, *Erosion kinetics of hydrolytically degradable polymers*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993. **90**(2): s. 552-556. doi: 10.1073/pnas.90.2.552, ISSN (online): 0027-8424.
13. Vroman, I. and L. Tighzert, *Biodegradable Polymers*. *Materials*, 2009. **2**(2): s. 307-344. doi: 10.3390/ma2020307, ISSN (online): 1996-1944.
14. Göpferich, A., *Mechanisms of polymer degradation and erosion*. In: D.F. Williams. *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium*. Oxford: Elsevier, 1996, s. 117-128. doi: 10.1016/B978-008045154-1.50016-2, ISBN: 978-0-08-045154-1.
15. Varshavsky, A., *Proteolysis*. In: S. Brenner and J.H. Miller. *Encyclopedia of Genetics*. New York: Academic Press, 2001, s. 1573-1575. doi: 10.1006/rwgn.2001.1041, ISBN: 978-0-12-227080-2.
16. Makadia, H.K. and S.J. Siegel, *Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier*. *Polymers*, 2011. **3**(3): s. 1377-1397. doi: 10.3390/polym3031377, ISSN (online): 2073-4360.
17. Shive, M.S. and J.M. Anderson, *Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1997. **28**(1): s. 5-24. doi: 10.1016/s0169-409x(97)00048-3, ISSN (online): 0169-409X.

18. Basu, A., et al., *Poly(alpha-hydroxy acid)s and poly(alpha-hydroxy acid-co-alpha-amino acid)s derived from amino acid*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016. **107**: s. 82-96. doi: 10.1016/j.addr.2016.08.003, ISSN (online): 0169-409X.
19. Gentile, P., et al., *An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering*. *International journal of molecular sciences*, 2014. **15**(3): s. 3640-3659. doi: 10.3390/ijms15033640, ISSN (online): 1422-0067.
20. Sharma, S., et al., *PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2015. **80**: s. 30-40. doi: 10.1016/j.trac.2015.06.014, ISSN (online): 0165-9936.
21. Sun, X., et al., *Poly(Lactic-co-Glycolic Acid): Applications and Future Prospects for Periodontal Tissue Regeneration*. *Polymers*, 2017. **9**(6): 189. doi: 10.3390/polym9060189, ISSN (online): 2073-4360.
22. Hines, D.J. and D.L. Kaplan, *Poly(lactic-co-glycolic) acid-controlled-release systems: experimental and modeling insights*. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 2013. **30**(3): s. 257-276. doi: 10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.2013006475, ISSN (online): 2162-660X.
23. Pillai, O. and R. Panchagnula, *Polymers in drug delivery*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001. **5**(4): s. 447-51. doi: 10.1016/s1367-5931(00)00227-1, ISSN (online): 1367-5931.
24. Swider, E., et al., *Customizing poly(lactic-co-glycolic acid) particles for biomedical applications*. *Acta Biomaterialia*, 2018. **73**: s. 38-51. doi: 10.1016/j.actbio.2018.04.006, ISSN (online): 1742-7061.
25. Danhier, F., et al., *PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications*. *Journal of Controlled Release*, 2012. **161**(2): s. 505-22. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.01.043, ISSN (online): 0168-3659.
26. Kapoor, D., et al., *PLGA: A unique polymer for drug delivery*. *Therapeutic delivery*, 2015. **6**: s. 41-58. doi: 10.4155/tde.14.91, ISSN (online): 2041-5990.

27. Tang, S.C. and J.H. Yang, *Dual Effects of Alpha-Hydroxy Acids on the Skin*. *Molecules*, 2018. **23**(4): 863. doi: 10.3390/molecules23040863, ISSN (online): 1420-3049.
28. Gao, Q., et al., *Direct Synthesis with Melt Polycondensation and Microstructure Analysis of Poly(L-lactic acid-co-glycolic acid)*. *Polymer Journal*, 2002. **34**(11): s. 786-793. doi: 10.1295/polymj.34.786, ISSN (online): 1349-0540.
29. Félix Lanao, R.P., et al., *Physicochemical properties and applications of poly(lactic-co-glycolic acid) for use in bone regeneration*. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 2013. **19**(4): s. 380-390. doi: 10.1089/ten.TEB.2012.0443, ISSN (online): 1937-3376.
30. Pignatello, R., *PLGA-Alendronate Conjugate as a New Biomaterial to Produce Osteotropic Drug Nanocarriers*. In: *Biomaterials Applications for Nanomedicine*. London: IntechOpen, 2011, s. 165-184. doi: 10.5772/25766, ISBN: 978-953-307-661-4.
31. Zhou, S., et al., *Synthesis and characterization of biodegradable low-molecular-weight aliphatic polyesters and their use in protein delivery system*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2004. **91**: s. 1848-1856. doi: 10.1002/app.13385, ISSN (online): 1097-4628.
32. Sobczak, M., *Ring-opening polymerization of cyclic esters in the presence of choline/SnOct2 catalytic system*. *Polymer Bulletin*, 2012. **68**(9): s. 2219-2228. doi: 10.1007/s00289-011-0676-8, ISSN (online): 1436-2449.
33. Kricheldorf, H.R., C. Boettcher, and K.-U. Tönnies, *Poly lactones: 23. Polymerization of racemic and meso, l-lactide with various organotin catalysts-stereochemical aspects*. *Polymer*, 1992. **33**(13): s. 2817-2824. doi: 10.1016/0032-3861(92)90459-A, ISSN (online): 0032-3861.
34. Kowalski, A., A. Duda, and S. Penczek, *Mechanism of Cyclic Ester Polymerization Initiated with Tin(II) Octoate. 2. Macromolecules Fitted with Tin(II) Alkoxide Species Observed Directly in MALDI-TOF Spectra*. *Macromolecules*, 2000. **33**(3): s. 689-695. doi: 10.1021/ma9906940, ISSN (online): 0024-9297.

35. Sheftel, V.O., *Indirect food additives and polymers: Migration and toxicology*. Boca Raton: CRC Press, 2000, 1320 s. doi: 10.1201/9781482293821, ISBN: 978-042-907-675-6.
36. Matsumura, S., K. Mabuchi, and K. Toshima, *Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of lactide*. *Macromolecular Rapid Communications*, 1997. **18**(6): s. 477-482. doi: 10.1002/marc.1997.030180604, ISSN (online): 1022-1336.
37. Wang, Z.-Y., et al., *Syntheses of poly(lactic acid-co-glycolic acid) serial biodegradable polymer materials via direct melt polycondensation and their characterization*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2006. **99**(1): s. 244-252. doi: 10.1002/app.22468, ISSN (online): 0021-8995.
38. Korshak, V.V. and V.A. Vasnev, *Experimental Methods of Solution Polymerization*, In: G. Allen and J.C. Bevington. *Comprehensive Polymer Science and Supplements*. Amsterdam: Pergamon, 1989, s. 143-165. doi: 10.1016/B978-0-08-096701-1.00151-8, ISBN: 978-0-08-096701-1.
39. Ajioka, M., et al., *The basic properties of poly(lactic acid) produced by the direct condensation polymerization of lactic acid*. *Journal of environmental polymer degradation*, 1995. **3**(4): s. 225-234. doi: 10.1007/BF02068677, ISSN (online): 1572-8900.
40. Ajioka, M., et al., *Aliphatic polyesters and their copolymers synthesized through direct condensation polymerization*. *Polymer Degradation and Stability*, 1998. **59**(1): s. 137-143. doi: 10.1016/S0141-3910(97)00165-1, ISSN (online): 0141-3910.
41. Moon, S.I., et al., *Melt polycondensation of L-lactic acid with Sn(II) catalysts activated by various proton acids: A direct manufacturing route to high molecular weight Poly(L-lactic acid)*. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2000. **38**(9): s. 1673-1679. doi: 10.1002/(SICI)1099-0518(20000501)38:9<1673::AID-POLA33>3.0.CO;2-T, ISSN (online): 0887-624X.

42. Lambert, W.J. and K.D. Peck, *Development of an in situ forming biodegradable poly-lactide-co-glycolide system for the controlled release of proteins*. Journal of Controlled Release, 1995. **33**(1): s. 189-195. doi: 10.1016/0168-3659(94)00083-7, ISSN (online): 0168-3659.
43. Engineer, C., J. Parikh, and A. Raval, *Review on Hydrolytic Degradation Behavior of Biodegradable Polymers from Controlled Drug Delivery System*. Trends in Biomaterials and Artificial Organs, 2011. **25**(2): s. 79-85. ISSN (online): 0971-1198.
44. Das, M., A. Sarma, and T. Chakraborty, *PLGA-derived anticancer Nano therapeutics: Promises and challenges for the future*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2016. **8**: s. 484-499. ISSN (online): 0975-7384.
45. Miller, R.A., J.M. Brady, and D.E. Cutright, *Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios*. Journal of Biomedical Material Research, 1977. **11**(5): s. 711-719. doi: 10.1002/jbm.820110507, ISSN (online): 0021-9304.
46. Gilding, D.K. and A.M. Reed, *Biodegradable polymers for use in surgery-polyglycolic/poly(lactic acid) homo- and copolymers: 1*. Polymer, 1979. **20**(12): s. 1459-1464. doi: 10.1016/0032-3861(79)90009-0, ISSN (online): 0032-3861.
47. Jain, R.A., *The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices*. Biomaterials, 2000. **21**(23): s. 2475-2490. doi: 10.1016/S0142-9612(00)00115-0, ISSN (online): 0142-9612.
48. Reed, A.M. and D.K. Gilding, *Biodegradable polymers for use in surgery-poly(glycolic)/poly(lactic acid) homo and copolymers: 2. In vitro degradation*. Polymer, 1981. **22**(4): s. 494-498. doi: 10.1016/0032-3861(81)90168-3, ISSN (online): 0032-3861.
49. Jamshidi, K., S.H. Hyon, and Y. Ikada, *Thermal characterization of polylactides*. Polymer, 1988. **29**(12): s. 2229-2234. doi: 10.1016/0032-3861(88)90116-4, ISSN (online): 0032-3861.

50. In Pyo Park, P. and S. Jonnalagadda, *Predictors of glass transition in the biodegradable poly-lactide and poly-lactide-co-glycolide polymers*. Journal of Applied Polymer Science, 2006. **100**(3): s. 1983-1987. doi: 10.1002/app.22135, ISSN (online): 0021-8995.
51. Lee, S.K., et al., *Synergistically enhanced osteoconductivity and anti-inflammation of PLGA/ β -TCP/Mg(OH)₂ composite for orthopedic applications*. Materials Science and Engineering: C, 2019. **94**: s. 65-75. doi: 10.1016/j.msec.2018.09.011, ISSN (online): 0928-4931.
52. Darestani, M., et al., *Degradation of Poly(D,L-lactide-co-glycolide) 50:50 Implant in Aqueous Medium*. Iranian Polymer Journal, 2005. **14**(8): s. 753-763. ISSN (online): 1026-1265.
53. Nagoba, B., et al., *Acidic Environment and Wound Healing: A Review*. Wounds: a compendium of clinical research and practice, 2015. **27**(1): s. 5-11. ISSN (online): 1943-2704.
54. d'Arcy, R., J. Burke, and N. Tirelli, *Branched polyesters: Preparative strategies and applications*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2016. **107**: s. 60-81. doi: 10.1016/j.addr.2016.05.005, ISSN (online): 0169-409X.
55. Hadar, J., et al., *Characterization of branched poly(lactide-co-glycolide) polymers used in injectable, long-acting formulations*. Journal of Controlled Release, 2019. **304**: s. 75-89. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.04.039, ISSN (online): 0168-3659.
56. Hirao, A. and H.-S. Yoo, *Dendrimer-like star-branched polymers: novel structurally well-defined hyperbranched polymers*. Polymer Journal, 2011. **43**(1): s. 2-17. doi: 10.1038/pj.2010.109, ISSN (online): 1349-0540.
57. Dailey, L.A. and T. Kissel, *New poly(lactic-co-glycolic acid) derivatives: Modular polymers with tailored properties*. Drug Discovery Today: Technologies, 2005. **2**(1): s. 7-13. doi: 10.1016/j.ddtec.2005.05.017, ISSN (online): 1740-6749.

58. Snejdrova, E., et al., *Mucoadhesive plasticized system of branched poly(lactic-co-glycolic acid) with aciclovir*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2016. **42**(10): s. 1653-1659. doi: 10.3109/03639045.2016.1160109, ISSN (online): 0363-9045.
59. Snejdrova, E., M. Dittrich, and M. Drastik, *Plasticized branched aliphatic oligoesters as potential mucoadhesive drug carriers*. International Journal of Pharmaceutics, 2013. **458**(2): s. 282-286. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.10.030, ISSN (online): 0378-5173.
60. Farjadian, F., et al., *Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: Challenges and opportunities*. Nanomedicine, 2018. **14**(1): s. 93-126. doi: 10.2217/nnm-2018-0120. ISSN (online): 1748-6963.
61. El-Say, K.M. and H.S. El-Sawy, *Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2017. **528**(1): s. 675-691. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.06.052, ISSN (online): 0378-5173.
62. Su, Y.K., *Nitride-Based LEDs and Superluminescent LEDs*. In: P. Bhattacharya, R. Fornari, and H. Kamimura. *Comprehensive Semiconductor Science and Technology*. Amsterdam: Elsevier, 2011, s. 28-100. doi: 10.1016/B978-0-44-453153-7.00024-9, ISBN: 978-0-444-53153-7.
63. Rao, J.P. and K.E. Geckeler, *Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters*. Progress in Polymer Science, 2011. **36**(7): s. 887-913. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001, ISSN (online): 0079-6700.
64. García-Pinel, B., et al., *Lipid-Based Nanoparticles: Application and Recent Advances in Cancer Treatment*. Nanomaterials, 2019. **9**(4): 638. doi: 10.3390/nano9040638, ISSN (online): 2079-4991.
65. Khan, I., K. Saeed, and I. Khan, *Nanoparticles: Properties, applications and toxicities*. Arabian Journal of Chemistry, 2019. **12**(7): s. 908-931. doi: 10.1016/j.arabjc.2017.05.011, ISSN (online): 1878-5352.

66. Krishnaswamy, K. and V. Orsat, *Sustainable Delivery Systems Through Green Nanotechnology*. In: A.M. Grumezescu. *Nano- and Microscale Drug Delivery Systems*. Amsterdam: Elsevier, 2017, s. 17-32. doi: 10.1016/B978-0-323-52727-9.00002-9, ISBN: 978-0-323-52727-9.
67. Crucho, C.I.C. and M.T. Barros, *Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods*. *Materials Science and Engineering: C*, 2017. **80**: s. 771-784. doi: 10.1016/j.msec.2017.06.004, ISSN (online): 0928-4931.
68. Rai, R., S. Alwani, and I. Badea, *Polymeric Nanoparticles in Gene Therapy: New Avenues of Design and Optimization for Delivery Applications*. *Polymers*, 2019. **11**(4): 745. doi: 10.3390/polym11040745, ISSN (online): 2073-4360.
69. Astete, C.E. and C.M. Sabliov, *Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles*. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2006. **17**(3): s. 247-289. doi: 10.1163/156856206775997322, ISSN (online): 0920-5063.
70. de Waard, H., H.W. Frijlink, and W.L.J. Hinrichs, *Bottom-up preparation techniques for nanocrystals of lipophilic drugs*. *Pharmaceutical research*, 2011. **28**(5): s. 1220-1223. doi: 10.1007/s11095-010-0323-3, ISSN (online): 1573-904X.
71. Santos, A.C., et al., *Layer-by-Layer Assembly for Nanoarchitectonics*. In: K. Ariga and M. Aono. *Advanced Supramolecular Nanoarchitectonics*. New York: William Andrew Publishing, 2019, s. 89-121. doi: 10.1016/B978-0-12-813341-5.00005-X, ISBN: 978-0-12-813341-5.
72. Ali, H.S., P. York, and N. Blagden, *Preparation of hydrocortisone nanosuspension through a bottom-up nanoprecipitation technique using microfluidic reactors*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009. **375**(1-2): s. 107-113. doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.03.029, ISSN (online): 0378-5173.
73. Fessi, H., et al., *Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1989. **55**(1): R1-R4. doi: 10.1016/0378-5173(89)90281-0, ISSN (online): 0378-5173.

74. Chhabra, R., G. Tosi, and A. Grabrucker, *Emerging Use of Nanotechnology in the Treatment of Neurological Disorders*. Current pharmaceutical design, 2015. **21**(22): s. 3111-3130. doi: 10.2174/1381612821666150531164124, ISSN (online): 1381-6128.
75. Paredes, A., et al., *Nanoencapsulation in the food industry: manufacture, applications and characterization*. Journal of Food Bioengineering and Nanoprocessing, 2016. **1**(1): s. 56-79. ISSN (online): 2501-2568
76. Thakral, S., N.K. Thakral, and D.K. Majumdar, *Eudragit: a technology evaluation*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2013. **10**(1): s. 131-49. doi: 10.1517/17425247.2013.736962, ISSN (online): 1742-5247.
77. Salatin, S., et al., *Development of a nanoprecipitation method for the entrapment of a very water soluble drug into Eudragit RL nanoparticles*. Research in pharmaceutical sciences, 2017. **12**(1): s. 1-14. doi: 10.4103/1735-5362.199041, ISSN (online): 1735-5362.
78. Yadav, K.S. and K.K. Sawant, *Modified nanoprecipitation method for preparation of cytarabine-loaded PLGA nanoparticles*. AAPS PharmSciTech, 2010. **11**(3): s. 1456-1465. doi: 10.1208/s12249-010-9519-4, ISSN (online): 1530-9932.
79. Sternling, C.V. and L.E. Scriven, *Interfacial turbulence: Hydrodynamic instability and the marangoni effect*. AIChE Journal, 1959. **5**(4): s. 514-523. doi: 10.1002/aic.690050421, ISSN (online): 0001-1541.
80. Banerjee, A., et al., *Role of nanoparticle size, shape and surface chemistry in oral drug delivery*. Journal of controlled release, 2016. **238**: s. 176-185. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.07.051, ISSN (online): 1873-4995.
81. Zhang, J., et al., *Effects of major parameters of nanoparticles on their physical and chemical properties and recent application of nanodrug delivery system in targeted chemotherapy*. International journal of nanomedicine, 2017. **12**: s. 8483-8493. doi: 10.2147/IJN.S148359, ISSN (online): 1178-2013.

82. Poojari, R.J., *PLGA: the smart therapeutics goods carrier*. *Frontiers in pharmacology*, 2013. **4**: 20. doi: 10.3389/fphar.2013.00020, ISSN (online): 1663-9812.
83. Caldorera-Moore, M., et al., *Designer nanoparticles: incorporating size, shape and triggered release into nanoscale drug carriers*. *Expert opinion on drug delivery*, 2010. **7**(4): s. 479-495. doi: 10.1517/17425240903579971, ISSN (online): 1744-7593.
84. Liu, Y., et al., *The shape of things to come: importance of design in nanotechnology for drug delivery*. *Therapeutic delivery*, 2012. **3**(2): s. 181-194. doi: 10.4155/tde.11.156, ISSN (online): 2041-5990.
85. Long, Y., et al., *Swelling Mechanism of Core–Shell Polymeric Nanoparticles and Their Application in Enhanced Oil Recovery for Low-Permeability Reservoirs*. *Energy & Fuels*, 2019. **33**(4): s. 3077-3088. doi: 10.1021/acs.energyfuels.9b00131, ISSN (online): 0887-0624.
86. Yu, M. and J. Zheng, *Clearance Pathways and Tumor Targeting of Imaging Nanoparticles*. *ACS nano*, 2015. **9**(7): s. 6655–6674. doi: 10.1021/acsnano.5b01320, ISSN (online): 1936-0851.
87. Hoshyar, N., et al., *The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction*. *Nanomedicine*, 2016. **11**(6): s. 673-692. doi: 10.2217/nnm.16.5, ISSN (online): 1748-6963.
88. Choi, H.S., et al., *Renal clearance of quantum dots*. *Nature biotechnology*, 2007. **25**(10): s. 1165-1170. doi: 10.1038/nbt1340, ISSN (online): 1087-0156.
89. Gustafson, H.H., et al., *Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem*. *Nano today*, 2015. **10**(4): s. 487-510. doi: 10.1016/j.nantod.2015.06.006, ISSN (online): 1748-0132
90. Attia, M.F., et al., *An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2019. **71**(8): s. 1185-1198. doi: 10.1111/jphp.13098, ISSN (online): 0022-3573.

91. Danaei, M., et al., *Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems*. *Pharmaceutics*, 2018. **10**(2): 57. doi: 10.3390/pharmaceutics10020057, ISSN (online): 1999-4923.
92. Clayton, K.N., et al., *Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry*. *Biomicrofluidics*, 2016. **10**(5): 054107-054107. doi: 10.1063/1.4962992, ISSN (online): 1932-1058.
93. Shrivastava, A., *Polymerization*. In: *Introduction to Plastics Engineering*. New York: William Andrew Publishing, 2018, s. 17-48. doi: 10.1016/B978-0-323-39500-7.00002-2, ISBN: 978-0-323-39500-7.
94. Joseph, E. and G. Singhvi, *Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: a potential nanocarrier*. In: A.M. Grumezescu. *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy*. New York: William Andrew Publishing, 2019, s. 91-116. doi: 10.1016/B978-0-12-816505-8.00007-2, ISBN: 978-0-12-816505-8.
95. Kumar, A. and C.K. Dixit, *Methods for characterization of nanoparticles*. In: S. Nimesh, R. Chandra, and N. Gupta. *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2017, s. 43-58. doi: 10.1016/B978-0-08-100557-6.00003-1, ISBN: 978-0-08-100557-6.
96. Baalousha, M., et al., *Natural Colloids and Nanoparticles in Aquatic and Terrestrial Environments*. In: J.R. Lead. *Environmental and Human Health Impacts of Nanotechnology*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009, s. 109-161. doi: 10.1002/9781444307504.ch4, ISBN: 978-144-430-750-4.
97. Hang, J., et al., *Electrostatic and electrosteric stabilization of aqueous suspensions of barite nanoparticles*. *Powder Technology*, 2009. **192**(2): s. 166-170. doi: 10.1016/j.powtec.2008.12.010, ISSN (online): 0032-5910.
98. Kamyshny, A. and S. Magdassi, *Aqueous Dispersions of Metallic Nanoparticles*. In: M. Starov. *Nanoscience: Colloidal and Interfacial Aspects*. Boca Raton: CRC Press, 2010, s. 747-778. doi: 10.1201/EBK1420065008-c25. ISBN 9781138198944.

99. Doroszkowski, A., *The physical chemistry of dispersion*. In: R. Lambourne and T.A. Strivens. *Paint and Surface Coatings*, druhé vydání. Cambridge: Woodhead Publishing, 1999, s. 198-242. doi: 10.1533/9781855737006.198, ISBN: 978-1-85573-348-0.
100. Ivanov, M.G. and D.M. Ivanov, *Nanodiamond Nanoparticles as Additives to Lubricants*. In: O.A. Shenderova and D.M. Gruen. *Ultananocrystalline Diamond*, druhé vydání. New York: William Andrew Publishing, 2012, s. 457-492. doi: 10.1016/B978-1-4377-3465-2.00014-1, ISBN: 978-1-4377-3465-2.
101. Kestens, V., et al., *Challenges in the size analysis of a silica nanoparticle mixture as candidate certified reference material*. *Journal of Nanoparticle Research*, 2016. **18**(6): 171. doi: 10.1007/s11051-016-3474-2, ISSN (online): 1572-896X.
102. Newton, A.M.J. and S. Kaur, *Solid lipid nanoparticles for skin and drug delivery: Methods of preparation and characterization techniques and applications*. In: A.M. Grumezescu. *Nanoarchitectonics in Biomedicine*. New York: William Andrew Publishing, 2019, s. 295-334. doi: 10.1016/B978-0-12-816200-2.00015-3, ISBN: 978-0-12-816200-2.
103. Johnston, R.L., *Metal Nanoparticles and Nanoalloys*. In: R.L. Johnston and J.P. Wilcoxon. *Frontiers of Nanoscience*. Amsterdam: Elsevier, 2012, s. 1-42. doi: 10.1016/B978-0-08-096357-0.00006-6, ISSN (série): 1876-2778.
104. Dorofeev, G., et al., *Determination of nanoparticle sizes by X-ray diffraction*. *Colloid Journal*, 2012. **74**: s. 675–685. doi: 10.1134/S1061933X12060051, ISSN (online): 1608-3067.
105. Gross, J., et al., *Nanoparticle tracking analysis of particle size and concentration detection in suspensions of polymer and protein samples: Influence of experimental and data evaluation parameters*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2016. **104**: s. 30-41. doi: 10.1016/j.ejpb.2016.04.013, ISSN (online): 0939-6411.

106. Bootz, A., et al., *Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004. **57**(2): s. 369-375. doi: 10.1016/S0939-6411(03)00193-0, ISSN (online): 0939-6411.
107. Kraemer, E.O. and S.T. Dexter, *The Light-Scattering Capacity (Tyndall Effect) and Colloidal Behavior of Gelatine Sols and Gels*. The Journal of Physical Chemistry, 1927. **31**(5): s. 764-782. doi: 10.1021/j150275a014, ISSN (online): 0092-7325.
108. Stetefeld, J., S.A. McKenna, and T.R. Patel, *Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences*. Biophysical reviews, 2016. **8**(4): s. 409-427. doi: 10.1007/s12551-016-0218-6, ISSN (online): 1867-2450.
109. Malm, A.V. and J.C.W. Corbett, *Improved Dynamic Light Scattering using an adaptive and statistically driven time resolved treatment of correlation data*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): 13519. doi: 10.1038/s41598-019-50077-4, ISSN (online): 2045-2322.
110. Pecora, R., *Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids*. Journal of Nanoparticle Research, 2000. **2**(2): s. 123-131. doi: 10.1023/A:1010067107182, ISSN (online): 1572-896X.
111. Kaszuba, M., et al., *Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering*. Journal of Nanoparticle Research, 2008. **10**(5): s. 823-829. doi: 10.1007/s11051-007-9317-4, ISSN (online): 1572-896X.
112. Coglitore, D., et al., *Transition from fractional to classical Stokes-Einstein behaviour in simple fluids*. Royal Society open science, 2017. **4**(12): 170507-170507. doi: 10.1098/rsos.170507, ISSN (online): 2054-5703.
113. Kvítek, L., R. Novotný, and P. Píkal, *Stanovení velikostní distribuce částic anorganických disperzí metodou dynamického rozptylu světla*. Chemické listy, 1998. **92**: s. 431-433. ISSN (online): 1213-7103.

114. Tucker, I.M., et al., *Laser Doppler Electrophoresis applied to colloids and surfaces*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2015. **20**(4): s. 215-226. doi: 10.1016/j.cocis.2015.07.001, ISSN (online): 1359-0294.
115. Smith, B.A. and B.R. Ware, *Apparatus and Methods for Laser Doppler Electrophoresis*. In: D.M. Hercules, et al. *Contemporary Topics in Analytical and Clinical Chemistry: Volume 2*. New York: Springer, 1978, s. 29-54. doi: 10.1007/978-1-4615-6731-8_2, ISBN: 978-1-4615-6731-8.
116. Kaszuba, M., et al., *High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques*. Philosophical Transactions of The Royal Society A, 2010. **368**(1927): s. 4439-4451. doi: 10.1098/rsta.2010.0175, ISSN (online): 1364-503X.
117. Bouzigues, C.I., P. Tabeling, and L. Bocquet, *Nanofluidics in the Debye Layer at Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces*. Physical Review Letters, 2008. **101**(11): 114503. doi: 10.1103/PhysRevLett.101.114503, ISSN (online): 1079-7114.
118. Freire, J.M., et al., *Using zeta-potential measurements to quantify peptide partition to lipid membranes*. European biophysics journal, 2011. **40**(4): s. 481-487. doi: 10.1007/s00249-010-0661-4, ISSN (online): 1432-1017.
119. Bastos-González, D. and F.J. de Las Nieves, *On the zeta-potential of sulfonated polystyrene model colloids*. Progress in Colloid & Polymer Science, 1993. **93**: s. 37-44. doi: 10.1007/BFb0118469, ISSN (online): 0340-255X.
120. Skoglund, S., et al., *Difficulties and flaws in performing accurate determinations of zeta potentials of metal nanoparticles in complex solutions-Four case studies*. PLoS ONE, 2017. **12**(7): e0181735. doi: 10.1371/journal.pone.0181735, ISSN (online): 1932-6203.
121. *Simplifying the measurement of zeta potential using M3-PALS*. Application note. <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/application-notes/AN101104ZetaPotentialM3-PALS> (online 18.3.2020)

122. Guarrera, V. and H. Ott, *Electron Microscopy of Ultracold Gases*. In: P.W. Hawkes. *Advances in Imaging and Electron Physics*. Amsterdam: Elsevier, 2011, s. 75-98. doi: 10.1016/B978-0-12-385981-5.00002-1, ISSN (série): 1076-5670, ISBN (eBook): 978-012-817-184-4.
123. Baghaie, A., et al., *Three-dimensional reconstruction of highly complex microscopic samples using scanning electron microscopy and optical flow estimation*. PLoS ONE, 2017. **12**(4): e0175078. doi: 10.1371/journal.pone.0175078, ISSN (online): 1932-6203.
124. Nasrollahzadeh, M., et al., *6 - Plant-Mediated Green Synthesis of Nanostructures: Mechanisms, Characterization, and Applications*, in *Interface Science and Technology*, M. Nasrollahzadeh, et al., Editors. 2019, Elsevier. s. 199-322. doi: 10.1016/B978-0-12-813586-0.00006-7, ISSN (online): 1573-4285.
125. Vernon-Parry, K.D., *Scanning electron microscopy: an introduction*. III-Vs Review, 2000. **13**(4): s. 40-44. doi: 10.1016/S0961-1290(00)80006-X, ISSN (online): 0961-1290.
126. So, S., et al., *Overcoming diffraction limit: From microscopy to nanoscopy*. Applied Spectroscopy Reviews, 2018. **53**(2-4): s. 290-312. doi: 10.1080/05704928.2017.1323309, ISSN (online): 0570-4928.
127. Bozzola, J.J. and L.D. Russell, *Electron microscopy principles and techniques for biologists*. Burlington: Jones & Bartlett, 1999, 670 s. doi: 10.1086/417649, ISBN: 978-058-518-187-5.
128. Saba, N., M. Jawaid, and M.T.H. Sultan, *Thermal properties of oil palm biomass based composites*. In: M. Jawaid, P. Md Tahir, and N. Saba. *Lignocellulosic Fibre and Biomass-Based Composite Materials*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2017, s. 95-122. doi: 10.1016/B978-0-08-100959-8.00006-8, ISBN: 978-0-08-100959-8.
129. Groenewoud, W.M., *Differential scanning calorimetry*. In: *Characterisation of Polymers by Thermal Analysis*. Amsterdam: Elsevier, 2001, s. 10-60. doi: 10.1016/B978-044450604-7/50002-9, ISBN: 978-0-444-50604-7.

130. Gill, P., T.T. Moghadam, and B. Ranjbar, *Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience*. Journal of biomolecular techniques, 2010. **21**(4): s. 167-193. PMID: 21119929, ISSN (online): 1943-4731.
131. Clas, S.D., C.R. Dalton, and B.C. Hancock, *Differential scanning calorimetry: applications in drug development*. Pharmaceutical Science & Technology Today, 1999. **2**(8): s. 311-320. doi: 10.1016/S1461-5347(99)00181-9, ISSN (online): 1461-5347.
132. Lukas, K. and P.K. LeMaire, *Differential scanning calorimetry: Fundamental overview*. Resonance, 2009. **14**(8): s. 807-817. doi: 10.1007/s12045-009-0076-7, ISSN (online): 0973-712X.
133. Mukherjee, I. and M. Rosolen, *Thermal transitions of gelatin evaluated using DSC sample pans of various seal integrities*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2013. **114**: s. 1161–1166. doi: 10.1007/s10973-013-3166-4, ISSN (online): 1588-2926.
134. Luisi, M., B. Wilthan, and G. Pottlacher, *Influence of purge gas and spacers on uncertainty of high-temperature heat flux DSC measurements*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2015. **119**(3): s. 2329-2334. doi: 10.1007/s10973-014-4329-7, ISSN (online): 1588-2926.
135. Bahreini, M., et al., *Thermodynamics and kinetic analysis of carbon nanofibers as nanozymes*. Nanotechnology, science and applications, 2019. **12**: s. 3-10. doi: 10.2147/NSA.S208310, ISSN (online): 1177-8903.
136. TA Instruments, Inc. *THERMAL APPLICATIONS NOTE: Purge Gas Recommendations for use in Modulated DSC*.
tainstruments.com/pdf/literature/TN44.pdf (dostupné online 15.4.2020)
137. Chiu, M.H. and E.J. Prenner, *Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions*. Journal of pharmacy & bioallied sciences, 2011. **3**(1): s. 39-59. doi: 10.4103/0975-7406.76463, ISSN (online): 0975-7406.

138. Leyva-Porras, C., et al., *Application of Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Modulated Differential Scanning Calorimetry (MDSC) in Food and Drug Industries*. *Polymers*, 2019. **12**(1): 5. doi: 10.3390/polym12010005, ISSN (online): 2073-4360.
139. Prime R.B., et al. *Thermogravimetric Analysis (TGA)*. In: J.D. Menczel and R.B. Prime. *Thermal Analysis of Polymers: Fundamentals and Applications*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009, s. 241-317. doi: 10.1002/9780470423837.ch3, ISBN (eBook): 978-047-042-383-7.
140. Auroux, A., *Calorimetry and Thermal Methods in Catalysis*. Heidelberg: Springer-Verlag, 2013, 561 s. doi: 10.1007/978-3-642-11954-5, ISBN (eBook): 978-3-642-11954-5.
141. Komesu, A., et al., *Study of Lactic Acid Thermal Behavior Using Thermoanalytical Techniques*. *Journal of Chemistry*, 2017. s. 1-7. doi: 10.1155/2017/4149592, ISSN (online): 2090-9071.
142. Boguta, P., Z. Sokołowska, and K. Skic, *Use of thermal analysis coupled with differential scanning calorimetry, quadrupole mass spectrometry and infrared spectroscopy (TG-DSC-QMS-FTIR) to monitor chemical properties and thermal stability of fulvic and humic acids*. *PLoS ONE*, 2017. **12**(12): e0189653. doi: 10.1371/journal.pone.0189653, ISSN (online): 1932-6203.
143. Moser, A. and M. Feuchter, *Mechanical Properties of Composites Used in High-Voltage Applications*. *Polymers*, 2016. **8**(7): 260. doi: 10.3390/polym8070260, ISSN (online): 2073-4360.
144. Rudin, A. and P. Choi, *Mechanical Properties of Polymer Solids and Liquids*, In: *The Elements of Polymer Science & Engineering*, třetí vydání. Boston: Academic Press, 2013, s. 149-229. doi: 10.1016/B978-0-12-382178-2.00004-3, ISBN: 978-0-12-382178-2.
145. Becker, H. and L.E. Locascio, *Polymer microfluidic devices*. *Talanta*, 2002. **56**(2): s. 267-287. doi: 10.1016/S0039-9140(01)00594-X, ISSN (online): 0039-9140.

146. Qian, R. and Y. Yu, *Transition of polymers from rubbery elastic state to fluid state*. *Frontiers of Chemistry in China*, 2009. **4**(1): s. 1-9. doi: 10.1007/s11458-009-0014-y, ISSN (online): 1673-3614.
147. Ebnesajjad, S., *Introduction to Plastics*. In: E. Baur, K. Ruhrberg, and W. Woishnis. *Chemical Resistance of Engineering Thermoplastics*. New York: William Andrew Publishing, 2016, s. 13-25. doi: 10.1016/B978-0-323-47357-6.00021-0, ISBN: 978-0-323-47357-6.
148. Morris, B.A., *Rheology of Polymer Melts*, In: *The Science and Technology of Flexible Packaging*. New York: William Andrew Publishing, 2017, s. 121-147. doi: 10.1016/B978-0-323-24273-8.00005-8, ISBN: 978-0-323-24273-8.
149. Schramm, G., *A practical approach to rheology and rheometry*, druhé vydání. Karlsruhe: Gebrueder Haake, 2000, 290 s. ISBN-13: UOM:39015034276983.
150. Hou, Y.Y. and H.O. Kassim, *Instrument techniques for rheometry*. *Review of Scientific Instruments*, 2005. **76**(10): 101101. doi: 10.1063/1.2085048, ISSN (online): 0034-6748.
151. Johnston, M.T. and R.H. Ewoldt, *Precision rheometry: Surface tension effects on low-torque measurements in rotational rheometers*. *Journal of Rheology*, 2013. **57**(6): s. 1515-1532. doi: 10.1122/1.4819914, ISSN (online): 0148-6055.
152. Malvern Panalytical, *Rheometry - rotational: Rotational rheometers for measuring viscosity and viscoelasticity*.
<http://www.malvern.com/en/products/technology/rheometry-rotational/>
 (dostupné online 3.4.2016).
153. *FRANCK, A.J., Understanding Instrument Inertia Corrections in Oscillation. TA Instruments, 2005.*
http://www.tainstruments.com/pdf/literature/APN006_Understanding_Instrument_Inertia_V1.pdf (dostupné online 5.5.2020).

154. Zhao, S., et al., *Lipid Nanoparticles-Encapsulated YF4: A Potential Therapeutic Oral Peptide Delivery System for Hypertension Treatment*. *Frontiers in pharmacology*, 2019. **10**: s. 102-102. doi: 10.3389/fphar.2019.00102, ISSN (online): 1663-9812.
155. Schubert, S., J. Delaney, and U. Schubert, *Nanoprecipitation and Nanoformulation of Polymers: From History to Powerful Possibilities beyond Poly(lactic acid)*. *Soft Matter*, 2011. **7**: s. 1581-1588. doi: 10.1039/c0sm00862a, ISSN (online): 17446848.
156. Keles, H., et al., *Investigation of factors influencing the hydrolytic degradation of single PLGA microparticles*. *Polymer Degradation and Stability*, 2015. **119**: s. 228-241. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2015.04.025, ISSN (online): 0141-3910.
157. Pan, J. and X. Chen, *Modelling degradation of amorphous biodegradable polyesters: basic model*. In: J. Pan. *Modelling Degradation of Bioresorbable Polymeric Medical Devices*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2015, s. 15-31. doi: 10.1533/9781782420255.1.15, ISBN: 978-1-78242-016-3.
158. Zweers, M.L.T., et al., *In vitro degradation of nanoparticles prepared from polymers based on dl-lactide, glycolide and poly(ethylene oxide)*. *Journal of Controlled Release*, 2004. **100**(3): s. 347-356. doi: 10.1016/j.jconrel.2004.09.008, ISSN (online): 0168-3659.
159. Fredenberg, S., et al., *The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems- A review*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011. **415**(1): s. 34-52. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.05.049, ISSN (online): 0378-5173.
160. Zolnik, B.S. and D.J. Burgess, *Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release*. *Journal of Controlled Release*, 2007. **122**(3): s. 338-344. doi: 10.1016/j.jconrel.2007.05.034, ISSN (online): 0168-3659.
161. Sah, H., et al., *Concepts and practices used to develop functional PLGA-based nanoparticulate systems*. *International journal of nanomedicine*, 2013. **8**: s. 747-765. doi: 10.2147/IJN.S40579, ISSN (online): 1178-2013

162. Wang, Y. and Y. Tan, *Enhanced drug loading capacity of 10-hydroxycamptothecin-loaded nanoparticles prepared by two-step nanoprecipitation method*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2016. **36**: s. 183-191. doi: 10.1016/j.jddst.2016.09.012, ISSN (online): 1773-2247.
163. Das, S., P.K. Suresh, and R. Desmukh, *Design of Eudragit RL 100 nanoparticles by nanoprecipitation method for ocular drug delivery*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2010. **6**(2): s. 318-323. doi: 10.1016/j.nano.2009.09.002, ISSN (online): 1549-9634.
164. Chourasiya, V., S. Bohrey, and A. Pandey, *Formulation, optimization, characterization and in-vitro drug release kinetics of atenolol loaded PLGA nanoparticles using 33 factorial design for oral delivery*. Materials Discovery, 2016. **5**: s. 1-13. doi: 10.1016/j.md.2016.12.002, ISSN (online): 2352-9245.
165. Huang, X. and C.S. Brazel, *On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems*. Journal of Controlled Release, 2001. **73**(2): s. 121-136. doi: 10.1016/S0168-3659(01)00248-6, ISSN (online): 0168-3659.
166. Berkland, C., et al., *Precise control of PLG microsphere size provides enhanced control of drug release rate*. Journal of Controlled Release, 2002. **82**(1): s. 137-147. doi: 10.1016/S0168-3659(02)00136-0, ISSN (online): 0168-3659.
167. Darvishi, B., et al., *Preparation and Antibacterial Activity Evaluation of 18- β -glycyrrhetic Acid Loaded PLGA Nanoparticles*. Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR, 2015. **14**(2): s. 373-383. PMID: 25901144, ISSN (online): 1735-0328.
168. Das, S., et al., *Methods and Mechanisms Involved in Antimicrobially Useful Nanoparticles with Agricultural Promises*. In: D.G. Panpatte and Y.K. Jhala. *Nanotechnology for Agriculture: Crop Production & Protection*. Singapore: Springer, 2019, s. 207-231. doi: 10.1007/978-981-32-9374-8_11, ISBN: 978-981-32-9374-8.

169. Bankier, C., et al., *A comparison of methods to assess the antimicrobial activity of nanoparticle combinations on bacterial cells*. PloS one, 2018. **13**(2): e0192093-e0192093. doi: 10.1371/journal.pone.0192093, ISSN (online): 1932-6203.
170. Jain, D., et al., *Unraveling the cytotoxic potential of Temozolomide loaded into PLGA nanoparticles*. Daru : Journal of Pharmaceutical Science, 2014. **22**: 18. doi: 10.1186/2008-2231-22-18, ISSN (online): 2008-2231.
171. McKinnon, K.M., *Flow Cytometry: An Overview*. Current protocols in immunology, 2018. **120**: 5.1.1-5.1.11. doi: 10.1002/cpim.40, ISSN (online): 1934-368X.
172. Balouiri, M., M. Sadiki, and S.K. Ibsouda, *Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review*. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2016. **6**(2): s. 71-79. doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005, ISSN (online): 2095-1779.
173. Mendes, A.I., et al., *Miconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for local delivery to the oral mucosa: Improving antifungal activity*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013. **111**: s. 755-763. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.05.041, ISSN (online): 0927-7765.
174. Gaba, B., et al., *Nanostructured lipid carrier system for topical delivery of terbinafine hydrochloride*. Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University, 2015. **53**(2): s. 147-159. doi: 10.1016/j.bfopcu.2015.10.001, ISSN (online): 1110-0931.
175. Newland, J.G. and S.M. Abdel-Rahman, *Update on terbinafine with a focus on dermatophytoses*. Clinical, cosmetic and investigational dermatology, 2009. **2**: s. 49-63. doi: 10.2147/ccid.s3690, ISSN (online): 1178-7015.
176. AK Scientific, I. *Safety data sheet, Terbinafine*, 2020. https://aksci.com/sds/K662_SDS.pdf (dostupné online 13.4.2020).
177. Hossain, A., et al., *Preparation, Characterisation, and Topical Delivery of Terbinafine*. Pharmaceutics, 2019. **11**(10): 548. doi: 10.3390/pharmaceutics11100548, ISSN (online): 1999-4923.

178. Ministerstvo zdravotnictví ČR, *Český lékopis 2017 - Doplněk 2019 (ČL 2017 - Dopl. 2019): Pharmacopoea Bohemica MMXVII - Addendum MMXIX (Ph. B. MMXVII - Add. MMXIX)*. Praha: Grada Publishing, 2019, 1312 s. ISBN: 978-80-271-2531-9.
179. Tubic-Grozdanic, M., M.B. Bolger, and P. Langguth, *Application of Gastrointestinal Simulation for Extensions for Biowaivers of Highly Permeable Compounds*. The AAPS Journal, 2008. **10**(1): s. 213-226. doi: 10.1208/s12248-008-9023-x, ISSN (online): 1550-7416.
180. Darkes, M.J., L.J. Scott, and K.L. Goa, *Terbinafine: a review of its use in onychomycosis in adults*. American Journal of Clinical Dermatology, 2003. **4**(1): s. 39-65. doi: 10.2165/00128071-200304010-00005, ISSN (online): 1175-0561.
181. Shah, V.H. and A. Jobanputra, *Enhanced Ungual Permeation of Terbinafine HCl Delivered Through Liposome-Loaded Nail Lacquer Formulation Optimized by QbD Approach*. AAPS PharmSciTech, 2018. **19**(1): s. 213-224. doi: 10.1208/s12249-017-0831-0, ISSN (online): 1530-9932.
182. Tanriverdi, S.T., et al., *Terbinafine hydrochloride loaded liposome film formulation for treatment of onychomycosis: in vitro and in vivo evaluation*. Journal of Liposome Research, 2016. **26**(2): s. 163-73. doi: 10.3109/08982104.2015.1067892, ISSN (online): 0898-2104.
183. Chen, Y.C., et al., *Development of terbinafine solid lipid nanoparticles as a topical delivery system*. International Journal of Nanomedicine, 2012. **7**: s. 4409-4418. doi: 10.2147/IJN.S33682, ISSN (online): 1178-2013.
184. Duxfield, L., et al., *Development of gatifloxacin-loaded cationic polymeric nanoparticles for ocular drug delivery*. Pharmaceutical Development and Technology, 2016. **21**(2): s. 172-179. doi: 10.3109/10837450.2015.1091839, ISSN (online): 1083-7450.
185. National Center for Biotechnology Information, PubChem Database, *Terbinafine, CID=1549008*.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Terbinafine#section=Pharmacology-and-Biochemistry> (dostupné online 15.4.2020).

186. MCE MedChemExpres. *Terbinafine (Synonyms: TDT 067)*.
www.medchemexpress.com/Terbinafine.html (dostupné online 15.4.2020).
187. Bronich, T.K., et al., *Effects of Block Length and Structure of Surfactant on Self-Assembly and Solution Behavior of Block Ionomer Complexes*. *Langmuir*, 2000. **16**(2): s. 481-489. doi: 10.1021/la990628r, ISSN (online): 0743-7463.
188. National Center for Biotechnology Information, PubChem Database, *CID=18669*.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Didodecyldimethylammonium-bromide#section=DSSTox-Substance-ID> (dostupné online 14.4.2020).
189. Gossmann, R., et al., *Didodecyldimethylammonium bromide (DMAB) stabilized poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles: Uptake and cytotoxic potential in Caco-2 cells*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2018. **43**: s. 430-438. doi: 10.1016/j.jddst.2017.11.002, ISSN (online): 1773-2247.
190. Gossmann, R., K. Langer, and D. Mulac, *New Perspective in the Formulation and Characterization of Didodecyldimethylammonium Bromide (DMAB) Stabilized Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) (PLGA) Nanoparticles*. *PLoS One*, 2015. **10**(7): e0127532. doi: 10.1371/journal.pone.0127532, ISSN (online): 1932-6203.
191. Khachane, P., A.A. Date, and M.S. Nagarsenker, *Positively charged polymeric nanoparticles: application in improving therapeutic efficacy of meloxicam after oral administration*. *Pharmazie*, 2011. **66**(5): s. 334-348. PMID: 21699066, ISSN (online): 0031-7144.
192. Xu, K. and Q. Han, *DMSO as a solvent/ligand to monodisperse CdS spherical nanoparticles*. *Journal of Nanoparticle Research*, 2016. **18**(1): s. 16. doi: 10.1007/s11051-016-3323-3, ISSN (online): 1572-896X.
193. Brayton, C.F., *Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review*. *The Cornell Veterinarian*, 1986. **76**(1): s. 61-90. PMID: 3510103, ISSN (online): 0010-8901.

194. Swanson, B.N., *Medical use of dimethyl sulfoxide (DMSO)*. Reviews in clinical & basic pharmacology, 1985. **5**(1-2): s. 1-33. PMID: 3916302, ISSN (online): 0334-1534.
195. de Abreu Costa, L., et al., *Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Decreases Cell Proliferation and TNF- α , IFN- γ , and IL-2 Cytokines Production in Cultures of Peripheral Blood Lymphocytes*. Molecules, 2017. **22**(11): s. 1789. doi: 10.3390/molecules22111789, ISSN (online): 1420-3049.
196. Worthley, E.G. and C.D. Schott, *The toxicity of four concentrations of DMSO*. Toxicology and Applied Pharmacology, 1969. **15**(2): s. 275-281. doi: 10.1016/0041-008X(69)90027-1, ISSN (online): 0041-008X.
197. Marren, K., *Dimethyl sulfoxide: an effective penetration enhancer for topical administration of NSAIDs*. Phys Sportsmed, 2011. **39**(3): s. 75-82. doi: 10.3810/psm.2011.09.1923, ISSN (online): 0091-3847.
198. Marwah, H., et al., *Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery*. Drug Delivery, 2016. **23**(2): s. 564-78. doi: 10.3109/10717544.2014.935532, ISSN (online): 1071-7544.
199. Rodríguez-Gattorno, G., et al., *Metallic Nanoparticles from Spontaneous Reduction of Silver(I) in DMSO. Interaction between Nitric Oxide and Silver Nanoparticles*. The Journal of Physical Chemistry B, 2002. **106**(10): s. 2482-2487. doi: 10.1021/jp012670c, ISSN (online): 1520-6106.
200. Sahu, B.P. and M.K. Das, *Nanoprecipitation with sonication for enhancement of oral bioavailability of furosemide*. Acta Poloniae Pharmaceutica, 2014. **71**(1): s. 129-137. PMID: 24779201, ISSN (online): 0001-6837.
201. Lancheros, R., C.A. Guerrero, and R.D. Godoy-Silva, *Improvement of N-Acetylcysteine Loaded in PLGA Nanoparticles by Nanoprecipitation Method*. Journal of Nanotechnology, 2018. **2018**: s. 3620373. doi: 10.1155/2018/3620373, ISSN (online): 1687-9503.

202. Snejdrova, E., et al., *Branched PLGA derivatives with tailored drug delivery properties*. Acta Pharmaceutica, 2020. **70**(1): s. 63-75. doi: 10.2478/acph-2020-0011, ISSN (online): 1330-0075.
203. Alizadeh, A.M., et al., *Encapsulation of Curcumin in Diblock Copolymer Micelles for Cancer Therapy*. BioMed Research International, 2015. **2015**: 14. doi: 10.1155/2015/824746, ISSN (online): 2314-6141.
204. Teixeira, M., et al., *Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2005. **59**(3): s. 491-500. doi: 10.1016/j.ejpb.2004.09.002, ISSN (online): 0939-6411.
205. Musumeci, T., et al., *PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel*. International Journal of Pharmaceutics, 2006. **325**(1-2): s. 172-179. doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.06.023, ISSN (online): 0378-5173.
206. Esfandyari-Manesh, M., et al., *Study of antimicrobial activity of anethole and carvone loaded PLGA nanoparticles*. Journal of Pharmaceutical Research, 2013. **7**(4): s. 290-295. doi: 10.1016/j.jopr.2013.04.019, ISSN (online): 0974-6943.
207. Silva, M.F., et al., *Study of Thermal Degradation of PLGA, PLGA Nanospheres and PLGA/Maghemite Superparamagnetic Nanospheres*. Materials Research, 2015. **18**: s. 1400-1406. doi: 10.1590/1516-1439.045415, ISSN (online): 1516-1439.
208. Mainardes, R.M., M.P.D. Gremião, and R.C. Evangelista, *Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2006. **42**: s. 523-530. doi: 10.1590/S1516-93322006000400007, ISSN (online): 1516-9332.
209. Palacios, J., et al., *Characterization and thermal degradation of poly(d,l-lactide-co-glycolide) composites with nanofillers*. Polymer Engineering & Science, 2013. **53**(7): s. 1414-1429. doi: 10.1002/pen.23396, ISSN (online): 0032-3888.

210. Khalil, A., et al., *Preparation and Characterization of Electrospun PLGA/silver Composite Nanofibers for Biomedical Applications*. International journal of electrochemical science, 2013. **8**(3): 3483-3493. ISSN (online): 1452-3981.
211. Jeske, H., et al., *Thermomechanical behaviour of intumescent fire retardant coatings*. V. European Coatings Conference. Vincentz Network GmbH & Co. KG. Berlin, 13-14. Březen 2012. Dostupné online: shorturl.at/jkJWY.
212. Ayyoob, M. and Y.J. Kim, *Effect of Chemical Composition Variant and Oxygen Plasma Treatments on the Wettability of PLGA Thin Films, Synthesized by Direct Copolycondensation*. Polymers, 2018. **10**(10): 1132. doi: 10.3390/polym10101132, ISSN (online): 2073-4360.
213. Fox Jr., T.G. and P.J. Flory, *Second-Order Transition Temperatures and Related Properties of Polystyrene. I. Influence of Molecular Weight*. Journal of Applied Physics, 1950. **21**(6): s. 581-591. doi: 10.1063/1.1699711, ISSN (online): 10897550.
214. Govender, T., et al., *PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug*. Journal of Controlled Release, 1999. **57**(2): s. 171-185. doi: 10.1016/S0168-3659(98)00116-3, ISSN (online): 0168-3659.
215. Caputo, F., et al., *Measuring particle size distribution of nanoparticle enabled medicinal products, the joint view of EUNCL and NCI-NCL. A step by step approach combining orthogonal measurements with increasing complexity*. Journal of Controlled Release, 2019. **299**: s. 31-43. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.02.030, ISSN (online): 0168-3659.
216. Huang, W. and C. Zhang, *Tuning the Size of Poly(lactic-co-glycolic Acid) (PLGA) Nanoparticles Fabricated by Nanoprecipitation*. Biotechnology journal, 2018. **13**(1): 1700203. doi: 10.1002/biot.201700203, ISSN (online): 1860-7314.
217. Bilati, U., E. Allémann, and E. Doelker, *Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005. **24**(1): s. 67-75. doi: 10.1016/j.ejps.2004.09.011, ISSN (online): 0928-0987.

218. Wang, Y., et al., *Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer*. *Nanomaterials*, 2016. **6**(2): 26. doi: 10.3390/nano6020026, ISSN (online): 2079-4991.
219. Almoustafa, H.A., M.A. Alshawsh, and Z. Chik, *Technical aspects of preparing PEG-PLGA nanoparticles as carrier for chemotherapeutic agents by nanoprecipitation method*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017. **533**(1): s. 275-284. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.09.054, ISSN (online): 0378-5173.
220. Palacio, J., V.H. Orozco, and B.L. López, *Effect of the molecular weight on the physicochemical properties of poly(lactic acid) nanoparticles and on the amount of ovalbumin adsorption*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2011. **22**: s. 2304-2311. doi: 10.1590/S0103-50532011001200010, ISSN (online): 0103-5053.
221. Martín-Banderas, L., et al., *Cannabinoid derivate-loaded PLGA nanocarriers for oral administration: formulation, characterization, and cytotoxicity studies*. *International Journal of Nanomedicine*, 2012. **7**: s. 5793-5806. doi: 10.2147/IJN.S34633, ISSN (online): 1178-2013.
222. Hughes, J.M., et al., *Highly monodisperse, lanthanide-containing polystyrene nanoparticles as potential standard reference materials for environmental "nano" fate analysis*. *Journal of Applied Polymer Sciences*, 2015. **132**(24). doi: 10.1002/app.42061, ISSN (online): 0021-8995.
223. Verwey, E.J.W., *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*. *The Journal of Physical Chemistry*, 1947. **51**(3): s. 631-636. doi: 10.1021/j150453a001, ISSN (online): 0092-7023.
224. Liu, W., et al., *TiO₂ nanoparticles alter iron homeostasis in *Pseudomonas brassicacearum* as revealed by *PrrF* sRNA modulation*. *Environmental Science: Nano*, 2016. **3**(6): s. 1473-1482. doi: 10.1039/C6EN00316H, ISSN (online): 2051-8153.

225. Jelvehgari, M., et al., *Preparation and Determination of Drug-Polymer Interaction and In-vitro Release of Mefenamic Acid Microspheres Made of Cellulose Acetate Phthalate and/or Ethylcellulose Polymers*. Iranian journal of pharmaceutical research, 2011. **10**(3): s. 457-467. PMID: 24250377, ISSN (online): 1735-0328.
226. Awotwe-Otoo, D., et al., *Evaluation of anticancer drug-loaded nanoparticle characteristics by nondestructive methodologies*. AAPS PharmSciTech, 2012. **13**(2): s. 611-622. doi: 10.1208/s12249-012-9782-7, ISSN (online): 1530-9932.
227. Budhian, A., S.J. Siegel, and K.I. Winey, *Controlling the in vitro release profiles for a system of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles*. International Journal of Pharmaceutics, 2008. **346**(1): s. 151-159. doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.06.011, ISSN (online): 0378-5173.
228. Chu, K.S., et al., *Nanoparticle drug loading as a design parameter to improve docetaxel pharmacokinetics and efficacy*. Biomaterials, 2013. **34**(33): s. 8424-8429. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.07.038, ISSN (online): 1878-5905.
229. Wang, J., et al., *Natural Non-Mulberry Silk Nanoparticles for Potential-Controlled Drug Release*. International Journal of Molecular Sciences, 2016. **17**(12): 2012. doi: 10.3390/ijms17122012, ISSN (online): 1422-0067.
230. Panyam, J., et al., *Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2004. **93**(7): s. 1804-14. doi: 10.1002/jps.20094, ISSN (online): 0022-3549.
231. Blasi, P., et al., *Plasticizing effect of water on poly(lactide-co-glycolide)*. Journal of Controlled Release, 2005. **108**(1): s. 1-9. doi: 10.1016/j.jconrel.2005.07.009, ISSN (online): 0168-3659.
232. Peppas, N.A. and B. Narasimhan, *Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems*. Journal of Controlled Release, 2014. **190**: s. 75-81. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.06.041, ISSN (online): 0168-3659.

233. Fu, Y. and W. Kao, *Drug Release Kinetics and Transport Mechanisms of Non-degradable and Degradable Polymeric Delivery Systems*. Expert opinion on drug delivery, 2010. 7: s. 429-444. doi: 10.1517/17425241003602259, ISSN (online): 1742-5247
234. Serajuddin, A.T.M. and D. Mufson, *pH-Solubility Profiles of Organic Bases and Their Hydrochloride Salts*. Pharmaceutical Research, 1985. 2(2): s. 65-68. doi: 10.1023/A:1016382426347, ISSN (online): 1573-904X.
235. Moraes Moreira Carraro, T.C., et al., *Assessment of in vitro antifungal efficacy and in vivo toxicity of Amphotericin B-loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles*. Journal de Mycologie Médicale, 2017. 27(4): s. 519-529. doi: 10.1016/j.mycmed.2017.07.004, ISSN (online): 1156-5233.